

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y
Bromatología**



ELABORACIÓN DE QUESO DE MURCIA AL VINO CON CUAJO NATURAL EN PASTA

*Memoria presentada por Eduardo Ferrandini Banchemo para optar
al grado de Doctor*

Murcia, Abril de 2006

*Situado en alguna nebulosa lejana
hago lo que hago, para que
el universal equilibrio de que soy parte
no pierda el equilibrio.*

Del libro Voces, 1965, Antonio Porchia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco desde lo más profundo de mi corazón y sinceramente:

A mis directores de Tesis: Dra. María Belén López Morales por su paciencia y dedicación con mi tesis, conocimientos adquiridos, apoyo, amistad y confianza que me transmite, ayudarme a mejorar en muchos sentidos pero el que más, profesionalmente y al Dr. Manuel Castillo Zambudio por ayudarme a comprender cómo se mejora lo que ya está bien, colaborando de manera inestimable y permitirme participar en los trabajos de investigación que lleva a cabo conjuntamente con el profesor Payne en la Universidad de Kentucky en los Estados Unidos.

Al profesor José Laencina Sánchez, por aceptarme tal cual soy, su amistad, buenos consejos, colaboración y abrirme las puertas de par en par a la Ciencia y Tecnología de los Alimentos que tantas satisfacciones me brinda.

A todos mis compañeros del Área de Tecnología de Alimentos: María Dolores Fernández Garrido, Sancho Bañón Arias, José María Ros García, Daniel Álvarez Álvarez, Miguel Moliner, José María López Roca, Encarna Gómez Plaza, Fulgencio Marín Iniesta, Gema Nieto Martínez, Antonio Vicente, Eva, Belén y compañeros del grupo del vino, por compartir espacios y muchos momentos durante nuestras tareas comunes, por aceptarme y quererme.

A todos mis compañeros de Departamento del Área de Nutrición y Bromatología, por su buena predisposición, colaboración y actitud hacia mí, en todos los momentos que necesité compartir algo con cada uno de ellos.

A Adolfo Falagán y Antonio Luna del Consejo Regulador de las Denominaciones de Origen del Queso de Murcia y Queso de Murcia al Vino por su grata e incondicional colaboración.

Al Director de la Consejería de Sanidad y Consumo de la Región de Murcia Blas Marsilla y a su personal técnico del Laboratorio por la inmensa ayuda prestada a este trabajo.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología, por el Proyecto AGL2000-1029-C03-02 que permitió económicamente realizar este trabajo de investigación.

A la Dra. Esther Sendra Nadal y Francisco Javier García de la Universidad Miguel Hernández por ayudarme a dar mis primeros pasos y a enseñarme a trabajar en texturometría instrumental.

A los profesores Antonio Bernabé y Antonio Rouco por el apoyo, guía y afecto que me brindan.

A Juan Carlos Martínez Robles, por enseñarme tantas veces a elaborar el Queso de Murcia al Vino, su ilimitada amistad y compartir gratos momentos familiares.

A Carlitos Jodar y a mis amigos del grupo Dumbo por ayudarme de forma rápida, eficaz y alegre a resolver mis inconvenientes informáticos.

A Cari y Carmina por mantenerme limpio, ordenado, respirable y lleno de buenas fragancias el lugar donde paso tantas horas durante el día.

A la abuela Patrocinio, mis suegros, mi esposa Alejandra, mis hijos Griselda, Mariana y Ariel por cuidarme, quererme y mimarme sin límites y sin esperar algo a cambio.

A mis amigos Antonio Bernal y Frank Jolley por hacerme sentir bien y por sus sanas amistades.

A todos aquellos y aquello que olvido de mencionar y que me ayudaron para llegar hasta aquí y ahora.

A mi Ángel de la guarda por su guía y protección, Sor Eusebia Palomino Yenes, por los dones recibidos, pero por sobre todo a Dios, que hace posible todo lo que me ocurre, permitiéndome percibir un mundo mágico donde todo es bueno, sencillo, lógico, y posible cuando el amor se aplica a cada una de las cosas que hacemos, generando lo que siento y lo que yo soy.

*A mi esposa Alejandra y
a mis hijos, por estar siempre a mi lado.*

RESUMEN

En las últimas décadas la dificultad de encontrar en el comercio cuajos naturales en pasta de cordero, así como los inconvenientes legales causados por la normativa que regula sus contenidos microbiológicos ha facilitado que las industrias queseras recurran a cuajos y coagulantes lácteos comerciales estandares con la consiguiente pérdida de sabores tradicionales en una gran variedad de quesos que se logran con los cuajos en pasta.

El primer objetivo de este estudio, consiste en caracterizar cuatro diferentes cuajos en pasta de cordero elaborados siguiendo distintos procedimientos de fabricación a partir de abomasos de corderos lechales llenos y vacíos de leche, a los que posteriormente, se les aplica distintas tecnologías con el objetivo de conservarlos y estudiar su viabilidad práctica y comercial.

En segundo término y una vez seleccionado el cuajo en pasta idóneo que combina una actividad coagulante y lipolítica adecuada, se procede a su empleo en la elaboración de Queso de Murcia al vino, comparándolo con aquellos obtenidos con cuajo líquido de ternera, que es el que habitualmente se utiliza para su obtención industrial.

Por último, se procede a la caracterización de los quesos experimentales mediante el análisis fisicoquímico, microbiológico, reológico y sensorial para determinar el efecto que produce este tipo de cuajo en pasta de cordero, sobre los quesos de Murcia al Vino y poder compararlos con los elaborados siguiendo la técnica habitual.

Se demuestra que los quesos obtenidos con el cuajo natural en pasta de cordero son diferentes a los habitualmente fabricados, principalmente por alcanzar un determinado grado de madurez en un tiempo menor, reflejado en la textura, manifestar una actividad proteolítica y lipolítica más intensas causantes de la formación de sabores diferentes a los habitualmente obtenidos, principalmente algo amargos y picantes.

Los resultados del análisis sensorial del panel de cata muestran que, si bien estos quesos se diferencian de los que habitualmente se obtienen mediante el uso de cuajo comercial, ofrecen una alternativa válida y novedosa al sector quesero de la Región de Murcia.

SUMMARY

Since last decades it is so difficult to obtain lamb rennet pastes because they are generally not available and also new rules make them be out of law specially microbial levels. It led manufacturers to get others kind of rennets or coagulants. Although they can obtain cheaper rennets easily what they lost was one of the most important things: the natural, tipycal traditional flavour of the cheese.

The main objective of this study is the characterization of four lamb rennet pastes obtained following different sort of manufactures. This consists in treating two groups of abomasas ones full and the other ones empty of milk before the slaughter. After that these two groups of abomasas are treated with different technics so that they can be employed lately without any problem by combining adequate renneting and lipase activity. After one of them is chosen it is employed to manufacture Queso de Murcia al Vino (Murcian wine cheese) to compare with that obtained from kid liquid rennet.

Secondly, several kind of analysis are made on the cheeses in order to determine its characteristics and the differences between them.

As a result of this investigation we found that it exists many differences between the two types of cheeses. For example those cheeses made with rennet paste reached an adequate grade of maturity before those made with kid liquid rennet. Also we determined higher proteolysis and lipolysis activities values in those made with natural lamb rennet paste. In addition the cheeses obtained using rennet paste had a piquant and little bitter taste which was different to those made with commercial rennet.

Finally, the sensory analysis gave a so good score for the cheese manufactured with rennet paste. It means that this kind of lamb rennet paste can be employed in the cheese making industrial sector as a good new alternative one.

Resumen.....	I
Summary.....	II
Índice general.....	III
Índice de tablas.....	VII
Índice de figuras.....	X
Abreviaturas.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. PRODUCCIÓN GANADERA CAPRINA.....	3
I.2. LECHE DE CABRA.....	5
I.2.1. Aspectos saludables de la leche de cabra.....	7
I.2.2. Producción y composición fisicoquímica de la leche de cabra Murciano-Granadina.....	8
I.3. QUESO DE MURCIA AL VINO.....	11
I.3.1. Antecedentes.....	11
I.3.2. Etapas de fabricación.....	12
I.3.3. Maduración del queso de Murcia al Vino.....	14
I.3.4. Comercialización.....	16
I.3.5. Empleo de cuajo comercial y en pasta de cordero en la elaboración de queso de Murcia al Vino.....	17
I.3.5.1. <u>Cuajos y coagulantes lácteos</u>.....	18
I.3.5.2. <u>Cuajos en pasta</u>.....	21
I.4. INFLUENCIA DEL TIPO DE CUAJO EMPLEADO EN LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL QUESO.....	24
I.4.1. Proteolisis.....	24
I.4.2. Lipólisis.....	26
II. OBJETIVOS.....	31
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
III.1 ELABORACIÓN DE CUAJOS NATURALES.....	37
III.2. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS.....	41
III.2.1. Leche de cabra Murciano-Granadina.....	41

1) <i>Determinación de pH</i>	41
2) <i>Determinación de la concentración de grasa</i>	41
3) <i>Determinación del extracto seco total</i>	42
4) <i>Determinación de la concentración de proteína</i>	42
5) <i>Determinación de la concentración de ácidos grasos totales</i>	42
6) <i>Análisis microbiológicos</i>	44
III.2.2. Cuajo en pasta de cordero	50
III.2.2.1. <u>Actividad coagulante y enzimática</u>	50
III.2.2.1.1. <i>Determinación de la actividad coagulante</i>	50
III.2.2.1.2. <i>Actividad enzimática</i>	51
III.2.2.2. <u>Aptitud a la coagulación</u>	51
III.2.2.3. <u>Parámetros microbiológicos</u>	57
III.3. ELABORACIÓN DE QUESO DE MURCIA AL VINO	57
III.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS QUESOS DE MURCIA AL VINO	61
III.4.1. Parámetros físico-químicos	61
1) <i>Determinación del pH</i>	62
2) <i>Determinación del extracto seco total</i>	62
3) <i>Determinación de cloruro sódico</i>	62
4) <i>Determinación de proteína</i>	63
5) <i>Determinación de grasa</i>	63
6) <i>Determinación de la actividad de agua</i>	64
7) <i>Determinación de las fracciones nitrogenadas</i>	64
8) <i>Determinación de los ácidos grasos totales</i>	66
9) <i>Determinación de los ácidos grasos libres</i>	66
III.4.2. Parámetros microbiológicos	68
III.4.3. Características organolépticas	68
III.4.3.1. <u>Textura</u>	68
III.4.3.1.1. <i>Preparación de las muestras</i>	68
III.4.3.1.2. <i>Prueba de compresión uniaxial</i>	69
III.4.3.1.3. <i>Prueba de relajación del esfuerzo</i>	69

III.4.3.2. <u>Análisis sensorial</u>	71
III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	73
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
IV.1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS	77
IV.1.1. Leche de Cabra Murciano-Granadina	77
1) <i>Parámetros fisicoquímicos</i>	77
2) <i>Ácidos grasos totales</i>	79
3) <i>Análisis microbiológicos</i>	83
IV.1.2. Cuajo en pasta de cordero	86
IV.1.2.1. <u>Actividad coagulante y enzimática</u>	86
IV.1.2.1.1. <i>Actividad coagulante</i>	86
IV.1.2.1.2. <i>Actividad enzimática</i>	94
IV.1.2.2. <u>Aptitud a la coagulación</u>	97
IV.1.2.3. <u>Selección de cuajo en pasta</u>	100
IV.1.2.4. <u>Parámetros microbiológicos</u>	102
IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS QUESOS DE MURCIA AL VINO	105
IV.2.1. Parámetros físico-químicos	105
1) <i>pH</i>	105
2) <i>Extracto seco total</i>	108
3) <i>Cloruro sódico</i>	109
4) <i>Proteína</i>	114
5) <i>Materia grasa</i>	115
6) <i>Actividad de agua</i>	117
7) <i>Fracciones nitrogenadas</i>	117
8) <i>Ácidos grasos totales</i>	125
9) <i>Ácidos grasos libres</i>	131
IV.2.2. Parámetros microbiológicos	143
IV.2.3. Características organolépticas	150
IV.2.3.1. <u>Textura</u>	150
IV.2.3.2. <u>Análisis sensorial</u>	157

V. CONCLUSIONES.....	163
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	169

Tabla 1. Producción mundial de cabra y otros rumiantes por décadas.....	4
Tabla 2. Producción de leche de cabra y de otros rumiantes en la cuenca mediterránea durante 1988.....	5
Tabla 3. Producción mundial de leche de algunos animales rumiantes por décadas.....	6
Tabla 4. Evolución de la producción de leche de vaca y cabra en la Región de Murcia.....	9
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos básicos para leche de cabra M-G.....	10
Tabla 6. Agentes del afinado de los quesos y su acción en diferentes procesos catabólicos.....	15
Tabla 7. Producción y comercialización del Queso de Murcia al Vino durante el año 2004.....	17
Tabla 8. Características de los cuajos y coagulantes lácteos.....	20
Tabla 9. Enzimas presentes en el cuajo líquido y en pasta.....	22
Tabla 10. Nivel de detección sensorial para distintos AGL.....	28
Tabla 11. Ácidos grasos libres determinados en los Quesos de Murcia al Vino.....	67
Tabla 12. Ficha de cata utilizada para el análisis sensorial de los quesos de Murcia al Vino.....	72
Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos en leche de cabra M-G.....	78
Tabla 14. Perfil de AGT en leche de cabra M-G ($\mu\text{Mol kg}^{-1}\text{leche}$).....	80
Tabla 15. Comparación del perfil de AGT (%) en leche de cabra.....	82
Tabla 16. Parámetros microbiológicos de las muestras de leche de cabra M-G, utilizadas para la elaboración de los quesos ($\log \text{ufc mL}^{-1}$).....	83
Tabla 17. Efecto de las variables independientes lote, réplica y tipo de enzima sobre la actividad coagulante (días de conservación como covariable).....	86
Tabla 18. Efecto de las variables independientes tipo de enzima y lote sobre la actividad coagulante (Días de conservación como covariable).....	87
Tabla 19. Efecto de las variables independientes lote, réplica y tipo de enzima sobre la actividad proteolítica (días de conservación como covariable).....	94

Tabla 20. Variación de la actividad proteolítica de los distintos tipos de enzima en relación con los días de conservación.....	95
Tabla 21. Valores medios de actividad lipasa de los diferentes cuajos en pasta.	97
Tabla 22. Análisis de varianza y del estadístico F, para las variables dependientes (Temperatura de la leche como covariable).....	98
Tabla 23. Efecto de las variables réplica y tipo de enzima sobre las variables dependientes $D_{m\acute{a}x}$, R_{cut} y $T_{m\acute{a}x}$	99
Tabla 24. Valores medios de los parámetros de caracterización tecnológica de los diferentes tipos de enzima.....	100
Tabla 25. Parámetros microbiológicos en origen de los cuajos en pasta (log ufc g^{-1}).....	102
Tabla 26. Parámetros microbiológicos de los extractos acuosos de los cuajos en pasta (log ufc mL^{-1}).....	104
Tabla 27. Evolución de los parámetros fisicoquímicos de los quesos durante la maduración (días).....	106
Tabla 28. Distribución del NaCl en las fases acuosa y sólida en los quesos, durante la maduración.....	111
Tabla 29. Contenido proteico y graso en el extracto seco de los quesos durante la maduración.....	116
Tabla 30. Evolución de las fracciones de nitrógeno soluble de los diferentes quesos a lo largo del período de maduración (% del Nitrógeno Total).....	120
Tabla 31. Evolución de los AGT según tipo de cuajo empleado (mg AGT kg^{-1} materia grasa).....	125
Tabla 32. AGT según grado de saturación en los quesos elaborados (%).....	129
Tabla 33. AGT agrupados según longitud de la cadena carbonada en los quesos elaborados (%).....	130
Tabla 34. Valores de AGL ($\mu Mol kg^{-1}$ queso) en los quesos elaborados durante la maduración.....	132
Tabla 35. Evolución de los grupos de AGL (%) en los quesos elaborados durante la maduración.....	141
Tabla 36. Evolución de los parámetros microbiológicos en el queso (log ufc g^{-1}).....	144
Tabla 37. Prueba de compresión uniaxial de los Quesos de Murcia al Vino	151

elaborados.....	
Tabla 38. Valores de los parámetros de relajación “r” y “e” para los quesos, a los 45 y 60 días de maduración.....	155
Tabla 39. Características sensoriales de los quesos analizados por el panel de cata.....	158
Tabla 40. Clasificación de los quesos según el análisis sensorial.....	160

Figura 1. Diagrama de flujo de la elaboración de Queso de Murcia al Vino...	13
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración y análisis realizados.....	38
Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de cuajos de cordero en pasta.....	40
Figura 4. Colonias de enterobacterias en agar VRBG.....	46
Figura 5. Colonias características de coliformes.....	46
Figura 6. Colonias características de <i>Salmonella</i> spp. en agar XLD.....	47
Figura 7. Colonias con halo, típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> , en agar Baird Parker.....	48
Figura 8. Colonias negras de <i>C. Sulfito-reductores</i> en agar SPS.....	48
Figura 9. Colonias de <i>L. monocytogenes</i> en agar Palcam.....	49
Figura 10. Colonias de levaduras desarrolladas en medio agar OGYE suplementado.....	50
Figura 11. Perfil de dispersión durante la coagulación de leche de cabra y su primera y segunda derivadas según CASTILLO <i>et al.</i> (2004a).....	52
Figura 12. Detalle de la cuba de coagulación y sensor CoAguLite 4 A (CASTILLO, 2001).....	54
Figura 13. Equipo de medición de dispersión NIR. CASTILLO, (2001).....	55
Figura 14. Curva característica de la dispersión de la luz en función del tiempo y parámetros derivados. R, perfil de dispersión; R', primera derivada de R.....	57
Figura 15. Cuba experimental utilizada para elaborar el Queso de Murcia al Vino.....	58
Figura 16. Vista general de la cuba de cuajado y del equipo de adquisición de datos <i>NIR</i>	59
Figura 17. Detalle de las sondas de reflectancia difusa y termométrica conectadas a la cuba de cuajado.....	59
Figura 18. Gráfica característica del esfuerzo (σ) en función de la deformación (ϵ) de un ensayo de compresión uniaxial.....	69
Figura 19. Representación del esfuerzo de un material sólido (S), líquido (L)	

y viscoelástico (VE), en función del tiempo después de la aplicación súbita de una deformación.....	70
Figura 20. Variación de la actividad coagulante a lo largo del período de conservación, de los diferentes lotes del cuajo en pasta AVS.....	89
Figura 21. Variación de la actividad coagulante a lo largo del período de conservación, de los diferentes lotes del cuajo en pasta ALF.....	91
Figura 22. Variación de la actividad coagulante a lo largo del período de conservación, de los diferentes lotes del cuajo en pasta AVC.....	92
Figura 23. Variación de la actividad coagulante a lo largo del período de conservación, de los diferentes lotes del cuajo en pasta ALS.....	93
Figura 24. Perfil de reflectancia difusa.....	98

a_w	Actividad de agua
ACRIMUR	Asociación Española de Criadores de la Cabra Murciano-Granadina
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos grasos libres
AGROMUR	Cooperativa que integra agricultores y ganaderos de Murcia y provincias limítrofes
AGT	Ácidos grasos totales
AL	Abomasos llenos
ALF	Cuajo en pasta elaborado con abomasos llenos y frescos
ALS	Cuajo en pasta elaborado con abomasos llenos y secados en estufa
ANOVA	Análisis de la varianza
AQUEMUR	Asociación de Fabricantes de Queso de la Comunidad de Murcia
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
AV	Abomasos vacíos
AVC	Cuajo en pasta elaborado con abomasos vacíos y congelados
AVS	Cuajo en pasta elaborado con abomasos vacíos y secados en cámara
B.O.E.	Boletín Oficial del Estado
B.O.R.M.	Boletín Oficial de la Región de Murcia
BAL	Bacterias acidolácticas
BSI	British Standards Institution
CE	Enzyme Commission (Comisión de Enzimas IUPAC-IUBMB)
CIHEAM	Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos
COAGACART	Cooperativa Agrícola Ganadera Cartagena
C-terminal	Grupo ácido Terminal
C₂	Ácido acético
C₃	Ácido propiónico
C₄	Ácido butírico
iC₄	Ácido isobutírico
C₅	Ácido valérico
iC₅	Ácido isovalérico

C₆	Ácido caproico
C₇	Ácido enántico
C₈	Ácido caprílico
C₉	Ácido pelargónico
C₁₀	Ácido cáprico
C₁₁	Ácido undecanoico
C₁₂	Ácido láurico
C₁₃	Ácido tridecanoico
C₁₄	Ácido mirístico
C_{14:1}	Ácido miristoleico
C₁₅	Ácido pentadecanoico
C₁₆	Ácido palmítico
C_{16:1}	Ácido palmitoleico
C₁₈	Ácido esteárico
C_{18:1}	Ácido oleico
C_{18:2}	Ácido linoleico
C_{18:3}	Ácido linolénico
d	Días de maduración
D.O.	Denominación de origen
Da	Dalton
DD.OO	Denominaciones de Origen
D_{máx}	Máximo de la primera derivada de la curva de reflectancia
EEB	Encefalitis Espongiforme Bovina
EM	Ester metílico
EPG	Esterasa Pregástrica
ES	Extracto seco total
ETSN 70%	Nitrógeno soluble en etanol al 70 %
ETSN	Nitrógeno soluble en etanol
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

Abreviaturas

FENIL	Federación Nacional de la Industria Lechera
FIL-IDF	Federation Internationale De Laiterie - International Dairy Federation
g	Gramo
G	Grasa butirosa
GL	Grados de libertad
h	Horas
HR	Humedad relativa
ICARDA	Centro Internacional para la Investigación de la Agricultura en Areas Aridas
IGA	Asociación Internacional de la Cabra
ILRI	Instituto Internacional para la Investigación del Ganado
IMCU	Unidades internacionales de coagulación de leche
J	Julios o Joules (unidad de trabajo o energía)
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
LED	Diodo de emisión de luz
LPG	Lipasa pregástrica
LPL	Enzima natural de la leche lipoproteinlipasa
LU	Unidad lipasa
Lys	Lisina
m	Metro (unidad S.I. de longitud)
mA	Miliamperios
mL	Mililitros
mMol	Milimoles
mV	Milivoltios

M	Molar (número de moles L ⁻¹)
Met	Metionina
Mg	miligramo
Min	Minutos
Mm	Milímetros
M-G	Murciano-Granadina (Raza caprina)
nm	Nanometros
N	Newton (unidad S.I. de fuerza)
NIR	Infrarrojo cercano (Near infra-red)
NNP	Nitrógeno no proteico
NS	Nitrógeno soluble
NT	Nitrógeno total
N-terminal	Grupo amino terminal
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón (mg/L)
<i>p/v</i>	Relación: peso/volumen
P	Proteína total
Pa	Pascal (unidad S.I. de presión)
PGE	Lipasa pregástrica esterasa
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Proteol.	Proteolítica
PTA	Acido fosfotúngstico
PTASN	Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico
PTASN 5%	Fracción nitrogenada soluble en ácido fosfotúngstico al 5%
R	Ratio de dispersión
R'	Primera derivada de la ratio de dispersión
R_{cut}	Ratio de reflectancia en el tiempo de corte
R_{max}	Ratio de reflectancia a tiempo T _{max}
RU	Rennet Unit (unidad de actividad coagulante)

Ser	Serina
SNpH_{4.4}	Nitrógeno soluble a pH 4.4
SNpH_{4.6}	Nitrógeno soluble a pH 4.6
SNTCA	Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético
t_{cut}	Tiempo desde la adición de la enzima hasta el corte visual
temp.	Temperatura
t_{max}	Tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de dispersión
TCA	Acido tricloroacético
TCASN 12%	Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12 %
TCASN 24%	Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 24 %
TPA	Análisis del perfil de textura
Tyr	Tirosina
U	Unidad de actividad lipasa
V	Voltios
Val	Valina
W	Trabajo necesario por unidad de volumen (J m ⁻³)
W_f	Trabajo de fractura (J m ⁻³)
WSN	Nitrógeno soluble en agua
α-caseína	Caseína alfa
α_{S1}-CN	α _{S1} -caseína
β-caseína ,	Caseína beta
β-CN	
ε	Deformación longitudinal unitaria (adimensional)
ε_f	Deformación de fractura (adimensional)
ε_H	Deformación de Hencky
κ-caseína	Caseína kappa

μm	Micrometros
μMol	Micro moles
σ	Esfuerzo (Pa)
σ_f	Esfuerzo de fractura (Pa)
Ω	Ohmios
%	Por ciento
\geq	Mayor o igual
\sim	Aproximadamente
"	Pulgadas
<	Menor
>	Mayor
$^{\circ}\text{Bé}$	Grado Baumé
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado

I. 1. PRODUCCIÓN GANADERA CAPRINA

Históricamente, la cuenca Mediterránea se ha caracterizado por ser eminentemente agraria y artesana donde la cabra ha acompañado a los pastores durante siglos. Gran parte de la población Mediterránea se ha dedicado tradicionalmente a las actividades comerciales, entre ellas, la producción de leche, habitualmente de cabra, destinada al consumo local. La leche de cabra se utilizaba directamente para consumo humano y los excedentes se transformaban en queso fresco. De hecho, la producción regional de queso forma parte de la herencia cultural dejada por los romanos en la Península Ibérica, que los utilizaban como moneda de cambio en sus transacciones comerciales (FREITAS *et al.*, 2000). Por el contrario, la explotación de la vaca y sus productos derivados es un hecho mucho más reciente que data de mediados del siglo pasado.

La cabra, junto a la oveja, es el animal doméstico más emblemático de la zona mediterránea. Su excelente adaptación al clima mediterráneo, fuertemente caluroso y seco, le otorga importantes ventajas zootécnicas, en comparación con otras especies domésticas. Según MORAND-FEHR *et al.* (2004), la cabaña caprina mundial aumentó aproximadamente un 58% durante los últimos veinte años, mientras que las cabañas vacuna y ovina crecieron sólo un 22,5 y 9,6% respectivamente (**Tabla 1**). Según dichos autores, se aprecia un descenso del número de cabezas de ganado ovino y bovino en los países con mayores recursos que probablemente se asocia a un incremento del ganado

caprino, como consecuencia de la mayor aceptación de la carne y leche de esta especie en el mercado de estos países.

Tabla 1. Producción mundial de cabra y otros rumiantes por décadas

ESPECIE	AÑO ^a		
	1980	1990	2000
CABRA			
Países con ingresos altos	8 (1,7)	9 (1,6)	9 (1,3)
Países con ingresos medios	109 (24,2)	125 (21,9)	136 (19,1)
Países con ingresos bajos	334 (74,1)	436 (76,5)	566 (79,6)
Total	451	570	711
OVEJA			
Países con ingresos altos	290 (30,8)	350 (33,2)	278 (27,0)
Países con ingresos medios	344 (36,6)	364 (34,5)	350 (34,0)
Países con ingresos bajos	306 (32,6)	341 (32,3)	402 (39,0)
Total	940	1055	1030
VACA			
Países con ingresos altos	258 (23,6)	239 (20,4)	238 (17,8)
Países con ingresos medios	385 (35,2)	420 (35,8)	491 (36,6)
Países con ingresos bajos	451 (41,2)	515 (43,8)	611 (45,6)
Total	1094	1174	1340

MORAND-FEHR *et al.* (2004). ^aProducción expresada en millones de cabezas; cantidad entre paréntesis, porcentaje sobre la producción total

MORAND-FEHR *et al.* (2004) atribuyen el crecimiento actual de la producción de ganado caprino a los siguientes factores:

- Mayor capacidad de adaptación al medio ambiente.
- Mejora de las condiciones de explotación agrícolas en los países en desarrollo.
- La persistencia de culturas comunitarias, donde la economía de mercado es limitada, y el intercambio de animales es la norma.
- La imagen ecológica de las granjas caprinas y sus productos elaborados en los países más desarrollados.

Además de los factores manifestados por MORAND-FEHR *et al.* (2004), otras causas del crecimiento de la producción caprina son:

- Los nuevos conocimientos científicos que demuestran el beneficio nutricional del consumo de leche de cabra.
- Cierta rechazo hacia el consumo de leche de vaca por algunos sectores de la población europea como consecuencia de los dos primeros casos mortales de Encefalitis Espongiforme Bovina (EEB) en Inglaterra en 1995 y que hasta la actualidad se ha cobrado 27 vidas (BRUN *et al.*, 2005).

I. 2. LECHE DE CABRA

En relación con la producción de leche de cabra y otros rumiantes, y tal como recoge BOYAZOGLU *et al.* (2001), los datos disponibles más recientes, que incluyen a la vez a todos los países del arco mediterráneo, corresponden al año 1988 (**Tabla 2**), donde se observa que España es el cuarto país productor de leche de cabra de la zona mediterránea, por detrás de Francia, Grecia e Irán.

Tabla 2. Producción de leche de cabra y de otros rumiantes en la cuenca mediterránea durante 1988

Países	Producción de leche (millones de toneladas)			
	Vaca	Cabra	Oveja	Búfalo
África				
Argelia	984	145	180	-
Egipto	1.350	15	93	2.022
Libia	100	15	40	-
Marruecos	1.010	35	27	-
Túnez	670	12	17	-
Asia				
Chipre	136	26	20	-
Israel	1.093	14	19	-
Líbano	200	37	34	-
Siria	1.118	80	580	1
Turquía	9.000	249	826	87
Europa				
Albania	721	69	70	7
Francia	24.500	492	243	-
Grecia	750	460	670	1
Italia	10.876	150	759	144
Malta	41	3	2	-
Portugal	1.750	42	97	-
España	6.100	350	300	-
Eslovenia	568	-	-	-
Croacia	285	-	6	-
Yugoslavia	2.081	-	46	-
Para-Mediterráneos				
Bosnia	202	-	3	-
Bulgaria	1.200	162	110	12
Irán	4.075	398	463	169
Irak	315	53	155	21
Jordania	123	19	34	-
Macedonia	139	-	48	-
Rumania	4.970	-	343	-
Todo el mundo	470.172	12.374	8.272	59.347
Porcentaje sobre la producción mundial	15,8	22,8	62,7	4,2

BOYAZOGLU *et al.* (2001)

En la **Tabla 3** se especifica la tendencia de la producción lechera mundial en relación con los diferentes estratos sociales. Si hacemos referencia exclusiva a la leche de cabra, se observa que la producción mundial ha aumentado un 67% en los últimos 20 años, lo que sugiere un mayor interés del sector productivo caprino por la producción de leche, si consideramos que el número de cabezas de ganado caprino sólo ha ascendido un 58% durante dicho período. El incremento de la producción láctea caprina es más acusado en los países con menores recursos *per capita*. Para la leche de oveja la tendencia también es alcista aunque se observa una depresión en los países con ingresos intermedios en la última década.

Tabla 3. Producción mundial de leche de algunos animales rumiantes por décadas

ESPECIE	AÑO ^a		
	1980	1990	2000
CABRA			
Países con ingresos altos	1,07 (15,0)	1,03 (11,3)	1,07 (9,0)
Países con ingresos medios	2,48 (34,7)	2,36 (25,8)	2,78 (23,3)
Países con ingresos bajos	3,59 (50,3)	5,76 (62,9)	8,06 (67,7)
Total	7,14	9,15	11,91
OVEJA			
Países con ingresos altos	1,06 (17,1)	1,35 (18,8)	1,54 (21,7)
Países con ingresos medios	3,61 (58,1)	3,89 (54,0)	3,38 (47,5)
Países con ingresos bajos	1,54 (24,8)	1,96 (27,2)	2,19 (30,8)
Total	6,21	7,20	7,11
VACA			
Países con ingresos altos	223 (67,0)	234 (63,1)	249 (51,1)
Países con ingresos medios	84 (25,2)	94 (25,3)	168 (34,5)
Países con ingresos bajos	26 (7,8)	43 (11,6)	70 (14,4)
Total	333	371	487

MORAND-FEHR *et al.* (2004). ^a Producción de leche expresada en millones de toneladas; cantidad entre paréntesis, porcentaje sobre la producción total

De acuerdo con la **Tabla 3**, el crecimiento de la producción de leche de cabra durante las últimas dos décadas en los países con bajos ingresos supera al de la leche de vaca y oveja en un 21 y 52% respectivamente. Por este motivo se puede ser optimista sobre el futuro de este sector, por lo que cualquier esfuerzo orientado a fomentar su producción y/o la investigación científica en este campo resultaría muy beneficioso tanto para el sector como para la calidad de la leche de cabra y sus productos.

A pesar de la creciente importancia de la explotación ganadera caprina, las investigaciones realizadas a escala mundial en ganado caprino se mantienen menos desarrolladas que en vacuno. En el año 2000 los países con menor renta *per capita*, -que aportan el 81% de la producción caprina mundial-, produjeron tan sólo un 33% del total

de publicaciones científicas en esta materia. Por el contrario, los países ricos -que representan el 1% de la cabaña caprina mundial-, publicaron el 46% de los trabajos científicos sobre ganado caprino. En general, la calidad científica de los trabajos de investigación en caprino es muy inconstante, si bien, dicha calidad mejora continuamente (MORAND-FEHR *et al.*, 2004). No obstante, es de suma importancia la implicación de los científicos en el desarrollo de este sector junto con la colaboración de organizaciones internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Centro Internacional para la Investigación de la Agricultura en Áreas Áridas (ICARDA), Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), Instituto Internacional para la Investigación del Ganado (ILRI), Asociación Internacional de la Cabra (IGA), y de las autoridades locales, especialmente en aquellas regiones de marcada tradición en producción caprina o donde exista la posibilidad de iniciar el desarrollo de dicho sector ganadero. De hecho, el desarrollo y explotación del ganado caprino en áreas desfavorecidas es de gran interés social. Uno de los ejemplos en este sentido es el pastoreo controlado de esta especie zootécnica, que no presenta riesgos para el equilibrio ecológico y contribuye a la disminución de las malezas que generan con frecuencia incendios devastadores durante el verano (VACAS FERNÁNDEZ, 2003).

I. 2. 1. Aspectos saludables de la leche de cabra

Uno de los factores mas decisivos en el crecimiento de la producción y consumo de leche de cabra -en la Región de Murcia y en el resto del mundo- es el efecto beneficioso para la salud humana derivado del consumo de leche de cabra y sus elaborados, que ha sido plenamente reconocido por la comunidad científica internacional. La leche de cabra es menos alergénica (GUO *et al.*, 1998) y más digestible que la leche de vaca (JANDAL, 1996). La menor capacidad alergénica de la leche de cabra se debe a las diferencias genotípicas y fenotípicas que distinguen a las proteínas de vaca y cabra entre sí. En general, aquellos infantes y niños que exhiben reacciones alérgicas a la leche de vaca, toleran perfectamente la leche de cabra y sus derivados (McCULLOUGH, 2004). Esta ventaja inmunológica, fuertemente defendida por nutricionistas y pediatras ingleses, parece ser de suma importancia en la alimentación infantil principalmente hasta el primer año de vida. También se reconoce actualmente la mejor digestibilidad de la grasa de leche de cabra comparada con la de

vaca, probablemente como consecuencia de la diferencia en el tamaño del glóbulo graso que ambas leches presentan. No obstante, las causas reales de la gran digestibilidad de la grasa de leche de cabra deben ser mucho más complejas, puesto que la leche de vaca de consumo habitual es generalmente homogeneizada, por lo que contiene glóbulos grasos de dimensiones ciertamente reducidas. Otra ventaja interesante del consumo de la leche de cabra, en comparación con la de vaca, es el aumento de las ingesta de hierro –imprescindible para la síntesis del grupo hemo– y cobre –necesario para la movilización del hierro– como consecuencia de una mayor absorción de dichos minerales a nivel intestinal. Así, las personas con problemas de mala absorción, pueden mejorar su estado de salud mediante la incorporación de leche de cabra a la dieta (CAMPOS *et al.*, 2004). El consumo de leche de cabra también representa una alternativa a la leche materna en el tratamiento de niños con hipertreoninemia, mediante la inclusión en las fórmulas infantiles de suero de cabra en polvo con reducida fracción glicomacropéptido (SILVA *et al.*, 2004).

A pesar de la elevada y contrastada información existente sobre las propiedades nutritivas y saludables tan ventajosas para la población –en especial en niños– de la leche caprina y sus elaborados, se han publicado recientemente algunos estudios de autores franceses que señalan aspectos negativos sobre su consumo. A pesar que la frecuencia de estos inconvenientes es muy baja comparados con los de leche de vaca y derivados, cuando los síntomas aparecen, lo hacen de forma mucho más severa que en las alergias relacionadas con otros alimentos. Los síntomas que algunos pacientes padecen son prurito, edema, asma, y eventualmente, shock anafiláctico. LAMBLIN *et al.* (2001), estudian tres pacientes que tras ingerir quesos elaborados con leche de cabra u oveja, muestran reacciones alérgicas intensas acompañadas de un nivel elevado de inmunoglobulina E y sin embargo toleran los elaborados con leche de vaca. Para BIDAT *et al.* (2003), la aparición de casos de alergia en niños y adolescentes (edad: 15 meses-16 años) frente a la leche de cabra y oveja y sus elaborados en ausencia de problemas frente a leche de vaca y sus elaborados, es cada vez más frecuente.

I. 2. 2. Producción y composición fisicoquímica de la leche de cabra Murciano-Granadina

En la Región de Murcia destaca la explotación de la raza Murciano-Granadina (M-G) especialmente por su elevada producción láctea anual y por la excelente aptitud

tecnológica de su leche para la producción de diferentes variedades de queso (PÉREZ *et al.*, 1991; LÓPEZ *et al.*, 1999). La mayor parte de los animales se dedican a la producción de leche que se destina a la fabricación de queso u otros derivados lácteos. Esta raza caprina, mayoritaria en Murcia, es además la más importante de España, tanto en número de cabezas como en producción de leche (VACAS FERNÁNDEZ, 2003). La evolución de la producción de leche de cabra y vaca en la Región de Murcia durante el período 1995-2002 se recoge en la **Tabla 4**. Se observa que la producción de leche de cabra evoluciona en paralelo a la de vaca hasta el año 2002, año en que la producción de ambos tipos de leche alcanza un máximo histórico. Si la producción se considera en términos relativos al volumen diario de leche recogido, podemos concluir que la Región de Murcia es fundamentalmente productora de leche de cabra.

Tabla 4. Evolución de la producción de leche de vaca y cabra en la Región de Murcia

ESPECIE (miles de litros)	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
VACA	21.509	21.772	19.175	21.121	23.341	26.762	21.984	29.997
CABRA	21.125	18.164	17.089	19.788	20.933	22.005	16.909	23.506
TOTAL	42.634	39.936	36.264	40.909	44.274	48.767	38.893	53.503

Fuente: Centro Regional de Estadística dependiente de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia

En la **Tabla 5** se refleja la composición de la leche de cabra de esta especie, determinada por varios autores.

La comparación entre los valores medios para contenido graso (G), proteína (P) y extracto seco (ES) reportados por los distintos autores, permite comprobar una mejora en la composición química de la leche de cabra M-G en los últimos 25 años, con la excepción de lo publicado por JUÁREZ *et al.* (1989). Los valores más altos para G y ES corresponden a lo publicado por dichos autores, y para P, los determinados por FERRANDINI *et al.* (2003). El valor más bajo para G encontrado es 3,4%, para P 2,2% y para ES 13,1%.

En los diferentes continentes existen numerosas razas caprinas destinadas a la producción de leche. Si comparamos G entre las distintas razas caprinas de diferentes partes del mundo con los valores medios para leche de cabra M-G reflejadas en la **Tabla 5** y para un mismo año, observamos que G en leche de cabra M-G es superior en todos los casos, como se detalla a continuación: 5,1% en animales cruzados entre las

razas Barbari, Jamunapari, Beetal y Negra de Bengala (PRASAD *et al.*, 2002); 4,9% en la raza Tswana (AGANGA *et al.*, 2002); 4,3% para la raza Damascus (HADJIPANAYIOTOU, 1995); e inferior a 3,5% en las razas Alpina, Saanen, Verzasca, Orobica y Frisa (MORONI *et al.*, 2001).

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos básicos para leche de cabra M-G

AUTOR/ES	AÑO	% GRASA	% PROTEÍNA	% EXT. SECO
Marqués	1977	4,7	3,5	-
Juarez	1985	4,5	3,5	13,2
Juarez <i>et al.</i>	1989	6,6	3,6	15,7
Lacasa	1989	5,2	3,3	13,5
Pedauyé	1989	3,4	2,2	-
Falagán <i>et al.</i>	1991	5,2	3,3	-
Pérez <i>et al.</i>	1991	5,7	3,5	14,2
Lafuente <i>et al.</i>	1993	5,1	3,3	14,0
López <i>et al.</i>	1995	4,6	3,2	-
Castillo <i>et al.</i>	1998	6,3	3,3	13,7
Hellín <i>et al.</i>	1998	4,7	3,2	13,1
López <i>et al.</i>	1999	5,2	3,6	14,4
Contreras <i>et al.</i>	2001	5,6	3,8	14,8
Vacas Fernández	2003	5,4	3,6	14,5
Ferrandini <i>et al.</i>	2003	6,2	3,9	15,4

Por el contrario, en relación al contenido proteico encontramos valores superiores en: la raza Tswana 4,9% (AGANGA *et al.*, 2002); Nubian 4,2% (SUNG *et al.*, 1999); Damascus con un 4,1% (HADJIPANAYIOTOU, 1995); un valor similar de 3,7% en cabras cruzadas de las razas Barbari, Jamunapari, Beetal y Negra de Bengala (PRASAD *et al.*, 2002) y valores inferiores (<3,3% en las razas Alpina, Saanen, Verzasca, Orobica y Frisa según MORONI *et al.*, 2001).

Podemos concluir señalando la elevada productividad de la cabra adulta M-G, ya que muchos rebaños en Murcia, con un único ordeño diario y un parto al año, producen más de 600 kg de leche por lactación, con 5,4% GB, 3,6% PT y 14,5% ES (Consejo Regulador de las DD.OO. Queso de Murcia y Queso de Murcia al Vino, 2005).

Estas y otras evidencias confirman claramente el valor productivo de esta raza así como la excelente composición química de su leche y justifican su empleo para la producción de quesos con elevado valor añadido.

I. 3. QUESO DE MURCIA AL VINO

La importancia cuantitativa del sector caprino en la Región de Murcia, favorecida por las ventajas que reporta la explotación de una raza autóctona de excelentes características productivas ha justificado el auge de la industria quesera regional, que ha dado lugar a la obtención de dos Denominaciones de Origen: “Queso de Murcia” y “Queso de Murcia al Vino”. El “Queso de Murcia al Vino” se define como un queso graso, de pasta prensada, lavada y no cocida, que se comercializa a partir de los 45 días después de su elaboración y de 30 días en las piezas pequeñas. Es un queso de forma cilíndrica, con bordes rectos pero no vivos y lateral ligeramente redondeado. Su corteza es lisa, sin grabados, muy ligera y está lavada con vino tinto doble pasta que le confiere un color granate-rojizo característico. La masa es compacta al corte, la textura es cremosa y elástica con pocos y pequeños ojos, su sabor es agradablemente ácido, poco salado y su aroma suave (Consejo Regulador de las DD.OO. Queso de Murcia y Queso de Murcia al Vino, 2005).

I. 3. 1. Antecedentes

La creciente producción de leche de cabra en la Región de Murcia, la importancia cualitativa de la presencia de una raza autóctona como la cabra M-G, la mayor concienciación por parte del consumidor de los aspectos saludables del consumo de leche de cabra y el inicio de las exportaciones de leche fuera de los límites regionales han estimulado, sin duda alguna, la participación de los organismos autonómicos en el crecimiento de este sector. Es importante destacar el papel asumido por la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, que consciente de las inquietudes, problemas e indefensión de los ganaderos de ganado caprino de la Región de Murcia, genera en 1983 líneas de actuación dentro del Plan para el Fomento de la Ganadería Extensiva que favorecen una mejor comercialización de la leche, la tipificación de un queso puro de cabra específico de la Región y la instalación de una quesería piloto experimental (LÓPEZ, 1993). Dicha autora, menciona una vez más el papel preponderante que tiene esta Consejería al concretar en 1988 un convenio con la Asociación de Fomento de Quesos Artesanos para la creación de un queso puro de cabra que identificara a la Región de Murcia y que además tuviera una proyección en el

mercado nacional. Como resultado de este proyecto y tras una exhaustiva cata, el Queso de Murcia al Vino es elegido entre tres alternativas diferentes de queso y es protegido mediante denominación de producto de calidad desde 1990.

Este proyecto tan ambicioso, que culmina con la aparición de nuevos tipos de quesos de gran aceptación por parte de la población local, comunitaria e internacional, es coronado con otras actuaciones muy importantes para el sector caprino en la Región de Murcia, cuyos beneficios superan con creces las expectativas iniciales. La primera actuación es la creación en 1990 de la Asociación de Fabricantes de Queso de la Comunidad de Murcia (AQUEMUR), formada por queserías que trabajan coordinadamente en la consecución de quesos puros de cabra con personalidad propia, y de gran calidad. A finales de los años 90, se crean dos Cooperativas de recogida y comercialización de leche de cabra (COAGACART S. Coop. y AGROMUR S. Coop.) que cuentan con más de 150 ganaderos asociados trabajando con éxito en la mejora del nivel técnico de las explotaciones y de la calidad de la leche producida. En 1996 AQUEMUR y las Organizaciones Profesionales Agrarias solicitaron a la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, la protección de los quesos de cabra mediante una Denominación de Origen, logrando su reconocimiento provisional en 1997, creándose el Consejo Regulador Provisional de las Denominaciones de Origen “Queso de Murcia” y “Queso de Murcia al Vino”, con el objetivo de proteger, promocionar y controlar la calidad de los productos amparados. Este Consejo Regulador quedó ratificado como Definitivo en el año 2001 (CONSEJO REGULADOR DENOMINACIONES DE ORIGEN PROTEGIDAS QUESO DE MURCIA Y QUESO DE MURCIA AL VINO, 2005).

I. 3. 2. Etapas de fabricación

En la **Figura 1**, se recoge de forma esquemática el proceso de elaboración de queso de Murcia al Vino.

La pasterización de la leche afecta tanto al proceso proteolítico como lipolítico durante la maduración del queso. También, genera diversos cambios en la leche que pueden a su vez modificar las características del queso elaborado a partir de ella.

Este tratamiento, disminuye el contenido inicial de gérmenes aeróbicos mesófilos, inactiva o reduce la actividad de algunas enzimas de la leche (BUSTAMANTE, 2002) y activa la plasmina endógena.

Los quesos elaborados con leche pasteurizada suelen tener menor intensidad de sabor en comparación con los que se obtienen de la misma leche cruda de muy buena calidad. Esto puede deberse a la destrucción de algunas bacterias deseables de la leche cruda y que no actúan como iniciadoras de la fermentación láctica.

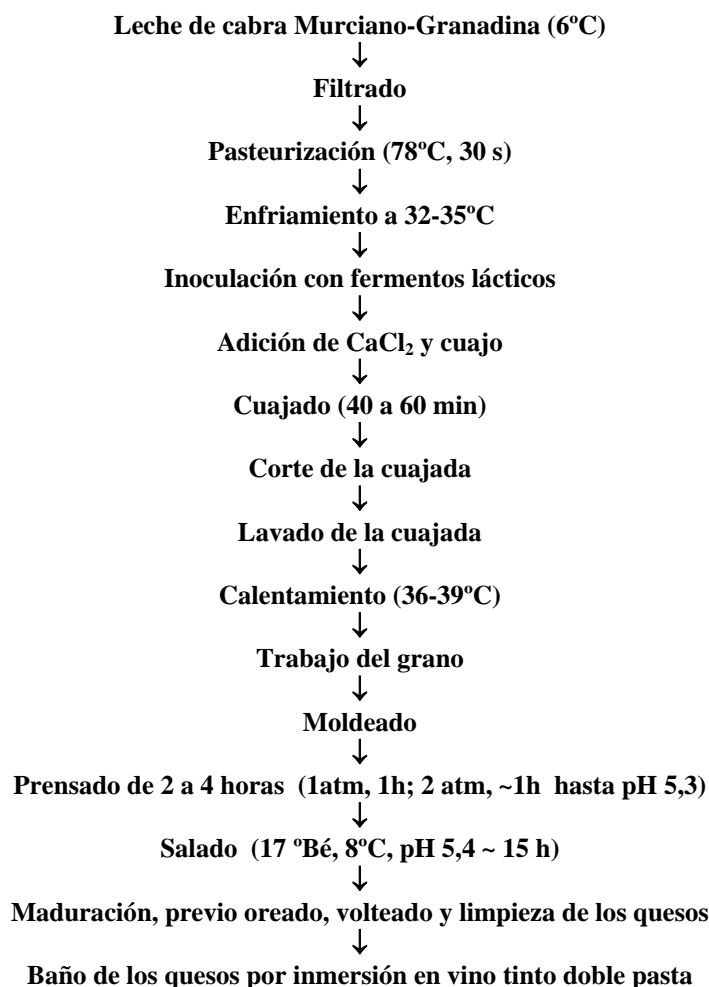


Figura 1. Diagrama de flujo de la elaboración de Queso de Murcia al Vino

Para elaborar Queso de Murcia al Vino se emplea una mezcla de cultivos liofilizados de *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris* (Cocos Gram positivos, crecen entre 10-45°C, reducen el tornasol rápidamente, no toleran el NaCl en concentraciones superiores a 6,5%, no forman esporas y son más o menos termodúricas) y *S. thermophilus* (Cocos Gram positivos, crecen entre 10-45 °C, reducen la leche

tornasolada, no toleran el NaCl en concentraciones superiores a 6,5%, no forman esporas y son termodúricas).

El cuajo habitualmente empleado en las queserías de la Región de Murcia es un extracto de cuajo vacuno con 80% de quimosina y 20% de pepsina. La temperatura del proceso de coagulación para la elaboración de Queso de Murcia al Vino es de 33-34°C. A pesar de que la quimosina tiene una temperatura óptima de actividad enzimática de ~40°C, normalmente en la elaboración de queso se emplean temperaturas más bajas (33-34°C), ya que a estas temperaturas, se obtienen geles que se comportan mejor reológicamente (i.e., cuajadas más firmes, que no se desmenuzan en partículas muy pequeñas al cortarlas) que desueran mejor. La utilización de temperaturas mucho más bajas (21-27°C) generan cuajadas más blandas y gelatinosas.

Las condiciones del desuerado, regulan el contenido del extracto seco y de los minerales de la cuajada así como la lactosa y cuajo residual (BERNARDO, 1991; CASTILLO *et al.*, 2000). En nuestro caso, el propósito es obtener una cuajada desuerada y lavada (eliminación de una parte del suero exudado de la cuajada y su reemplazo por agua a ~37°C) con el objeto de eliminar gran parte de la lactosa y cuajo residual, que nos permita regular la evolución del pH y la flora microbiana, y de esta manera poder obtener un queso mucho más suave y característico. Una mayor cantidad de lactosa retenida generaría una mayor cantidad de ácido láctico, y una mayor cantidad de cuajo residual contribuiría al desarrollo de un mayor grado de proteolisis durante la maduración, como consecuencia de la acción inespecífica de la quimosina (BERNARDO, 1991).

Mediante el lavado de la cuajada, la disminución del pH se tornará lenta y más fácil de controlar durante el trabajo del grano, prensado y posterior salado de los quesos. El incremento de temperatura durante el lavado también acelera suavemente la sinéresis de los granos.

I. 3. 3. Maduración del queso de Murcia al Vino

Durante el período de maduración de este tipo de queso se efectúan las prácticas de volteo y limpieza, así como los tratamientos externos correspondientes. Las cámaras destinadas a la maduración disponen de una humedad relativa superior al 80% y una temperatura que oscilará entre 9-13°C (B.O.R.M. n° 168, 2001).

El afinado del queso depende fuertemente del pH y de la actividad de agua (a_w), determinada principalmente por el contenido de humedad y la concentración de NaCl. Los principales agentes del afinado son enzimas hidrolíticas de origen diverso que actúan sobre los componentes mayoritarios de la cuajada, i.e., proteínas, grasa y lactosa. Cada tipo de queso presentará características diferenciales que se alcanzan al final del período de maduración y contribuyen de forma significativa a la “personalidad” del mismo. El flavor y textura característicos de un queso, son el resultado de diferentes y complejas reacciones bioquímicas que hidrolizan en mayor o menor grado los diferentes componentes de la cuajada (MOONEY *et al.*, 1998).

La **Tabla 6** muestra de forma esquemática el efecto relativo que producen los diferentes agentes de afinado durante la maduración de los quesos, y sus interrelaciones.

Tabla 6. Agentes del afinado de los quesos y su acción en diferentes procesos catabólicos

AGENTE	GLÚCIDOS	PROTEÍNAS	LÍPIDOS	CITRATO
1. Cuajos y enzimas coagulantes	-	XX	-	-
Cuajos en pasta	-	XXX	XXX	-
2. Bacterias lácticas	XXX	XX	X	X
3. Bacterias lácticas atenuadas	X	X	-	-
4. Mohos y levaduras	X	XX	XX	X
5. Flora secundaria	X	X	X	X
6. Enzimas endógenas	-	X	X	-
7. Proteinasas comerciales	-	XXX	-	-
8. Peptidasas comerciales	-	X	-	-
9. Lipasas comerciales	-	-	XXX	-
10. Esterasas comerciales	-	-	X	-

Efecto nulo: - ; Efecto bajo: X; Efecto medio: XX; Efecto alto: XXX

Si bien los cuajos comerciales vacunos –de uso habitual en la industria quesera– y los cuajos de oveja en pasta contienen concentraciones de quimosina similares, la actividad proteolítica es mayor en los cuajos en pasta, que además poseen actividad lipasa y esterasa, lo que permite acelerar considerablemente la maduración. La maduración acelerada de los quesos, es de suma importancia en aquellas industrias queseras que tienen grandes producciones, donde el tiempo de comercialización y utilización de espacios es de vital importancia económica. Para alcanzar niveles

similares de maduración a los obtenidos mediante el empleo del cuajo en pasta, sería necesario combinar distintos agentes de afinado, pero en la práctica se ha demostrado que esta posibilidad tiene grandes dificultades para su manejo y los productos que se obtienen son heterogéneos incluso en idénticas condiciones de elaboración (KIRBY, 1989). Otro hecho que diferencia al cuajo en pasta de otros cuajos naturales es su proceso de elaboración, ya que la obtención de los cuajos en pasta requiere un menor número de etapas al realizarse la activación de los zimógenos de quimosina y pepsina de forma autocatalítica.

I. 3. 4. Comercialización

La producción de quesos con Denominación de Origen Protegida en la Región de Murcia alcanzó en el año 2004 los 320.604 kg –empleándose para ello 2,5 millones de litros de leche de cabra M-G–, de los cuales el 95,5% (306.114 kg) corresponden al Queso de Murcia al Vino. Esta cifra, supone un incremento de la producción del 15% con respecto al año anterior (**Tabla 7**). Las estadísticas publicadas por la Federación Nacional de Industrias Lácteas (FENIL) en el año 2002 reflejan la distribución en el mercado de este tipo de queso. Un total de 172.574 kg de Queso de Murcia al Vino (85%) se vendieron en el mercado nacional, 10.151 kg (5%), en la Unión Europea (Alemania, Reino Unido, Francia e Italia) y 20.303 kg (10%) en terceros países (Estados Unidos). Según estas cifras de comercialización facilitadas por el Consejo Regulador de las DD.OO Protegidas de Queso de Murcia y Queso de Murcia al Vino, 188.175 kg de Queso de Murcia al Vino (61,5%) se exportaron en el año 2004 a Inglaterra, Alemania, Finlandia, Australia y Estados Unidos. El principal importador de este tipo de queso en la actualidad es Estados Unidos, donde se consume el 77,5% de la exportación total, lo que representa casi la mitad de la producción total de Queso de Murcia al Vino.

En conclusión, la importancia cuantitativa del sector caprino en la Comunidad de Murcia, favorecida por las ventajas que reporta la explotación de una raza autóctona como la cabra M-G, justifica el auge actual de la industria artesanal quesera murciana, que cuenta con la protección de las instituciones de la Región de Murcia desde 1990.

Tabla 7. Producción y comercialización del Queso de Murcia al Vino durante el año 2004

País o Comunidad	Queso de Murcia al Vino (Kg)	%
España:	117.939	38,53
Murcia	32.895	10,75
Otras Comunidades:	85.044	27,78
Madrid	28.038	9,16
Cataluña	26.541	8,67
C. Valenciana	24.104	7,87
Resto	6.361	2,08
Exportación:	188.175	61,47
Estados Unidos	145.779	47,62
Inglaterra	18.943	6,19
Alemania	18.405	6,01
Finlandia	1.511	0,49
Australia	1.477	0,48
Resto países	2.060	0,68
TOTAL	306.114	100

Fuente: Consejo Regulador Denominaciones de Origen Protegidas Queso de Murcia y Queso de Murcia al Vino (2005)

El esfuerzo coordinado de los distintos segmentos que componen el sector caprino (i.e., productores, fabricantes, distribuidores, detallistas, instituciones privadas y públicas y centros de investigación) permitirá, sin duda, un desarrollo rápido y coordinado de dicho sector ganadero, creando unas expectativas de futuro realmente esperanzadoras.

I. 3. 5. Empleo de cuajo comercial y en pasta de cordero en la elaboración de queso de Murcia al Vino

El continuo aumento de la demanda, ventas y valor añadido de la leche de cabra y sus derivados (SALDO *et al.*, 2003), así como la preferencia de los consumidores por alimentos saludables, que proporcionen sensaciones organolépticas novedosas y sofisticadas (MARINO, 2004) induce a pensar que el futuro de esta variedad de alimentos lácteos es realmente muy próspero. En este sentido, la obtención de aromas, sabores y texturas novedosas en los quesos de cabra así como la recuperación de propiedades organolépticas tradicionales, requieren el desarrollo y empleo de cuajos naturales. Estas enzimas hidrolíticas contribuyen de forma significativa a las

características sensoriales y diferencian los productos obtenidos, de aquellos elaborados mediante el empleo de los cuajos comerciales habituales y de las enzimas coagulantes de origen vegetal o microbiano.

En Europa, los principales quesos que requieren el empleo de cuajo en pasta son de origen italiano: Romano, Provolone, Asiago, etc., (RHODIA FOOD INGREDIENTS, 2001). Según los resultados publicados por PIREDDA *et al.* (2003), existen numerosos precedentes del empleo de cuajo de oveja en pasta en el área mediterránea para la producción de quesos tradicionales bajo denominación de origen (DD.OO.) entre los que destacan: Idiazabal y Roncal en España, Feta en Grecia y Pecorino Romano, Fiore Sardo y Provolone Valpadana en Italia.

I. 3. 5. 1. Cuajos y coagulantes lácteos

El empleo del cuajo obtenido a partir de los abomasos de terneros lactantes, tiene una tradición que se remonta a la antigüedad siendo industrializado en Europa alrededor del año 1874 (ABD EL-SALAM *et al.*, 1987). El cuajo –también llamado quimosina y antiguamente renina -, es una enzima que pertenece al grupo de las aspartatoproteinasas (E.C.3.4.23.4; E.C. indica Comisión de Enzimas IUPAC; 3. la clase de enzima, en este caso “hidrolasa”; 4. la subclase de enzima, en este caso “proteasa”; 23. la sub-sub clase de enzima, en este caso “proteasa ácida” y 4. es un número específico) que es secretada por el abomaso, estómago verdadero de los rumiantes jóvenes en forma inactiva llamada pro-cuajo, o pro-quimosina, y que se activa por autocatálisis por remoción del péptido N-terminal (GREEN, 1977). Este proceso se acelera en presencia de iones H^+ (AMIGO GARRIDO, 1989). El abomaso de los rumiantes secreta en forma de zimógenos tres proteasas aspárticas (o ácidas) que coagulan la leche, conocidas como quimosina, pepsina A (E.C. 3.4.23.1) y gastricsina (E.C. 3.4.23.3). La quimosina incluye dos formas A y B que difieren en las secuencias de sus proenzimas solamente en un aminoácido (sustitución de un Asp por Gly en la posición 290). A pesar de la escasa diferencia estructural existente, se pueden separar cromatográficamente (MARTIN HERNÁNDEZ *et al.*, 1984). La quimosina y la pepsina se hallan en mayor proporción que la gastricsina, cuya actividad frente a las caseínas no está muy estudiada.

En la Norma general de identidad y pureza para el cuajo y otras enzimas coagulantes de leche destinados al mercado interior, aprobada por Orden de 14 de enero de 1988 (BOE del 20/02/1996), define al cuajo, como el producto obtenido

exclusivamente de los cuajares de rumiantes y cuyo componente activo está constituido por quimosina y pepsina. Dentro de esta Reglamentación también se define coagulante lácteo, como aquellas preparaciones de proteinasas de origen animal, vegetal o microbiano capaces de provocar la desestabilización de la micela de caseína con formación de un gel lácteo, en las condiciones habituales empleadas durante la elaboración del queso.

La **Tabla 8** recoge los diferentes tipos de cuajo y coagulantes lácteos empleados en la elaboración de queso con sus principales características, ventajas y desventajas a tener en cuenta para su elección.

La quimosina y todos los sustitutos del cuajo comercialmente aceptados, son proteinasas ácidas pertenecientes a la misma familia siendo sus secuencias en aminoácidos y estructuras tridimensionales altamente parecidas (DE JONG, 1990).

Con frecuencia, los coagulantes lácteos reemplazan el uso del cuajo debido principalmente a causas estacionales y a la escasez de abomasos de animales lechales.

Los coagulantes lácteos obtenidos de animales no rumiantes, de origen vegetal y microbiano, cuando se utilizan en la elaboración de quesos, producen en los mismos características texturales, aromas y sabores totalmente diferentes en relación con aquellos quesos elaborados en las mismas condiciones con cuajo de ternero. Por ejemplo, la pepsina de cerdo se utiliza en algunos países mediterráneos y proporciona cuajadas amargas, aunque con consistencias muy diferentes a las obtenidas con cuajo de ternero (ALAIS, 1970). La pepsina de pollo es la menos utilizada, siendo empleada con mucha frecuencia en Israel y la República Checa. Aunque el empleo de muchos coagulantes microbianos suele ser más popular por su precio, en realidad el costo solo constituye alrededor del 0,5% del costo total de la elaboración del queso (WINWOOD, 1989).

En relación con los coagulantes vegetales utilizados en España, destacan los obtenidos a partir de cardos (*Cynara cardunculus*), y su uso durante la elaboración de quesos se lleva a cabo en las comarcas de La Serena, El Casar y Cáceres de la Comunidad Autónoma de Extremadura, y Los Pedroches (Córdoba). En Portugal destacan los quesos Serra, Serpa y Azeitao y en Italia el queso Cacio Fiore. El uso de este tipo de coagulantes confiere a estos quesos de oveja, una cremosidad y sabor amargo característico (MENDIOLA, 2000). El empleo de estos coagulantes en quesos como Edam y Roquefort producen bajos rendimientos y defectos en la textura y sabor (GREEN, 1977).

Tabla 8. Características de los cuajos y coagulantes lácteos

TIPO DE COAGULANTE	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Extracto de cuajo de ternero	Enzima natural Enzima ideal Patrón tradicional Rendimiento según dosis	·Escasez de estómagos ·Coste ·No aprobado por la ley judía ·No aceptado por vegetarianos
Cuajo de oveja y cabra lechal	Propia para la leche de oveja y cabra Muy similar al extracto de cuajo de ternero	·Igual que para extracto de cuajo de ternero
Cuajo bovino	Similar al cuajo de ternero pero diferente proporción enzimática (principalmente pepsina) Se adapta a todo tipo de quesos	·Sensible al pH y calcio
Cuajo porcino	Coste Pepsina	·Muy sensible a pH altos y temperatura ·Alta actividad proteolítica ·Sabores amargos y rendimiento
Pepsina de pollo	Aceptado por la ley judía	·Alta actividad proteolítica ·Sabores y rendimiento ·Inactivación en suero
Quimosina producida por microorganismos modificados genéticamente	Disponibilidad Aceptada por la ley judía Aceptada por vegetarianos Pureza Coste	
<i>Mucor miehei</i>	Coste Suministro	·Rendimiento ·Inactivación en suero ·Alta actividad proteolítica y sabores
<i>Mucor pussillus</i>	Coste Suministro	·Calidad y rendimiento ·Alta actividad proteolítica y sabores ·pH dependiente ·Inactivación en suero
<i>Endothia parasitica</i>	Coste Suministro Baja dependencia con el pH	·Rendimiento ·Alta actividad proteolítica
<i>Cynara cardunculus</i>	Producido localmente Productos tradicionales	·Alta actividad proteolítica ·Rendimiento ·Sabores amargos

HARBOE *et al.* (1992)

La quimosina se puede obtener industrialmente mediante la síntesis de una proquimosina utilizando microorganismos obtenidos por manipulación genética y posteriormente la proenzima se activa a su forma de quimosina. El reemplazo de la Tyr₇₇ con Phe, o la Val₁₁₃ también con Phe, produce un incremento en la actividad coagulante de la enzima (WHITAKER, 1994). Este tipo de síntesis mediada por

microorganismos, asegura la disponibilidad comercial de la enzima a lo largo de todo el año, y además se reduce en gran medida el coste de producción y el impacto de contaminación ambiental, lo que lleva principalmente a los productores de quesos frescos, de corta comercialización, a elegirlos y utilizarlos con frecuencia. Esta quimosina tiene una especificidad proteolítica diferente a la quimosina de ternera, pero los resultados que se obtienen son ampliamente aceptados para la fabricación de una gran variedad de quesos. Este tipo de coagulantes lácteos se utiliza en los Estados Unidos mientras que la quimosina de ternera se emplea en la mayoría de los países europeos y en Nueva Zelanda.

I. 3. 5. 2. Cuajos en pasta

JORDAN (1995) señala que dentro de los cuajos naturales los cuajos en pasta poseen una intensa y homogénea actividad lipolítica. Se parte de estómagos limpios que luego sufren un proceso de secado y salazonado para su conservación, hasta que finalmente se trituran, amasan y dejan reposar durante ~3-4 meses en refrigeración para asegurar, antes de su utilización, la ausencia de cualquier flora patógena. Para la obtención de cuajos en pasta con mayores concentraciones enzimáticas se emplea una pasta blanquecina procedente de la leche coagulada en el interior de los abomasos de rumiantes lechales, conocida como “gema”.

Los términos “cuajo de cordero” o “cuajo de cordero artesanal” en pasta encontrados en la literatura científica y utilizados para obtener quesos en países mediterráneos, suelen referirse a un conjunto de diversos elaborados cuyo contenido enzimático es muy variado. Las diferencias se deben fundamentalmente a la selección del tejido, que suele consistir en abomasos de corderos lechales, así como a su posterior manipulación y la metodología empleada para la preparación del extracto antes de agregarse a la leche (BUSTAMANTE, 2002).

En Italia, se comercializan cuajos de cordero en pasta, mientras que en España aún no se comercializan, ni están muy estudiados (BUSTAMANTE, 2002).

Cuando se quieren obtener cuajos naturales en pasta con una gran actividad de quimosina y lipasa, se debe partir de animales de un mes de vida aproximadamente y alimentados solo con leche (D’ELIA, 2004).

La **Tabla 9**, compara la distribución de las enzimas proteolíticas y lipolíticas que se puede encontrar en un cuajo en forma líquida y en pasta.

Tabla 9. Enzimas presentes en el cuajo líquido y en pasta

Enzimas	Cuajo líquido	Cuajo en pasta
Coagulantes	Quimosina	Quimosina
Proteasas	Pepsina y gastricsina	Pepsina y gastricsina
Lipasas	---	Pregástrica y gástrica

PIREDDA *et al.* (2003)

Las operaciones de elaboración del cuajo en pasta no alteran la composición del complejo enzimático presente en el abomaso del animal. Las enzimas proteolíticas y lipolíticas pasan casi inalteradas al cuajo en pasta, pero no ocurre lo mismo cuando se obtiene el mismo cuajo en forma líquida. La preparación del cuajo líquido necesita un paso de activación de la pro quimosina en quimosina activa por ajuste del pH, lo que provoca la pérdida de las enzimas lipolíticas (PIREDDA *et al.*, 2003).

Es de uso corriente -incluso en las publicaciones científicas-, el empleo del término actividad lipasa en lugar de actividad lipolítica (que incluye tanto a la acción de las enzimas lipasas como las esterases). Para aclarar mejor este concepto definiremos estas actividades, contenidas en el término “actividad lipolítica”.

Se define como lipasa a la enzima que hidroliza los enlaces éster de glicéridos emulsionados en una interfase aceite-agua (FENNEMA, 1982). Las enzimas lipolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en vegetales, animales y microorganismos. Las lipasas están en líquidos biológicos, células, semillas, órganos y otros tejidos.

En nuestro caso cuando nos refiramos a actividad lipasa estaremos aludiendo a valores de actividad obtenidos a partir de la determinación de ácido butírico utilizando tributirina como sustrato de reacción.

Las otras dos enzimas lipolíticas encontradas en el extracto ovino se conocen como esterases debido a que hidrolizan una variedad de ésteres como sustratos, pero no reaccionan con la tributirina.

Como se comenta anteriormente, los cuajos comerciales líquidos se hallan libres de actividad lipolítica. En cambio los cuajos en pasta la contienen como esterasa pregástrica (EPG), altamente específica para cadenas cortas de ácidos grasos que se hallan esterificando el carbono terminal del glicerol. La succión del animal estimula la

secreción de EPG en la base de la lengua y es introducida en el abomaso junto con la leche ingerida. Existen pequeñas diferencias en la especificidad de la enzima -según la especie del animal-, que se traducen también en pequeñas variaciones del sabor característico de los quesos (COLLINS *et al.*, 2003).

BUSTAMANTE *et al.* (2000) comprueban que la actividad lipolítica encontrada en los cuajos de cordero en pasta de cordero depende del origen y del estado del estómago en el momento del sacrificio del animal. La actividad lipasa es mayor en aquellos abomasos obtenidos por sacrificio después de la ingesta de leche. CHÁVARRI (1999) y PIREDDA *et al.* (2003) matizan que la lipasa pregástrica es más abundante en los abomasos de animales alimentados solo con leche, mientras que la lipasa gástrica predomina en aquellos estómagos de animales que han ingerido otro tipo de alimento.

Esta actividad según los mismos autores decae de forma exponencial desde 13 U g⁻¹ hasta 5 U g⁻¹ a las 58 semanas, cuando el cuajo en pasta se conserva refrigerado a 4°C, y según BUSTAMANTE (2002) esta pérdida es más acusada, cuando el nivel de actividad enzimática inicial es mayor. PIREDDA *et al.* (2003) observan un comportamiento opuesto en la actividad coagulante. Un descenso del pH hasta un valor de 2,0 en estos mismos cuajos en pasta, provoca un aumento de la actividad coagulante y una total inactivación de la actividad lipolítica, como consecuencia de la activación de los zimógenos (pro-quimosina y pro-pepsina) y la inactivación de las enzimas lipolíticas.

La mayoría de los cuajos de cordero en pasta, después de su obtención, muestran una actividad esterasa creciente durante el primer mes cuando se mantienen refrigerados a 4°C, durante aproximadamente 14 meses con variaciones diarias de hasta un 25% de forma similar a lo encontrado para la actividad coagulante. Al igual que para la actividad lipasa, la actividad esterasa se inhibe completamente cuando el pH del cuajo alcanza un valor de 2,0 momento en que la actividad coagulante se activa.

Esta actividad lipasa puede proceder de microorganismos (mohos, levaduras y bacterias) o de animales, que son extraídas de la región pregástrica de los rumiantes (lengua, faringe, epiglotis y esófago). Las lipasas de origen animal liberan fundamentalmente ácidos grasos de cadena corta, mientras que las de origen microbiano liberan ácidos grasos de cadena más larga (HARBOE, 1994). Según BUSTAMANTE (2002) el origen de la actividad esterasa encontrada en muchos quesos es probablemente microbiano. Un gran incremento de los ácidos grasos libres totales no es un indicador de la presencia de lipasa pregástrica en el cuajo en pasta utilizado, mientras que un valor

superior de 65% de ácidos grasos libres de cadena corta (C₄-C₁₀) principalmente ácido butírico, sí es un índice fiable de la presencia de la misma en el cuajo en pasta.

La misma autora, piensa que el empleo de estas lipasas tiene un gran futuro en muchas otras variedades de queso distintas de las que actualmente las utilizan como Provolone, Romano y otras variedades como el Feta, y en menor escala en Cheddar tipo rancio, Manchego, Samsó, Ras, Romi, Domiati, Kopanisti, quesos azules, etc.

I. 4. INFLUENCIA DEL TIPO DE CUAJO EMPLEADO EN LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL QUESO

A pesar de que durante la elaboración de diferentes tipos de quesos las enzimas responsables del proceso de coagulación se utilizan en pequeñas proporciones, el origen de éstos tiene una gran importancia en el producto final, especialmente cuando los períodos de maduración de los quesos son prolongados. En este apartado sólo se aborda la influencia de las enzimas procedentes de rumiantes, no incluyendo los coagulantes lácteos. La función principal del cuajo en la fabricación de queso es la coagulación de la leche, aunque tiene un papel preponderante en sus características organolépticas, ya que alrededor de un 6% de la quimosina queda retenida en la cuajada. Su efecto dependerá de la presencia o ausencia de actividad lipolítica en el cuajo utilizado, la concentración de enzima inicial, la proporción de enzima retenida tras el desuerado y de su actividad durante el proceso de maduración.

I. 4. 1. Proteolisis

Trabajando en idénticas condiciones, el efecto final producido por un cuajo, será similar, independientemente del empleo de cuajo líquido o en pasta de cordero porque las enzimas responsables en este proceso son semejantes en ambos tipos de cuajo, y se hallan en análogas proporciones.

La degradación de la matriz proteica producida durante la maduración, influye en los cambios del perfil de textura del queso -elasticidad, fragilidad, adhesividad, dureza, gomosidad, masticabilidad-, en el desarrollo de sabores básicos (salado, amargo, dulce, ácido y humámico), y por supuesto en su olor, por la producción de NH₃, aminos, compuestos azufrados y ácidos grasos libres volátiles. RAMPILLI *et al.* (1995)

sostienen que el sabor y aroma de un queso vienen dado en gran medida por la aportación de sustancias químicas que se originan como consecuencia de la degradación de la matriz proteica (péptidos, aminoácidos, amoníaco, compuestos sulfurados).

DEMETER (1971), menciona que el dulzor de los quesos se debe a la presencia del aminoácido *Pro* (TAVARIA *et al.*, 2003, incluyen además de *Pro*, *Ser* y *Asn*) y que los aminoácidos de carácter ácido como *Glu* y *Asn* influyen marcadamente en el aroma de los quesos. TAVARIA *et al.* (2003) relaciona ciertos aminoácidos libres con el desarrollo del sabor en los quesos como por ejemplo la *Arg* que está asociada con el amargor.

La proteólisis primaria es la responsable de la textura blanda característica al principio de la obtención de la cuajada, y la proteólisis secundaria, al generar péptidos de pequeño tamaño y alta hidrofobicidad que son detectados por los receptores del sabor, producen la sensación de amargor (TAVARIA *et al.*, 2003). Los péptidos sirven como substratos precursores para las proteinasas y peptidasas bacterianas que los transforman en péptidos más pequeños y aminoácidos libres. La alteración de la textura del queso durante la masticación, influye en la liberación de compuestos aromáticos.

ENGEL *et al.* (2000), concluyen que los principales compuestos que participan en el sabor del queso de cabra son las sales minerales y el ácido láctico (coincidiendo con SOUSA *et al.*, 2001), mientras que los lípidos, la fracción volátil, la lactosa, los aminoácidos y los péptidos tienen una menor influencia. También determinan que los péptidos de alto peso molecular no contribuyen de manera directa al flavor del queso pero son importantes para el desarrollo correcto de su textura, aunque los péptidos de elevado peso molecular pueden ser hidrolizados por las peptidasas a cadenas más cortas, que sí contribuyen a la formación del flavor, en leche de vaca, cabra y oveja. En los quesos de vaca predomina principalmente el gusto salado y amargo, en los de oveja el gusto humámico, y en los de cabra humámico, amargo y la sensación astringente en la boca.

La pérdida de elasticidad y firmeza del queso a medida que madura, se debe principalmente a los cambios producidos en la red espacial proteica de su matriz como consecuencia de la continua pérdida de humedad (que restringe su movimiento cuando se aplica una presión determinada) y la ruptura de la misma dando lugar a la formación de sustancias diferentes.

I. 4. 2. Lipólisis

La grasa en el queso se encuentra homogéneamente dispersa y apenas alterada respecto de la leche. Está constituida fundamentalmente por triglicéridos y es degradada de un modo variable dependiendo de las condiciones de la maduración.

La grasa del queso además de su gran aporte calórico, de ácidos grasos esenciales y de vitaminas liposolubles, influye significativamente en el comportamiento sensorial y reológico del queso. La grasa afecta su dureza, elasticidad y adhesividad, mejorando su homogeneidad y cremosidad (CHÁVARRI, 1999).

La grasa se halla formando una interfase grasa-agua-proteína, y actúa como mecanismo de soporte de los sabores liposolubles, que son liberados durante su consumo. Por lo tanto, la fracción lipídica tiene un papel fundamental en el sabor del queso.

El sabor característico de la leche de cabra a veces es indeseable para el consumidor, pero en los quesos de cabra su presencia es ventajosa y deseada debido a la contribución en las propiedades organolépticas, de los productos derivados de la maduración que atenúan el olor y sabor de la leche de cabra.

Los ácidos grasos libres (AGL) de cadena corta contribuyen al desarrollo del aroma y sabor del queso y pueden ser precursores de compuestos volátiles como metilcetonas, alcanos, lactonas y ésteres alifáticos y aromáticos (CHÁVARRI, 1999). Los de cadena larga parecen contribuir al sabor de fondo.

RAMPILLI *et al.* (1995) sostienen que la degradación de la matriz lipídica contribuye al sabor y aroma de un queso mediante la formación de ácidos grasos, aldehídos, metilcetonas y lactonas. El típico sabor picante de los quesos Provolone y Pecorino Romano se atribuye a la elevada concentración de ácidos grasos de cadena corta producidos por la acción hidrolítica de las lipasas contenidas en el cuajo en pasta. SOUSA *et al.* (1997) mencionan que los ácidos grasos libres contribuyen positivamente al sabor característico de una gran variedad de quesos, cuando éstos se hallan equilibrados con los productos de origen proteolítico y demás productos derivados de la acción catalítica de otras enzimas. Este sabor aparece cuando la concentración de ácido butírico es superior a 2000 mg L⁻¹.

BUFFA *et al.* (2001) concluyen que la lipólisis intensa encontrada particularmente en quesos italianos duros, y en quesos de cabra es esencial para el desarrollo correcto de sus sabores, y que la mayoría de los ácidos grasos libres que se

generan son 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 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 (GABORIT *et al.*, 2001) contribuyen al sabor característico a cabra en el queso. El origen de los ácidos grasos responsables del inconfundible sabor a cabra pueden deberse a: 1) la lipólisis inicial o endógena de la leche, 2) la inducida por los distintos tratamientos y operaciones tecnológicas que sufre la leche durante su procesado, y 3) la generada por la acción microbiana de los cultivos utilizados, en diferente grado según las especies empleadas, existiendo una carencia de información en relación al efecto que producen en los sabores de los quesos elaborados con leche de cabra, los mohos y levaduras (GABORIT *et al.*, 2001).

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 daría lugar a la rancidez típica, generada por la producción de una cantidad excesiva de ácidos grasos volátiles liberados por la acción de la lipoprotein lipasa.

BUSTAMANTE (2002), considera que la actividad lipolítica en los cuajos de cordero en pasta (ausente en los cuajos comerciales líquidos) está muy poco caracterizada. Libera ácidos grasos de cadena corta (principalmente C₄ y C₆) y media (hasta C₁₂) pero no de cadena larga, coincidiendo con la especificidad de la lipasa pregástrica de los mamíferos, lo que sugiere que la lipasa pregástrica podría ser la responsable al menos parcialmente, de la actividad lipolítica característica del cuajo en pasta de cordero. Este tipo de cuajo a diferencia de los habituales, produce en los quesos un típico sabor picante acompañado de un aroma penetrante.

En la **Tabla 10** se muestran los valores umbrales para el sabor de diferentes ácidos grasos saturados de cadena corta lineal en solución acuosa, donde puede notarse que la menor concentración detectada sensorialmente por el ser humano, corresponde al ácido butírico seguido del ácido propiónico y decanoico.

Los ácidos grasos de cadena larga (>12 átomos de carbono), tienen un papel menos importante en el sabor debido a su alto umbral de percepción sensorial, mientras que los de cadena corta e intermedia (C₄ – C₁₂) tienen un considerable valor umbral de percepción, lo cual genera una nota característica.

Tabla 10. Nivel de detección sensorial para distintos AGL

Compuesto	Umbral del sabor ($\mu\text{Mol kg}^{-1}$)
C ₂	900
C ₃	400
C ₄	200
C ₆	700
C ₈	700
C ₁₀	400

CHÁVARRI (1999). Nota: valor del umbral original expresado como mMol kg^{-1}

El ácido butírico contribuye al sabor rancio y al sabor típico a queso, y el hexanoico tiene un sabor pungente y a queso azul. El octanoico tiene un sabor típico a jabón, cera, a cabra, rancio, humedad y frutal. Dependiendo de la concentración y del umbral de percepción, los ácidos grasos volátiles pueden contribuir positivamente al aroma del queso o también al defecto de rancidez.

El efecto de los ácidos grasos libres en el sabor del queso está influenciado por el pH. Por ejemplo en quesos con elevados valores de pH, puede desaparecer el sabor debido a la neutralización de los ácidos grasos.

Estudios sensoriales realizados en queso Romano, Provolone y Roquefort, catalogados como fuertes, rancios y con sabores butíricos, tienen una concentración alta de AGL. En quesos Port Salut, Monterey, Edam y Colby, los sabores suaves a leche se corresponden con niveles bajos de AGL (CHÁVARRI, 1999).

HARBOE (1994) realza la importancia del empleo de cuajo en pasta de rumiantes (que actualmente están disponibles con una aceptable calidad microbiológica) ya que generan características de tipo lipolítico y un excelente sabor en los quesos, posiblemente debido a la presencia de otras enzimas además de la LPG y las enzimas coagulantes.

La lipasa pregástrica esterasa (PGE) aportada por el cuajo en pasta actúa durante la maduración del queso sobre los triglicéridos liberando ácidos grasos (COLLINS *et al.*, 2003), que contribuyen a la formación del gusto y del aroma del queso directamente, siendo además las responsables del gusto picante producido por los ácidos grasos de cadena corta, en particular, por el ácido butírico (PIREDDA *et al.*, 2003). GEORGALA *et al.* (2004), cuando estudian el queso Feta tradicional que utiliza una mezcla de leche de oveja y cabra, observan que cuando emplean un cuajo artesanal obtenido de oveja y cabra y lo comparan frente al mismo pero combinado con cuajo de ternera, el queso

procedente del primero tiene un sabor picante significativamente mayor. Esto lo atribuyen a una mayor formación de ácido butírico. Además afirman que la actividad lipolítica en estos quesos puede provenir de la actividad de las bacterias ácido lácticas y propiónicas.

También se ha publicado que los cuajos de oveja confieren al queso un aroma más intenso que los de ternero, como ocurre en el queso Kefalotyri. ANIFANTAKIS (1976) asegura que el empleo de cuajo de corderos lechales, en sustitución del cuajo tradicional de ternero cuando se fabrica queso Feta y Kefalotyri en Grecia, da lugar a productos con sabores más intensos que son preferidos por la mayoría de los consumidores.

En algunos mercados de Grecia e Italia se prefieren los quesos con sabor fuerte que se elaboran con una pasta obtenida mediante la trituración de la mucosa de estómagos de oveja o cabra. Las lipasas presentes en estas pastas provocan en el queso el desarrollo de un sabor característico, y cuando sólo se dispone de cuajo tradicional, es preciso adicionar a la leche, antes de su coagulación, algunas lipasas comerciales (SCOTT, 1991).

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.

Como consecuencia de la escasa disponibilidad de cuajos naturales en pasta se han ido reduciendo gradualmente las características artesanales de los quesos, especialmente aquellas relacionadas con los sabores y texturas peculiares, que definen un producto tradicional. La pérdida de estos atributos tan demandados hoy día, radica en el empleo de cuajo vacuno, de quimosina obtenida a partir de microorganismos recombinantes o de enzimas coagulantes de origen microbiano, como práctica corriente en la elaboración de la mayoría de los quesos del mundo. El queso de Murcia al Vino no es una excepción, elaborándose habitualmente con cuajo líquido vacuno (80% de quimosina). En este sentido, el empleo de cuajo en pasta ovino, de elevada actividad proteolítica, lipolítica y esterásica, supondría una alternativa para realzar aromas, sabores y texturas de interés en dicho queso o, simplemente, una oportunidad para el desarrollo de nuevos tipos de queso.

Esta Memoria de Tesis Doctoral tiene dos objetivos principales. *El primero* consiste en la caracterización de varios cuajos naturales en pasta de cordero –elaborados según diferentes protocolos a partir de cuajares de animales lechales– mediante la determinación de sus actividades coagulante y lipolítica. *El segundo* objetivo consiste en la selección de aquel cuajo en pasta con propiedades enzimáticas, coagulantes y microbiológicas adecuadas para su empleo en la elaboración de Queso de Murcia al Vino, y la determinación de la influencia del uso de dicho cuajo en el producto final, en

comparación con los productos obtenidos con cuajo bovino comercial. La consecución de estos dos objetivos se logra a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación de la actividad enzimática (proteolítica y lipolítica) de los diferentes tipos de cuajo en pasta elaborados (i.e., cuajos en pasta obtenidos mediante diferentes procedimientos).
2. Caracterización de la adaptabilidad tecnológica de los diferentes cuajos en pasta en función de su actividad coagulante, mediante el empleo de dispersión de radiación de infrarrojo próximo, como método de monitorización de los procesos de agregación micelar y de endurecimiento de la cuajada.
3. Selección del cuajo en pasta idóneo para la fabricación de Queso de Murcia al Vino, en función de sus propiedades enzimáticas, coagulantes y microbiológicas y elaboración de dicha variedad de queso mediante el empleo del cuajo seleccionado.
4. Caracterización de los quesos obtenidos en base a parámetros fisicoquímicos, microbiológicos, reológicos y sensoriales.

La consecución de dichos objetivos, supone la primera aportación para el empleo industrial de cuajos naturales en pasta, con cualidades enzimáticas y microbiológicas capaces de ensalzar el perfil organoléptico del Queso de Murcia al Vino mediante la incorporación y/o recuperación de atributos sensoriales de interés para la industria artesanal quesera murciana.

Para la consecución de los objetivos propuestos en esta Memoria de Tesis Doctoral, se diseñan cuatro protocolos diferentes para la elaboración de cuajos experimentales de cordero en pasta. La selección del cuajo en pasta idóneo para la fabricación de Queso de Murcia al Vino se efectúa en base a diferentes técnicas de laboratorio que determinan las propiedades enzimáticas, coagulantes y microbiológicas de dichos cuajos. Finalmente, se aborda la puesta a punto de aquellos equipos y materiales necesarios para la elaboración de Queso de Murcia al Vino y los procedimientos analíticos requeridos para la evaluación fisicoquímica, microbiológica, reológica y sensorial de los quesos obtenidos. En el diagrama de bloques de la **Figura 2** se muestra, de forma esquemática, el procedimiento general seguido en esta Memoria de Tesis, desde la fase inicial de elaboración de cuajos en pasta hasta la etapa final de evaluación de la calidad del producto obtenido.

III. 1. ELABORACIÓN DE CUAJOS NATURALES

Para la elaboración de los diferentes cuajos de cordero en pasta se utilizaron abomasos de corderos lechales de un mes de edad, recogidos en mataderos de la Comunidad Autónoma de Castilla-León por la empresa Cuajos Caporal S. L. (La Cistérniga, Valladolid, www.cuajoscaporal.com). Los criterios seguidos para la clasificación de los cuajares fueron: a) elección de abomasos procedentes de corderos sacrificados con el estómago lleno y b) selección de abomasos blanquecinos (i.e. el

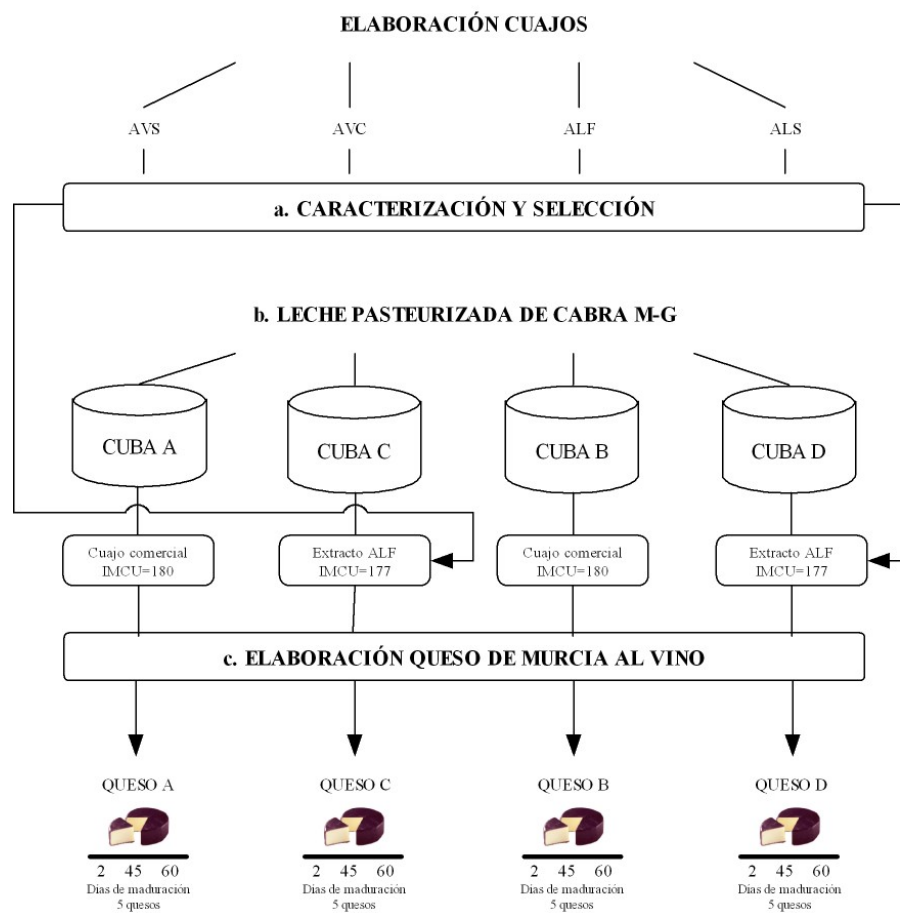


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración y análisis realizados

ANÁLISIS REALIZADOS

a. CARACTERIZACIÓN DE CUAJOS DE CORDERO EN PASTA

- Actividad coagulante
- Contenido en quimosina y pepsina
- Actividad lipolítica
- Aptitud a la coagulación
- Análisis microbiológicos

b. LECHE EN CUBA

- pH
- Extracto seco total
- Materia grasa
- Proteína
- Ácidos grasos totales
- Análisis microbiológicos

c. QUESOS

- pH
- Extracto seco total
- Proteína
- Materia grasa
- NaCl
- a_w
- Fracciones nitrogenadas solubles
- Ácidos grasos totales
- Ácidos grasos libres
- Análisis microbiológicos
- Análisis reológicos
- Análisis sensorial

animal es aún lactante, ya que la alimentación de hierba confiere un color muy oscuro; se aceptan abomasos desde color blanco a marrón claro). Los abomasos seleccionados se transportan a la industria, inmersos en salmuera, en una nevera portátil donde se almacenan en una cámara frigorífica a 4-6°C. El tiempo máximo transcurrido desde la recogida de los abomasos hasta su procesado nunca fue superior a los siete días. Tras su llegada a Cuajos Caporal S. L., los abomasos seleccionados se dividen en dos grupos para la elaboración de dos tipos diferentes de cuajo en pasta: a) abomasos vacíos (AV) y b) abomasos llenos (AL).

a) Cuajos procedentes de abomasos vacíos

Los abomasos vacíos se dividen en dos lotes. Un primer lote, se deseca directamente mediante el procedimiento habitual empleado en Cuajos Caporal (ventilación forzada a 30°C durante 2 días). Los abomasos secos se pican en una picadora comercial hasta obtener un picado grosero que se humedece con una pequeña cantidad de agua. A continuación, la mezcla se introduce en la picadora hasta conseguir una pasta fina a la que se añade un 23% de NaCl. El cuajo así elaborado se denomina AVS (cuajo de abomaso vacío y seco).

El segundo lote de abomasos vacíos se congela a -30°C hasta su procesado. Tras la descongelación, el abomaso húmedo se procesa como se ha descrito en el caso del primer lote. Este cuajo se identifica como AVC (abomaso vacío y congelado).

b) Cuajos procedentes de abomasos llenos

Los abomasos llenos, se mantienen refrigerados en salmuera (4-6°C) hasta un máximo de 7 días en Cuajos Caporal. Estos abomasos se dividen en dos lotes. El primer lote se tritura con un 23% de NaCl tal como se ha descrito anteriormente. Este cuajo se denomina ALF (abomaso, lleno y fresco). El otro grupo de abomasos llenos y en salmuera, se seca en una estufa de aire forzado a 30°C durante 3 días y posteriormente se trituran con un 23% de NaCl siguiendo el procedimiento descrito. Este cuajo se denomina ALS (abomaso lleno y seco).

A continuación se muestra el diagrama de flujo correspondiente a la elaboración de los cuatro cuajos en pasta de cordero (**Figura 3**).

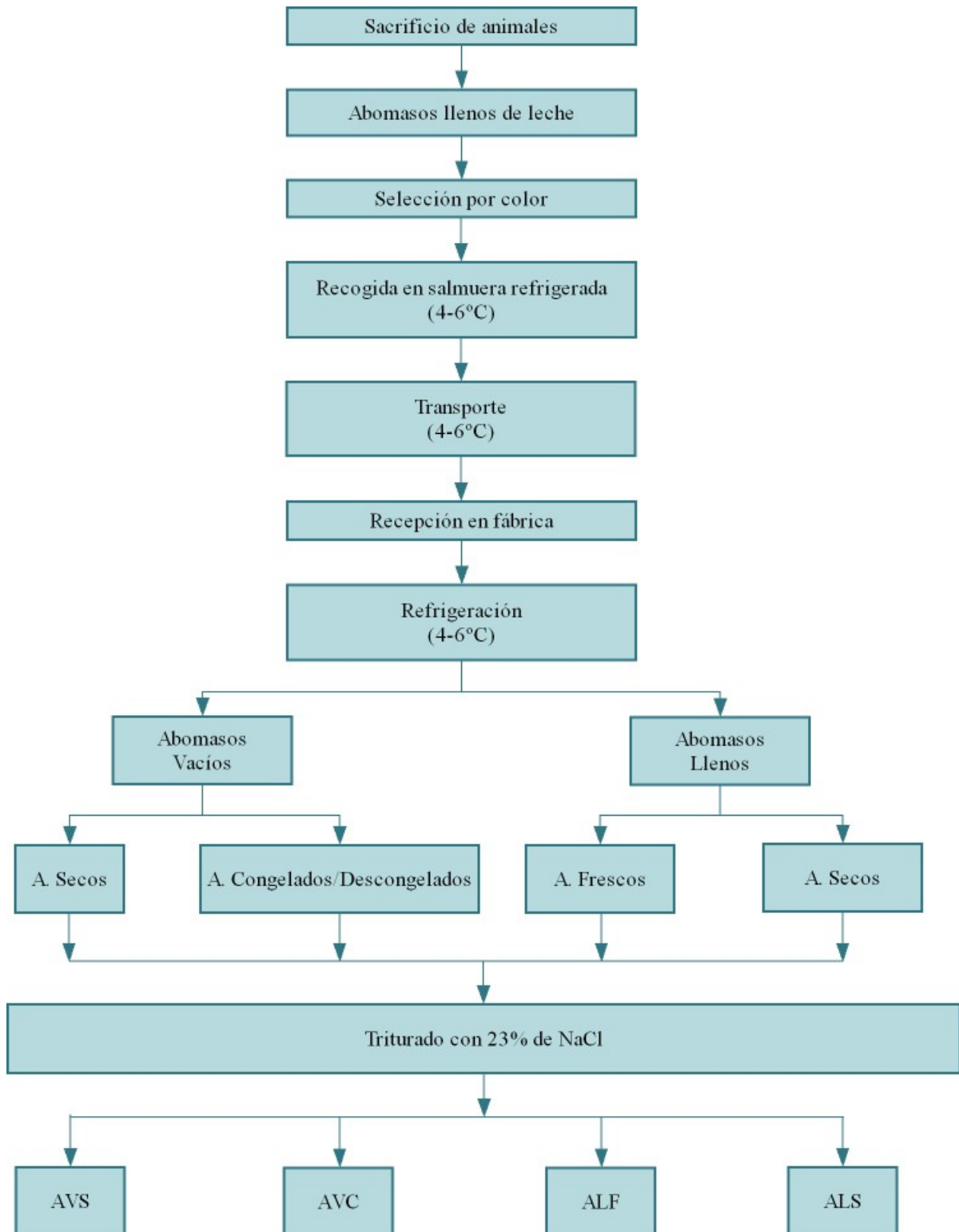


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de cuajos de cordero en pasta

A. (Abomasos)

Para cada uno de los tipos de cuajo en pasta se elaboran cuatro réplicas (~4 kg de cuajo por elaboración) que se envasan en frascos de vidrio con tapa hermética y se mantienen en refrigeración a 4-6°C durante un período mínimo de 9 meses, a fin de valorar la pérdida de actividades enzimáticas durante su almacenamiento. El tiempo de conservación seleccionado (9 meses) se corresponde con la vida comercial de este tipo de cuajos, como consecuencia de la pérdida de actividad lipasa a partir de los 4-5 meses en condiciones de refrigeración (BUSTAMANTE *et al.*, 2000).

III. 2. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS

III. 2. 1. Leche de cabra Murciano-Granadina

Antes de proceder a la elaboración de Queso de Murcia al Vino se toman muestras de leche pasteurizada directamente de la cuba experimental mediante frascos de plástico estériles. A partir de cada muestra se determina pH, extracto seco total, concentración de grasa, proteína y ácidos grasos totales y se realizan análisis microbiológicos.

El agua destilada empleada para la realización de los distintos ensayos tiene un grado analítico tipo II, es suministrada por la red de abastecimiento de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia y producida por electro-desionización a través del Sistema RX Millipore (Francia, www.millipore.com).

1) Determinación de pH

Las determinaciones de pH se realizan mediante un pH-metro Crison® (micropH 2001, Barcelona, www.crison.it) conectado a un electrodo combinado de vidrio Crison® (52-02). El pH-metro se calibra a dos puntos con soluciones estándar de pH 7,00 y 4,02 (Crison®) a temperatura ambiente y las medidas de pH se realizan a dicha temperatura por triplicado.

2) Determinación de la concentración de grasa

La determinación de la concentración de grasa se realiza mediante el método ácidobutirométrico de Gerber según la norma **ISO 3433:1975 // ISO 3432:1975**. La

temperatura de los butirómetros se controla mediante un baño termostatzado Selecta (Digiterm100, Barcelona, www.jpselecta.es). Los butirómetros se centrifugan 10 minutos mediante una centrífuga Gerber Orto-Alresa (Lacter, España, www.ortoalresa.com) equipada con control automático de temperatura. La lectura del butirómetro se realiza con una precisión del 0,25%. Las mediciones para cada muestra de leche se realizan por triplicado.

3) *Determinación del extracto seco total*

Se desecan 10 g \pm 0,1 mg de leche en una cápsula de porcelana mediante el empleo de una estufa de convección DVE (Heraeus D6450, Madrid, www.heraeus.es) a 105°C \pm 0,5 hasta peso constante según norma **IDF 4A:1982**. Las muestras se analizan por triplicado.

4) *Determinación de la concentración de proteína*

La determinación de la concentración de nitrógeno total se realiza a partir de 5 mL de leche mediante el método Kjeldahl, según la norma **IDF 25:1964**. La destilación, se lleva a cabo en un destilador automático Büchi (323, Suiza, www.buchi.com). La valoración se completa mediante un valorador automático Metrohm 20 (702 SM Titrino, Suiza). Las mediciones para cada muestra de leche se realizan por triplicado.

5) *Determinación de la concentración de ácidos grasos totales*

Para determinar la composición de los ácidos grasos de las muestras de leche, se realiza previamente una extracción lipídica, y posteriormente se procede a la derivatización de los ácidos grasos, identificación y cuantificación mediante cromatografía gaseosa (Norma **UNE en ISO 5508:1996**).

a) *Extracción de la fracción lipídica*

La extracción lipídica se realiza según el método Röse-Gottlieb (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS, 14th Edition.,1978). Los solventes orgánicos de la fase polar se evaporan mediante un rotavapor Büchi (011, Suiza). La temperatura de evaporación se controla a través de un

baño termostático Büchi (461) y un equipo de refrigeración Heto (Comfort, Barcelona). Tras la extracción, la fase lipídica se pesa y congela a -18°C hasta su derivatización (aproximadamente 1 mes).

b) *Derivatización de los ácidos grasos*

Los ácidos grasos se hidrolizan y metilan hasta obtener los ésteres metílicos (EM) correspondientes como se detalla a continuación. Se pesa la muestra de grasa junto con el patrón interno (EM del ácido undecanoico, Sigma U 0250, Madrid, www.sigmaaldrich.com) en un matraz y se le adiciona metilato sódico 0,2 N. Se calienta a reflujo mediante placa calefactora eléctrica de manta Selecta (Agimatic-N, Barcelona) adaptando un tubo de refrigeración al matraz hasta obtener una sola fase. Durante esta etapa, los ácidos grasos se liberan y esterifican dando lugar a sus correspondientes EM, se dejan enfriar y se añade una disolución al 3% de H_2SO_4 en metanol anhidro, calentando a ebullición durante 5 minutos. Durante este paso se completa la esterificación favoreciéndose además la estabilización de los EM. Se suspende el calentamiento y se deja enfriar. Luego se añade n-hexano con agitación, calentando suavemente durante 2 minutos para favorecer la disolución de los ésteres en este solvente. Se deja enfriar el contenido y a continuación se vierte en un matraz aforado mezclándolo con una solución sobresaturada de NaCl hasta la separación de dos fases bien diferenciadas. La fase superior transparente contiene los EM disueltos en n-hexano.

c) *Determinación analítica mediante cromatografía de gases*

Las muestras conteniendo los EM de los ácidos grasos se refrigeran en hielo picado, y antes de 24 horas, se analizan utilizando un cromatógrafo de gases Fisons Instruments (GC8000 series, Italia) con un detector de ionización de llama (FID-80) de la misma marca, modelo y origen. Se utiliza una columna capilar con 5% de Fenil Metil Siloxano entrecruzado, 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película Hewlett-Packard (HP5, Barcelona, www.hp.com). Las condiciones de trabajo son:

- Gas portador: Helio
- Flujo de columna: 1 mL min^{-1}
- Flujo de aire: 300 mL min^{-1}
- Flujo de hidrógeno: 30 mL min^{-1}

- Divisor: 1/100
- Temperatura del inyector: 270°C
- Temperatura del detector: 280°C
- Rampas de temperatura: 60°C a 160°C con un incremento de 5°C min⁻¹
160°C a 180°C con un incremento de 2°C min⁻¹
180°C a 240°C con un incremento de 5°C min⁻¹,
manteniendo esta temperatura final durante 10 minutos.

La identificación de los EM de los ácidos grasos se realiza mediante comparación con los tiempos de retención de los patrones de referencia (EM del ácido butírico, metilado a partir de ácido butírico B 2503; EM del ácido caproico C 5049; EM del ácido caprílico C 3375; EM del ácido cáprico C 2125; EM del ácido láurico L 7272; EM del ácido mirístico M 3378; EM del ácido palmítico P 5177; EM del ácido palmitoleico P 6087; EM del ácido esteárico S 5376; EM del ácido oleico O 4754; EM del ácido linoleico L 1876 y EM del ácido linolénico L 2626) suministrados por Sigma (Madrid).

Los EM de los ácidos grasos se cuantifican usando el EM del ácido undecanoico (Sigma U 0250, Madrid) como estándar interno, y a partir de las rectas de calibrado de cada ácido graso. Todos los ácidos grasos analizados presentaron una respuesta lineal en el rango de concentraciones estudiadas. La integración de los ácidos grasos se lleva a cabo mediante el “software” Chrom Card Fisons Instruments (Italia), y la concentración de cada ácido graso se expresa en $\mu\text{M Kg}^{-1}$. Las inyecciones de cada muestra se realizan por triplicado.

6) Análisis microbiológicos

Se realizan los siguientes recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sulfito-reductores, *Listeria monocytogenes*, levaduras y mohos según la Norma para Leche Cruda de Cabra y Oveja correspondiente a productos sin tratamiento térmico (R.D. 1679/94, B.O.E. 24/09/94; R.D. 402/96, B.O.E. 8/4/96). Las siembras de cada muestra se realizan por duplicado a partir de tres diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} y

10^{-3}) en agua peptonada Difco (www.vgdusa.com). Para las siembras en masa se utiliza 1 mL y 0,1 mL cuando es en superficie.

En el recuento de colonias, sólo se consideran las placas en las que han crecido entre 30 y 300 colonias. El número de unidades formadoras de colonias se determina según la Norma UNE 34-805/1983 (B.O.E. 162 8-07-1985) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum C}{[n_1 + (n_2/10)]d}$$

donde $N = n^\circ$ de ufc g^{-1} o mL^{-1} , $\sum C =$ suma de todas las colonias en las placas contadas, $n_1 =$ número de placas en la primera dilución contada, $n_2 =$ número de placas en la segunda dilución contada, y $d =$ dilución en la que se ha realizado el primer recuento.

a) Aerobios mesófilos

El recuento de la flora aerobia mesófila se realiza mediante siembra en masa en agar para recuento en placa (PCA) de Oxoid[®] (www.oxid.com) al que se le adiciona cloruro de trifenil tetrazolio (TTC Solution) de Oxoid[®] al 0,2% *p/v* con el fin de visualizar mejor las colonias y facilitar el recuento. Las placas se incuban en una estufa de cultivo Selecta (207, Barcelona) a $30 \pm 1^\circ C$ y la lectura se realiza a las 72 h.

b) *Enterobacteriaceae*

El recuento de *Enterobacteriaceae* totales se realiza mediante siembra en masa en agar Biliado-Rojo Violeta-Glucosa (VRBG) de Oxoid[®] pH 7. Una vez solidificado, se adiciona una segunda capa de agar. La incubación se realiza a $37 \pm 1^\circ C$ en una estufa Selecta (207, Barcelona) durante 24 h. Se consideran enterobacterias las colonias teñidas de color rojo violeta, rodeadas de un halo de precipitación también de color violeta. Posteriormente se confirma que las colonias observadas corresponden a la familia *Enterobacteriaceae* mediante siembra de dos colonias típicas sobre agar VRBA que se incuban a $37 \pm 1^\circ C$ durante 24 h. De esta siembra se seleccionan dos colonias típicas y se estrictan sobre agar nutritivo (PCA) de Oxoid[®], incubándose a $37 \pm 1^\circ C$ durante 24 h y a partir de las colonias aisladas se realizan las pruebas bioquímicas

confirmativas de oxidasa y fermentación de agar hierro Kliger (KIA) de bioMerieux® (www.biomerieux.com). La **Figura 4** muestra una placa de petri con colonias típicas de enterobacterias.

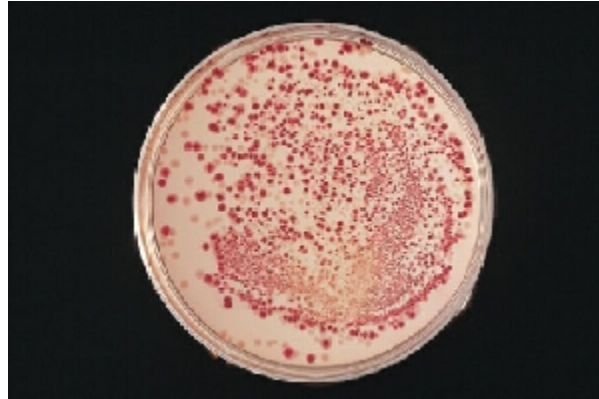


Figura 4. Colonias de enterobacterias en agar VRBG

c) *Escherichia coli*

El recuento de *Escherichia coli* se realiza mediante siembra en masa, con el medio cromogénico selectivo Coli ID de bioMérieux® siguiendo la Norma **AFNOR (BIO 12/5-01/99)**. Las placas se incuban a $44 \pm 0,1^\circ\text{C}$ en una estufa Memmert (Alemania, www.memmert.com). El recuento de las típicas colonias color rosa a violeta se realiza a las 24 h. En la **Figura 5** se aprecian colonias de bacterias coliformes, las que aparecen coloreadas de color rosa violáceo corresponden a *E.coli*.

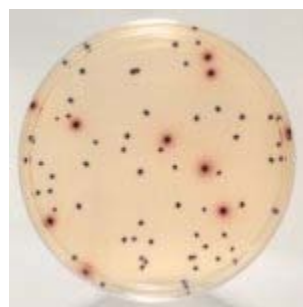


Figura 5. Colonias características de coliformes

d) *Salmonella* spp.

Para el recuento de salmonela, se siguen los siguientes pasos:

1) *Preenriquecimiento*. Se pesan 25 g de leche y se incuban en 225 mL de agua de peptona tamponada estéril de bioMerieux. Una vez homogeneizada la mezcla, se incuba a 37°C durante 16-20 h.

2) *Enriquecimiento*. A partir del caldo de preenriquecimiento se siembran 0.1 mL en Rappaport-Vasiliadis (RV) de Oxoid® y 1 mL en Mueller Kauffman Tetrathionate Broth Base de Oxoid® al que se adiciona solución yodo-yoduro potásico y solución verde brillante. Ambos medios se incuban a 42°C durante 18-24 h.

3) *Aislamiento*. A partir de los tubos de enriquecimiento de Rappaport-Vasiliadis y Mueller Kauffman se siembra por estría en placas de Agar Xilosa lisina desoxicolato (XLD) de bioMerieux® y SM ID de bioMerieux® que se incuban a 37°C durante 18-24 h (**Figura 6**).

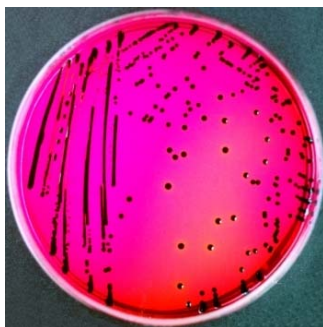


Figura 6. Colonias características de *Salmonella* spp. en agar XLD

4) *Confirmación*. Se aíslan colonias de aspecto típico de *Salmonella* en los medios de aislamiento y se investiga la formación de H₂S y la actividad lisina decarboxilasa mediante la siembra en agar hierro Kliger (KIA) de bioMerieux® y en agar lisina hierro (LIA) de Merck® (www.merck.de/microbiology). También se realiza la determinación de la actividad β-galactosidasa mediante discos impregnados de ortonitrofenil beta-D-galacto piranósido (O.N.P.G.) de Oxoid®. Se verifica la presencia de *Salmonella* spp., en aquellas colonias que dieron positivo a las tres pruebas anteriores mediante la identificación bioquímica con la galería comercial API 20E de bioMerieux®.

e) *Staphylococcus aureus*

Los recuentos de estafilococos se obtienen mediante siembra en superficie en el medio para estafilococos coagulasa positivos, Baird Parker RPF-agar (bioMerieux)® según la Norma **UNE-EN ISO 6888-2:2000**. Tras la siembra, las placas se incuban a

37 ± 1°C durante 48 h. Las placas se observan a las 24 y 48 h y se consideran positivas las colonias de color gris negro rodeadas de un halo opaco como se puede observar en la parte inferior de la **Figura 7**.

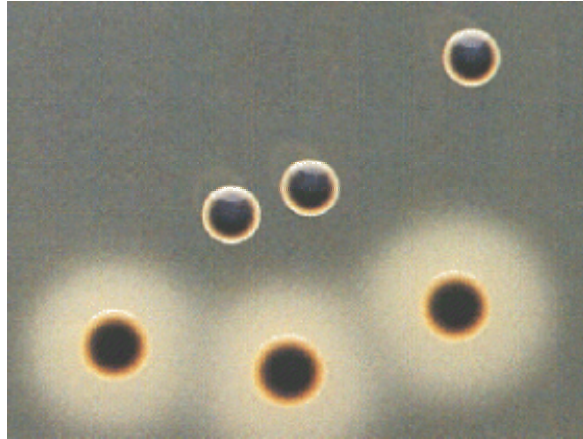


Figura 7. Colonias con halo, típicas de *Staphylococcus aureus*, en agar Baird Parker

f) *Clostridium* sulfito-reductores

Para el recuento de este tipo de microorganismos, se utiliza el medio de cultivo Agar Sulfito Polimixina Sulfadiacina (SPS) de Merck®. La siembra se realiza en masa en tubos con 20 mL del medio de cultivo, que una vez agitados se cubren con una capa de parafina estéril. La incubación se realiza a 37°C durante 24 h. Las colonias negras se consideran *Clostridium* sulfito-reductores (**Figura 8**).

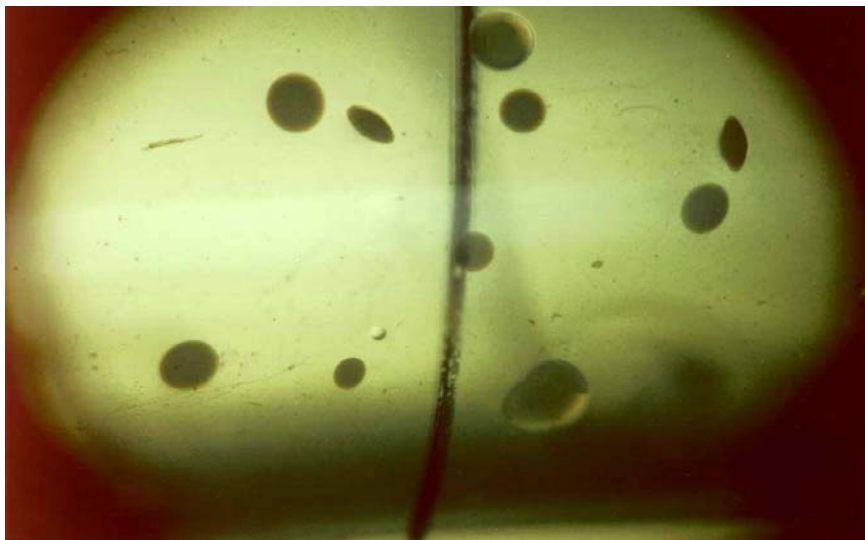


Figura 8. Colonias negras de *C. Sulfito-reductores* en agar SPS

g) *Listeria monocytogenes*

La determinación de esta bacteria se realiza en el Laboratorio de la Consejería de Sanidad y Consumo de la Región de Murcia, mediante el empleo de un inmunoanalizador automático VIDAS LMO (bioMérieux, Francia), basado en la técnica inmunoquímica de fluorescencia.

Cuando se obtienen lecturas $\geq 0,05$ se confirma la existencia de *Listeria monocytogenes* mediante la siembra en superficie de la suspensión de enriquecimiento del caldo de Fraser sobre un agar PALCAM (bioMérieux, Francia) o agar OXFORD (bioMérieux, Francia) y luego se incuba 24 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en una estufa (**Figura 9**). Las colonias de color verde grisáceo con halo negro características que se desarrollan, a continuación, se identifican y confirman mediante las pruebas bioquímicas utilizando el equipo API-Listeria (bioMérieux, Francia).

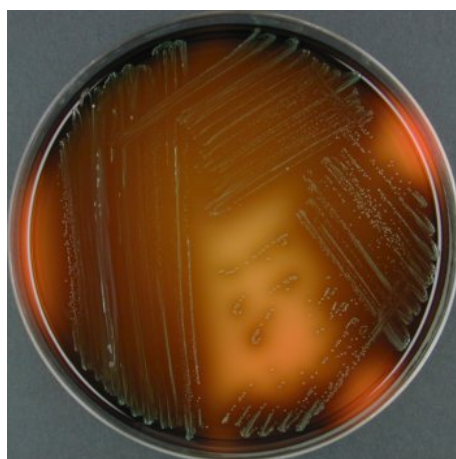


Figura 9. Colonias de *L. monocytogenes* en agar Palcam

h) Mohos y levaduras

El medio de cultivo utilizado es Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (OGYE) Agar base de Oxoid[®]. Tras la esterilización del medio y cuando éste se encuentra a 45°C se adiciona asépticamente un vial de OGYE Selective Supplement de Oxoid[®], se siembra en masa y se realiza la incubación a 25°C durante 5 días. Las colonias de mohos y levaduras se cuantifican conjuntamente (**Figura 10**).



Figura 10. Colonias de levaduras desarrolladas en medio agar OGYE suplementado

III. 2. 2. Cuajo en pasta de cordero

Los cuatro cuajos en pasta de cordero elaborados según se describe en el Apartado **III. 1** de Material y Métodos se conservan refrigerados hasta el final de la fase experimental. Durante el tiempo de conservación, se toman muestras periódicas que se analizan para estudiar la evolución de la actividad enzimática (coagulante, proteolítica y lipolítica) y adaptación tecnológica (tiempo de coagulación, tiempo de corte, velocidad de endurecimiento, dureza máxima) de cada uno de los cuajos en estudio. Los resultados obtenidos constituyen el criterio de selección del cuajo en pasta idóneo para la elaboración de Queso de Murcia al Vino, a fin de obtener un queso de elevada actividad proteolítica y lipolítica que realce los aromas y sabores en este producto.

III. 2. 2. 1. Actividad coagulante y enzimática

La caracterización de los cuajos se valora en base a su actividad coagulante y enzimática.

III. 2. 2. 1. 1. *Determinación de la actividad coagulante*

La actividad coagulante se estima mediante determinación del tiempo de coagulación de Berridge en muestras de leche en polvo desnatada estándar (Chr. Hansen lote 149-2, Maryland & Virginia, MD Foods, www.chr-hansen.com) según la Norma **FIL-IDF 110A (1987)**.

III. 2. 2. 1. 2. *Actividad enzimática*

La valoración de la actividad hidrolítica de los cuajos en pasta se realiza en base a su actividad proteolítica y lipolítica.

a) Actividad proteolítica

Como consecuencia de las características peculiares del cuajo en pasta, la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) no recomienda el método de cromatografía de intercambio iónico (Norma **FIL-IDF 110B:1997**) para la determinación del porcentaje de quimosina y pepsina en este tipo de cuajos.

La determinación del contenido de quimosina de los cuajos en pasta se realiza en base al cálculo del “Factor F”, que se define como el cociente de las actividades coagulantes (norma **FIL-IDF 157A:1997**) de la muestra en leche estándar a valores de pH 6,0 y 6,5. El porcentaje de quimosina de las muestras se estima mediante regresión lineal entre la concentración de quimosina de mezclas de estándares de quimosina (98,2% de quimosina, 987 IMCU, cuajo en polvo) y pepsina (98,8% de pepsina y 990 IMCU, cuajo en polvo), combinados en diferentes proporciones (Norma **FIL-IDF 157:1992**), y sus valores “F”.

b) Actividad lipolítica

Se evalúa mediante la actividad lipasa que es determinada por el grupo de investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco, según el método descrito por VALIVETY *et al.* (1992), conocido como el método pH-stat que utiliza tributirina (Fluka, Madrid, www.sigmaaldrich.com) emulsionada como sustrato. Los ácidos grasos libres liberados se cuantifican mediante cromatografía gaseosa (CHÁVARRI *et al.*, 1997).

III. 2. 2. 2. Aptitud a la coagulación

La valoración de la aptitud a la coagulación de los cuajos de cordero en pasta se determina mediante el empleo de un sensor de dispersión de radiación infrarroja porque esta tecnología de monitorización de la coagulación constituye el método en línea, comercialmente disponible, que ha sido más rigurosamente caracterizado hasta el momento.

Dicha señal contiene información sobre los cambios físicos, el tamaño y/o la estructura de las micelas de caseína durante la hidrólisis enzimática y la formación del gel (CASTILLO, 2001). Se observa que el perfil de dispersión aumenta sigmoidalmente durante la coagulación ácida, enzimática y mixta. El aumento de señal depende del tipo de leche (15-21%, leche de cabra; 50%, leche desnatada de vaca). La ratio de dispersión comienza con un valor unidad y representa el porcentaje de aumento de la señal durante la coagulación. El perfil de dispersión muestra un período de latencia (**Figura 11, I**), en el que las reacciones de hidrólisis predominan sin cambio detectable en la ratio de dispersión. El perfil de dispersión muestra un período de latencia (**Figura 11, I**), en el que las reacciones de hidrólisis predominan sin cambio detectable en la ratio de dispersión.

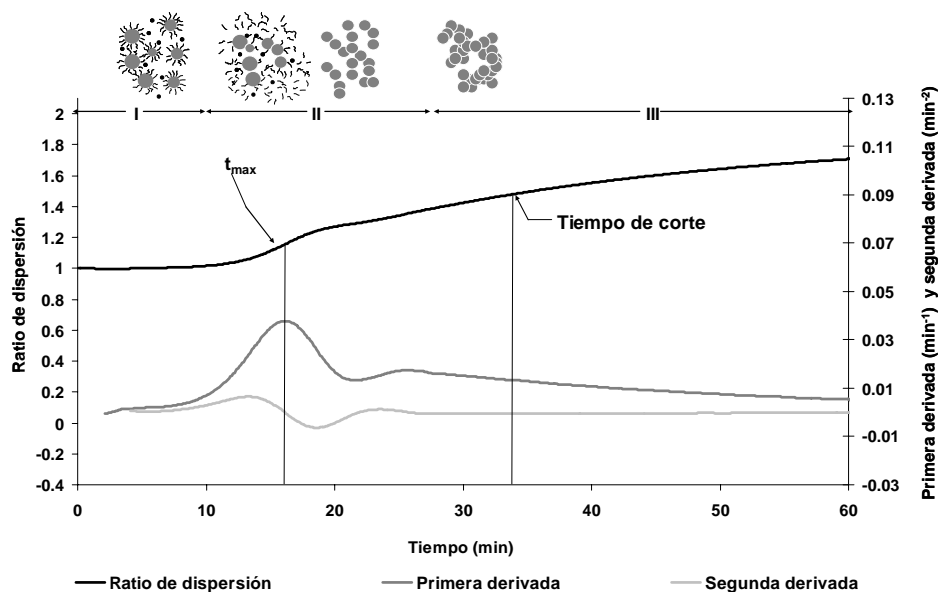


Figura 11. Perfil de dispersión durante la coagulación de leche de cabra y su primera y segunda derivadas según CASTILLO *et al.* (2004a)

La ratio de dispersión aumenta durante la formación del gel debido a la unión entre las micelas de caseína. Como consecuencia, se distingue un período sigmoidal (**Figura 11, II**) donde las reacciones de agregación micelar predominan, y un período asintótico (**Figura 11, III**) donde la unión entre las micelas de caseína continúa mientras se desarrolla la firmeza del gel. A partir del perfil de dispersión se obtiene el parámetro t_{max} (tiempo desde la adición de enzima hasta que se alcanza la velocidad máxima de incremento de la ratio de dispersión). El parámetro t_{max} se correlaciona fuertemente con la constante de hidrólisis enzimática (SAPUTRA, 1992). CASTILLO (2001) determina que t_{max} se corresponde con un grado de conversión de caseína $\alpha = 0,78$ y demuestra que t_{max} predice con eficacia el tiempo de coagulación de Berridge (R^2

= 0'991 y $SEP = 54$ s). Dicho autor estima que t_{max} representa un 89% del tiempo de coagulación de Berridge. En otras palabras, el sensor mide indirectamente la velocidad de la reacción de hidrólisis mediante el parámetro t_{max} . De hecho, cuando la temperatura, pH, concentración de calcio o de enzima cambian, t_{max} varía en consonancia. CASTILLO (2001) observa que t_{max} varía inversamente con la concentración de enzima de acuerdo con la ecuación de Foltmann, al igual que el tiempo de coagulación de Berridge, mientras que la pendiente del perfil de dispersión a $t = t_{max}$ sigue la ecuación de Arrhenius en función de la temperatura.

Otra ventaja del empleo de la dispersión de radiación NIR reside en que, como se observa en la **Figura 11**, el perfil de dispersión no sólo contiene información sobre la constante de velocidad de hidrólisis, sino también sobre las constantes de velocidad de los procesos de formación del gel. De hecho, CASTILLO (2001) obtiene los valores de las constantes de velocidad de las reacciones de agregación micelar, k_2 , y endurecimiento del gel, k_1 , a partir del perfil de dispersión. No resulta sorprendente, por tanto, que el parámetro óptico t_{max} también esté fuertemente correlacionado con el tiempo de corte. CASTILLO *et al.*, (2004b) demuestran la eficacia de t_{max} como método de monitorización de la coagulación de leche de cabra y de predicción del tiempo de corte durante la elaboración de queso de Murcia al Vino, y establecen rangos de valores típicos de los parámetros de dispersión para este tipo de queso (CASTILLO, *et al.*, 2005).

a) Características del equipo NIR de fibra óptica

Para los ensayos se utiliza leche en polvo desnatada (Chr. Hansen, Maryland & Virginia) reconstituida según la Norma **FIL-IDF 110A (1987)**.

La monitorización de la medida de dispersión de radiación NIR se realiza en una cuba de acero inoxidable ($15 \times 13,3 \times 15$ cm) tal como aparece en la **Figura 12**, equipada con una tapa recubierta con aislante térmico para reducir el enfriamiento superficial de la muestra por evaporación. A la cuba se le practica una perforación en la pared para la inserción del sensor óptico.

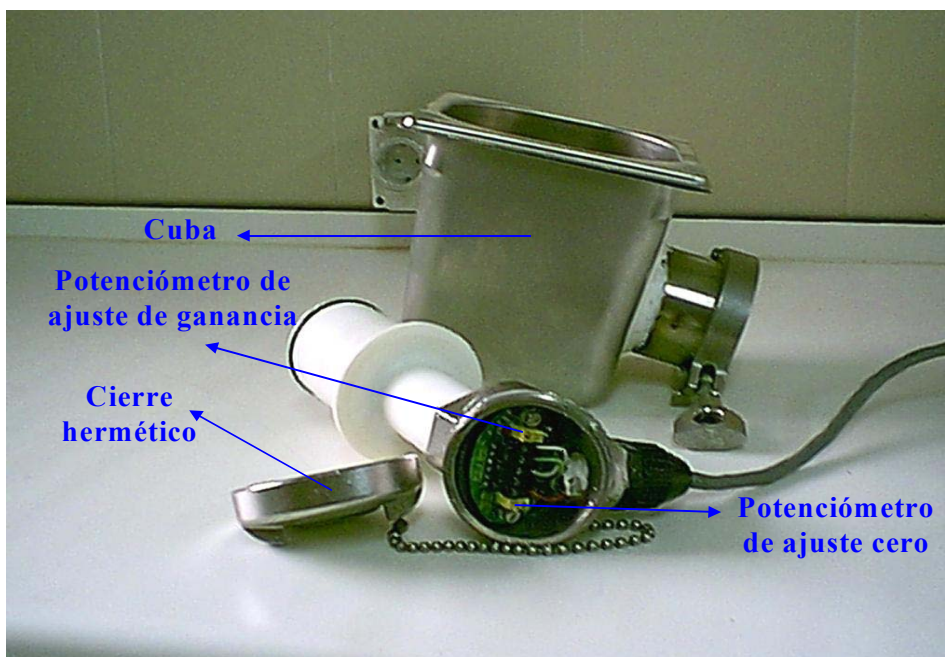


Figura 12. Detalle de la cuba de coagulación y sensor CoAguLite 4 A (CASTILLO, 2001)

La temperatura de la leche se controla por inmersión de la cuba en un baño termostático (Selecta modelo Digiterm 100, Barcelona, precisión $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$). El equilibrio térmico de la muestra se comprueba mediante determinación de la temperatura de agua y leche con un termómetro digital (Digitron modelo T206 TC, Inglaterra, precisión $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, www.digitron.co.uk). Tras la adición de la enzima, la leche se agita durante un minuto para distribuir la enzima de forma homogénea. La monitorización de la coagulación mediante el sensor de fibra óptica se inicia a partir de que se añade la enzima.

Para la obtención del perfil de dispersión de radiación NIR durante la coagulación se emplea un sensor de fibra óptica modelo CoAguLite 4A (Reflectronics, Inc., Lexington, KY, EEUU; www.reflectronics.com). Las piezas metálicas están fabricadas en acero inoxidable (316 SS). Por su diseño, el sensor es compacto, rígido, sanitario (estándar sanitario, 3A, 46-01), resistente a la corrosión y hermético.

Los sensores CoAguLite, cuantifican la intensidad de la radiación NIR dispersada por las micelas de caseína que es linealmente convertida en una señal de 4-20 mA, que a través de una resistencia de $250\ \Omega$, proporciona un voltaje de 1 a 5 V. El sensor requiere para su funcionamiento de 10-24 voltios de corriente continua y consta de una fibra óptica de $600\ \mu\text{m}$ de diámetro que transmite hasta la muestra de leche luz de 880 nm procedente de un fotodiodo (LED), y de una segunda fibra del mismo grosor, que

conduce la radiación dispersada por las partículas de la muestra hasta un fotodetector de silicio (mod. TSL 245 detector, Texas Instrument Incorporated, Dallas, TX, EEUU; www.ti.com).

El sistema de adquisición de datos se compone de un ordenador personal (pentium) equipado con un convertidor analógico digital (DAS 802, Keithley Instrument Inc., Cleveland, OH, EEUU; www.keithley.com). El sistema está programado para adquisición y procesado de datos a tiempo real usando Visual Basic.net (Microsoft Corporation, Redmond, WA) (www.microsoft.com) y VTX 1.1 (Keithley Instrument Inc., Cleveland, OH). El conjunto del equipo aparece en la fotografía de la **Figura 13**.

b) Calibración del sensor

El equipo se conecta al menos una hora antes de proceder a su calibración para garantizar el equilibrio térmico entre el LED y el fotodetector. La calibración se realiza ajustando la señal de salida del sensor para conseguir suficiente respuesta durante la coagulación. Puesto que la señal de salida del sensor está comprendida entre 4 y 20 mA, la señal obtenida en ausencia de dispersión (dispersión cero) debe ajustarse mediante el potenciómetro situado en el cabezal exterior de la sonda, indicado en la **Figura 12**.

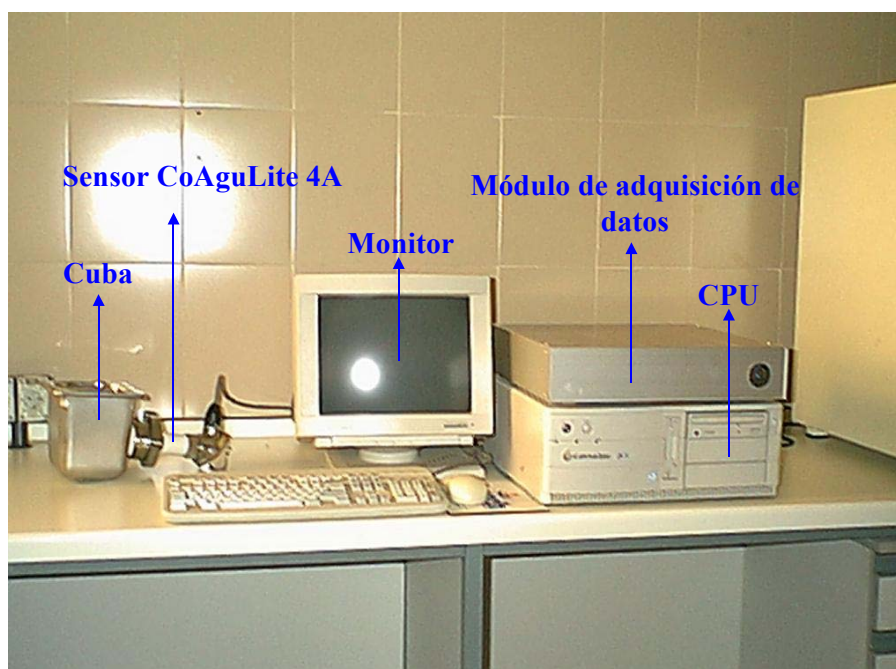


Figura 13. Equipo de medición de dispersión NIR. CASTILLO, (2001)

La señal tras la coagulación no debe ser superior a 5 V (20mA). El blanco (señal en leche sin coagular) debe ajustarse a un voltaje aproximadamente igual al 25% de la

escala total (8 mA). Colocando una tapa negra de goma en el extremo distal del sensor se ajusta la señal correspondiente al valor de dispersión cero, equivalente a un potencial de 1 V (4 mA), mientras que la ganancia correspondiente a la reflectancia habitual en leche se ajusta, con el sensor inmerso en leche, a una señal aproximada de 2 V (25% de incremento de señal).

c) Obtención del perfil de reflectancia

El voltaje se mide cada 2 s, en función de la intensidad de dispersión, almacenándose cada 6 s la media de tres medidas. Los primeros 10 registros de voltaje (1 minuto de datos), corregidos con respecto al valor cero de dispersión (1 V) y promediados, constituyen el voltaje inicial (V_0). El sistema calcula, a tiempo real, un cociente de dispersión construyendo un perfil de dispersión con respecto al tiempo.

La ratio de dispersión (R) se calcula mediante división del voltaje medido a cada tiempo (menos 1 V correspondiente al cero de dispersión) por V_0 . También se calcula a tiempo real la primera derivada de la ratio de dispersión con respecto al tiempo (R'), empleando lotes de 4 minutos de las medidas más recientes (41 puntos). La pendiente de cada lote de datos se calcula mediante regresión lineal cada 6 s, y se asigna al punto medio de cada lote de datos.

d) Parámetros de dispersión de NIR

Los parámetros objeto de estudio obtenidos a partir del perfil de dispersión en función del tiempo (**Figura 14**) son:

- t_{\max} , tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la primera derivada (min).
- R_{\max} , ratio de dispersión a tiempo t_{\max} (adimensional).
- R_{cut} , ratio de dispersión en el tiempo de corte visual (adimensional).
- R'_{\max} , máximo valor de la primera derivada de la ratio de dispersión (min^{-1}).
- t_{cut} , tiempo desde la adición de la enzima hasta el corte visual (min).

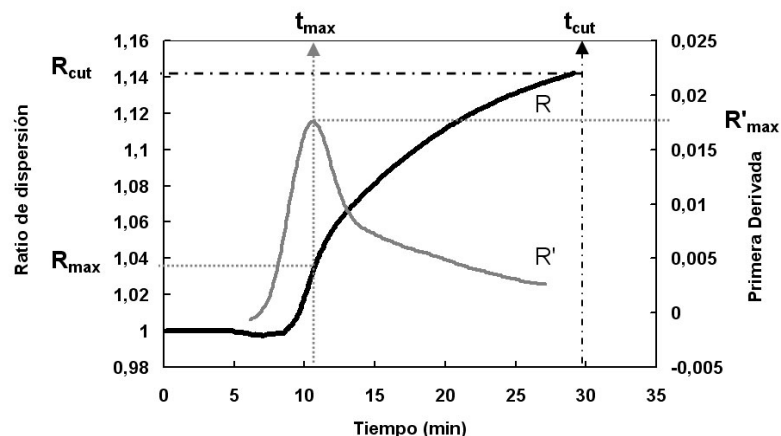


Figura 14. Curva característica de la dispersión de la luz en función del tiempo y parámetros derivados. R, perfil de dispersión; R', primera derivada de R

III. 2. 2. 3. Parámetros microbiológicos

A partir de los extractos acuosos (obtenidos del cuajo de cordero en pasta seleccionado) utilizados para elaborar el Queso de Murcia al Vino, se realiza el recuento microbiológico de las mismas especies microbianas determinadas en leche a excepción del recuento de *L. monocytogenes*, que no se realiza en cuajos. Los procedimientos empleados para el recuento de la flora microbiana son idénticos a los ya descritos para las muestras de leche (Apartado **III. 2. 1. 6**).

III. 3. ELABORACIÓN DE QUESO DE MURCIA AL VINO

Las elaboraciones experimentales de queso de Murcia al Vino, se realizan en la Planta Piloto de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia. Se emplea una cuba experimental cerrada “doble O” (**Figura 15**) de acero inoxidable AISI-304 de 50 litros de capacidad (Talleres Cameselle S. L., Vigo, www.cameselle.com).



Figura 15. Cuba experimental utilizada para elaborar el Queso de Murcia al Vino

Las características de la cuba son:

- a) Dimensiones: Largo 75 cm; Ancho 50 cm y Alto 151 cm.
- b) Peso aproximado: 150 kg (Bastidor incluido).
- c) Moto reductor: Tipo S/F; Potencia 0,09 kW; Velocidad máxima 17,5 r.p.m.; Par máximo 25,5 N.m.
- d) Sonda de Temperatura: Tipo PT-100; Conexión G ½"; Rango -50°C a + 250°C.
- e) Cilindro de levantamiento: Diámetro 50 mm; Carrera 100 mm; Presión de trabajo $6 \cdot 10^5$ Pa; Fuerza de empuje 1155 N; Conexiones G 1/8".
- f) Válvula de Pilotaje Cilindro: Tipo 3/2 de posición mantenida; Accionamiento manual de tirador; Conexiones G 1/8".
- g) Válvula llenado de leche: Tipo Mariposa manual; Conexión DN 25.
- h) Válvula limpieza: Tipo Mariposa manual; Conexión DN 25.
- i) Válvula vaciado: Tipo tornillo; Estanqueidad junta de teflón.
- j) Orientación liras: Corte /Arrastre manual con fijación mediante pasador.
- k) Conexiones serpentín: G ½" macho.
- l) Conexión entrada a camisa: G ¾" macho.
- m) Esferas de lavado: Presión mínima $1,5 \cdot 10^5$ Pa; consumo 50 L min^{-1} .

Para la monitorización del proceso de coagulación se instala en la pared de la cuba un sensor CoAgulite modelo 4A como se muestran en las **Figuras 16 y 17**.



Figura 16. Vista general de la cuba de cuajado y del equipo de adquisición de datos NIR

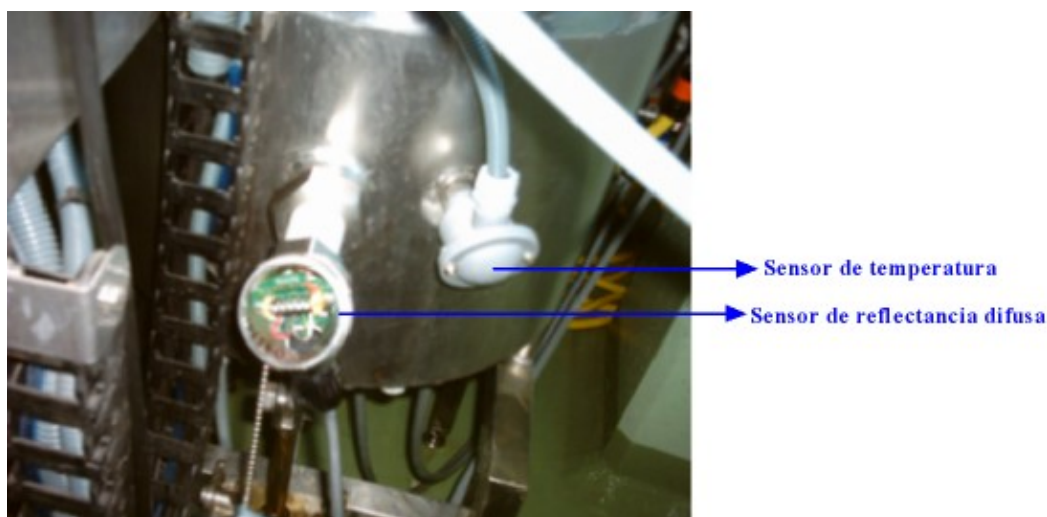


Figura 17. Detalle de las sondas de reflectancia difusa y termométrica conectadas a la cuba de cuajado

La leche pasteurizada utilizada en las elaboraciones de Queso al Vino procede de la quesería Villa Vieja de Calasparra (Murcia), que está inscrita como empresa elaboradora autorizada del Consejo Regulador de la D. O. del queso de Murcia al Vino.

Un total de cuatro elaboraciones se realizan en dos días (días 1 y 2) con una diferencia de dos días entre las mismas. En la primera elaboración del día 1, se utiliza cuajo de ternera comercial (Caglio Star S. A., Cieza, Murcia www.ciudadanos.cieza.net/cagliostar/) con un 80% de quimosina y 180 IMCU, a una concentración de $0,14 \text{ mL kg}^{-1}$ de leche. Para la segunda elaboración de ese día se emplea el cuajo en pasta de cordero experimental seleccionado (ALF): 71,1% de quimosina, 177 IMCU, actividad lipasa $4,57 \text{ U g}^{-1}$, que se añade a una concentración de

0,20 mL (de extracto acuoso del cuajo en pasta) kg^{-1} de leche. El extracto acuoso del cuajo en pasta se obtiene mezclando 60 g de cuajo en pasta previamente homogeneizado, con 100 mL de agua potable, en un frasco de plástico estéril. A continuación, se tamiza la mezcla mediante una gasa estéril, y se recoge el filtrado en otro frasco de plástico estéril.

Las concentraciones de ambos cuajos se seleccionan para obtener un tiempo de corte de la cuajada de 40 ± 10 min. El día 2 se repite el mismo esquema de elaboración con el objeto de efectuar las fabricaciones por duplicado. Todas las elaboraciones son realizadas por un experto quesero acreditado, y bajo la supervisión de un representante del Consejo Regulador de la D. O. de Queso de Murcia al Vino.

La leche pasteurizada se calienta hasta $33\text{-}34^\circ\text{C}$. A dicha temperatura, se agregan los cultivos iniciadores, previa dilución en leche, que actúan durante veinte minutos hasta que la leche alcanza un pH aproximado de 6,58.

Los cultivos iniciadores utilizados son una mezcla liofilizada de *Lactococcus lactis* subs. *lactis* y *cremoris* y *Streptococcus thermophilus*. Los cultivos se añaden en una proporción de 0,13 g de liofilizado DOM 3 (CSL, Caseario Sperimentale Lattiero, Italia, www.ilclodi.it) y 0,24 g de liofilizado STA-IDC 12 (CSL) por cada 50 L de leche.

Una vez que la leche alcanza la acidez deseada, se añaden 20 mL de disolución comercial de CaCl_2 48,78% *p/v* (Betelgeux, S. A. Gandía, Valencia, www.betelgeux.es). Posteriormente, y según corresponda, se añade el cuajo de ternera comercial o el extracto de cuajo en pasta de cordero, a las concentraciones señaladas. Una vez alcanzada la firmeza adecuada en el gel, se realiza un primer corte moderado durante 1 minuto y se deja la cuajada en reposo durante ~ 4 minutos. Entonces, se realiza un segundo corte de la cuajada hasta conseguir un tamaño de grano de $\sim 6\text{-}8$ mm.

A pH 6,50, se realiza el lavado de la cuajada mediante la eliminación de un 15% del volumen total de suero, que se reemplaza por agua potable a 37°C . El grano se trabaja hasta alcanzar un tamaño y textura adecuados. Posteriormente la cuajada se introduce en moldes de plástico cilíndrico, lisos a los que se les incorpora gasas para su prensado. Seguidamente, se prensan los moldes a 1 atmósfera de presión manométrica ($98 \cdot 10^3$ Pa) durante 1 h, se incrementa la presión hasta 2 atm ($196 \cdot 10^3$ Pa) y se mantiene dicha presión durante ~ 60 min, hasta que el pH del queso alcanza un valor de $\sim 5,3$. Tras el prensado se introducen las piezas de queso en salmuera (17°Bé , 8°C , pH 5,4 ajustado

con ácido láctico 80% *p/v*) durante 15 h. Tras el salado se trasladan los quesos en refrigeración (~10°C) a las instalaciones de la quesería Villa Vieja (Calasparra, Murcia) para su baño en vino y maduración. Los quesos se maduran a 12°C y 85% de humedad y los baños en vino tinto de doble pasta se realizan según el siguiente esquema:

- Primer baño, a la entrada en la cámara de maduración (30 minutos).
- Segundo baño a los 7 días (15-30 minutos, según el estado de la corteza).
- Tercer baño a los 14 días (15-30 minutos, según el estado de la corteza).
- Último baño a los 21 días (0-15 minutos, según el estado de la corteza).

El diagrama de flujo correspondiente al proceso de elaboración de Queso de Murcia al Vino se encuentra en el Apartado **I. 3. 2.** de esta Memoria de Tesis Doctoral.

Los quesos (5 piezas de cada elaboración; 20 piezas en total), permanecen bajo estricta supervisión de personal técnico autorizado de dicha quesería hasta los días 45 y 60 de maduración, momento en el que se procede al traslado de las piezas a las instalaciones del Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia, para su posterior análisis. Las piezas correspondientes a los 2 días de maduración permanecen en el Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología para su análisis.

III. 4. CARACTERIZACIÓN DE LOS QUESOS DE MURCIA AL VINO

III. 4. 1. Parámetros físico-químicos

Las determinaciones fisicoquímicas realizadas en los quesos experimentales obtenidos (a excepción de los ácidos grasos libres que se efectúan en la Universidad del País Vasco), se realizan en los laboratorios del Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia según se detalla a continuación.

A partir de cada uno de los quesos elaborados se obtienen trozos de ~150 g que se envasan a un vacío de 0,98 atm manométricas ($9,6 \cdot 10^4$ Pa) en una cámara de envasado INELVI (500, Barcelona, www.inelvi.com) en bolsas de plástico y se congelan en una ultra congeladora Sanyo Electric Co. Ltd. (MDF U3086 S, Japón, www.sanyo.com) a –80°C hasta su análisis fisicoquímico.

Tras la descongelación de los quesos, a temperatura de refrigeración (3-4°C) durante 24 h, las muestras se trituran con una picadora Moulinex (España, www.moulinex.com), se envasan en botes herméticos de propileno y se refrigeran (3-4°C) hasta su análisis que se realiza antes de 24 h.

1) *Determinación del pH*

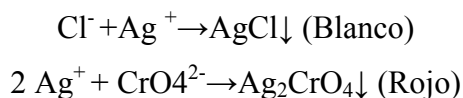
Se realiza según el procedimiento descrito en el Apartado **III. 2. 1. 1**), correspondiente al procesado de muestras de leche. Previa trituración de la muestra (5 g) y posterior suspensión en 30 mL de agua destilada, ésta se agita en un multiagitador magnético Selecta (Agimatic-N, Barcelona) durante 10 minutos, y se procede a la determinación de pH por triplicado.

2) *Determinación del extracto seco total*

Se procede según el método para muestras de leche descrito en el Apartado **III. 2. 1. 3**). Se emplean ~3 g de la muestra de queso triturado que se mezclan con ~10 g de arena de mar lavada y previamente desecada en la cápsula de porcelana. Las muestras se analizan por triplicado.

3) *Determinación de cloruro sódico*

La determinación de Cl⁻ en el queso, expresada como NaCl, se realiza mediante la extracción de Cl⁻ en agua caliente, filtrado y valoración con AgNO₃ utilizando K₂CrO₄ como indicador. El punto de viraje se observa mediante la formación de un precipitado rojo de Ag₂CrO₄ según las siguientes ecuaciones químicas:



En un vaso de precipitado se pesan ~5 g ($\pm 0,1$ mg) de queso triturado. A continuación se añaden ~30 mL de agua destilada caliente (60-70°C) y se homogeniza mediante agitador magnético Selecta (Agimatic-N, Barcelona) durante 5 min.

El contenido se pasa a un matraz aforado de 100 mL. Se repite la operación con otros 30 mL de agua destilada caliente. Se lava varias veces el vaso de precipitado

pasando el resultado de los lavados al matraz hasta el aforo. La solución obtenida se filtra. Se eliminan los primeros 10-20 mL del filtrado y se recoge el resto. Se toman 10 mL del filtrado y se pasan a un Erlenmeyer. Se añaden ~50 mL de agua destilada, 1 mL de la solución de K_2CrO_4 al 5% p/v y ~0,5 g de $NaHCO_3$, y se homogeniza la mezcla. La valoración se efectúa con la solución de $AgNO_3$ 0,1 N hasta que tiene lugar el viraje a la coloración naranja-rojiza.

La concentración de Cl^- , expresado como gramos de NaCl en 100 g de queso, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{g NaCl}{100 g queso} = \frac{V \cdot N \cdot 58,4428}{P}$$

Donde

V = volumen de $AgNO_3$ gastados.

N = normalidad del $AgNO_3$ utilizado

P = peso muestra queso.

Las determinaciones se realizan por triplicado.

A partir del contenido porcentual de NaCl en el queso, y del extracto seco se calcula el porcentaje de NaCl en el extracto seco y en la fracción acuosa.

4) *Determinación de proteína*

Se procede según la misma técnica empleada para muestras de leche que se detalla en el Apartado **III. 2. 1. 4)** del capítulo Material y Métodos, a partir de $0,5 g \pm 0,1 mg$ de muestra.

Las mediciones para cada muestra de queso se realizan por triplicado.

5) *Determinación de grasa*

Se realiza mediante digestión de la muestra con ácido sulfúrico en caliente, tratamiento con alcohol iso-amílico y centrifugación empleando el butirómetro de Van Gulik-Gerber según Norma **ISO 3433:1975 // ISO 3432:1975**.

Esta determinación en cada queso, se realiza por triplicado.

6) *Determinación de la actividad de agua (a_w)*

La a_w del queso se realiza mediante el equipo Novasina[®] (TH 200, Suiza, www.novasina.ch). Para la calibración del aparato se emplean disoluciones salinas saturadas patrones con valores de humedad relativa conocidas (LiCl·H₂O 11%, KCH₃COO 23%, MgCl₂·6H₂O 33%, Mg(NO₃)₂·6H₂O 53%, NaCl 75%, BaCl₂·2H₂O 90% y K₂CrO₇ 98%), comenzando por la de mayor valor de humedad relativa, finalizando con la de menor valor. Se coloca la muestra triturada en la celda del aparato y se espera a que la lectura se estabilice (~1 h). Esta determinación se realiza por duplicado de cada muestra de queso.

7) *Determinación de las fracciones nitrogenadas*

A partir del nitrógeno total contenido en las muestras de queso, se estudian las fracciones nitrogenadas siguientes según la norma **FIL-IDF 25:1964** (BÜTIKOFER *et al.*, 1993):

- Fracción soluble en agua (WSN)
- Fracción soluble en citrato trisódico a pH 4,4 (pH_{4,4}SN)
- Fracción soluble en ácido tricloroacético al 12% *p/v* (TCASN 12%)
- Fracción soluble en ácido fosfotúngstico al 5% *p/v* (PTASN 5%)
- Fracción soluble en etanol al 28,5% *v/v* (ETSN 28,5%)

Todas las determinaciones se realizan por duplicado para cada una de las muestras de queso analizadas.

a) Fracción nitrogenada soluble en agua (WSN)

Se pesan en una balanza analítica 25 g (\pm 0,1 mg) de queso triturado y se introducen en una bolsa plástica conteniendo 125 mL (\pm 0,01 mL) de agua destilada a 40°C. Luego se homogeniza la mezcla en un triturador mecánico IUL Instruments (Masticator, Barcelona, www.iul-instruments.de) durante 5 min. A continuación se introduce en un baño termostatizado durante 1 h a 40°C. El contenido de la bolsa, se centrifuga durante 43 min a 8.200 r.p.m. y 4°C mediante una centrifuga Selecta (Medifriger-BL, Barcelona).

El líquido sobrenadante, de aspecto ligeramente turbio, se filtra a través de lana de vidrio y el filtrado (WSN) se utiliza para determinar el contenido de nitrógeno.

b) Fracción nitrogenada soluble en citrato trisódico a pH 4.4 (pH_{4,4}SN)

Se pesa en una balanza analítica 5 g ($\pm 0,1$ mg) de queso triturado y se mezcla con 100 mL ($\pm 0,01$ mL) de solución de citrato trisódico a pH 7,0 y se homogeniza con la ayuda de un agitador magnético con calefacción a 30°C durante 30 minutos. A continuación, se ajusta el pH de la mezcla a 4,40 ($\pm 0,05$) con una disolución 1 M de HCl. Luego se deja reposar la muestra a 30°C durante 30 min y se filtra utilizando papel de filtro Whatman N° 40. El líquido filtrado (pH_{4,4}SN), se utiliza para determinar el contenido de nitrógeno.

c) Fracción nitrogenada soluble en TCA 12% (TCASN 12%).

Para obtener esta fracción soluble se mezclan en un Erlenmeyer, volúmenes iguales de WSN y de una disolución acuosa de TCA al 24% *p/v*. Después de agitar se deja reposar durante 2 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se filtra mediante papel Whatman N° 40 y el líquido transparente obtenido (TCASN 12%) se utiliza para determinar su contenido de nitrógeno.

d) Fracción nitrogenada soluble en ácido fosfotúngstico al 5% *p/v* (PTASN 5%)

Esta fracción nitrogenada soluble, se obtiene mezclando en un Erlenmeyer 5 ml de WSN con 3,5 mL de H₂SO₄ 3,95 M y 1,5 mL de disolución acuosa de ácido fosfotúngstico de 33,3% *p/v*. Se agita la mezcla y se deja reposar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se filtra con papel Whatman N° 40 y el filtrado obtenido (PTASN 5%) se emplea para determinar su contenido en nitrógeno.

e) Fracción de nitrógeno soluble en 28,5% de etanol (ETSN 28,5%)

Se obtiene mezclando 70 mL de WSN (previamente ajustado a pH 5,5 con HCl 1 M) con 30 mL de etanol de 95%. La mezcla final, se deja durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se filtra mediante Whatman N° 40. El filtrado transparente (ETSN 28,5%) se emplea para determinar su contenido en nitrógeno.

8) *Determinación de los ácidos grasos totales (AGT)*

Para determinar la composición de los ácidos grasos de las muestras de queso, se realiza previamente una extracción lipídica siguiendo la misma técnica detallada en el Apartado **III. 2. 1. 5)** de esta Memoria de Tesis Doctoral.

a) Extracción de la fracción lipídica.

Se realiza siguiendo el mismo método descrito en el Apartado **III. 2. 1. 5a)** del capítulo de Material y Métodos para muestras de leche. Como etapa previa se realiza una homogenización en un equipo ultra-turrax Janke & Kunkel (T25 IKA-Labortechnik, Alemania) de la muestra triturada ($1,0-1,5 \text{ g} \pm 0,1\text{mg}$) a la que se le había agregado previamente 7 mL de H₂O destilada a $\sim 70^\circ\text{C}$, a continuación se agregan 3 mL de NH₄OH, se vuelve a homogenizar y finalmente se lava con 10 mL de etanol absoluto la parte del triturador que toma contacto con la muestra colocando los lavados alcohólicos en el mismo vaso.

La mezcla obtenida se vierte en un embudo de decantación de 250 mL, y a continuación se procede exactamente igual que para las muestras de leche.

b) Derivatización de los ácidos grasos.

Para proceder a la derivatización de los ácidos grasos, se procede como en el Apartado **III. 2. 1. 5b)** del capítulo Material y Métodos.

c) Determinación analítica mediante cromatografía de gases

Esta cuantificación se realiza de la forma expresada en el Apartado **III. 2. 1. 5c)** del capítulo Material y Métodos.

9) *Determinación de ácidos grasos libres (AGL)*

Para el estudio correspondiente de los AGL de cada uno de los quesos de las cuatro fabricaciones de 2, 45 y 60 días de maduración, se envían las muestras envasadas y congeladas a -80°C –como se describe en el apartado **III. 4. 1.-** al laboratorio del grupo de investigación del País Vasco mediante transporte refrigerado (\sim antes de las 24 h).

La **Tabla 11** contiene los AGL cuantificados, su simbología, nombres habituales y sistemáticos.

Tabla 11. Ácidos grasos libres determinados en los Quesos de Murcia al Vino

Símbolo	Nombre Común	Nombre sistemático
C4	butírico	butanoico
iC4	isobutírico	2-metil-propanoico
C5	valérico	pentanoico (patrón interno)
iC5	isovalérico	3 metil-butanoico
C6	caproico	hexanoico
C7		heptanoico
C8	caprílico	octanoico
C9		nonanoico (patrón interno)
C10	cáprico	decanoico
C11		undecanoico
C12	láurico	dodecanoico
C13		tridecanoico
C14	mirístico	tetradecanoico
C14:1	miristoleico	cis-9-tetradecenoico
C15		pentadecanoico
C16:0	palmítico	hexadecanoico
C16:1	palmitoleico	cis-9-hexadecanoico
C17	margárico	heptadecanoico (patrón interno)
C18:0	esteárico	octadecanoico
C18:1c	oleico	cis-9-octadecenoico
C18:1t	elaídico	trans-9-octadecenoico
C18:2c	linoleico	cis-9-cis-12-octadecadienoico
C18:2t	linoelaídico	trans-9-trans-12-octadecadienoico
C18:3	linolénico	cis-6-cis-9-cis-12octadecatrienoico
C19		nonadecanoico
C20	araquídico	eicosanoico
C20:1		cis-11-eicosanoico

Los análisis se llevan a cabo siguiendo la técnica de cromatografía gas-líquido según detallan CHÁVARRI *et al.* (1997). No es necesario derivatizar previamente los AGL y para cuantificarlos se utiliza un equipo Hewlett-Packard (5890, serie II) empleando una columna capilar de sílice de 25 m de largo y 0,32 mm de diámetro revestida con una película de polietilenglicol de 0,52 μm de espesor. Como patrones

internos se utilizan los ácidos pentanoico, nonanoico y heptadecanoico agregados a la muestra de queso en el momento de la extracción, y las determinaciones se realizan por duplicado.

Con la columna utilizada, algunos de los isómeros del C18:1 no se resuelven bien (los picos son complejos y se tiene la certeza que hay más de 1 compuesto), por lo que se procede a cuantificarlos como el compuesto mayoritario en ese tiempo de retención.

III. 4. 2. Parámetros microbiológicos

Se toman 10 g de queso y se añaden 90 mL de citrato trisódico de Merck al 2% *p/v*. Posteriormente, la mezcla se tritura y amalgama, mediante un homogenizador vertical de palas Masticator IUL Instruments (Barcelona) durante 4 min. De esta manera se obtiene la primera dilución decimal. Finalmente, se realizan las determinaciones microbiológicas ya descritas en el apartado **III. 2. 1. 6**).

III. 4. 3. Características organolépticas

Los atributos reológicos y sensoriales de los quesos elaborados, se estudian con la ayuda de un texturómetro y mediante el panel de cata del Consejo Regulador de Queso de Murcia al Vino, respectivamente.

III. 4. 3. 1. Textura

III. 4. 3. 1. 1. *Preparación de las muestras*

A partir de las muestras de queso de 45 y 60 días de maduración se extraen muestras cúbicas de 1 cm³ de volumen a 1 cm de la corteza que se mantienen a 20°C durante 3 h antes de realizar las pruebas.

Este atributo sensorial se evalúa en los quesos elaborados mediante pruebas de compresión uniaxial y de relajación del esfuerzo mediante un analizador de textura TA-TX2 (State Micro System, Survey, Reino Unido) dotado de una célula de carga de 245 N y con una sonda PI00 (plato circular de 100 mm de diámetro).

III. 4. 3. 1. 2. Prueba de compresión uniaxial

La geometría de compresión utilizada se corresponde con un cilindro plano. Antes de la determinación, las muestras se lubrican con vaselina líquida en ambas caras de contacto para eliminar el efecto de fricción (BUFFA *et al.*, 2001). Los ensayos de compresión uniaxial se realizaron a una velocidad de compresión de 80 mm min^{-1} hasta que la muestra alcanza una deformación longitudinal unitaria $\varepsilon = 0,02$ ($\varepsilon = \Delta L/L_0$ donde L_0 es la longitud inicial del cubo). Para cada muestra de queso, se realizan 6 réplicas.

La **Figura 18** muestra la gráfica habitual obtenida durante este tipo de ensayos.

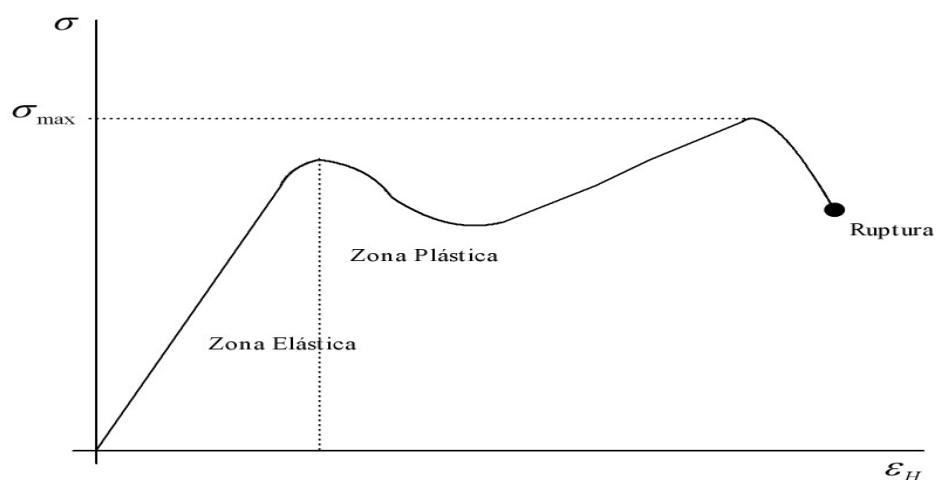


Figura 18. Gráfica característica del esfuerzo (σ) en función de la deformación (ε) de un ensayo de compresión uniaxial.

III. 4. 3. 1. 3. Prueba de relajación del esfuerzo

Cuando se somete a un cuerpo viscoelástico a una deformación constante, la fuerza necesaria para mantener dicha deformación no es constante y decae con el tiempo. A este fenómeno se lo conoce como relajación del esfuerzo.

Estas pruebas de relajación, se realizan con el mismo equipo que la prueba de compresión uniaxial y con la misma metodología de preparación de muestras. La muestra se somete a una deformación longitudinal unitaria $\varepsilon = 0,01$ durante 3 minutos empleando una geometría de compresión cilíndrica que aplica una carga de 245 N sobre la muestra a una velocidad de 200 mm min^{-1} . Se obtiene una curva experimental característica para materiales viscoelásticos y a partir de ésta se calculan las constantes “e” (adimensional) y “r”(s⁻¹) conocidas como parámetros de relajación. Las muestras puramente elásticas proporcionan una gráfica paralela al eje de abscisas, donde el valor inicial del esfuerzo aplicado $Y_{(0)}$ para la deformación se mantendrá constante en el

tiempo porque el material no se relaja. Para un líquido, el esfuerzo tendrá un valor finito mientras dure la deformación y será cero para todos los valores t positivos (ROSENTHAL, 2001) exhibiendo un comportamiento gráfico paralelo al eje de ordenadas (relajación instantánea). Para materiales que tienen un comportamiento reológico intermedio como el queso (viscoelástico), después de la aplicación de un esfuerzo inicial $Y_{(0)}$ durante un determinado tiempo, al principio disminuirá rápidamente el valor inicial del esfuerzo y luego más lentamente dando lugar a valores intermedios de $Y_{(t)}$ en función del tiempo que pueden llegar a ser cero o aproximarse a un valor asintótico. La **Figura 19**, muestra las tres gráficas típicas del esfuerzo que pueden obtenerse para cuerpos sólidos rígidos elásticos, líquidos y viscoelásticos en función del tiempo después de aplicar a cada uno de ellos una deformación durante un tiempo.

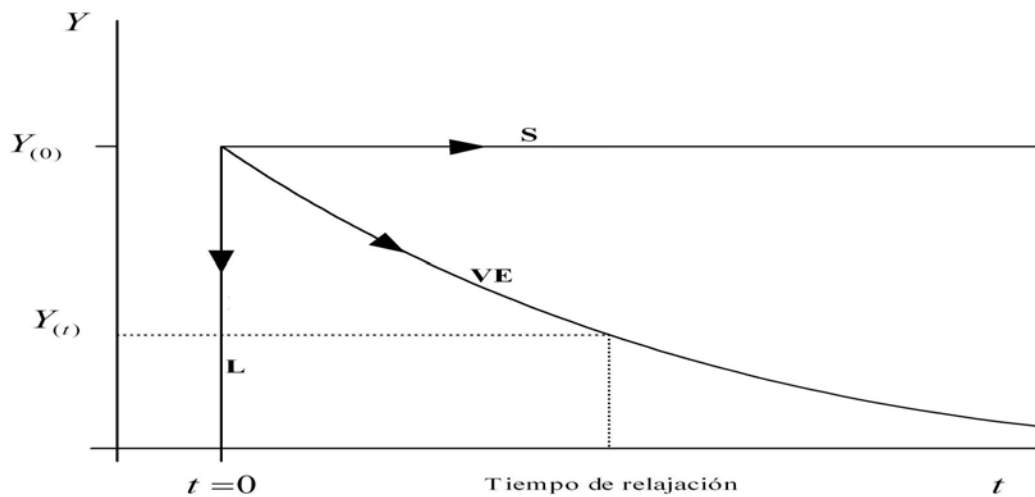


Figura 19. Representación del esfuerzo de un material sólido (S), líquido (L) y viscoelástico (VE), en función del tiempo después de la aplicación súbita de una deformación.

Las curvas de relajación del esfuerzo experimentales se evalúan de acuerdo con la ecuación hiperbólica original de Peleg (1979) (PAVIA *et al.*, 1999):

$$Y(t) = \frac{F_0 - Ft}{F_0}$$

$$\frac{t}{Y(t)} = \frac{1}{(e \cdot r)} + \frac{t}{e}$$

Donde $Y_{(t)}$ es la presión o esfuerzo de relajación normalizada por Peleg, t el tiempo de relajación inmediatamente después de aplicada la deformación y a partir de t igual a cero (**Figura 19**); e y r son constantes conocidas como parámetros de relajación.

El parámetro e es adimensional y se relaciona con el nivel de disminución del esfuerzo (presión) durante la relajación pudiendo tomar valores entre 0 y 1. Cuando e adquiere un valor igual a cero, la presión de relajación $Y_{(t)}$ es cero y se trata de un sólido muy rígido (comportamiento elástico). Por el contrario si alcanza un valor de uno, se trata de un líquido (no deformable a temperatura constante).

La constante r (s^{-1}) representa el rango en el que el esfuerzo se relaja. Si alcanza un valor igual o cercano a cero, entonces $Y_{(t)}$ toma un valor aproximado o igual a cero como en el caso de un sólido rígido elástico ideal, mientras que valores superiores indicarán un comportamiento menos elástico y más viscoso (comportamiento viscoelástico), más aproximado a un líquido.

Para esta prueba se realizan 4 réplicas de cada una de las muestras de queso las cuales previamente se lubrican con vaselina líquida en ambas caras al igual que en las pruebas de compresión uniaxial como se detalla en el apartado **III. 4. 3. 1. 1.**

III. 4. 3. 2. Análisis sensorial

La cata para evaluar los quesos elaborados, se realiza en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, bajo la supervisión de un Técnico del Consejo Regulador.

Para la realización de esta prueba se utiliza un panel compuesto por 10 catadores, que son seleccionados en función de su disponibilidad y aptitudes sensoriales por el Consejo Regulador de la D.O. del Queso de Murcia al Vino.

Una pieza completa y otra cortada a la mitad de cada uno de los cuatro quesos de 45 días de maduración, se exhibe al conjunto de los jueces para la realización de la fase visual donde se realizará la evaluación de la forma, corteza, color de la pasta así como del número y distribución de los ojos. Para estimar el resto de las propiedades organolépticas (olor, sabor, textura, gusto residual) se realiza una fase olfato-gustativa de las muestras de cada uno de los quesos. En esta segunda fase, las muestras se presentan a los jueces en forma de cuñas de ~8 mm de espesor que se sirven en platos a una temperatura de ~15°C. En primer lugar se valoran los quesos elaborados con cuajo comercial y luego los fabricados con cuajo en pasta. Esta misma operación se repite

después de ~30 min de descanso con los quesos correspondientes a los 60 días de maduración.

Cada catador recibe de forma sucesiva 8 muestras de queso en total. De forma previa a la ejecución del análisis los panelistas son informados de que las cuatro primeras muestras de queso corresponden a 45 días de maduración y los restantes a 60 días.

En la **Tabla 12** se muestra la hoja de cata utilizada para calificar los quesos estudiados facilitada por el Consejo Regulador de la D.O. del Queso de Murcia al Vino.

Tabla 12. Ficha de cata utilizada para el análisis sensorial de los quesos de Murcia al Vino

Nota Característica	0= descalificado 1	5	9	Coefficiente	Total puntuación
FORMA	Muy irregular	Regular	Perfecta Cilíndrico Cantos redondeados	2	
CORTEZA	Heterogénea muy enmohecida	Homogénea Limpia	Muy homogénea Muy limpia Color granate oscuro	2	
COLOR DE LA PASTA	Heterogéneo	Normal	Perfecto	1	
OJOS	+ 60 granos	Hasta 60 granos tamaño irregular	max. 30 granos de arroz	1	
TEXTURA	Muy blanda Muy dura	Flexible	Perfecta	3	
OLOR	No característico	Franco	Muy bueno	2	
GUSTO	No característico	Bueno	Muy bueno	3	
GUSTO FINAL	Desagradable	Agradable	Muy agradable	2	

SE CONSIDERA ELIMINADO UN PRODUCTO QUE OBTENGA 0 EN ALGUNA DE SUS CARACTERÍSTICAS

Para cada uno de los atributos valorados existen tres columnas de puntuación, 0-3, 3-6 y 6-9, a las que se asigna un valor orientativo de 1, 5 y 9 respectivamente. En función de la importancia de cada atributo en la percepción global, cada uno de los atributos está ponderado con un coeficiente.

Siguiendo los criterios de puntuación recogidos en la **Tabla 12**, los quesos de Murcia al Vino se clasifican como excelentes aquellos que alcanzan una puntuación entre 136-144; muy bueno entre 125-135; bueno 110-124; aceptable 96-109; regular 76-95 y defectuoso 50-75, eliminándose aquellos quesos con una puntuación inferior a 50.

III. 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis de los datos se realiza mediante el Modelo Lineal General Univariante/Multivariante del paquete estadístico Statistix para Windows (versión 7.0, Analytical Software, USA) o el Modelo Lineal General Univariante/Multivariante del paquete estadístico Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS, versión 9.0.1., 1999). En los modelos estadísticos se introducen los factores experimentales como efectos principales, incluyéndose en el análisis, las interacciones más importantes entre los factores estudiados (en el caso multivariante). El efecto aleatorio ejercido sobre los parámetros estudiados por diversas variables no fijas se considera mediante la inclusión de co-variables en el modelo. Tras un análisis preliminar de los datos, se eliminan todas aquellas interacciones y co-variables que no contribuyen significativamente a la variabilidad de los datos.

El análisis de la varianza (ANOVA) estima el estadístico F de Fisher-Snedecor para contrastar la hipótesis nula de igualdad de medias en los distintos grupos. Dicho estadístico compara la variabilidad debida a las diferencias entre grupos con la debida a las diferencias dentro de los grupos. Para el ANOVA, las medias de mínimos cuadrados (LSM) y la significación de cada tratamiento se computan mediante suma de cuadrados tipo III o IV. Las diferencias entre las medias de los diversos tratamientos se consideraron significativas cuando $P < 0.05$. Como prueba de rango post hoc, para determinar cual es el sentido de las diferencias detectadas por el análisis de varianza, se selecciona el coeficiente de Scheffe.

Para la representación de los resultados se emplea la media aritmética como medida central y la desviación típica o el coeficiente de variación como indicador de la dispersión de los resultados.

IV. 1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS

IV. 1. 1. Leche de cabra Murciano-granadina

La calidad y el rendimiento quesero, están influidos en gran medida por las características de la materia prima empleada para su elaboración. La composición química de la leche de cabra es muy variable al estar determinada por factores tales como: raza, dieta, clima, período de lactancia y medio ambiente (GUO *et al.*, 2004).

Los análisis efectuados sobre las muestras de leche utilizadas para la elaboración de los Quesos de Murcia al Vino se realizaron siguiendo las técnicas descritas en Material y Métodos.

1) *Parámetros fisicoquímicos*

Los valores medios de los parámetros fisicoquímicos básicos analizados en las muestras de leche de cabra Murciano-Granadina (M-G) se detallan en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos en leche de cabra M-G

Muestra	pH	Extracto Seco (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
Leche 1	6.59 ^c ± 0.00	12.71 ^d ± 0.03	4.65 ^b ± 0.06	3.36 ^b ± 0.03
Leche 2	6.57 ^d ± 0.01	13.04 ^c ± 0.01	4.75 ^b ± 0.00	3.36 ^b ± 0.03
Leche 3	6.60 ^b ± 0.00	13.61 ^b ± 0.01	5.20 ^a ± 0.00	3.45 ^{ab} ± 0.07
Leche 4	6.62 ^a ± 0.00	13.85 ^a ± 0.01	5.33 ^a ± 0.04	3.53 ^a ± 0.03
Media	6,60	13,30	4,98	3,43
DE	± 0,00	± 0,02	± 0,03	± 0,04

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Si comparamos los parámetros fisicoquímicos obtenidos para las muestras de leche, se puede concluir que:

- El pH y el extracto seco (ES) de las muestras son significativamente diferentes, correspondiendo los valores más altos de ambos parámetros a la leche 4. El nivel más bajo de pH se observa en la muestra de leche 2, y para el ES en la leche 1.
- El contenido graso (G) de las muestras de leche utilizadas el primer día de elaboración (leches 1 y 2) difieren significativamente de las muestras de leche empleadas el segundo día de elaboración (leches 3 y 4), siendo inferiores los valores correspondientes al primer día.
- En cuanto al contenido de proteína (P), se observa un comportamiento similar al señalado para la G, aunque en un menor grado de significación, donde los menores porcentajes se hallan en las muestras de leche del primer día de elaboración.
- La leche 4 tiene los mayores valores de pH, ES, G y P, mientras que la leche 1 alcanza los niveles más bajos para ES, G y P.

Si consideramos los valores mínimos establecidos para la elaboración de Queso de Murcia al Vino que se refleja en el pliego de condiciones del **Anexo I punto B de la Orden de 11 de julio de 2001 de la Región de Murcia**, las leches del primer día de elaboración (leches 1 y 2) se hallan por debajo del valor establecido en cuanto a G y ES

(4,65% y 4,75% G; 12,71% y 13,04% ES respectivamente), al ser los valores mínimos establecidos de 5,0% G y 13,4% ES respectivamente. Los valores para las restantes (leche 3 y 4) cumplen la legislación vigente.

Para obtener queso fresco de cabra, PÉREZ *et al.* (1991) utilizan leche con contenidos superiores de ES (14,2%) y G (5,69%) y similares de P (3,45%). PIRISI *et al.* (1994) para el mismo tipo de queso parte de valores mucho más bajos 6,57 pH, 10,4% ES, 2,74% G y 2,74% P, comparados con los valores medios determinados en este estudio (**Tabla 13**).

FRESNO *et al.* (1996) para la elaboración de Queso Armada, emplean leche con un pH similar (6,59) y contenidos superiores de ES, G y P (15,8%, 5,58% y 4,35% respectivamente), y en la fabricación de Queso Picante, FREITAS *et al.* (1997) parten de leche con valores más altos de pH y G (6,66 y 5,68%) e inferiores de P (3,28%).

GABORIT *et al.* (2001) elaboran Queso Sainte-Maure empleando leche de cabra con un valor de pH superior (6,75) e inferiores para G (3,89%) y P (3,39%) y los mismos investigadores para la elaboración de Queso de cabra tipo Camembert obtienen en leche un contenido mayor de P (3,77%) y niveles inferiores de pH (6,53) y G (4,46%).

Durante la obtención de Queso Babia-Laciana, FRANCO *et al.* (2003) parten de leche con valores superiores de pH, ES y G (6,66, 15,0% y 6,0%) y un valor proteico inferior (3,2%). En estudios recientes llevados a cabo por SORYAL *et al.* (2005), se elabora queso fresco de coagulación ácida utilizando leche de cabra de diferentes razas cuyos valores medios para Alpina son inferiores (10,1% ES, 2,76% G y 2,53% P) y para Nubian son superiores (13,5% ES, 4,37% G y 3,87% P).

Finalmente, LÓPEZ *et al.* (1999) estudian las variaciones en la composición fisicoquímica de leche de cabra M-G durante 9 meses y obtienen medias superiores para ES, G y P (14,37%, 5,18% y 3,63% respectivamente) y similares para el pH (6,61).

2) Ácidos grasos totales

El origen de los ácidos grasos totales (AGT) en la leche, es fundamentalmente a partir de los triglicéridos (~ 98 %), de los mono y diglicéridos y fosfolípidos, si bien, una pequeña proporción de los mismos se encuentra en forma de ácidos grasos libres.

La determinación cuantitativa de los AGT en la leche permite establecer la influencia que estos compuestos tienen en las propiedades finales del queso, principalmente su sabor.

Los principales AG de la leche de cabra son los mismos que se encuentran en oveja y vaca: butírico (C₄), caproico (C₆), caprílico (C₈), cáprico (C₁₀), láurico (C₁₂), mirístico (C₁₄), palmítico (C₁₆), esteárico (C₁₈), oleico (C_{18:1}), linoleico (C_{18:2}) y linolénico (C_{18:3}) (HELLÍN *et al.*, 1998).

La principal característica de la leche de cabra es su mayor contenido en AG de cadena corta en relación con la de vaca (HAENLEIN, 2004), propiedad que se utiliza para conocer el grado de mezcla entre los dos tipos de leche.

Los resultados obtenidos de los análisis de las muestras de leche de cabra M-G utilizadas para elaborar los Quesos de Murcia al Vino se detallan en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Perfil de AGT en leche de cabra M-G ($\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche)

Ácido graso	Leche 1	Leche 2	Leche 3	Leche 4
C ₆	6,83 ^{ab} ± 0,77	1,04 ^c ± 0,06	8,76 ^a ± 1,95	4,93 ^b ± 0,86
C ₈	7,99 ^{ab} ± 1,03	1,39 ^c ± 0,04	9,60 ^a ± 1,90	5,72 ^b ± 0,47
C ₁₀	27,66 ^a ± 1,34	6,09 ^b ± 0,07	27,83 ^a ± 3,55	22,54 ^a ± 0,70
C ₁₂	6,92 ^{ab} ± 0,54	2,34 ^c ± 0,00	6,56 ^b ± 0,57	7,77 ^a ± 0,26
C ₁₄	7,67 ^b ± 0,54	3,24 ^c ± 0,12	7,25 ^b ± 0,58	12,31 ^a ± 0,37
C ₁₆	17,71 ^b ± 2,16	8,63 ^c ± 0,19	17,89 ^b ± 1,65	33,07 ^a ± 1,94
C _{16:1}	0,42 ^{bc} ± 0,04	0,28 ^c ± 0,06	0,48 ^b ± 0,04	1,07 ^a ± 0,08
C ₁₈	4,91 ^b ± 0,67	2,86 ^b ± 0,25	5,72 ^b ± 0,65	10,87 ^a ± 2,08
C _{18:1}	7,46 ^b ± 1,08	4,53 ^b ± 0,39	8,87 ^b ± 1,00	17,77 ^a ± 3,59
C _{18:2}	1,11 ^b ± 0,14	0,61 ^b ± 0,02	1,39 ^b ± 0,19	2,81 ^a ± 0,50
C _{18:3}	0,08 ^b ± 0,07	0,07 ^b ± 0,01	0,00 ^b ± 0,00	0,19 ^a ± 0,04

Medias con diferentes superíndices en la misma fila son significativamente distintas ($P < 0.05$)

Se determinan diferencias significativas en la composición de sus AGT, en todas las muestras de leche analizadas siendo inferiores los determinados en la leche 2 (a excepción del C_{18:3} que es menor en la leche 3).

Para C₆ y C₈ la leche 2, 3 y 4 muestran diferencias significativas entre sí correspondiendo los mayores valores a la leche 3 (8,76 y 9,60 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche respectivamente) y los menores a la leche 2 (1,04 y 1,39 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche respectivamente).

Para el ácido cáprico (C_{10}) no se observan diferencias significativas excepto para la leche 2 que tiene una menor concentración.

Sin embargo existen diferencias significativas para el C_{12} entre la leche 4 (7,77 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche), 3 (6,56 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche) y 2 (2,34 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche).

El mismo comportamiento se observa para el C_{12} , C_{14} , C_{16} y $C_{16:1}$ donde las diferencias son significativas entre las leche 4, 3 y 2 correspondiendo el mayor contenido a la leche 4 seguida de la leche 3 y la leche 2 (**Tabla 14**).

El resto de AGT determinados (C_{18} , $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$) muestran un comportamiento idéntico donde únicamente la leche 4 tiene diferencias significativas con el resto de las leches estudiadas con valores superiores en todos los AGT.

Las diferencias observadas para los AGT entre la leche 2 y el resto de las leches podrían ser debidas al origen diverso de las leches a partir de diferentes explotaciones ganaderas, pautas de alimentación distintas y/o alteraciones del rumen.

HAENLEIN (2004) realiza un estudio comparativo de AGT en leche de cabra y vaca y determina en la leche de cabra valores mucho más elevados para los ácidos grasos de cadena larga (C_{14} , C_{16} , $C_{16:1}$, C_{18} , $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$) que los encontrados en las leches utilizadas en esta Tesis Doctoral (14,04; 35,55; 3,15; 15,49; 34,75; 3,93 y 1,44 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche respectivamente), no obstante el valor de C_{10} (15,12 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche) es inferior a los determinados en este estudio, siendo similares para C_6 , C_8 y C_{12} (7,76; 6,94 y 6,00 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ leche respectivamente).

En la **Tabla 15** se pueden comparar los valores porcentuales de los AGT que componen los diferentes perfiles de AG en leche de cabra de diferentes razas determinados por diversos autores.

El valor porcentual más elevado del C_4 en leche de cabra (5,8%) lo determinan LAENCINA *et al.* (1982) y el más bajo (1,6%) MORAND-FEHR *et al.* (1977) comparándolos con lo señalado por diversos investigadores tal como se muestra en la **Tabla 15**. MORAND-FEHR *et al.* (1977) encuentran el nivel más bajo de C_6 (2,0%), mientras que KLOBASA *et al.* (1970) determinan las concentraciones mínimas de los ácidos C_8 (1,9%), C_{10} (5,4%) y C_{12} (2,5%). En este trabajo de investigación, los valores medios de C_6 , C_8 , C_{10} y C_{12} son superiores a los publicados por los autores que se citan en la **Tabla 15**.

Las concentraciones más elevadas de C_{14} (12,8%) y C_{16} (34,8%) son determinadas en leche de cabra Murciano-Granadina por HELLÍN *et al.* (1998), mientras que las inferiores (7,7 y 21,3% respectivamente) son señaladas por KLOBASA

et al. (1970). De los tres porcentajes de ácido palmitoleico mostrados en la **Tabla 15** el valor medio superior (2,2%) corresponde al determinado por JANDAL (1996).

Tabla 15. Comparación del perfil de AGT (%) en leche de cabra

Autores	Ácidos grasos											
	C4	C6	C8	C10	C12	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C18:2	C18:3
Ferrandini (2006)	-	6,47	7,41	25,24	7,08	9,14	23,20	0,68	7,31	11,59	1,78	0,10
Klobasa <i>et al.</i> (1970)	3,8	2,2	1,9	5,4	2,5	7,7	21,3	-	14,4	28,1	2,5	0,7
Swaminathan <i>et al.</i> (1970)	2,6	2,3	2,7	8,4	4,5	11,1	28,9	-	7,8	27,8	2,6	-
Parodi (1971)	4,0	3,0	3,1	8,7	3,6	9,1	23,1	-	12,9	24,3	2,9	1,5
Morand-Fehr <i>et al.</i> (1977)	1,6	2,0	2,4	9,7	5,0	11,6	34,0	-	4,5	15,1	1,9	1,2
Cerutti <i>et al.</i> (1978)	3,6	3,1	3,1	9,9	3,9	10,4	27,9	-	12,1	19,5	1,4	0,6
García Olmedo <i>et al.</i> (1979)	2,3	2,7	3,2	11,5	5,3	10,4	24,9	-	9,7	21,6	1,6	1,2
Uusi-Rauva <i>et al.</i> (1979)	4,5	3,2	3,4	9,8	4,1	8,7	21,9	-	8,3	20,8	3,2	-
Laencina <i>et al.</i> (1982)	5,8	2,5	2,9	11,5	6,6	12,0	30,9	-	5,8	11,7	0,9	-
Martín Hernández <i>et al.</i> (1984)	3,0	2,9	3,6	11,6	6,5	11,2	28,1	2,1	10,8	23,4	2,6	1,4
Martín Hernández <i>et al.</i> (1988)	2,2	2,6	3,2	10,6	4,8	10,3	28,4	-	6,3	19,7	1,8	0,3
Boros <i>et al.</i> (1990)	4,5	2,4	2,4	8,3	3,2	9,0	26,1	-	16,7	24,9	1,1	1,1
Jandal (1996)	2,6	2,9	2,7	8,4	3,3	10,3	24,6	2,2	12,5	28,5	2,2	-
Hellín <i>et al.</i> (1998)	2,99	6,25	2,52	10,41	5,64	12,81	34,80	-	6,84	13,26	3,60	0,88

BOROS *et al.* (1990) determinan un valor porcentual de ácido esteárico superior (16,7%) mientras que MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1988) el inferior (6,3%), mientras que para el ácido oleico el mayor porcentaje (28,5%) corresponde al observado por JANDAL (1996).

Finalmente HELLÍN *et al.* (1998) hallan los valores más altos de ácido linoleico (3,6%) y los más bajos (0,9%) LAENCINA *et al.* (1982), mientras que el nivel superior para el ácido linolénico (1,5%) lo determina PARODI (1971). Las concentraciones de AG insaturados: C_{16:1}, C_{18:1} y C_{18:3} observadas en esta Memoria de Tesis Doctoral son inferiores a las reflejadas por el resto de los autores, mientras que para el resto de los AGT se observa que las medias de las muestras de leche utilizadas en este trabajo tienen valores similares a los publicados por los autores citados.

GULATI *et al.* (1997) sostienen que los valores de C₁₈, C_{18:1} y C_{18:2} determinados en la leche de cabra pueden ser utilizados como indicadores del grado de protección de las grasas formadas por biohidrogenación en el rumen y que luego son transferidos a la leche. Este hecho hace pensar en la posibilidad que las muestras de leche utilizadas en este trabajo de investigación (con niveles bajos de estos AGT) provienen de animales sometidos a dietas no adecuadas y/o a desequilibrios de la actividad ruminal como se ha comentado anteriormente.

3) Análisis microbiológicos

Las muestras de leche pasteurizada se toman directamente de la cuba de elaboración de queso antes de adicionar el cultivo iniciador. El perfil microbiológico obtenido en cada elaboración se recoge en la **Tabla 16**.

Si comparamos los valores de los parámetros microbiológicos determinados en las muestras de leche empleadas, podemos afirmar que:

Tabla 16. Parámetros microbiológicos de las muestras de leche de cabra M-G, utilizadas para la elaboración de los quesos (log ufc mL⁻¹)

Muestra	Aerobios Totales	Enterobacterias	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. sulfito reductores</i>	Mohos y levaduras	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Leche 1	4.40 ^d ±0.14	4.27 ^b ±0.07	4.22 ^b ±0.11	2.14 ^b ±0.22	3.45 ^b ±0.24	0.65 ^c ±0.79	SD	SD
Leche 2	4.60 ^c ±0.07	4.78 ^b ±0.40	4.64 ^a ±0.14	2.74 ^a ±0.36	4.41 ^a ±0.33	4.60 ^a ±0.24	SD	SD
Leche 3	6.02 ^a ±0.02	5.38 ^a ±0.01	3.57 ^c ±0.22	0.00 ^c ±0.00	2.70 ^c ±0.20	1.89 ^b ±0.13	SD	SD
Leche 4	5.30 ^b ±0.00	5.34 ^a ±0.23	3.85 ^c ±0.13	0.00 ^c ±0.00	2.02 ^d ±0.04	2.45 ^b ±0.19	SD	SD

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

SD: Sin desarrollo

- Los recuentos hallados para bacterias aerobias mesófilas y para *Clostridium sulfito-reductores* son significativamente diferentes entre las cuatro muestras de leche entre sí, siendo los correspondientes a aerobios totales superiores en las muestras de leche del segundo día de fabricación (leche 3 y 4) que no cumplen con la Normativa vigente que considera como máximo un valor de 10⁵ ufc mL⁻¹.

Por el contrario los niveles hallados para *Clostridium* sulfito-reductores son más elevados en las leches utilizadas el primer día de elaboración. Para este indicador bacteriano no existen valores reglamentados en leche. GABORIT *et al.* (2001) utilizan leche de cabra para elaborar queso Camembert y queso fresco de coagulación ácida, con niveles de recuento de aerobios mesófilos que son similares a los nuestros (4,42 y 4,68 log ufc mL⁻¹) e inferiores para hongos (0,32 log ufc mL⁻¹ para ambos quesos).

- Los valores determinados para enterobacterias en las muestras de leche utilizadas el primer día de elaboración (leche 1 y 2) son similares entre sí y menores que los recuentos correspondientes a las empleadas el segundo día (leche 3 y 4), donde predomina la *E. coli*. Las muestras de leche 3 y 4 empleadas no cumplen lo estipulado en la legislación vigente donde el valor máximo aconsejado para *Enterobacteriaceae* es de 5 ufc mL⁻¹.
- En relación con *Staphylococcus aureus*, se determinan diferencias estadísticamente significativas entre las leches empleadas el primer día de elaboración 1 (2,14 log ufc mL⁻¹) y 2 (2,74 log ufc mL⁻¹), no obteniéndose desarrollo en aquellas empleadas el segundo día de elaboración (leches 3 y 4). Para esta bacteria no se especifican valores reglamentarios para leche tratada térmicamente.
- En los recuentos para hongos, se observa un predominio total de levaduras en todas las muestras de leche sobre los mohos, determinando valores similares en las leches del segundo día de fabricación, y significativamente diferentes en las leches empleadas durante el primer día de elaboración donde la leche 1 contiene una menor cantidad. No se especifican limitaciones en los recuentos para hongos en la legislación.
- No se desarrolla *Salmonella* spp. ni *Listeria monocytogenes* en las muestras de leche analizadas. Por lo tanto desde el punto de vista de patogenicidad, todas las muestras cumplen la normativa vigente.

Para las cuatro elaboraciones de Queso de Murcia al Vino, se parte de leches con un alto contenido de bacterias aerobias mesófilas a pesar de estar tratadas térmicamente en la fábrica de queso de la cual proceden. La calidad higiénica de las mismas no es la ideal, ya que se obtienen además valores elevados de enterobacterias en todos los casos.

También se aprecia un determinado nivel de contaminación de origen fecal en todas las leches utilizadas como se puede apreciar en los valores hallados para *E. coli*.

S. aureus se desarrolla sólo en las dos muestras de leche utilizadas el primer día de elaboración (para los quesos A y C), mientras que los *Clostridium* sulfito-reductores aparecen en todas las muestras y en mayor concentración en las muestras de leche 1 y 2.

Estos elevados niveles microbiológicos, pueden deberse principalmente a una contaminación a la salida del pasteurizador, a los recipientes de plástico (empleados para transportar la leche pasteurizada hacia la Planta Piloto), y/o a las superficies interiores de la cuba de cuajado. A pesar de poseer un sistema de lavado y desinfección por aspersión, por ser una cuba cerrada no es posible su apertura así como el desmontaje de las liras para una mejor higiene, haciendo que algunas de sus superficies interiores se tornen inaccesibles y muy difíciles de limpiar e higienizar.

Se descarta un posible problema que pudiera tener el pasteurizador empleado para el tratamiento térmico de las distintas muestras de leche ya que los controles microbiológicos de rutina practicados sobre el equipo por parte de la empresa son satisfactorios.

Las relaciones y comentarios realizados en este apartado, se efectúan tomando en consideración los valores límites fijados en la normativa vigente en el momento de realizarse los ensayos microbiológicos de este trabajo de investigación de Tesis Doctoral. Sin embargo es importante destacar la existencia de una actualización recientemente publicada en el **Diario Oficial de la Unión Europea (2005)**, relativa a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios entre ellos los relacionados con la leche y productos lácteos, donde se puede observar la categorización del alimento a través de una numeración, los microorganismos a tener en cuenta, un plan determinado para la toma de muestras y sus límites, valores de recuentos microbianos inferiores y superiores tolerables, así como el método analítico de referencia, la fase de elaboración en la que se aplica el criterio de toma de muestras y la acción a tomar en caso de resultados insatisfactorios. Para la leche pasteurizada considera a las enterobacterias como indicadores de la efectividad del tratamiento térmico así como de posibles contaminaciones posteriores a la pasteurización. El nivel máximo que tolera en 2 muestras (de un total de 5 muestras) es $0,7 \log \text{ufc mL}^{-1}$ de leche. Según esta nueva exigencia, las muestras de leche empleadas incumplen lo establecido en la actualidad.

IV. 1. 2. Cuajo en pasta de cordero

IV.1.2.1. Actividad coagulante y enzimática

Los distintos tipos de cuajos naturales se caracterizan mediante la determinación de la actividad coagulante y enzimática, tal y como se describen en el capítulo Material y Métodos.

IV.1.2.1.1. *Actividad coagulante*

El primer objetivo es valorar la influencia de cada uno de los parámetros ensayados y determinar aquellos que afectan significativamente a la actividad coagulante. Se estudia cada uno de los componentes de la fuente de variación (lote, réplica, y tipo de enzima) frente a la actividad coagulante, mediante el modelo lineal ANOVA. Los resultados se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Efecto de las variables independientes lote, réplica y tipo de enzima sobre la actividad coagulante (días de conservación como covariable)

Fuente de variación	GL	SC	F	P
Lote	3	18.983,3	5,07	0,0025
Réplica	1	37,0027	0,03	0,8636
Tipo enzima	3	1.184.230	316,19	0,0000
Residual	117	146.065	---	---
Total	124	1.349.315	---	---

GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; F: estadístico F; P: significación

Covariable	Coficiente	Error estándar	Student's T	P
Día conservación	-1,14880	0,11687	-9,83	0,0000

De los resultados obtenidos, observamos que las variables lote, tipo de enzima y la covariable día de conservación, influyen significativamente en la actividad coagulante (valores de $P < 0,05$), mientras que la variable réplica no influye (valor de $P > 0,05$), por lo que dicha variable es eliminada del modelo estadístico ANOVA.

La variable día de conservación de los cuajos, se toma como covariable para disminuir el uso de grados de libertad. Si se considera la variable día de conservación

como variable independiente dentro de la fuente de variación, el consumo de grados de libertad (n-1) limitaría el estudio estadístico.

En la **Tabla 18** puede compararse la relación existente entre la actividad coagulante de los distintos tipos de enzima y el lote.

Tabla 18. Efecto de las variables independientes tipo de enzima y lote sobre la actividad coagulante (Días de conservación como covariable)

Tipo de enzima	Lote	Actividad coagulante (IMCU g ⁻¹ cuajo)	
		Valor medio	Desviación estándar
AVS	1	421,60 ^a	± 46,26
AVS	2	385,49 ^a	± 56,89
AVS	3	368,91 ^a	± 61,46
AVS	4	388,81 ^a	± 55,58
Media		391,20¹	± 55,05
ALF	1	143,25 ^a	± 33,11
ALF	2	189,44 ^a	± 34,61
ALF	3	190,03 ^a	± 29,56
ALF	4	184,95 ^a	± 55,29
Media		176,92³	± 38,14
AVC	1	152,27 ^b	± 23,57
AVC	2	208,11 ^a	± 31,41
AVC	3	184,54 ^{ab}	± 37,37
AVC	4	146,54 ^b	± 26,58
Media		172,87³	± 29,73
ALS	1	240,19 ^a	± 57,56
ALS	2	279,44 ^a	± 62,18
ALS	3	245,07 ^a	± 58,33
ALS	4	224,21 ^a	± 56,72
Media		247,23²	± 58,70

a,b, indican diferencias significativas entre lotes (P< 0.05)

1,2,3, indican diferencias significativas entre tipos de enzima (P<0.05)

La mayor actividad coagulante corresponde al cuajo en pasta elaborado con abomasos vacíos y secos (AVS), seguido de los abomasos llenos y secados en una estufa con ventilación a 30 °C (ALS), observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

La menor actividad coagulante corresponde a los estómagos vaciados y congelados (AVC), que podría ser debido a que el proceso de congelación aplicado disminuya la actividad coagulante en el producto final obtenido coincidiendo con lo publicado por LÓPEZ en 1993. No se observan diferencias significativas entre esta enzima y ALF (abomasos llenos y frescos), aunque muestra una actividad coagulante ligeramente superior a AVC.

Si observamos la **Tabla 18**, se concluye que solamente existen diferencias significativas entre los diferentes lotes del cuajo tipo AVC. Este hecho podría justificarse teniendo en cuenta la falta de homogeneidad de la pasta, muy característica en estos tipos de cuajos en pasta.

A continuación, se muestran cuatro figuras que reflejan la variación de la actividad coagulante de los distintos tipos de enzima, para cada lote analizado, a lo largo del período de conservación (**Figuras 20, 21, 22 y 23**).

Las disminuciones en la actividad coagulante observadas en todas las pastas al principio del período de conservación, no coincide con lo publicado por BUSTAMANTE *et al.* (2000) que en cuajo en pasta de oveja de raza Lacha determinan un incremento de la actividad coagulante a los 60 días en refrigeración a 4°C, permaneciendo dicho valor constante durante 1 año.

Por otra parte, el aumento de la actividad coagulante encontrada en todos los cuajos hacia el final del período de conservación, podría deberse a que la quimosina y la pepsina se secretan como zimógenos que se activan de forma autocatalítica a valores de pH inferiores a 4,0. En este tipo de cuajo en pasta se observa un aumento más pronunciado de la actividad coagulante a medida que el tiempo transcurre, debido a que los cuajares vacíos y secados en el momento de la obtención de la pasta correspondiente, tienen un valor de pH ~5,0 que retarda la activación de los zimógenos.

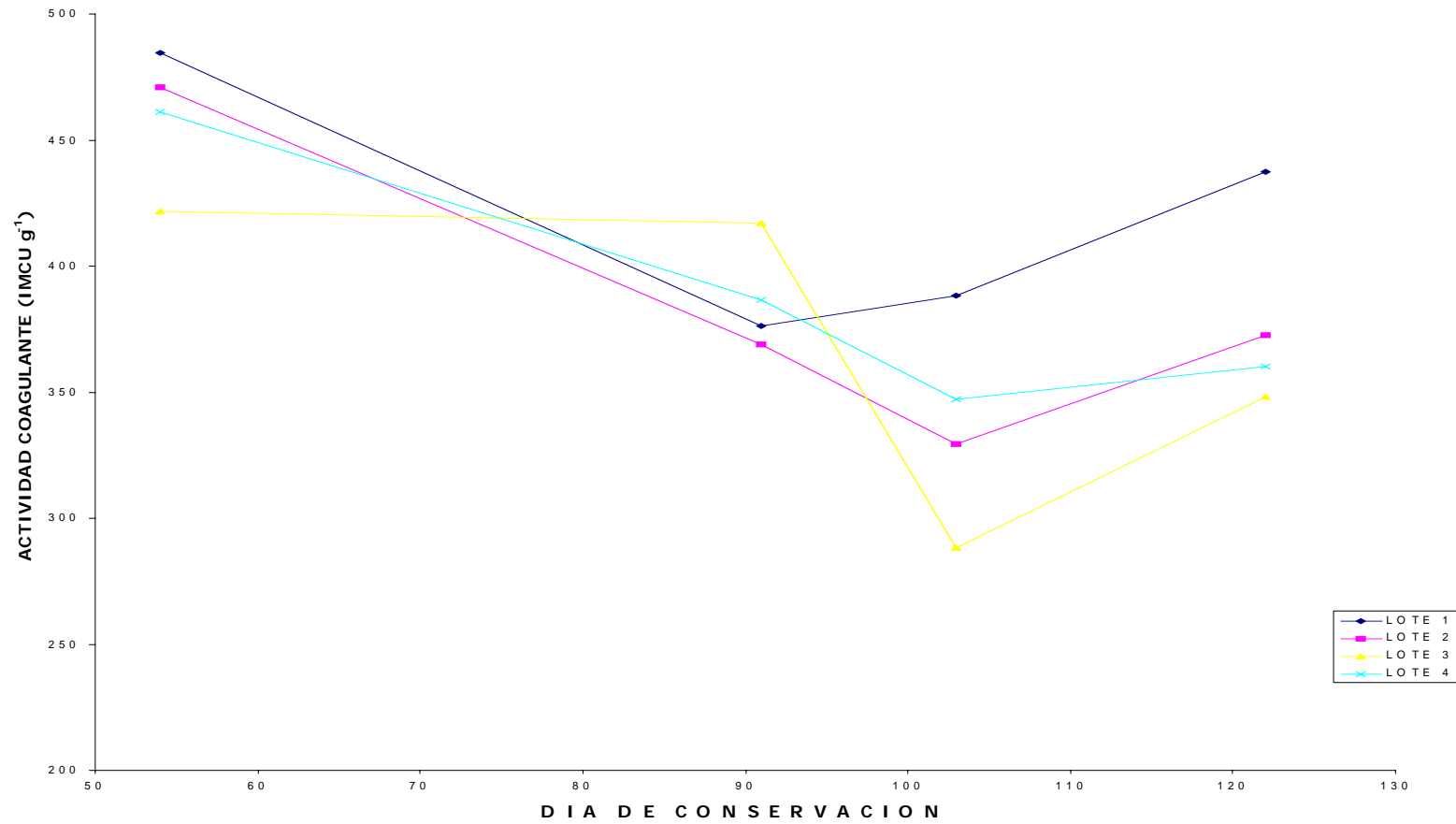


Figura 20. Variación de la actividad coagulante a lo largo del período de conservación, de los diferentes lotes del cuajo en pasta AVS

La **Figura 20** refleja los valores más altos obtenidos de actividad coagulante de todos los tipos de cuajo en pasta elaborados tanto al principio como al final del período de conservación, y que corresponden al elaborado a partir de abomasos vaciados y secados tradicionalmente (AVS). El menor valor hallado corresponde al lote 3 mientras que el mayor corresponde al lote 1. Esta tendencia, se mantiene a lo largo del período de conservación. Este tipo de cuajo tiene un valor de pH $\sim 5,0$ y muestra una activación más lenta.

En la **Figura 21**, se aprecian valores inferiores a 270 IMCU g^{-1} para los cuatro lotes de la enzima ALF (elaborados a partir de estómagos llenos y frescos) correspondiendo el mayor valor al lote 4 al principio y al final del período de conservación, mientras que el menor valor corresponde al lote 1, a lo largo de todo el período de tiempo estudiado. El cuajo en pasta del lote 4, presenta un comportamiento particular a los cuatro meses de conservación, coincidiendo prácticamente su actividad coagulante con el que presenta el lote 1 en el mismo período de tiempo, lo que muestra una vez más la gran heterogeneidad que presentan estos tipos de cuajo a la hora de evaluarlos analíticamente.

Este cuajo presenta un aumento de la actividad coagulante poco notable con el tiempo, debido a que los zimógenos están prácticamente activados desde el principio, ya que los abomasos para preparar la pasta ALF tienen un valor de pH entre 4,0-4,3, por lo que el aumento de la actividad coagulante no es tan significativo.

En la **Figura 22** se muestra la variación de la actividad coagulante de los cuatro lotes elaborados del cuajo en pasta tipo AVC (abomasos vaciados y congelados) a lo largo de su conservación. Este cuajo es el que presenta los valores más bajos de actividad coagulante de todos los cuajos estudiados.

Como se ha comentado anteriormente, el proceso de congelación aplicado a los cuajares antes de su transformación, afecta de forma negativa a la actividad coagulante del cuajo en pasta obtenido, como han observado otros investigadores. Esta disminución en la actividad coagulante, probablemente se debe a una desnaturalización de las enzimas coagulantes por el proceso de congelación a la que fueron sometidas.

En este caso, la actividad coagulante más alta corresponde al lote 2, mientras que la más baja al lote 4.

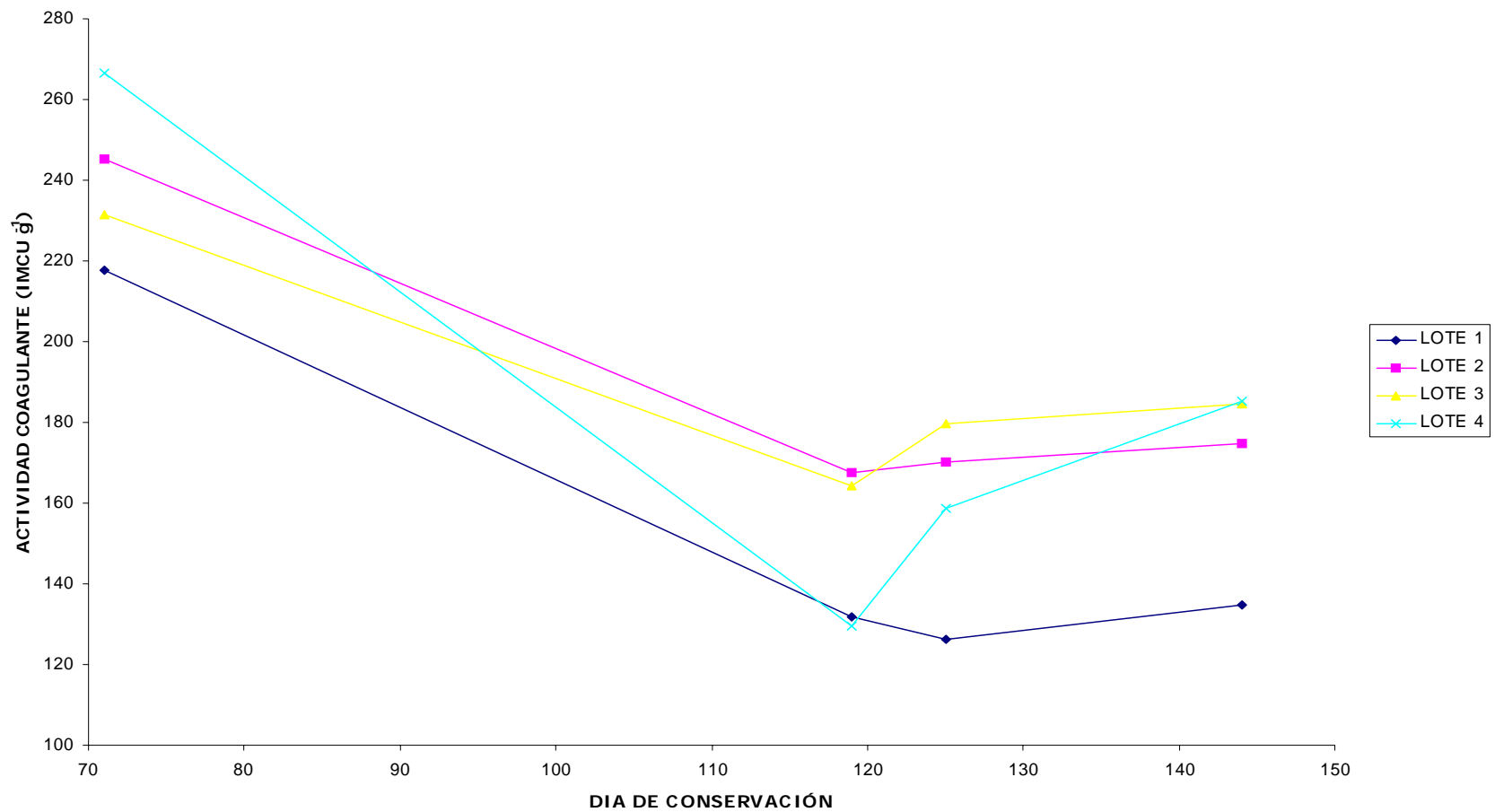


Figura 21. Variación de la actividad coagulante a lo largo del período de conservación, de los diferentes lotes del cuajo en pasta ALF

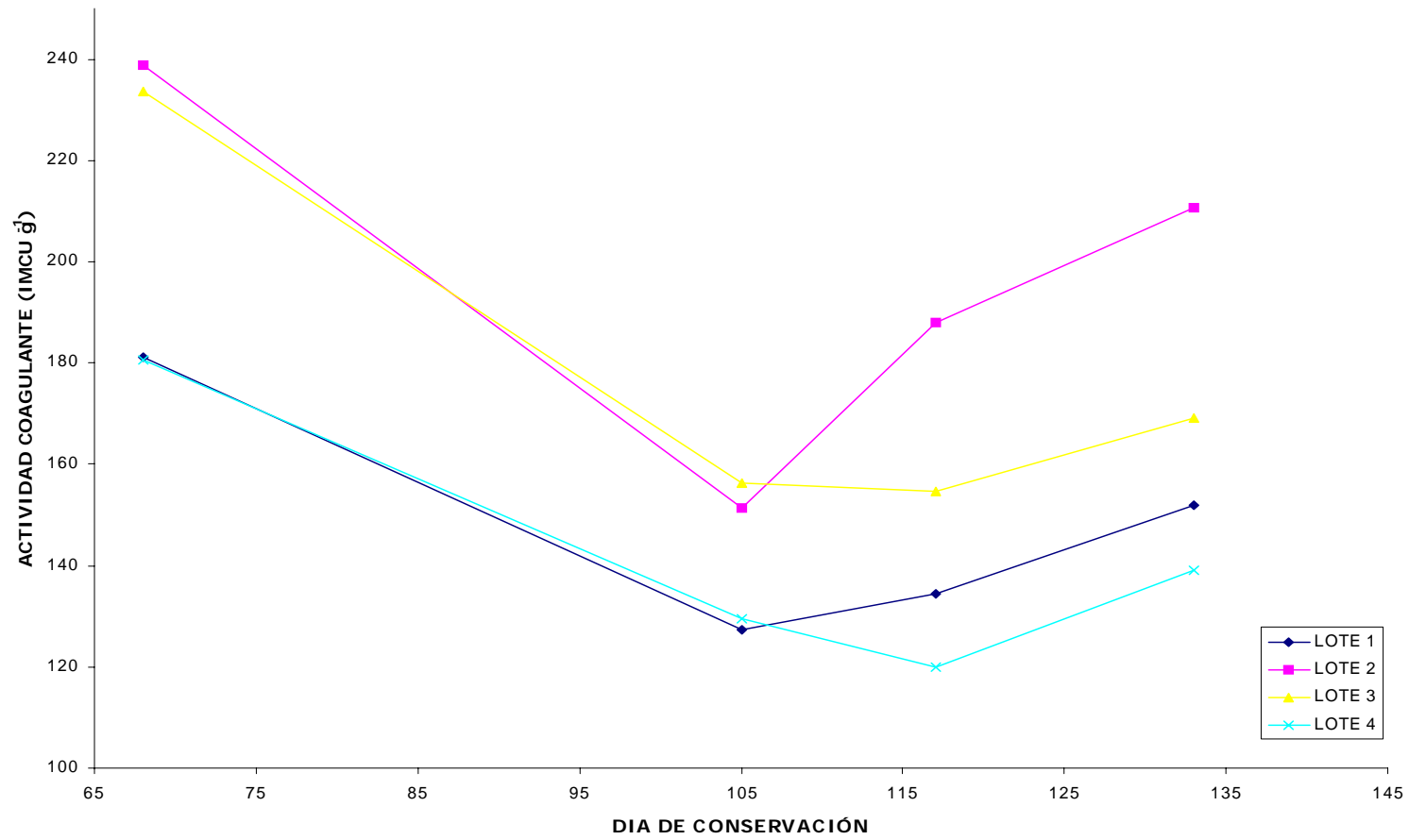


Figura 22. Variación de la actividad coagulante a lo largo del período de conservación, de los diferentes lotes del cuajo en pasta AVC

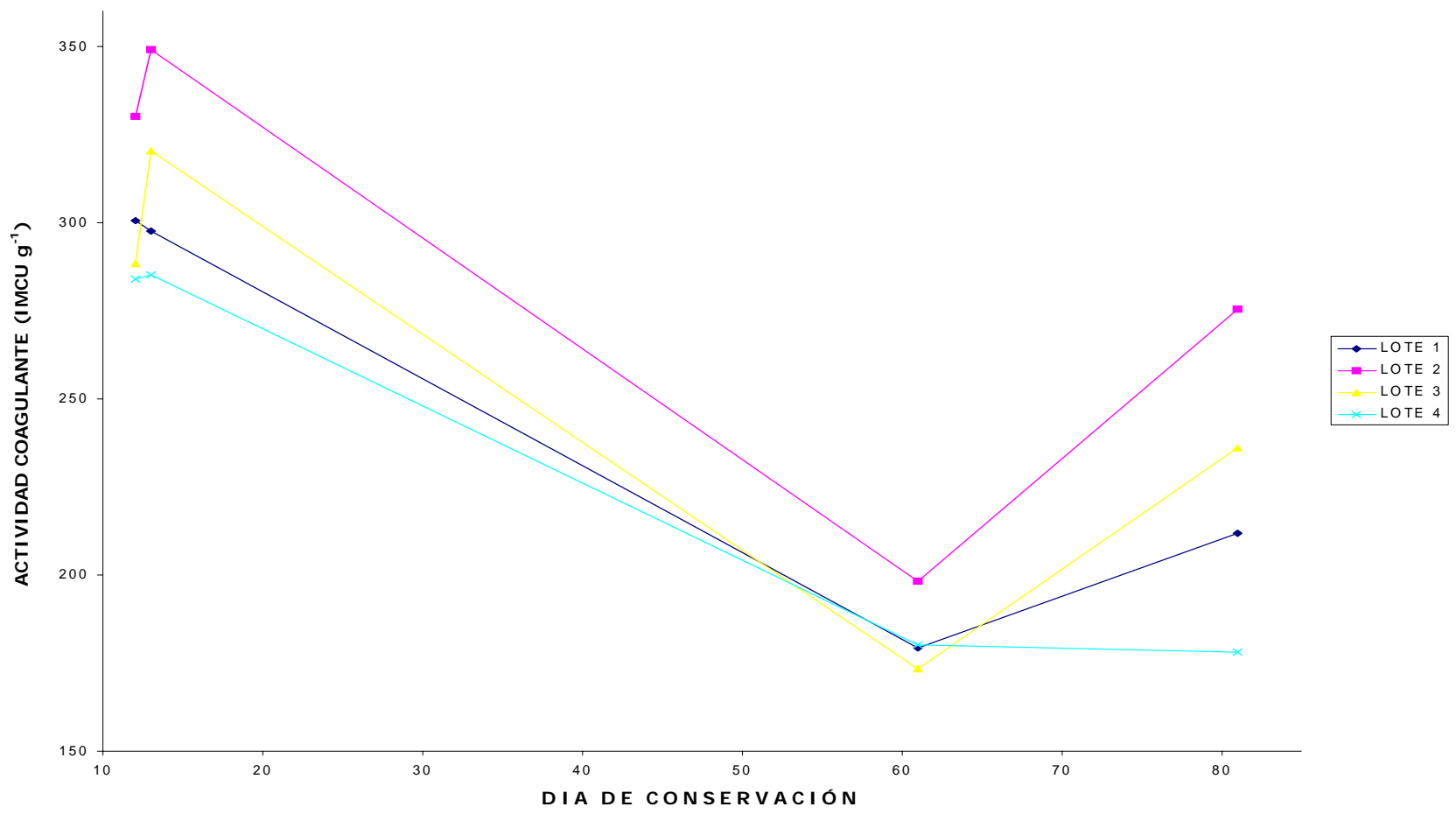


Figura 23. Variación de la actividad coagulante a lo largo del período de conservación, de los diferentes lotes del cuajo en pasta ALS

La **Figura 23**, permite observar el comportamiento de la actividad coagulante de los cuajos en pasta elaborados a partir de abomasos llenos con secado acelerado (ALS) durante su etapa de conservación en refrigeración. Durante los primeros 60 días, todos los lotes muestran un comportamiento similar con disminución de su actividad coagulante, y posteriormente se observa un aumento proporcional y mayor para los lotes 2 y 3 siendo menor para el lote 1. El lote 4 muestra un comportamiento diferente con una tendencia a disminuir.

El valor mayor alcanzado corresponde al lote 2 y el menor al lote 4 coincidiendo con lo observado para el cuajo AVC.

IV.1.2.1.2. Actividad enzimática

a) Actividad proteolítica

Al igual que para la actividad coagulante, para la actividad proteolítica se procede a aplicar el mismo criterio estadístico que relaciona los valores experimentales obtenidos para las variables independientes estudiadas (**Tabla 19**).

Como ya se ha comentado para la actividad coagulante, la variable día de conservación de los cuajos se tomó como covariable para disminuir grados de libertad (n-1).

Tabla 19. Efecto de las variables independientes lote, réplica y tipo de enzima sobre la actividad proteolítica (días de conservación como covariable)

Fuente de variación	GL	SC	F	P
Lote	3	594,951	1,10	0,3523
Réplica	1	11,416	0,06	0,8018
Tipo enzima	3	1.061,95	1,96	0,1235
Residual	117	21.105,2	---	---
Total	124	22.773,5	---	---

GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; F: estadístico F; P: significación

Covariable	Coficiente	Error estándar	Student's T	P
Día conservación	-0,19901	0,04510	-4,41	0,0000

De acuerdo con los valores estadísticos hallados, ninguna de las fuentes de variación afectan significativamente al parámetro actividad proteolítica (valores de $P > 0,05$). Por el contrario, el tiempo de conservación sí influye en la actividad enzimática de los cuajos en pasta experimentales estudiados ($P = 0,0000$).

Al no existir diferencias entre las variables estudiadas, se estudia mediante el análisis de varianza simple, la relación que existe entre el porcentaje de quimosina de las distintas enzimas y los días de conservación de las mismas (**Tabla 20**).

De acuerdo con los resultados de la **Tabla 20**, para el tipo de enzima AVS el porcentaje de quimosina no varía en función del tiempo de conservación aunque se observa una disminución significativa de su actividad a los 103 días de conservación que podría deberse a la heterogeneidad de las pastas mencionadas. El valor medio obtenido para el cuajo AVS es de 75,62% que es análogo a lo determinado por IRIGOYEN *et al.* (2001) en un cuajo similar (77,6%) empleado en la elaboración de Queso Roncal.

Tabla 20. Variación de la actividad proteolítica de los distintos tipos de enzima en relación con los días de conservación

Tipo de enzima	Día de conservación	% de Quimosina	Desviación estándar
AVS	54	82,31 ^a	± 16,51
	91	82,48 ^a	± 10,39
	103	59,46 ^b	± 7,34
	122	78,22 ^a	± 3,19
ALF	71	77,35 ^a	± 11,49
	119	83,72 ^a	± 8,08
	125	69,89 ^{ab}	± 8,76
	144	53,43 ^b	± 17,00
AVC	68	80,16 ^a	± 13,98
	105	78,78 ^{ab}	± 10,17
	117	69,70 ^{ab}	± 15,57
	133	59,11 ^b	± 13,21
ALS	12	78,53 ^b	± 12,01
	13	93,21 ^a	± 2,17
	61	69,36 ^b	± 5,00
	81	80,72 ^{ab}	± 6,29

Medias con distintos superíndices en la misma columna y para cada tipo de enzima son significativamente distintas ($P < 0.05$)

BUSTAMANTE *et al.* (2000) determinan la actividad proteolítica en diferentes cuajos en pasta de oveja Lacha con valores de quimosina entre 73 y 80%.

El comportamiento enzimático de la enzima ALS, es similar al observado para la enzima AVS a lo largo del período de conservación obteniéndose un valor medio superior de quimosina (80,46%).

Para la enzima ALF, se aprecia una disminución significativa de la actividad debida a quimosina al final del período de conservación, al igual que para la enzima AVC, con valores medios inferiores a los otros cuajos en pasta de 71,10 y 71,94% respectivamente. IRIGOYEN *et al.* (2001) determinan en otro cuajo en pasta ovino un valor inferior de 54,0%.

La gran desviación estándar observada en las muestras analizadas se debe a la heterogeneidad de las diferentes muestras de cuajo en pasta de un mismo lote.

Si consideramos la variación que puede observarse como consecuencia de la heterogeneidad de las pastas durante la determinación del contenido de quimosina de esta experiencia, el método de elaboración de los cuatro tipos de cuajos en pasta obtenidos, no influye de forma significativa en el porcentaje de quimosina, pudiendo ser todas las muestras clasificadas de acuerdo a su contenido de quimosina como extractos de cuajo ya que presentan la mayoría de ellas un porcentaje cercano o superior al 75%

b) Actividad lipolítica

La actividad lipolítica se define a través de la determinación de las actividades lipasa y esterasa. Durante este trabajo de experimentación haremos referencia a la actividad lipasa.

La unidad de actividad lipasa (LU) convencional utilizada para el cuajo en pasta, indica los μmoles de NaOH necesarios para mantener un valor de $\text{pH} = 8,6$ de un sustrato de tributirina emulsionada durante un minuto a 35°C (CORRADINI *et al.*, 1994). Mientras que BUSTAMANTE *et al.* (2000) la definen como la cantidad de enzima que produce $1 \mu\text{mol}$ de ácido butírico -a partir de tributirina como sustrato- en un minuto, expresándose como U g^{-1} de tejido.

Las determinaciones correspondientes a la actividad lipasa de las cuatro enzimas elaboradas se llevan a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco y los valores promedio obtenidos se muestran en la

Tabla 21. Las cuatro enzimas obtenidas muestran la gran variabilidad existente de la actividad lipolítica, cuando se utiliza tributirina como sustrato.

Tabla 21. Valores medios de actividad lipasa de los diferentes cuajos en pasta

Tipo de enzima	Actividad lipasa (U g ⁻¹)
AVS	10,57 ^a ± 2,82
ALF	4,57 ^b ± 2,19
AVC	9,23 ^a ± 3,00
ALS	1,46 ^c ± 0,63

Los cuajos en pasta AVS y AVC no tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí mostrando valores superiores de actividad lipasa (10,57 U g⁻¹ y 9,23 U g⁻¹ respectivamente) comparadas con los cuajos en pasta ALF (4,57 U g⁻¹) y ALS (1,46 U g⁻¹) que son significativamente inferiores y distintos entre sí (**Tabla 21**). BUSTAMANTE (2002) analiza diversos cuajos en pasta de cordero elaborados en distintas queserías artesanales en diferentes épocas del año y determina niveles de actividad lipasa muy variables entre 0,11-5,84 U g⁻¹ varios de ellos semejantes al valor encontrado en el cuajo tipo ALF, empleado en este estudio.

Otros autores determinan valores inferiores (1,07 U g⁻¹) de actividad lipasa en cuajo en pasta de cordero (CHÁVARRI, 1999) mientras que CASTILLO *et al.* (2005) en cuajo en pasta de ternero higienizado 0,79 U g⁻¹ que es aproximadamente 2 veces inferior a la enzima ALS.

IV.1.2.2. Aptitud a la coagulación

Para el estudio del comportamiento frente a la coagulación de la leche de las muestras de cuajo de cordero en pasta, objeto de este estudio, se emplea un sensor de fibra óptica instalado en una cuba experimental de laboratorio de 2 litros de capacidad aproximadamente. El perfil gráfico que se obtiene cuando se emplea leche estándar como sustrato del cuajo, es similar al mostrado en la **Figura 24** (CASTILLO, 2001).

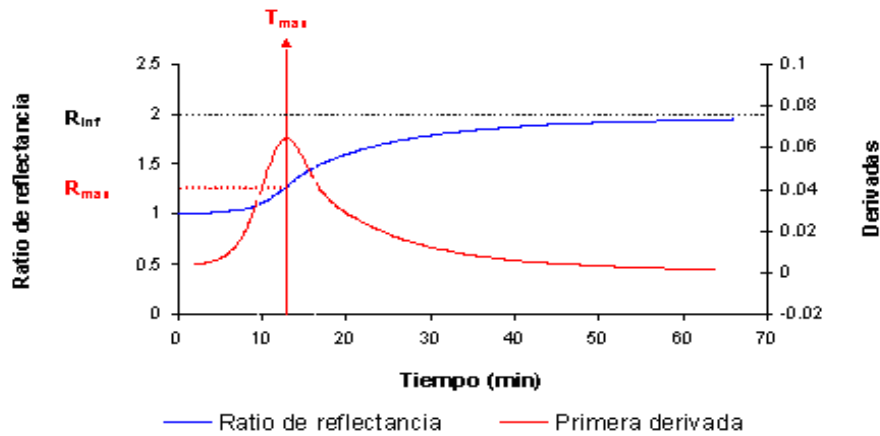


Figura 24. Perfil de reflectancia difusa

T_{max} , tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia. R_{max} , ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia

Los valores de los indicadores de aptitud frente a la coagulación determinados mediante el sensor de reflectancia difusa se comparan estadísticamente con cada una de las variables independientes ensayadas. Para ello se calculan los valores del estadístico F y la significancia P. Estos resultados se expresan en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Análisis de varianza y del estadístico F, para las variables dependientes (Temperatura de la leche como covariable).

Fuente de variación	GL	F			
		D máx	R máx	R cut	T máx
Lote	3	2,49 ^c	0,13 ^c	0,54 ^c	0,96 ^c
Réplica	1	0,38 ^c	0,97 ^c	4,33 ^b	0,18 ^c
Tipo de enzima	3	9,82 ^a	2,13 ^c	0,74 ^c	15,31 ^a

GL: grados de libertad; F: estadístico ANOVA F
^a significancia a 99%
^b significancia a 95%
^c no significativo al nivel 0,05

Covariable	Valores de la significancia P			
	Dmáx	Rmáx	Rcut	Tmáx
Temperatura	0,5145	0,4847	0,0379	0,2043

El estudio estadístico que relaciona los valores de las variables dependientes $D_{máx}$, $R_{máx}$, R_{cut} y $T_{máx}$ frente a los correspondientes de las variables independientes lote, réplica y tipo de enzima, permite comprobar que a los valores de $D_{máx}$ y $T_{máx}$ sólo le influye el tipo de enzima. Sin embargo, los valores determinados para el parámetro $R_{máx}$ no son modificados por ninguna de las variables estudiadas, por lo que no se incluye en

los posteriores estudios, mientras que para los valores R_{cut} la variable que la modifica es la réplica con una significación a nivel 0,05.

En este estudio se ha considerado la temperatura de la leche como covariable para disminuir grados de libertad y así poder estudiar estadísticamente al resto de las variables independientes. En este caso, la covariable temperatura de la leche, afecta solamente al parámetro R_{cut} con una significancia del 95 %, de acuerdo con CASTILLO (2001).

El efecto que producen las variables independientes ensayadas sobre los parámetros que evalúan el comportamiento durante el proceso de la formación del gel de caseína, pueden apreciarse en la **Tabla 23**.

Los valores medios para $D_{m\acute{a}x}$ solo muestran diferencias significativas entre la enzima AVS y las enzimas ALF y AVC, teniendo el mayor valor medio la enzima AVS.

Tabla 23. Efecto de las variables réplica y tipo de enzima sobre las variables dependientes $D_{m\acute{a}x}$, R_{cut} y $T_{m\acute{a}x}$

		$D_{m\acute{a}x}$ (min^{-1})	R_{cut}	$T_{m\acute{a}x}$ (min)
Réplica	1	No afecta	1,271 ^b ± 0,325	No afecta
	2			
Tipo de enzima				
	AVS	0,049 ^a ± 0,004	No afecta	6,1 ^b ± 0,1
	ALF	0,040 ^b ± 0,003		12,7 ^a ± 2,1
	AVC	0,041 ^b ± 0,005		11,6 ^a ± 3,6
	ALS	0,044 ^{ab} ± 0,002		9,7 ^a ± 1,0

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

El parámetro $D_{m\acute{a}x}$ está relacionado con la hidrólisis de la caseína, y la velocidad de agregación (CASTILLO, 2001). En nuestro caso la enzima AVS tiene una mayor velocidad de hidrólisis de la caseína en relación con los cuajos naturales ALF y AVC. Para la variable dependiente $T_{m\acute{a}x}$, (tiempo en el que aproximadamente el 80% de la κ -caseína está hidrolizada) observamos que AVS necesita un tiempo significativamente mucho menor que el resto de las enzimas para lograr el mismo efecto, por lo tanto, el tiempo de coagulación será menor.

IV.1. 2. 3. Selección de cuajo en pasta

El objetivo primordial para la selección de un cuajo de cordero en pasta, es obtener un método de fabricación de producto que permita recuperar los sabores tradicionales en quesos de oveja y cabra.

Para proceder a la selección del cuajo en pasta experimental que se utilizará durante las elaboraciones de queso de Murcia Al vino, se evalúan los parámetros que determinan la adaptabilidad tecnológica de la enzima, y se verifica que reúna los requisitos microbiológicos establecidos en la Reglamentación Técnica Sanitaria (Norma general de identidad y pureza para el cuajo y otros enzimas coagulantes de leche destinados al mercado interior, Orden de 14 de enero de 1988).

En la siguiente **Tabla 24**, se reflejan los valores medios de todos los parámetros tecnológicos determinados de los diferentes cuajos en pasta evaluados.

Tabla 24. Valores medios de los parámetros de caracterización tecnológica de los diferentes tipos de enzima

Tipo de enzima	Actividad proteolítica (%Quimosina)	Actividad coagulante (IMCU g ⁻¹)	Parámetros de coagulación			Actividad lipolítica
			T _{máx} (min)	D _{máx} (min ⁻¹)	R _{cut}	Actividad lipasa (U g ⁻¹)
AVS	75,62	391,20	6,1	0,049	---	10,57
ALF	71,10	176,92	12,7	0,040	---	4,57
AVC	71,94	172,87	11,6	0,041	---	9,23
ALS	80,46	247,23	9,7	0,044	---	1,46

La selección del cuajo en pasta a utilizar en la elaboración del Queso de Murcia al Vino se realiza fundamentalmente buscando un equilibrio entre la actividad coagulante y lipolítica, ya que no se aprecian variaciones significativas en el contenido de quimosina de los diferentes cuajos ensayados, el cuajo en pasta que reúne estas características es el elaborado con abomasos llenos y frescos (ALF). Como se aprecia en la **Tabla 24** el cuajo en pasta seleccionado tiene un contenido de quimosina de 71,1 %, actividad coagulante 177 IMCU g⁻¹ y una actividad lipasa de 4,57 U g⁻¹. BARZAGHI *et*

al. (1997) y BUSTAMANTE *et al.* (2000) determinan en cuajos en pasta de cordero valores medios de quimosina (73,6 y 76,5%, respectivamente) similares al cuajo ALF. En relación con la actividad coagulante, valores entre (155-363 IMCU g⁻¹) hallan BUSTAMANTE *et al.* (2000), mientras que BARZAGHI *et al.* (1997) encuentran niveles muy superiores (12246 y 20721 IMCU g⁻¹) también en cuajos en pasta de cordero, comparados con el seleccionado en este estudio.

Por otra parte BUSTAMANTE *et al.* (2000) determinan valores comprendidos entre 3,7-26,9 U g⁻¹ de actividad lipasa en varios cuajos en pasta de cordero, aunque BARZAGHI *et al.* (1997) hallan valores inferiores (1,65 y 1,85 U g⁻¹) al seleccionado en este estudio.

ADDIS *et al.* (2005a) preparan un cuajo en pasta ovino sacrificando animales lechales en el que determinan un valor de 95 IMCU g⁻¹ para actividad coagulante y 81,69% de quimosina. En el mismo cuajo en pasta, investigan la actividad lipasa (utilizando tributirina como sustrato) a tres valores distintos de pH (5,50; 6,20 y 7,00) alcanzando los siguientes resultados: 5,60; 1,60 y 0,22 U g⁻¹ respectivamente, que muestra una gran dependencia de la actividad lipasa con el pH. El valor de pH utilizado en el método conocido como pH-Stat es de 5,50. Empleando como sustrato nata de leche de oveja, ADDIS *et al.* (2005b) determinan la actividad lipolítica en diferentes cuajos en pasta obteniendo un valor promedio mucho más alto (1197 U g⁻¹).

En queso Feta, MOATSOU *et al.* (2004) utilizan cuajo líquido de cordero y ternera artesanal con 70% de quimosina, encontrando niveles muy bajos de actividad coagulante y lipasa (31 IMCU mL⁻¹ y 1,67 U mL⁻¹ respectivamente). Los resultados obtenidos durante estos ensayos, demuestran que el cuajo en pasta AVS, elaborado con estómagos vacíos, secos y humedecidos, presenta la mayor velocidad de coagulación (i.e., menores tiempos de coagulación y de corte). Estos resultados coinciden con los obtenidos en la Universidad del País Vasco utilizando un gelógrafo para la estimación objetiva de la aptitud a la coagulación. Sin embargo, al ser el objetivo de este Proyecto la selección de aquellos cuajos en pasta que combinen una elevada actividad coagulante y una actividad lipolítica adecuada en base a su especificidad de sustrato, se seleccionan para los ensayos de planta piloto aquellos elaborados a partir de abomasos llenos frescos, conservados en salmuera (ALF) ya que presenta un equilibrio óptimo entre actividad lipolítica y coagulante.

IV.1.2.4. Parámetros microbiológicos

Cuajos en pasta de cordero

Los valores de las medias calculadas para los diferentes parámetros microbiológicos, (realizados por el grupo de investigación de la Universidad del País Vasco dentro del marco de colaboración establecido en el Proyecto de Investigación “Caracterización de cuajos de cordero y optimización de sus métodos de fabricación para la recuperación de sabores tradicionales en quesos de oveja y cabra”, financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología) de los cuajos en pasta de cordero a lo largo del período de conservación se detallan en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Parámetros microbiológicos en origen de los cuajos en pasta (log ufc g⁻¹)

Enzima	Aerobios Totales	Enterobacterias	E. coli	S.aureus	C. sulfito reductores	Mohos y levaduras	Salmonella spp.
AVS	4,19	ND	ND	ND	1,63	2,07	ND
ALF	4,02	ND	ND	ND	2,43	2,33	ND
AVC	3,85	0,43	ND	0,13	1,57	2,30	ND
ALS	4,44	ND	ND	ND	2,68	1,90	ND

Valores medios a lo largo del período de conservación. ND: No detectado

En la **Tabla 25** se observa que en los cuatro tipos de enzima estudiados, a lo largo del período de conservación, no se ha detectado *E. coli* coincidiendo con DEIANA *et al.* (1980) e IRIGOYEN *et al.* (2001) ni *Salmonella* spp. coincidiendo con IRIGOYEN *et al.* (2001) Se detecta la presencia de enterobacterias (0,43 log ufc g⁻¹) y de *S. aureus* (0,13 log ufc g⁻¹) solamente en la pasta de cuajo AVC, cuyas concentraciones son aceptables considerando la legislación vigente para las enterobacterias, pero no para *S. aureus* (ausencia en 1 g). IRIGOYEN *et al.* (2001) señalan un valor superior de 2,50 log ufc g⁻¹ para enterobacterias pero no encuentran desarrollo de *S. aureus* mientras que DEIANA *et al.* (1980) determinan un valor de 2,30 log ufc g⁻¹ para *S. aureus* no encontrando enterobacterias.

Los recuentos de aerobios mesófilos a 30°C están por debajo -en todos los cuajos- del límite especificado en la Legislación, que tolera un nivel máximo de 10⁵ ufc g⁻¹. Estos niveles alcanzados, son semejantes a los publicados por DEIANA *et al.* (1980)

que describen un valor de 4,70 log ufc g⁻¹. BARZAGHI *et al.* (1997) e IRIGOYEN *et al.* (2001) determinan 3,58 log ufc g⁻¹ en cuajos en pasta de oveja.

MOATSOU *et al.* (2004) analizan el contenido microbiano de un cuajo líquido partiendo de abomasos de cordero y ternera lechales elaborados de forma artesanal en el que no detectan la presencia de *Salmonella* spp. ni *S. aureus*. El recuento de aerobios mesófilos (5,48 log ufc mL⁻¹) y enterobacterias (3,43 log ufc mL⁻¹) es superior a los de este estudio, sin embargo los valores de *Clostridium* (1,85 log ufc mL⁻¹) y hongos (1,48 log ufc mL⁻¹) son similares.

La presencia de *C.* sulfito-reductores, es preocupante ya que el nivel detectado en los cuatro tipos de enzimas es muy superior al permitido (máximo 1 ufc g⁻¹). Otros autores como BARZAGHI *et al.* (1997) obtienen valores superiores, DEIANA *et al.* (1980) descubren un valor similar de 2,38 log ufc g⁻¹ e IRIGOYEN *et al.* (2001) no lo detectan en 1 gramo.

Las bacterias conocidas como anaerobios sulfito-reductores, constituyen un grupo asociado a los *Clostridium* spp. que se caracterizan por ser microorganismos Gram positivos, que se desarrollan en ausencia de oxígeno, y cuyas esporas se encuentran habitualmente en la materia fecal pero en una proporción menor que *E. coli*. El representante más difundido dentro de este grupo de bacterias es el *C. perfringens* que se encuentra en un 73% de las muestras de aguas naturales analizadas, como ocurre de forma similar con los coliformes.

Su fuente natural además de las heces, es el suelo, sedimentos marinos, vegetales en descomposición, aguas superficiales, heridas en humanos y animales, así como en alimentos elaborados en condiciones deficientes de higiene (GESCHE *et al.*, 2003).

Ante este hecho se decidió comprobar la presencia de *C. perfringens* en los cuatro prototipos, obteniéndose resultados positivos en todos los casos.

Esta situación se repite con los mohos y levaduras, donde los recuentos hallados son muy superiores a los establecidos en la **Orden de 14 de enero de 1988** para el cuajo y otras enzimas coagulantes que tolera solamente para estos microorganismos una concentración máxima de 10 ufc g⁻¹. Similares inconvenientes microbiológicos encuentran DEIANA *et al.* (1980) que investigando con un cuajo en pasta comercial utilizado habitualmente en Cerdeña para la obtención de queso Fiore Sardo, hallan un valor aún superior para estos microorganismos de 4,37 log ufc g⁻¹, mientras que IRIGOYEN *et al.* (2001) especifican un valor similar de 2,19 log ufc g⁻¹.

Extractos acuosos a partir del cuajo en pasta seleccionado

Una vez seleccionado el cuajo en pasta de cordero (ALF) a partir de los cuatro tipos de cuajos investigados según se describe en el apartado **IV. 1. 2. 3.** del capítulo Resultados y Discusión, se procede a preparar los extractos acuosos del cuajo seleccionado ALF para emplearlos en la elaboración de los Quesos de Murcia al Vino. Los pasos necesarios para obtener los extractos acuosos se detallan en el apartado III. 3. del capítulo Material y Métodos.

El extracto líquido 1 se emplea para la elaboración del queso C y el 2 para el queso D, pero ambos provienen del mismo cuajo en pasta experimental (ALF).

Los resultados de los análisis microbiológicos practicados sobre los dos extractos acuosos utilizados, se encuentran en la **Tabla 26.**

Tabla 26. Parámetros microbiológicos de los extractos acuosos de los cuajos en pasta (log ufc mL⁻¹)

Muestra	Aerobios Totales	Enterobacterias	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. Sulfito reductores</i>	Mohos y levaduras	<i>Salmonella spp.</i>
Extracto 1	3.52 ^a ±0.36	3.06 ^a ±0.37	2.14 ^a ±0.25	1.85 ^a ±0.17	2.72 ^a ±0.15	2.32 ^a ±0.19	ND
Extracto 2	3.20 ^a ±0.25	2.62 ^a ±0.12	0.00 ^b ±0.00	0.00 ^b ±0.00	2.81 ^a ±0.25	1.89 ^b ±0.13	ND

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

ND: No detectado

De los análisis microbiológicos practicados sobre ambos extractos acuosos se deduce:

- No existen diferencias significativas entre los extractos acuosos utilizados en los valores determinados para aerobios totales, enterobacterias y *C. sulfito-reductores*.
- Existen diferencias significativas entre los extractos para *E. coli*, *S. aureus* y mohos y levaduras siendo siempre los recuentos superiores en el extracto utilizado el primer día de elaboración (Extracto 1).
- No se detectó la presencia de *Salmonella spp.* en 25 mililitros en ambos extractos.
- Ambos extractos cumplen la Legislación en el caso de los aerobios mesófilos (máximo 10⁵ ufc mL⁻¹) y *Salmonella spp.* (ausencia en 25 g).

- El Extracto 2 se ajusta a lo permitido legalmente en lo que respecta a *E. coli* (máximo 1 ufc mL⁻¹) y *S. aureus* enterotoxigénico (ausencia en 1 g).
- Los dos extractos acuosos empleados incumplen lo establecido para enterobacterias (máximo 10 ufc mL⁻¹), *C. sulfito-reductores* (máximo 1 ufc mL⁻¹) y Mohos y levaduras (máximo 10 ufc mL⁻¹).

Como se muestra en la **Tabla 26**, el Extracto 1 tiene una mayor concentración de *E. coli*, *S. aureus* y hongos que el Extracto 2, lo que podría deberse a una práctica higiénica incorrecta durante la manipulación, para la obtención de dicho extracto. Cabe destacar que durante la obtención de los dos extractos para coagular la leche, se ha intentado reproducir todos los procedimientos tal y como se desarrollan habitualmente en una quesería industrial, donde pequeños descuidos higiénicos durante las prácticas de manipulación de alimentos se pueden traducir en importantes incrementos en los recuentos bacterianos.

IV. 2. CARACTERIZACION DE LOS QUESOS DE MURCIA AL VINO

IV. 2. 1. Parámetros físico-químicos

La **Tabla 27** contiene los valores medios de los parámetros fisicoquímicos de los quesos durante la maduración.

1) pH

A los 2 días de maduración se observan diferencias significativas entre todos los quesos analizados, correspondiendo el valor más alto al queso B (6,14) y el más bajo al D (5,25). Valores similares (5,73-5,80) se determinan en queso de cabra Majorero (FREITAS *et al.*, 2000, MARTÍN-HERNANDEZ *et al.*, 1992), 5,80 en queso de cabra de pasta lavada (MARTÍN-HERNANDEZ *et al.* (1992) y 5,36 en queso de cabra tipo Camembert (GABORIT *et al.*, 2001); sin embargo, MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) determinan un valor superior en queso fresco de cabra (6,60) al inicio de la maduración.

Tabla 27. Evolución de los parámetros fisicoquímicos de los quesos durante la maduración (días)

Queso	pH			Ext. Seco (%)			Cloruro sódico (%)			Proteína (%)			Grasa (%)			a _w 20°C		
	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d
A	5.57 ^b ±0.05	5.36 ^b ±0.01	5.41 ^b ±0.01	54.18 ^b ±0.12	65.50 ^b ±0.10	66.30 ^c ±0.21	1.65 ^a ±0.01	1.95 ^a ±0.05	2.14 ^a ±0.07	19.85 ^a ±0.21	23.28 ^a ±0.22	23.84 ^b ±0.11	29.68 ^a ±0.76	39.40 ^c ±0.71	43.54 ^a ±0.59	0.97 ^a ±0.00	0.94 ^b ±0.01	0.95 ^{ab} ±0.00
B	6.14 ^a ±0.00	5.45 ^a ±0.01	5.46 ^a ±0.01	54.11 ^b ±0.16	62.92 ^c ±0.20	64.54 ^d ±0.17	1.50 ^b ±0.02	1.77 ^b ±0.07	1.94 ^b ±0.05	18.24 ^c ±0.20	21.11 ^b ±0.74	22.38 ^c ±0.12	29.86 ^a ±0.54	36.33 ^d ±0.42	40.83 ^b ±0.86	0.98 ^a ±0.00	0.96 ^a ±0.00	0.96 ^a ±0.01
C	5.40 ^c ±0.01	5.28 ^c ±0.01	5.36 ^c ±0.01	52.34 ^c ±0.17	65.56 ^b ±0.05	68.15 ^b ±0.04	1.42 ^c ±0.05	1.84 ^{ab} ±0.02	2.05 ^{ab} ±0.06	19.05 ^b ±0.19	23.34 ^a ±0.15	24.50 ^{ab} ±0.42	28.65 ^a ±0.92	42.07 ^b ±0.32	42.04 ^{ab} ±0.88	0.97 ^a ±0.00	0.95 ^{ab} ±0.00	0.95 ^{ab} ±0.00
D	5.25 ^d ±0.01	5.36 ^b ±0.01	5.36 ^c ±0.00	54.56 ^a ±0.04	69.64 ^a ±0.10	70.27 ^a ±0.08	1.42 ^c ±0.02	1.79 ^b ±0.06	2.03 ^{ab} ±0.07	19.40 ^{ab} ±0.15	23.72 ^a ±0.19	24.64 ^a ±0.08	29.97 ^a ±0.82	44.80 ^a ±0.71	43.08 ^a ±0.88	0.97 ^a ±0.00	0.95 ^{ab} ±0.00	0.94 ^b ±0.00

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes (P<0.05)

Otros autores (ZÁRATE *et al.*, 1997, OLARTE *et al.*, 2000, BUFFA *et al.*, 2004) determinan para el mismo período valores inferiores de pH (4,93, 4,85 y 4,99 en quesos de cabra Tenerife, Cameros y pasta prensada, respectivamente).

Valores aún más bajos de pH (4,32 y 4,60) se observan en quesos de coagulación ácida Sainte-Maure (GABORIT *et al.*, 2001) y tipo Babia-Laciana (FRANCO *et al.*, 2003), respectivamente.

A los 45 días los quesos A y D alcanzan el mismo valor y son significativamente diferentes a los valores determinados en los quesos B (5,45) y C (5,28). OLARTE *et al.* (2000) para el mismo período de maduración determinan un valor inferior de pH (4,69) en queso Cameros.

A los 60 días de maduración se observa que los valores de pH son iguales (5,36) en los quesos elaborados con cuajo en pasta experimental (quesos C y D) e inferiores a los elaborados con cuajo bovino (A y B) que muestran diferencias significativas entre sí (5,41 y 5,46). Este hecho confirma que el tipo de cuajo empleado afecta significativamente al pH del Queso de Murcia al Vino a los 60 días de maduración; IRIGOYEN *et al.* (2002) observan el mismo comportamiento en queso de oveja. Un valor similar al determinado en este estudio es señalado por MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) en queso Majorero (5,42), mientras que en el mismo tipo de queso FREITAS *et al.* (2000) encuentran un valor superior (5,51). ZÁRATE *et al.* (1997) y BUFFA *et al.* (2001) determinan valores de pH inferiores a los 60 días de maduración (4,65 y 4,84) en queso de cabra curado elaborado con cuajo comercial. Otros autores (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 1992; FRESNO *et al.*, 1996; FREITAS *et al.*, 2000; OLARTE *et al.*, 2000 y FRANCO *et al.*, 2003) también encuentran, en el mismo período de maduración, valores inferiores de pH en quesos de cabra de pasta lavada (5,27), Armada (4,69), La Serena (5,34), Cameros (4,98), Babia-Laciana (4,44) y en queso Feta (4,58 y 4,54) (MOATSOU *et al.*, 2004 y GEORGALA *et al.*, 2005). En general, se observan valores de pH inferiores en los quesos obtenidos a partir de cuajo en pasta, probablemente debido a una mayor actividad de las BAL en presencia de cuajo en pasta que generaría una mayor concentración de pequeños péptidos y aminoácidos libres (IRIGOYEN *et al.*, 2002).

El pH y la acidez, condicionan las transformaciones de la pasta del queso, regulando el desarrollo de los principales microorganismos implicados en la maduración del queso. A valores de pH inferiores a 5,0 sólo se desarrollan las bacterias

lácticas, mohos y levaduras. La mayoría de las proteasas presentan una actividad máxima a valores de pH comprendidos entre 5,5 y 6,5.

También IRIGOYEN *et al.* (2002) observan una disminución significativa del pH en el queso La Serena al utilizar coagulante vegetal, aunque este descenso no se produce en el queso Serra da Estrela. Por tanto, podemos concluir que el tipo de cuajo/coagulante empleado condiciona el valor del pH del queso, aunque su efecto dependerá de la tecnología empleada.

Para KIRBY (1989) el valor de pH óptimo del queso es 5,3, por lo que los Quesos de Murcia al Vino elaborados cuajo en pasta (quesos C y D) favorecerían el inicio de la maduración en relación con los obtenidos con cuajo comercial (quesos A y B).

En los quesos de pasta lavada y prensada como es el Queso de Murcia al Vino, el valor de pH suele mantenerse cercano a 5,5 durante el proceso de maduración (quesos A y B), siendo éste un valor crítico e importante para el desarrollo microbiano o la acción de las enzimas. Como señala BERNARDO (1991) pequeñas variaciones en el pH pueden dar lugar a cambios importantes en la textura y la calidad del queso.

2) *Extracto seco total*

La observación de los valores de este parámetro para cada uno de los quesos reflejados en la **Tabla 27** permite comprobar un incremento a lo largo del período de maduración, como consecuencia del proceso de secado producido en la cámara utilizada para tal fin, y que coincide con lo publicado por IRIGOYEN *et al.* (2002) y FRANCO *et al.* (2003).

Al comienzo de la maduración no existen diferencias significativas entre los quesos elaborados con cuajo comercial (quesos A y B) a pesar de ser elaborados a partir de leche con distinta composición química (**Tabla 27**). Sin embargo, no se observa dicha homogeneidad entre los quesos elaborados con cuajo en pasta -en el mismo período de maduración-, ya que muestran diferencias significativas entre sí siendo superior el valor para el queso D (54,56%) en relación con el C (52,34%). Un valor más alto de extracto seco (55,0%) determinan MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) a los dos días de maduración en queso Majorero. Para el mismo período de maduración diferentes investigadores encuentran niveles inferiores de extracto seco en queso fresco de cabra y de pasta lavada (42,0 y 45,3%, respectivamente) (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 1992), Tenerife (46,4%) (ZÁRATE *et al.*, 1997), Majorero (44,9%) (FREITAS *et*

al., 2000), Cameros (48,74%) (OLARTE *et al.*, 2000), Sainte-Maure (42,8%), queso de cabra tipo Camembert (46,1%) (GABORIT *et al.*, 2001), Babia-Laciana (41,9%) (FRANCO *et al.*, 2003), de cabra M-G curado (46,96%) (BUFFA *et al.*, 2004) y Domiati (37,7%) (SORYAL *et al.*, 2004).

De forma similar a lo anteriormente descrito, a los 45 días se observa que los quesos A y C alcanzan valores similares de sólidos totales (65,50 y 65,56%), mientras que los quesos D (69,64%) y B (62,92%) tienen niveles significativamente diferentes entre sí. Al final del proceso de maduración el valor de extracto seco es diferente entre todos los quesos objeto de este estudio, siendo más elevado en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero (quesos C y D), reflejando éstos una mayor velocidad de maduración en relación con los quesos elaborados con el cuajo comercial (quesos A y B). OLARTE *et al.* (2000) determinan un valor de materia seca (80,37%), superior al observado por nosotros, en queso Cameros de 45 días.

A los 60 días (FRESNO *et al.*, 1996, FREITAS *et al.*, 2000, OLARTE *et al.*, 2000, BUFFA *et al.*, 2001, FRANCO *et al.*, 2003, BUFFA *et al.*, 2004) hallan valores en quesos Armada (79,4%), Majorero (82,2%), Cameros (83,32%), curado de cabra (72,0%), Babia-Laciana (78,0%) y de cabra M-G curado (71,97%) respectivamente, superiores al determinado en Quesos de Murcia al Vino. Sin embargo, para este mismo período de maduración MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) señalan valores inferiores en quesos Majorero (60,2%) y pasta lavada (55,5%), coincidiendo con lo observado por ZÁRATE *et al.* (1997) en queso Tenerife (40,9) y MOATSOU *et al.* (2004) y GEORGALA *et al.* (2005) en queso Feta (48,50 - 44,37%, respectivamente).

A partir de los 45 días de maduración, todos los quesos analizados cumplen con la legislación vigente para Queso de Murcia al Vino que exige un valor mínimo de extracto seco de 55%.

3) Cloruro sódico

La incorporación de sal contribuye directamente al sabor, controla el crecimiento de las BAL y los microorganismos, regula la actividad del cuajo y otras enzimas favoreciendo la sinéresis de la cuajada (PAVIA *et al.*, 2000) y la formación de la corteza (BALLESTER, 2005).

De forma similar a lo observado para el extracto seco, cada uno de los quesos incrementa su contenido de NaCl conforme progresa la maduración, como consecuencia del proceso de secado al que se somete los quesos durante este período (**Tabla 27**).

A los 2, 45 y 60 días los quesos elaborados con cuajo comercial muestran diferencias significativas entre sí, correspondiendo la mayor concentración al queso A durante todo el período de tiempo estudiado. Los quesos elaborados con cuajo en pasta, no tienen diferencias significativas entre sí durante todo el período de maduración. Al final de la maduración el nivel superior corresponde al queso A (2,14%) y el más bajo al queso B (1,94%).

A los 2 días ZÁRATE *et al.* (1997) determinan en queso Tenerife elaborado con cuajo en pasta de cabra un valor de NaCl superior de 3,72%, mientras que OLARTE *et al.* (2000) en queso Cameros hallan un valor inferior (0,51%) en el mismo período de maduración y otro superior (3,12%) a los 45 días, comparados con los Quesos de Murcia al Vino de esta Memoria. También encuentran valores superiores ZÁRATE *et al.* (1997), OLARTE *et al.* (2000) y MOATSOU *et al.* (2004) en quesos de cabra Tenerife (6,10%), Cameros (3,25%) y Feta (3,73%), respectivamente a los 60 días de maduración.

La concentración de NaCl influye de forma importante en el curso global de la maduración, presentando la mayoría de los quesos un valor que oscila entre 1-2%. Valores muy altos pueden provocar una inhibición o retraso en la proteólisis y la glucólisis, produciendo un retraso en la maduración del queso, por lo que deberá asegurarse una concentración adecuada (KIRBY, 1989). Una menor proporción de NaCl dará lugar a una excesiva proteólisis con producción de sabores amargos u otros defectos no deseables.

La concentración de NaCl obtenida en cada uno de los quesos de esta Tesis Doctoral, a lo largo de todo el período estudiado, se hallan dentro del rango aconsejado por KIRBY (1989).

A partir de los valores medios de NaCl de cada uno de los quesos se puede determinar su distribución en las fases acuosa y sólida de los quesos (**Tabla 28**). Si analizamos dichos resultados, se puede observar un interesante comportamiento del movimiento del NaCl tanto hacia la fase húmeda como seca en el interior de los quesos, durante el período de envejecimiento. En los Quesos de Murcia al Vino se comprueba un desplazamiento paulatino del NaCl que se acumula en una mayor proporción en la fase acuosa de todos los quesos a lo largo de la maduración, con una velocidad de

difusión mayor en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero. Sin embargo, dentro de la fase sólida del queso, la movilización del NaCl se comporta de un modo diferente, donde no se observan variaciones importantes en el contenido de la sal durante todo el período de tiempo considerado.

Tabla 28. Distribución del NaCl en las fases acuosa y sólida en los quesos, durante la maduración

Queso	NaCl en el agua (%)			NaCl en el extracto seco (%)		
	Día de maduración			Día de maduración		
	2	45	60	2	45	60
A	3,59	5,66	6,34	3,04	2,98	3,22
B	3,28	4,78	5,46	2,78	2,81	3,00
C	2,99	5,33	6,42	2,72	2,80	3,00
D	3,12	5,91	6,84	2,60	2,57	2,89

Probablemente este comportamiento pueda deberse a un mayor incremento de la presión osmótica en la fracción acuosa de los quesos elaborados con cuajo en pasta, como consecuencia de la mayor velocidad de formación de compuestos de menor peso molecular de origen proteico derivado de una mayor actividad proteolítica (BUSTAMANTE, 2002). SARANTINOPOULOS *et al.* (2002) señalan que el incremento del contenido de agua observado durante la maduración del queso Feta es habitual en este tipo de queso, ya que se asocia a la ruptura de las uniones peptídicas y a la formación de nuevos compuestos iónicos que favorecen la entrada de agua a partir de la salmuera. Además detallan que el contenido de NaCl en la fracción acuosa en este tipo de queso se incrementa hasta el día 30 hasta alcanzar paulatinamente un valor de 5,8% que se estabiliza a los 60 días de maduración, que coincide con lo determinado en los quesos de Murcia al Vino de este estudio (**Tabla 28**).

La presión osmótica de una disolución acuosa a temperatura constante es directamente proporcional a su concentración molar (Mol L^{-1}), siendo esta relación experimental análoga a la ley de Boyle para los gases. Según GLASSTONE (1972) para una disolución se verifica

$$\frac{\pi}{c} = cte \quad \text{y} \quad \pi V = cte$$

Donde π es la presión osmótica; c la concentración molar de la disolución y V el volumen del sistema. Además, la proporcionalidad que existe entre la π y la temperatura absoluta (T) demuestra que a las disoluciones puede aplicarse una ley equivalente a la de Gay Lussac para los gases, por lo tanto

$$\frac{\pi}{T} = cte$$

y combinando las dos leyes de las disoluciones, se ve que

$$\pi = \frac{1}{M} \frac{mRT}{V}$$

Donde m es la masa expresada en gramos de la sustancia considerada; R la constante general de los gases ideales; y M el peso molecular de dicha sustancia. Como se puede apreciar, la presión osmótica se relaciona con el peso molecular de la sustancia osmóticamente activa de forma inversamente proporcional. Dentro del queso, para un momento determinado de la maduración y para un valor determinado de la sustancia que se quiera estudiar y en las mismas condiciones de maduración del queso, la presión osmótica en la fase húmeda del queso dependerá exclusivamente del peso molecular de dicha sustancia, debido a que el resto de las variables permanecen constantes dentro del sistema.

Por lo tanto la formación de sustancias de menor M y que vayan solubilizándose en la fase acuosa del queso harán que su presión osmótica aumente atrayendo una mayor cantidad de agua hacia la misma, generando en consecuencia un gradiente de difusión que transportaría NaCl hacia la fase acuosa del queso.

Para KIRBY (1989) los niveles de NaCl en la fase húmeda son importantes en cualquier queso, y si la temperatura se incrementa -con el objeto de acelerar su maduración- su importancia se acentúa aún más entre 4,0-5,0%. En nuestro caso, los valores se encuentran por debajo de lo recomendado por este autor al principio de la maduración (2,99 a 3,59%), y por encima (5,46 a 6,84%) al final de la misma (**Tabla 28**).

PAVIA *et al.* (2000) obtienen queso Manchego experimental con un contenido bajo en sal y para tal fin aplican un sistema de impregnación a vacío obteniendo a los 60

días en el interior del queso un valor promedio de NaCl en agua del 2,2% que equivale a tres veces menos que el obtenido para los Quesos de Murcia al Vino estudiados.

ZÁRATE *et al.* (1997) encuentran a los 2 días de maduración en queso Tenerife elaborado con cuajo en pasta de cabra un valor superior de 8,02% NaCl en ES comparado con los quesos de este estudio, mientras que MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) hallan niveles inferiores en quesos fresco (1,48%), pasta lavada (1,88%) y Majorero (0,54%). Esta afirmación coincide con FREITAS *et al.*, 2000 al determinar valores inferiores en el mismo período de maduración en quesos La Serena (2,45%), Majorero (1,31%) y con lo observado por OLARTE *et al.* (2000) en queso Cameros (1,05%). Estos autores encuentran un valor superior al determinado en nuestro estudio en queso Cameros (3,88%); sin embargo, POVEDA *et al.* (2004) en el mismo período de tiempo hallan un valor semejante en queso Manchego (2,95%) al observado en los quesos elaborados.

A los 60 días de maduración FRESNO *et al.* (1996), BUFFA *et al.* (2001) y POVEDA *et al.* (2004) determinan valores similares de NaCl en ES en quesos Armada (3,11%), curado de cabra (2,92%) y Manchego (3,24%), respectivamente. Sin embargo, otros autores hallan en el mismo período de maduración niveles superiores en quesos Majorero (4,48 y 3,44%) (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 1992 y FREITAS *et al.*, 2000), Tenerife (12,45%) (ZÁRATE *et al.*, 1997), La Serena (3,54%) (FREITAS *et al.*, 2000) y Cameros (3,90%) (OLARTE *et al.*, 2000). Valores inferiores encuentran MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992), FREITAS *et al.* (2000) y BALLESTEROS *et al.* (2006) en quesos de pasta lavada (2,45%), Idiazábal (2,85%) y Manchego (2,83%), respectivamente.

FRANCO *et al.* (2003) determinan un valor de NaCl en ES muy bajo tanto al inicio como al final de la maduración en queso Babia-Laciana (1,1%), ya que la sal en este tipo de queso se agrega a la leche antes de coagular, produciéndose su eliminación durante el desuerado y de esta manera se obtiene el queso de cabra con un contenido en sodio inferior. BUFFA *et al.* (2004) en queso curado de cabra M-G a los 60 días de maduración determinan un valor superior (7,51%) al encontrado en los quesos objeto del presente estudio.

4) Proteína

A los 2 días se observan diferencias significativas entre los quesos A, B y C correspondiendo al queso A el mayor porcentaje (19,85%), y el menor al queso B (18,24%) (**Tabla 27**).

A los 45 días, solamente hay diferencias significativas entre el queso B que mantiene la menor concentración (21,11%) y el resto de los quesos, mientras que a los 60 días las diferencias estadísticas son significativas entre los quesos B (22,38%), A (23,84%) y D (24,64%).

Si mediante cálculo matemático relacionamos el contenido proteico de cada uno de los quesos con su extracto seco observamos que todos los quesos elaborados siguen el mismo comportamiento, que consiste en una ligera disminución a los 45 días, seguido de un ligero ascenso al final de la maduración (**Tabla 29**), lo que coincide con lo señalado por IRIGOYEN *et al.* (2002) en queso de oveja.

Valores similares a los determinados para el Queso de Murcia al Vino los determinan MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) en queso fresco de cabra de 2 días (35,9%) y Majorero de 60 días (35,5%) y FREITAS *et al.* (2000) en queso Idiazábal (35,4%) a los 60 días.

Diversos investigadores a los 2 días de maduración encuentran valores de proteína en extracto seco superiores en queso de pasta lavada de cabra (37%) (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 1992), en queso Majorero (38,0 y 40,8%) (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 1992 y FREITAS *et al.*, 2000), Roncal (45,2%) (FREITAS *et al.*, 2000), Domiati (38,1%) (SORYAL *et al.*, 2004), mientras que OLARTE *et al.* (2000) determinan un valor inferior en queso Cameros (33,2%).

A los 45 días POVEDA *et al.* (2004) en queso Manchego hallan un valor superior (38,6%) y OLARTE *et al.* (2000) señalan un valor inferior en queso Cameros (33,2%) a los quesos de este estudio (**Tabla 29**).

Otros autores (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 1992; FREITAS *et al.*, 2000; IRIGOYEN *et al.*, 2002; MOATSOU *et al.*, 2004 y BALLESTEROS *et al.*, 2006) encuentran niveles más altos de proteína en extracto seco en quesos de pasta lavada (36,7%), La Serena (46,2%), Roncal (36,9%), Feta (36,5%) y Manchego (40,0%) a los 60 días de maduración. Por el contrario (FRESNO *et al.*, 1996; OLARTE *et al.*, 2000 y FRANCO *et al.*, 2003) determinan valores inferiores en quesos Armada (33,7%), Cameros (34,2%) y Babia-Laciana (32,8%) para el mismo período de maduración.

A partir de los 45 días todos los quesos cumplen con la normativa establecida para este tipo de queso que admite como valor mínimo 32% de proteína en extracto seco.

El tipo de cuajo empleado no afecta en un grado significativo al valor de la proteína en los Quesos de Murcia al Vino, mientras que IRIGOYEN *et al.* (2002) en queso de oveja determinan niveles de proteína significativamente mayores en quesos elaborados a partir de cuajo comercial en relación con los obtenidos con cuajo en pasta de cordero.

5) *Materia grasa*

Para este parámetro se observa que al inicio de la maduración todos los valores son iguales entre sí por lo que se puede pensar que existe una distribución homogénea para la grasa a los 2 días de maduración a pesar de partir de niveles de materia grasa dispares en las materias primas utilizadas (**Tabla 13**). A los 45 días los valores son significativamente distintos entre ellos, con un valor inferior para el queso B (36,33%) y superior para el D (44,80%). Al final del período de maduración se observan diferencias significativas entre el queso B (40,83%) frente al A y al D, que no difieren significativamente entre sí; el queso A tiene el mayor porcentaje (43,54%). Este hecho muestra una relación que no es lógica teniendo en cuenta que el queso A se elabora con la leche 1 que es la de menor contenido de grasa (**Tabla 13**). De lo observado se concluye que el tipo de cuajo solamente afecta al contenido de materia grasa de los Quesos de Murcia al Vino a los 45 días de maduración, alcanzando los niveles más altos en los elaborados con cuajo en pasta, similar a lo señalado por IRIGOYEN *et al.* (2002) en queso de oveja de 120 días de maduración.

Si en los diferentes quesos referimos el contenido graso al extracto seco obtenemos los valores medios que se reflejan en la **Tabla 29**.

Tabla 29. Contenido proteico y graso en el extracto seco de los quesos durante la maduración

Queso	Proteína en el extracto seco (%)			Grasa en el extracto seco (%)		
	Día de maduración			Día de maduración		
	2	45	60	2	45	60
A	36,63	35,54	35,96	54,78	60,16	64,06
B	33,71	33,55	34,67	55,17	57,73	63,27
C	36,39	35,60	35,94	54,74	64,17	61,69
D	35,56	34,07	35,07	54,93	64,33	61,31

Los quesos elaborados con cuajo bovino (A y B) incrementan su valor graso en el extracto seco durante todo el período de maduración analizado, comenzando con un porcentaje de grasa en extracto seco de 54,78% y 55,17% (quesos A y B), alcanzando al final del proceso de maduración un valor de 64,06% y 63,27% (A y B respectivamente). Un comportamiento diferente se observa en los quesos obtenidos a partir de cuajo en pasta de cordero (C y D) con un incremento más acusado a los 45 días, aunque a los 60 días desciende hasta valores inferiores a los determinados en quesos A y B, probablemente debido a la mayor actividad lipolítica de los cuajos en pasta. Esta observación no coincide con SARANTINOPOULOS *et al.* (2002) que determinan en queso Feta un comportamiento diferente, al disminuir el contenido de grasa hasta el día 30 y aumentar posteriormente hasta el día 60 de maduración.

FRANCO *et al.* (2003) en queso Babia-Laciana encuentran valores similares de grasa en extracto seco a los determinados en los quesos de este trabajo de investigación. Además, MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) determinan un valor superior en queso de cabra de pasta lavada (57,4%) a los 2 días de maduración.

Otros autores (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 1992, OLARTE *et al.*, 2000, FREITAS *et al.*, 2000) determinan valores inferiores de grasa en extracto seco en queso fresco de cabra (49,9%), Cameros (49,72%), Majorero (52,3%), acordes con los señalados por GABORIT *et al.* (2001) en quesos Sainte-Maure (51,6%) y queso de cabra tipo Camembert (50,7%). Coincidiendo con lo anteriormente expuesto SORYAL *et al.* (2004) determinan un valor inferior en queso Domiati (39,0%) a los 2 días de maduración, inferior al determinado por OLARTE *et al.* (2000) en queso Cameros a los 45 días de maduración (50,0%). Al final del período de maduración (60 días) otros autores (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 1992, FRESNO *et al.*, 1996, FREITAS *et al.*, 2000, OLARTE *et al.*, 2000 e IRIGOYEN *et al.*, 2002) observan valores inferiores de

grasa en extracto seco a los determinados en este trabajo en quesos de pasta lavada (54,5%), Armada (60,2%), Majorero (54,1%), Cameros (52,41%) y Roncal (52,5%), coincidiendo con lo observado por MOATSOU *et al.* (2004) y GEORGALA *et al.* (2005) en queso Feta (55,10 y 55,24%, respectivamente).

Todos los Quesos de Murcia al Vino a partir de los 45 días cumplen con lo exigido en la normativa en vigencia, que acepta como mínimo un valor de 45% de grasa en extracto seco.

6) Actividad de agua

El valor de la a_w está relacionado con la disponibilidad de agua del queso, necesaria para el desarrollo de los microorganismos y reacciones químicas y enzimáticas que en su conjunto darán lugar a las características organolépticas del producto.

Para este parámetro físico tan importante no se aprecian diferencias significativas entre los quesos al inicio de la maduración (**Tabla 27**). A los 45 días se observan diferencias significativas entre los quesos A (0,94) y B (0,96), y a los 60 días entre los quesos D (0,94) y B (0,96), elaborados con cuajo en pasta ovino y cuajo comercial, respectivamente.

Los valores hallados al inicio y al final de la maduración en los Quesos de Murcia al Vino, coinciden con lo publicado por BERNARDO (1991) que encuentra que el valor de la a_w varía desde 0,99 al comienzo de la maduración hasta 0,95-0,96 al final de la misma. FREITAS *et al.* (2000) en queso de cabra Majorero artesanal determinan un valor similar (0,97) a los 2 días, aunque resulta inferior a los 60 días (0,82), mientras que FRANCO *et al.* (2003) en queso Babia-Laciana hallan valores superiores al inicio (0,99) e inferiores a los 60 días de maduración (0,93) comparados con los Quesos de Murcia al Vino de este estudio.

7) Fracciones nitrogenadas

El proceso de proteólisis en un queso, se manifiesta por una solubilización de las caseínas que se traduce en un aumento del nitrógeno soluble (FOX *et al.*, 1991).

Para FREITAS *et al.* (1997), el efecto proteolítico se inicia con la ruptura de la paracaseína mediada por el cuajo residual y/o la plasmina generando polipéptidos, que

posteriormente siguen un proceso de degradación realizado por las proteasas de las BAL y/o de la flora microbiana secundaria. El fenómeno de la proteólisis primaria del queso conlleva la formación de péptidos de alto peso molecular insolubles en agua, y pequeños péptidos solubles en agua (MOONEY *et al.*, 1998).

El fraccionamiento del queso a través de varios agentes precipitantes y su posterior análisis -que determina el nitrógeno soluble en dichas fracciones- son un claro exponente metodológico para cuantificar el proceso proteolítico en el queso y por lo tanto de su grado de maduración.

Los resultados obtenidos de cada una de las fracciones nitrogenadas durante el período de maduración de cada uno de los quesos elaborados, se detallan en la **Tabla 30**.

La observación de los valores permite apreciar que todos estos parámetros indicadores de la maduración del queso, aumentan en todos los casos en función del tiempo, lo que indica que los quesos elaborados experimentan un claro proceso de fraccionamiento proteico, al liberar sustancias de menor peso molecular más solubles en agua que las proteínas originales.

WSN

Al inicio de la maduración, el valor del nitrógeno soluble en agua (WSN) muestra diferencias significativas entre los quesos elaborados con cuajo comercial (quesos A y B) y los elaborados con cuajo en pasta de cordero alcanzando valores superiores en estos últimos (quesos C y D). El mayor porcentaje corresponde al queso C (7,99%) y el menor al B (5,58%). En el mismo período de maduración MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) encuentran valores mayores en diferentes tipos de queso de cabra: 16,9% en fresco, 18,5% en pasta lavada y 15,4% en Majorero.

A los 45 días, el WSN en los diferentes quesos de Murcia al Vino no muestra diferencias significativas. KALIT *et al.* (2005) determinan un valor inferior (12,61%) en queso Tounj elaborado con leche de vaca y coagulante microbiano.

Al final de la maduración observamos que las diferencias vuelven a ser significativas entre los quesos elaborados con cuajo comercial -con valores inferiores- y los obtenidos a partir de cuajo en pasta de cordero C (21,91%) y D (19,39%). Varios autores determinan valores similares a los 60 días de maduración en diferentes quesos: 16,46-20,7% Manchego (PAVIA *et al.*, 2000; POVEDA *et al.*, 2004 y BALLESTEROS *et al.*, 2006), 18,50% queso curado de cabra M-G (BUFFA *et al.*, 2001), 17,94%

Cheddar de 90 días (FOX *et al.*, 1991). Sin embargo, MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) determinan valores superiores en quesos de cabra de pasta lavada (41,1%) y Majorero (32,1%) a los 60 días de maduración, lo que coincide con lo señalado por JIN *et al.* (1995) en quesos Caciotta (35,4%), Monterey Jack (23,0%) y Cheddar de cabra (23,0%).

Diferentes autores consultados en la bibliografía encuentran valores inferiores de WSN comparados con los quesos de este trabajo. Así, FREITAS *et al.* (1997) en queso Picante puro de cabra (11,9%) y Picante de cabra y oveja (entre 10,5-17,1%) de 55 días, LANE *et al.* (1997) en Cheddar (13,5%) de 60 días, BÜTIKOFER *et al.* (1993) en Fontina de 120 días (17,95%), VOLIKAKIS *et al.* (2004) y MOATSOU *et al.* (2004) en queso Feta de 60 días (14,56 y 12,9%), mientras que KALIT *et al.* (2005) en queso Tounj de 60 días de maduración determinan un 13,14%.

Si relacionamos el valor de pH de los distintos Quesos de Murcia al vino (**Tabla 27**) con el porcentaje de WSN (**Tabla 30**) se observa una relación inversa entre ambos parámetros, donde valores bajos de pH se corresponden con porcentajes elevados de la fracción de nitrógeno soluble en agua, que coincide con lo determinado por MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.* (1992) que atribuyen dicha relación a un mayor desarrollo de la proteólisis al disminuir el pH.

SN_{pH4.4}

A pH 4,4 los valores de nitrógeno soluble (SN_{pH4.4}) son similares en todos los quesos a los 2 días de maduración, alcanzando niveles superiores en los elaborados con cuajo en pasta (**Tabla 30**). Un valor semejante encuentran FRANCO *et al.* (2003) en queso Babia-Laciana de 3 días (8,6%), mientras que MEDINA *et al.* (1992) determinan valores muy superiores en queso Hispánico de oveja y vaca elaborado con quimosina genética (18,3%) y cuajo comercial (16,5%) respectivamente. LÓPEZ *et al.* (1999) en queso fresco de cabra M-G determinan valores (15,18%) que duplican a los obtenidos en los quesos A y B elaborados con cuajo comercial.

Tabla 30. Evolución de las fracciones de nitrógeno soluble de los diferentes quesos a lo largo del período de maduración (% del Nitrógeno Total)

Queso	WSN			PH 4.4			TCA			PTA			ETANOL		
	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d
A	6.76 ^b ±0.26	15.45 ^a ±0.83	16.51 ^c ±0.51	7.27 ^a ±1.42	16.51 ^b ±0.44	17.54 ^b ±0.16	2.28 ^b ±0.28	6.69 ^c ±0.06	7.86 ^c ±0.25	0.61 ^{ab} ±0.04	1.27 ^b ±0.03	1.63 ^b ±0.16	3.84 ^{bc} ±0.15	9.48 ^c ±0.11	10.61 ^b ±0.17
B	5.58 ^c ±0.42	15.58 ^a ±0.13	17.34 ^c ±0.36	7.12 ^a ±0.27	15.09 ^c ±0.61	17.44 ^b ±0.20	2.09 ^b ±0.19	6.45 ^c ±0.08	7.53 ^c ±0.22	0.56 ^b ±0.09	1.21 ^b ±0.04	1.68 ^b ±0.29	3.60 ^c ±0.10	9.17 ^d ±0.13	10.37 ^b ±0.23
C	7.99 ^a ±0.11	16.55 ^a ±2.72	21.91 ^a ±0.60	9.28 ^a ±1.09	19.42 ^a ±0.81	21.24 ^a ±1.23	2.84 ^a ±0.08	9.09 ^a ±0.26	11.12 ^a ±0.39	0.75 ^a ±0.03	1.71 ^a ±0.10	2.18 ^a ±0.25	4.08 ^b ±0.10	12.70 ^a ±0.04	15.25 ^a ±0.49
D	7.55 ^a ±0.11	15.80 ^a ±0.17	19.39 ^b ±0.89	9.32 ^a ±0.85	17.05 ^b ±0.21	20.08 ^a ±0.37	2.93 ^a ±0.13	8.50 ^b ±0.15	10.24 ^b ±0.19	0.73 ^a ±0.08	1.56 ^a ±0.08	1.91 ^{ab} ±0.09	5.25 ^a ±0.18	11.58 ^b ±0.13	14.85 ^a ±0.16

Medias con diferentes superíndices en la misma columna, son significativamente diferentes (P<0.05)

A los 45 días de maduración encontramos diferencias significativas entre el valor porcentual de $\text{SNpH}_{4.4}$ de los quesos A y D con los quesos B y C. El valor más elevado corresponde al queso C (19,42%) y el menor al B (15,09%). Al final de la maduración se observan diferencias significativas entre los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero -que alcanzan los valores superiores- y los obtenidos a partir de cuajo comercial (A y B). Valores similares a los encontrados para los Quesos de Murcia al Vino a los 60 días de maduración determinan MEDINA *et al.* (1992) en queso Hispánico elaborado con quimosina genética (18,4%), y cuajo comercial (20,3%), similar a lo señalado por IRIGOYEN *et al.* (2001) en queso Roncal (20,25%) y GOBBETTI *et al.* (2002) en Caciocavallo-Pugliese (18,3%).

Otros autores (BÜTIKOFER *et al.*, 1993 y FRANCO *et al.*, 2003) encuentran valores inferiores en quesos Fontina de 120 días (16,30%) y Babia-Laciana de 60 días de maduración (13,4%).

Coincidiendo con lo observado por LÓPEZ *et al.* (1990), se deduce que los Quesos de Murcia al Vino elaborados a los 60 días de maduración con cuajo en pasta de cordero (C y D) exhiben una actividad proteolítica (originada por la actividad del cuajo) significativamente mayor que los obtenidos a partir de cuajo comercial (A y B) como se aprecia en los valores obtenidos de $\text{SNpH}_{4.4}$ (**Tabla 30**). Este comportamiento muestra un efecto proteolítico superior del cuajo en pasta de cordero, comparado con el cuajo bovino comercial, tal como lo señalado por BUSTAMANTE (2002), al considerar que el aumento en el porcentaje de nitrógeno soluble a pH 4,6 en las primeras etapas de la maduración tiene su origen en la actividad de las proteasas endógenas de la leche, el coagulante residual y la actividad de las proteasas del cultivo iniciador en menor grado (FOX *et al.*, 1991). Según análisis electroforéticos en gel de poliacrilamida y cromatografía líquida de alta resolución esta fracción soluble está constituida por proteínas del suero, proteosa-peptonas, péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos derivados de la hidrólisis de las caseínas (FARKYE *et al.*, 1990).

Los niveles alcanzados de $\text{SNpH}_{4.4}$ en los Quesos de Murcia al Vino de esta memoria de Tesis Doctoral indican que en los quesos elaborados con cuajo en pasta de oveja la degradación de caseínas y péptidos es más intensa que en los obtenidos a partir de cuajo bovino, coincidiendo con BUSTAMANTE *et al.* (2002) que comparan el efecto de un cuajo en pasta ovino similar con otro comercial en la elaboración de Queso Idiazábal.

TCASN

Los resultados obtenidos de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCASN) al inicio de la maduración indican la existencia de diferencias significativas entre los quesos elaborados con cuajo comercial, que tienen valores inferiores, y los elaborados con cuajo en pasta experimental. Valores claramente superiores a los 2 días de maduración encuentran MEDINA *et al.* (1992) en queso Hispánico utilizando quimosina genética (5,69%) y cuajo comercial (5,28%), así como FRANCO *et al.* (2003) en queso Babia-Laciana (4,8%). LÓPEZ *et al.* (1999), determinan en queso fresco de cabra M-G de 2 días de maduración, utilizando cuajo comercial, niveles casi tres veces superiores a los obtenidos en los quesos A y B, que reflejan una actividad exopeptidasa de las BAL inferior en los quesos obtenidos con cuajo comercial.

A los 45 días de maduración los valores de la TCASN tienen diferencias significativas entre los quesos elaborados a partir de cuajo comercial A y B (con niveles similares), y los quesos C (9,09%) y D (8,50%), estos últimos significativamente diferentes entre sí. KALIT *et al.* (2005) determinan en queso de vaca Tounj –elaborado con coagulante microbiano- una cifra inferior (6,23%) en el mismo período de maduración.

Al final del período de maduración, determinamos un comportamiento semejante a lo expuesto anteriormente para los 45 días de maduración (**Tabla 30**). Niveles similares a los encontrados en los quesos C y D determinan VOLIKAKIS *et al.* (2004) en queso Feta (10,57%) y MEDINA *et al.* (1992) en queso Hispánico empleando quimosina genética (10,6%) y cuajo comercial (11,1%). Algunos autores señalan niveles superiores a los quesos aquí estudiados en queso Roncal (13,89%) (IRIGOYEN *et al.*, 2001) y en queso Fiore Sardo (16,59%) (ADDIS *et al.*, 2005b) utilizando en este último queso cuajo en pasta ovino. Sin embargo, otros investigadores encuentran valores inferiores en queso Fontina de 120 días (5,92%) (BÜTIKOFER *et al.*, 1993), en queso Babia-Laciana de 60 días (8,6%) (FRANCO *et al.*, 2003) y en queso de vaca con coagulante microbiano (6,83%) KALIT *et al.* (2005), en el mismo tiempo de maduración.

De acuerdo con lo mencionado por LÓPEZ *et al.* (1990), se deduce que los Quesos de Murcia al Vino elaborados con cuajo en pasta de cordero (C y D) tienen una actividad exopeptidasa de origen microbiano significativamente mayor que los fabricados con cuajo bovino (A y B) durante todo el período de maduración, como se refleja en los valores obtenidos de TCASN (**Tabla 30**).

A partir de la información analizada de las tres fracciones nitrogenadas determinadas en los Quesos de Murcia al Vino, se deduce que el $\text{SNpH}_{4,4}$ es mucho menos sensible que el TCASN y el WSN al valorar el grado de proteolisis de los quesos y, por lo tanto, su determinación se adecuaría mejor a quesos con un período de maduración más prolongado.

PTASN

Esta fracción nitrogenada soluble en ácido fosfotúngstico (PTASN) proporciona un índice de la producción de aminoácidos libres durante la maduración del queso (FOX *et al.*, 1991). En esta fracción observamos que los valores encontrados en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero son superiores a los procedentes de cuajo comercial durante todo el período de maduración. Además, se determinan diferencias significativas a los 2 días de maduración entre el queso B con los dos elaborados con cuajo en pasta que no muestran diferencias entre sí. En el mismo período de maduración, MEDINA *et al.* (1992) hallan valores superiores en queso Hispánico fabricado con quimosina genética (1,71) y cuajo comercial (2,03%) y FREITAS *et al.* (2000) en queso La Serena (2,60%).

A los 45 días de maduración, se observan diferencias entre los quesos elaborados con cuajo en pasta (C y D) que alcanzan valores superiores (1,71 y 1,56% respectivamente) a los obtenidos con cuajo bovino A y B. POVEDA *et al.* (2004) encuentran en queso Manchego 1,81%, valor similar al queso C.

Al final de la maduración las diferencias son significativas entre los quesos C (2,18%) con A y B (1,63 y 1,68%) que no difieren entre sí. Valores similares a los quesos A, B y C (**Tabla 30**) determinan FOX *et al.* (1991) en queso Cheddar de 90 días (1,59%) y POVEDA *et al.* (2004) en queso Manchego de 60 días (2,03%). Otros autores determinan valores superiores en queso Hispánico elaborado con quimosina genética (4,13%) y cuajo comercial (5,13%) (MEDINA *et al.*, 1992), La Serena (10,6%) (FREITAS *et al.*, 2000) y Fiore Sardo (6,14%) (ADDIS *et al.*, 2005b) a los 60 días de maduración, comparados con los quesos de este estudio en el mismo período de tiempo. Sin embargo, valores inferiores se determinan en quesos Manchego de 60 días (entre 0,91-1,44%) (BALLESTEROS *et al.*, 2006) y Fontina de 120 días (1,00%) (BÜTIKOFER *et al.*, 1993).

ETSN

El nitrógeno soluble en etanol (ETSN) presenta diferencias significativas al inicio de la maduración entre el queso D que alcanza el valor más alto (5,25%) y los quesos A (3,84%), B (3,60%) y C (4,08%), y estos dos últimos tienen diferencias significativas entre sí. A los 45 días de maduración todos los quesos son significativamente distintos correspondiendo los valores más elevados a los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero C y D (12,70, 11,58% respectivamente).

Al final de la maduración se observa que las diferencias son significativas entre los quesos elaborados con cuajo en pasta cuyos valores superan los obtenidos a partir de cuajo comercial. Este hecho confirma que los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero tienen una mayor velocidad de afinado que los obtenidos con cuajo bovino.

Esta fracción de nitrógeno soluble obtenida a partir del nitrógeno soluble en agua se utiliza para el posterior estudio electroforético de sus componentes, y normalmente no suele determinarse como tal a partir de su contenido de nitrógeno. Por tal motivo, y especialmente en queso de cabra, la bibliografía científica disponible es muy escasa. BÜTIKOFER *et al.* (1993) la determinan en queso Parmigiano-Reggiano encontrando un valor de 31,15% a los 540 días de maduración, que indica que estos valores pueden llegar a ser tres veces superiores a los encontrados en los Quesos de Murcia al Vino a los 60 días de maduración (**Tabla 30**). BUSTAMANTE (2002) en Queso Idiazábal de 180 días encuentra un valor inferior de 9,7% comparado con los quesos de este estudio a los 60 días de maduración. También la autora antes mencionada, señala que en Queso Idiazábal el nitrógeno soluble en etanol aumenta con la maduración y es significativamente mayor en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero comparado con los obtenidos a partir de cuajo comercial. Todo ello coincide con lo determinado para los Quesos de Murcia al Vino de esta memoria de Tesis Doctoral a partir de los 45 días de maduración, así como con lo señalado por IRIGOYEN *et al.* (2002).

Si comparamos los valores correspondientes de TCASN y de ETSN en cada uno de los quesos en relación con el día de maduración, ambas fracciones muestran un comportamiento similar, lo que coincide con lo observado por ROHM *et al.* (1996) quienes trabajan en queso Emmental y encuentran que los valores de ETSN cuando se utilizan soluciones acuosas de etanol entre 30-40 % son comparables con los resultados de la fracción TCASN 12 %, para el mismo queso y el mismo estadio de maduración.

8) Ácidos grasos totales

La determinación de los AGT de los quesos de Murcia al Vino elaborados se realiza tal como se describe en el apartado III. 4. 1. 8) del capítulo Material y Métodos.

En la **Tabla 31** se puede observar su evolución en los quesos elaborados con cuajo comercial y en pasta de cordero durante la maduración.

Tabla 31. Evolución de los AGT según tipo de cuajo empleado (mg AGT kg⁻¹ materia grasa)

Ácido Graso	Días de maduración					
	2		45		60	
	Comercial	Pasta	Comercial	Pasta	Comercial	Pasta
C ₆	11,96 ^a ± 0,55	14,14 ^a ± 4,39	12,60 ^a ± 1,28	14,82 ^a ± 3,16	29,45 ^a ± 19,09	10,89 ^b ± 1,67
C ₈	18,36 ^a ± 0,57	21,63 ^a ± 4,78	18,84 ^a ± 1,38	21,48 ^a ± 2,85	29,82 ^a ± 15,09	16,78 ^a ± 1,65
C ₁₀	87,93 ^a ± 8,94	93,44 ^a ± 5,06	87,93 ^b ± 2,90	93,16 ^a ± 3,56	132,28 ^a ± 55,48	83,22 ^a ± 6,96
C ₁₂	36,26 ^a ± 4,87	32,20 ^a ± 8,17	34,15 ^a ± 2,17	33,70 ^a ± 6,65	42,44 ^a ± 9,97	32,28 ^b ± 0,90
C ₁₄	61,86 [*] ± 9,54	48,50 ^a ± 20,64	52,39 ^a ± 8,08	49,90 ^a ± 13,76	66,82 ^a ± 10,84	48,42 ^b ± 9,11
C ₁₆	175,83 ^a ± 34,73	148,11 ^a ± 52,48	151,85 ^a ± 31,91	130,63 ^a ± 38,75	211,60 ^a ± 71,92	136,75 ^b ± 34,98
C _{16:1}	3,64 ^a ± 1,10	2,89 ^a ± 0,47	4,60 ^a ± 1,38	4,20 ^a ± 1,44	2,93 ^a ± 3,35	1,17 ^a ± 1,28
C ₁₈	56,86 ^a ± 11,46	49,69 ^a ± 19,61	51,03 ^a ± 15,03	38,61 ^a ± 15,46	48,42 ^a ± 11,59	45,58 ^a ± 19,49
C _{18:1}	92,37 ^a ± 18,35	80,22 ^a ± 32,19	85,32 ^a ± 27,57	60,34 ^a ± 22,79	84,59 ^a ± 32,63	75,71 ^a ± 33,41
C _{18:2}	13,44 ^a ± 1,25	10,72 ^a ± 4,48	10,98 ^a ± 3,09	9,63 ^a ± 2,81	12,91 ^a ± 3,04	10,04 ^a ± 3,45
C _{18:3}	1,14 ^a ± 0,76	0,00 ^b ± 0,00	1,09 ^a ± 0,37	0,50 ^a ± 0,79	0,64 ^a ± 0,59	0,77 ^a ± 0,84

Medias con distintos superíndices en la misma fila y para cada día de maduración son significativamente diferentes (P<0.05)

Ácido caproico

No se determinan diferencias estadísticamente significativas en el contenido de ácido caproico entre los quesos al inicio y a los 45 días de maduración, aunque al final de la misma los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero tienen una concentración significativamente menor como se aprecia en la **Tabla 31**. En los quesos obtenidos con cuajo de ternera (A y B) se observa un incremento en los valores de C₆ durante la maduración, mientras que en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero (C y D) los valores son similares entre sí hasta los 45 días decayendo hacia el final de la maduración.

El valor superior se alcanza en los quesos A y B (29,45 mg AGT kg⁻¹ grasa) y el inferior en los quesos C y D (10,89 mg AGT kg⁻¹ grasa) al final de la maduración.

Ácido caprílico

El ácido caprílico no muestra variaciones en su concentración en los quesos estudiados a lo largo de la maduración. Un comportamiento similar al observado para el C₆ se aprecia para el C₈ donde en los quesos con cuajo comercial la concentración se incrementa con la maduración, mientras que en los elaborados con cuajo en pasta son similares hasta los 45 días disminuyendo hacia el final de la maduración.

Al igual que para el C₆ a los 60 días de maduración, se determina un valor de C₈ superior en los quesos con cuajo comercial (29,82 mg AGT kg⁻¹ grasa) mientras que el inferior (16,78 mg AGT kg⁻¹ grasa) se observa en los elaborados con cuajo en pasta probablemente debido a una mayor actividad lipolítica en estos últimos quesos.

Ácido cáprico

No se encuentran diferencias significativas en los valores del ácido cáprico al inicio y al final de la maduración entre ambos tipos de queso, mientras que a los 45 días se observa un valor significativamente superior (93,16 mg AGT kg⁻¹ grasa) en los quesos obtenidos con cuajo en pasta. También se aprecia un incremento de los valores en los quesos con cuajo comercial, y una disminución en los quesos con cuajo en pasta experimental a medida que la maduración avanza, comportamiento similar al observado en el C₆ y el C₈.

Ácido láurico

Para el ácido láurico no se observan diferencias significativas entre los quesos a los 2 y 45 días de maduración (**Tabla 31**), mientras que al final de la misma los quesos elaborados con cuajo de ternera alcanzan niveles significativamente superiores (42,44 mg AGT kg⁻¹ grasa) a los obtenidos con cuajo en pasta de cordero (32,28 mg AGT kg⁻¹ grasa).

A diferencia de lo observado para los AGT anteriores, el valor más elevado se determina en los quesos con cuajo comercial a los 60 días, mientras que el menor (32,20 mg AGT kg⁻¹ grasa) en los obtenidos con cuajo en pasta al inicio de la maduración.

Ácido mirístico

El ácido mirístico únicamente muestra diferencias significativas al final del proceso de maduración, con valores superiores en los quesos con cuajo comercial (66,82 mg AGT kg⁻¹ grasa). En los quesos elaborados con cuajo en pasta los niveles del C₁₄ no varían durante la maduración, mientras que en los quesos obtenidos con cuajo comercial disminuye su concentración a los 45 días para incrementar al final del afinado.

Ácido palmítico

No se observan diferencias estadísticas significativas en el contenido de ácido palmítico entre los quesos a los 2 y 45 días de maduración. Al final de la maduración los quesos obtenidos con cuajo comercial alcanzan un valor significativamente superior (211,60 mg AGT kg⁻¹ grasa) al elaborado con cuajo en pasta de cordero (136,75 mg AGT kg⁻¹ grasa).

Ácido palmitoleico

No se determinan diferencias significativas en las concentraciones de ácido palmitoleico entre los distintos tipos de queso durante todo el período de maduración. En todos los quesos se manifiesta un incremento de los valores hasta los 45 días, para disminuir al final de la maduración (**Tabla 31**). El valor superior (4,60 mg AGT kg⁻¹ grasa) lo alcanzan los quesos elaborados con cuajo de ternera a los 45 días, mientras que el inferior los obtenidos con cuajo en pasta de cordero (1,17 mg AGT kg⁻¹ grasa) al final de la maduración.

Ácido esteárico

Valores semejantes de ácido esteárico se determinan en todos los quesos durante la maduración. Se observa que en los quesos obtenidos con cuajo comercial (A y B) los valores disminuyen al avanzar la maduración, aunque en los elaborados con cuajo en pasta (C y D), los valores disminuyen a los 45 días aumentando hacia el final de la maduración.

El valor más elevado del C₁₈ se detecta en los quesos con cuajo comercial a los 2 días (56,86 mg AGT kg⁻¹ grasa), mientras que el más bajo se encuentra en los quesos obtenidos con cuajo en pasta a los 45 días de maduración (38,61 mg AGT kg⁻¹ grasa). ARO *et al.* (1998) determinan un valor porcentual medio de C₁₈ superior (12,77%) en quesos españoles comparado con los Quesos de Murcia al Vino con cuajo comercial (7,32%) y cuajo en pasta de cordero (9,87%) de 60 días de maduración de esta memoria de Tesis Doctoral.

Ácido oleico

Los valores determinados de ácido oleico son similares en todos los quesos a lo largo del período de maduración. Se observa un comportamiento similar al establecido para el C₁₈, con un descenso de los valores en los quesos con cuajo comercial hacia el final de la maduración, mientras que en los obtenidos con cuajo en pasta de cordero disminuyen a los 45 días para aumentar a los 60 días de maduración. También de forma similar a lo encontrado en C₁₈ la concentración más alta se determina en los quesos con cuajo comercial de 2 días (92,37 mg AGT kg⁻¹ grasa) y la más baja en los quesos elaborados con cuajo en pasta a los 45 días de maduración (60,34 mg AGT kg⁻¹ grasa). ARO *et al.* (1998) hallan un valor porcentual medio inferior (3,67%) en quesos españoles, comparado con los Quesos de Murcia al Vino elaborados con cuajo comercial (12,78%) y cuajo en pasta de cordero (16,40%) de 60 días de maduración.

Ácido linoleico

No se observan diferencias significativas entre los valores determinados del C_{18:2} en los quesos elaborados, durante la maduración. La concentración de este ácido graso disminuye a los 45 días, aumentando al final de la maduración. Los valores más elevados se obtienen en los quesos obtenidos a partir de cuajo comercial al inicio de la maduración (13,44 mg AGT kg⁻¹ grasa) y el inferior los quesos C y D (cuajo en pasta de cordero) a los 45 días de maduración (9,63 mg AGT kg⁻¹ grasa).

Ácido linolénico

Al inicio de la maduración el ácido linolénico tiene diferencias estadísticamente significativas entre los quesos elaborados con cuajo comercial (1,14 mg AGT kg⁻¹ grasa) y aquellos obtenidos con cuajo en pasta, donde no se detecta este ácido graso. Entre los 45 y 60 días no se determinan diferencias entre ambos quesos. Se observa que la concentración de ácido linolénico disminuye durante la maduración en los quesos con cuajo de ternera, aumentando en los elaborados con cuajo en pasta.

En la **Tabla 32** se encuentran los valores porcentuales de los AGT agrupados según el grado de saturación de la cadena carbonada obtenidos a partir de las concentraciones determinadas en los quesos a lo largo de la maduración.

Tabla 32. AGT según grado de saturación en los quesos elaborados (%)

Quesos	Ácidos grasos saturados (%)			Ácidos grasos monoinsaturados (%)			Ácidos grasos poliinsaturados (%)		
	2 d	45 d	60 d	2 d	45 d	60 d	2 d	45 d	60 d
Cuajo comercial	80,24	80,03	84,73	17,16	17,61	13,22	2,60	2,36	2,05
Cuajo en pasta	81,29	83,66	81,00	16,57	14,12	16,66	2,14	2,22	2,34

Según los valores que se detallan, los quesos elaborados con cuajo de ternera (A y B) incrementan el porcentaje de ácidos grasos totales saturados hacia el final de la maduración, mientras que los obtenidos con cuajo en pasta de cordero (quesos C y D) lo incrementan a los 45 días disminuyendo al final del proceso de maduración. El mayor nivel porcentual lo alcanzan los quesos con cuajo comercial (84,73%) a los 60 días y el menor los mismos quesos, pero a los 45 días de maduración (80,03%). ARO *et al.* (1998) determinan un valor porcentual medio inferior de ácidos grasos totales saturados (62,51%) en quesos españoles comparados con los Quesos de Murcia al Vino de este trabajo con cuajo comercial (84,73%) y cuajo en pasta de cordero (81,00%) de 60 días de maduración.

Los ácidos grasos totales monoinsaturados determinados (C_{16:1} y C_{18:1}) en los quesos con cuajo comercial, por el contrario, se incrementan a los 45 días alcanzando un valor menor de 13,22% al final de la maduración y en aquellos elaborados con cuajo en

pasta se observa una disminución a los 45 días alcanzándose un valor similar a los quesos de 2 días (16,57%) al final de la maduración (16,66%).

El grupo de ácidos grasos totales poliinsaturados determinados ($C_{18:2}$ y $C_{18:3}$) muestran que los valores porcentuales en los quesos con cuajo comercial disminuyen a medida que el tiempo de maduración avanza, mientras que un comportamiento opuesto se determina en los quesos con cuajo en pasta, que aumentan su valor con la maduración. El mayor valor (2,60%) y el menor (2,05%) se obtienen en los quesos fabricados con cuajo comercial a los 2 y 60 días de maduración respectivamente.

A continuación se detallan los diferentes valores porcentuales de los AGT agrupados según la longitud de la cadena carbonada de los diferentes quesos (**Tabla 33**).

Tabla 33. AGT agrupados según longitud de la cadena carbonada en los quesos elaborados (%)

Quesos	Cadena corta $C_6 - C_{10}$ (%)			Cadena media $C_{12} - C_{14}$ (%)			Cadena larga $C_{16} - C_{18:3}$ (%)		
	2 d	45 d	60 d	2 d	45 d	60 d	2 d	45 d	60 d
Cuajo comercial	29,38 ^a ± 2,56	32,40 ^a ± 5,21	30,66 ^a ± 1,43	18,15 ^a ± 0,13	17,52 ^a ± 2,01	18,66 ^a ± 0,73	52,48 ^a ± 2,50	50,07 ^a ± 6,58	50,68 ^a ± 2,02
Cuajo en pasta	36,60 ^a ± 11,16	38,72 ^a ± 7,58	33,63 ^a ± 8,41	15,99 ^a ± 3,13	18,09 ^a ± 1,90	18,01 ^a ± 0,83	47,41 ^a ± 9,11	43,20 ^a ± 6,47	48,37 ^a ± 9,00

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente distintos ($P < 0.05$)

Si comparamos el perfil de AGT obtenido en los quesos elaborados a partir de cuajo en pasta con los obtenidos con cuajo comercial hasta los 45 días de maduración, se observa una diferente relación principalmente en los AGT de cadena corta, donde los niveles más altos se determinan en los quesos obtenidos a partir de cuajo en pasta de cordero mientras que al final de la maduración observamos una relación opuesta.

No se observan diferencias significativas en los valores porcentuales de los AGT agrupados según la longitud de la cadena carbonada entre los quesos durante la maduración. No obstante, los ácidos grasos de cadena corta tienen valores superiores, en los quesos elaborados con cuajo en pasta para todo el período de maduración. Los AGT de cadena media y larga, muestran un comportamiento opuesto al comentado anteriormente, donde con la excepción de los AGT de cadena media a los 45 días, los

niveles encontrados son superiores para los quesos elaborados a partir de cuajo comercial. ZHANG *et al.* (2005) determinan un valor porcentual similar (15,2%) de ácidos grasos totales de cadena media, un porcentaje superior de AGT de cadena larga (69,5%) y uno inferior (15,4%) de AGT de cadena corta en queso fresco de oveja obtenido con cuajo comercial, comparado con los correspondientes quesos elaborados de este estudio a los 2 días de maduración. SORYAL *et al.* (2004) determinan valores inferiores de ácidos grasos totales de cadena corta (5,59 mg AGT kg⁻¹ queso) en queso fresco Domiati elaborado con leche de cabra y cuajo comercial, comparados con los quesos de Murcia al Vino elaborados con cuajo de ternera (118,25 mg AGT kg⁻¹ queso) y cuajo en pasta de cordero (129,21 mg AGT kg⁻¹ queso) de 2 días de maduración. Dichos autores también encuentran niveles inferiores en los ácidos grasos de cadena larga (33,84 mg AGT kg⁻¹ queso) en el mismo queso fresco, comparados con los de este estudio quesos A y B (345,28 mg AGT kg⁻¹ queso) y quesos C y D (291,63 mg AGT kg⁻¹ queso) al inicio de la maduración.

DA SILVA (2001) señala que la composición de los AGT del queso no se modifica durante el proceso de maduración, con la excepción de los AGT de cadena corta (C₄-C₁₀) en los quesos con un mayor grado de lipólisis, que coincide con lo hallado en los quesos de esta Memoria de Tesis Doctoral.

9) Ácidos grasos libres

En la **Tabla 34** se recogen las concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas en los quesos elaborados con cuajo comercial (A y B) y en pasta (C y D) a los 2, 45 y 60 días de maduración.

Ácido acético

Al inicio de la maduración, se observan diferencias estadísticas significativas en ambos tipos de queso, con valores superiores en los elaborados con cuajo de ternera, mientras que a los 45 días y al final de la maduración los niveles alcanzados son similares entre ellos. YILMAZ *et al.* (2005) manifiestan que en queso de vaca Tulum el contenido del C₂ es mayoritario al inicio de la maduración, coincidiendo con lo determinado para los quesos de este trabajo.

Tabla 34. Valores de AGL ($\mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$) en los quesos elaborados durante la maduración

Ácido Graso	Días de Maduración					
	2		45		60	
	Comercial	Pasta	Comercial	Pasta	Comercial	Pasta
C2	1481,60 ^a ± 121,19	1255,60 ^b ± 108,92	5628,90 ^a ± 2827,90	7409,50 ^a ± 2841,40	6102,50 ^a ± 2588,30	6240,00 ^a ± 1045,20
C3	155,11 ^a ± 80,79	118,20 ^a ± 88,40	156,98 ^a ± 94,84	60,79 ^a ± 71,88	121,69 ^a ± 101,84	95,10 ^a ± 128,80
iC4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C4	52,85 ^b ± 8,31	105,60 ^a ± 16,41	340,52 ^b ± 148,70	782,79 ^a ± 266,77	464,09 ^b ± 213,63	859,23 ^a ± 163,17
iC5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
iC6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C6	45,87 ^b ± 9,93	67,05 ^a ± 9,81	187,76 ^a ± 60,58	301,84 ^a ± 100,73	218,90 ^a ± 57,10	333,17 ^a ± 106,33
C7	ND	7,13 ^a ± 14,25	ND	ND	ND	ND
C8	62,89 ^a ± 12,72	77,87 ^a ± 8,09	183,67 ^a ± 63,02	227,82 ^a ± 75,94	205,11 ^a ± 56,67	250,92 ^a ± 73,21
C9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C10	305,42 ^a ± 69,29	330,65 ^a ± 58,01	615,46 ^a ± 216,56	736,55 ^a ± 237,81	631,08 ^a ± 185,45	746,63 ^a ± 222,88
C11	23,77 ^a ± 10,12	21,42 ^a ± 9,26	27,82 ^a ± 16,77	14,48 ^a ± 28,96	16,02 ^a ± 21,55	28,12 ^a ± 6,52
C12	223,67 ^a ± 40,74	182,70 ^a ± 37,06	353,76 ^a ± 139,66	366,50 ^a ± 94,58	357,55 ^a ± 95,66	369,75 ^a ± 74,59
C13	2,19 ^a ± 4,38	5,27 ^a ± 6,54	11,32 ^a ± 10,16	ND	2,25 ^a ± 4,51	2,63 ^a ± 5,26
C14	243,39 ^a ± 55,51	238,77 ^a ± 47,28	463,33 ^a ± 149,52	514,88 ^a ± 160,43	470,26 ^a ± 133,42	514,10 ^a ± 150,11
C14:1	ND	8,04 ^a ± 7,27	7,63 ^a ± 9,36	ND	4,03 ^a ± 8,07	4,01 ^a ± 8,02
C15	30,67 ^a ± 5,66	25,96 ^a ± 4,25	50,69 ^a ± 16,30	53,85 ^a ± 13,33	49,15 ^a ± 11,45	53,28 ^a ± 13,99
C16	852,71 ^a ± 205,08	819,27 ^a ± 154,24	1408,90 ^a ± 430,63	1458,00 ^a ± 422,54	1373,60 ^a ± 413,05	1442,00 ^a ± 429,05
C16:1	6,30 ^a ± 8,09	16,73 ^a ± 2,92	23,03 ^a ± 16,37	31,39 ^a ± 7,40	23,76 ^a ± 17,81	27,39 ^a ± 8,89
C17	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C18	242,51 ^a ± 58,79	228,45 ^a ± 38,27	375,28 ^a ± 54,14	350,74 ^a ± 75,62	357,19 ^a ± 101,15	364,35 ^a ± 90,79
C18:1	485,34 ^a ± 102,79	465,55 ^a ± 66,68	902,60 ^a ± 149,47	846,86 ^a ± 137,18	914,91 ^a ± 255,10	888,88 ^a ± 231,55
C18:2	73,18 ^a ± 15,77	73,55 ^a ± 11,47	162,72 ^a ± 37,19	179,55 ^a ± 41,12	183,03 ^a ± 34,43	173,52 ^a ± 25,07
C19	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C18:3	ND	ND	ND	ND	3,90 ^a ± 7,80	3,02 ^a ± 6,04
C20	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Medias con distintos superíndices en la misma fila y para cada día de maduración son diferentes ($P < 0.05$). ND: No detectado

Además detallan que el C₂ en el queso no es de origen lipolítico sino que se produce como consecuencia de la fermentación de la lactosa por acción bacteriana (glucólisis acética), y del proceso de decarboxilación y deaminación oxidativa de aminoácidos. GEORGALA *et al.* (2005) determinan en queso Feta mezcla de oveja y cabra un valor 3,6 veces superior (21.866,67 $\mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$) a los 60 días de

maduración, similar al encontrado por VIRTO *et al.* (2003) en queso Idiazábal a partir de los 90 días de maduración.

Ácido propiónico

Los valores determinados de este ácido no muestran diferencias significativas durante toda la maduración, la mayor concentración se determina en los quesos elaborados con cuajo comercial a los 45 días de maduración, y la menor se alcanza en los quesos con cuajo en pasta en el mismo período de maduración. Se observa que los niveles alcanzados en los quesos con cuajo en pasta son inferiores a los elaborados con cuajo comercial durante todo el período estudiado.

Al igual que el C₂ el ácido propiónico en el queso no tiene un origen lipolítico sino que se produce como consecuencia de la acción microbiana sobre la lactosa (glucólisis propiónica), así como del proceso de decarboxilación y deaminación oxidativa a partir de aminoácidos (YILMAZ *et al.*, 2005).

Ácido butírico

Los valores de C₄ determinados son significativamente distintos entre los elaborados con cuajo comercial y cuajo en pasta de cordero, con concentraciones superiores en los obtenidos con cuajo en pasta durante todo el proceso de maduración. POVEDA *et al.* (2006) determinan un valor similar en queso de cabra español (500 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso), aunque otros autores hallan valores superiores en quesos Babia-Laciana, 515,91 y 3.530,68 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso a los 3 y 60 días respectivamente (FRANCO *et al.*, 2003); 3.840,91 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso Picante a partir de leche de cabra y oveja de 30 días (FREITAS *et al.*, 1996); 4.931,82 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Majorero con leche cruda y cuajo en pasta de ternera (FONTECHA *et al.*, 1990); 3.659,09 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Caciocavallo-Pugliese de vaca (GOBBETTI *et al.*, 2002); 19.147,73 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Feta de oveja y cabra (GEORGALA *et al.*, 2005); 2.135,23 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso de vaca con lipasa microbiana a los 60 días de maduración (YILMAZ *et al.*, 2005) y 10.454,55 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso de cabra español (POVEDA *et al.*, 2006). MALLATOU *et al.* (2003) determinan a los 60 días de maduración un valor inferior (397,73 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en queso Teleme de cabra.

YILMAZ *et al.* (2005) consideran que el C₄ es uno de los ácidos grasos libres que predominan en queso de vaca Tulum, que no coincide con lo determinado en los quesos

con cuajo comercial, aunque los valores encontrados en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero coinciden con lo señalado por dichos autores (**Tabla 34**).

Ácido caproico

Al inicio de la maduración, se observan diferencias significativas en el contenido de este AGL entre los quesos elaborados, siendo superior el contenido en los quesos con cuajo en pasta ($67,05 \mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$). A los 45 y 60 días el contenido del C_6 no muestra diferencias significativas entre los quesos, aunque se observan niveles más elevados en los quesos obtenidos con cuajo en pasta. FONTECHA *et al.* (1990) encuentran un valor 12 veces superior en queso Majorero de 60 días elaborado con leche cruda ($4.267,24 \mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$) de 60 días comparado con los quesos con cuajo en pasta de este estudio. Otros autores determinan niveles superiores de C_6 : $283,62$ y $1.183,62 \mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$ en Babia-Laciana a los 3 y 60 días, respectivamente (FRANCO *et al.*, 2003); $1.017,24 \mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$ en Caciocavallo-Pugliese (GOBBETTI *et al.*, 2002); $5.629,31 \mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$ en Feta de oveja y cabra (GEORGALA *et al.*, 2005); $716,40 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso con lipasa microbiana a los 60 días de maduración (YILMAZ *et al.*, 2005) y $1.094,83$ - $4.767,24 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ en quesos de cabra españoles (POVEDA *et al.*, 2006). Por el contrario MALLATOU *et al.* (2003) hallan en queso Teleme de cabra un valor de $301,72 \mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$ a los 60 días, inferior a los determinados en este estudio.

Ácido heptanoico

Solamente se determina este ácido graso libre de cadena impar en los quesos elaborados con cuajo en pasta al inicio de la maduración en pequeña concentración, $7,13 \mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$. No se encuentran valores publicados para este AGL en quesos en las referencias bibliográficas consultadas.

Ácido caprílico

No se encuentran diferencias en el contenido de C_8 durante la maduración, siendo superiores los valores determinados en los quesos con cuajo en pasta de cordero. FONTECHA *et al.* (1990) determinan un valor ($4.486,11 \mu\text{Mol kg}^{-1}\text{queso}$) - 18 veces superior al determinado en este estudio- en queso Majorero de leche cruda a los 60 días de maduración.

Varios autores (FRANCO *et al.*, 2003; MALLATOU *et al.*, 2003; GEORGALA *et al.*, 2005; YILMAZ *et al.*, 2005 y POVEDA *et al.*, 2006) también determinan niveles de C₈ superiores a los encontrados en este trabajo de investigación en quesos Babia-Laciana (172,22 y 1.059,03 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) de 3 y 60 días de maduración; Teleme de cabra (381,94 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso); Feta mezcla de oveja y cabra (2.041,67 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$); de vaca con lipasas microbianas (279,86 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) a los 60 días de maduración y en quesos de cabra españoles (2.319,44 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso), respectivamente. Otros investigadores hallan niveles inferiores (243,06 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en quesos Caciocavallo-Pugliese de 60 días (GOBBETTI *et al.*, 2002) y 194,44 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en quesos de cabra españoles (POVEDA *et al.*, 2006), en relación a los quesos de esta Memoria.

Ácido cáprico

No se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de este AGL durante la maduración. El valor superior corresponde a los quesos con cuajo en pasta de 60 días (746, 63 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso), mientras que el inferior se determina en los elaborados a partir de cuajo comercial a los 2 días de maduración (305,42 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$). POVEDA *et al.* (2006) determinan valores similares en quesos de cabra españoles (633,72 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso).

No obstante, otros autores consultados señalan niveles muy elevados de C₁₀ en relación con los determinados en este estudio, en queso Majorero de leche cruda de 60 días 14.145,35 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso (FONTECHA *et al.*, 1990); 1.656,98 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Picante de oveja y cabra de 30 días (FREITAS *et al.*, 1996); Babia-Laciana (373,84 y 1.998,26 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) a los 3 y 60 días (FRANCO *et al.*, 2003); Feta de oveja y cabra (8.872,09 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) de 60 días (GEORGALA *et al.*, 2005) y 6.139,53 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en quesos de cabra españoles (POVEDA *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos autores determinan concentraciones inferiores: 447,67 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Caciocavallo-Pugliese (GOBBETTI *et al.*, 2002); 290,70 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Teleme de cabra (MALLATOU *et al.*, 2003) y 452,33 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso con lipasas microbianas a los 60 días de maduración (YILMAZ *et al.*, 2005).

Ácido undecanoico

No se observan diferencias significativas de este ácido impar entre los distintos quesos elaborados. A los 2 y 45 días de maduración, los valores más altos se encuentran en los quesos elaborados con cuajo de ternera, mientras que a los 60 días la concentración más elevada corresponde a los quesos obtenidos con cuajo en pasta. Por lo general, no se determinan valores C_{11} en las referencias bibliográficas consultadas.

Ácido láurico

Este AGL no muestra diferencias entre los distintos quesos elaborados, observándose que al comienzo de la maduración el valor más alto corresponde a los quesos obtenidos con cuajo comercial ($223,67 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y a los 45 y 60 días a los elaborados con cuajo en pasta de cordero ($366,50$ y $369,75 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso respectivamente). Valores superiores a los determinados en este estudio se observan en quesos Babia-Laciana ($343,00$ y $636,50 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) a los 3 y 60 días de maduración (FRANCO *et al.*, 2003); ($8.355,00 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en Majorero de leche cruda (FONTECHA *et al.*, 1990); ($7.690,00 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en Feta de oveja y cabra (GEORGALA *et al.*, 2005); ($422,00 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en queso con lipasas microbianas a los 60 días de maduración (YILMAZ *et al.*, 2005) y ($405,00$ - $1595,00 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en quesos de cabra españoles (POVEDA *et al.*, 2006). Sin embargo, GOBBETTI *et al.* (2002) y MALLATOU *et al.* (2003) encuentran concentraciones inferiores comparadas con las determinadas en los quesos de este trabajo en quesos Caciocavallo-Pugliese ($250,00 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y Teleme de cabra ($275,00 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) a los 60 días de maduración.

Ácido tridecanoico

Este AGL que no se detecta en los quesos con cuajo en pasta de este estudio a los 45 días de maduración y los valores determinados no muestran diferencias significativas entre los distintos tipos de queso durante la maduración. El valor más alto ($11,32 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) se determina en los quesos elaborados con cuajo de ternera (A y B) a los 45 días de maduración. Tampoco se hallan valores del C_{13} en las referencias bibliográficas consultadas.

Ácido mirístico

Para este AGL no se determinan diferencias estadísticamente significativas entre los quesos analizados, observándose un valor superior en los elaborados con cuajo comercial (A y B) a los 2 días (243,39 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso), mientras que a los 45 y 60 días los niveles superiores se alcanzan en los quesos con cuajo en pasta C y D. FONTECHA *et al.* (1990) determinan concentraciones superiores (14.280,70 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en queso Majorero de leche cruda a los 60 días, siendo 27 veces superior al observado en los quesos con cuajo en pasta de este estudio al final de la maduración. Otros investigadores señalan valores superiores en relación a los quesos de esta Memoria, 363,16 y 898,68 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Babia-Laciana de 3 y 60 días de maduración (FRANCO *et al.*, 2003); 1.048,25 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Feta mezcla de oveja-cabra (GEORGALA *et al.*, 2005); 882,46 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso con lipasas microbianas a los 60 días (YILMAZ *et al.*, 2005) y 855,26-1.793,86 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en quesos de cabra españoles (POVEDA *et al.*, 2006). Por otra parte, GOBBETTI *et al.* (2002) y MALLATOU *et al.* (2003) determinan concentraciones de C₁₄ inferiores en quesos Caciocavallo-Pugliese (416,67 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y Teleme de cabra (197,37 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$) de 60 días de maduración.

Ácido miristoleico

No se detecta la presencia del C_{14:1} en los quesos con cuajo comercial al inicio y en los elaborados con cuajo en pasta a los 45 días de maduración. No se observan diferencias estadísticamente significativas en los valores de los distintos quesos durante el proceso de maduración. La concentración más elevada se determina en los quesos con cuajo en pasta (C y D) al inicio de la maduración (8,04 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y la menor en los mismos quesos al final de la maduración. No se encuentran valores de este ácido graso en las referencias bibliográficas consultadas.

Ácido pentadecanoico

No se determinan diferencias significativas entre los distintos tipos de queso durante el proceso de maduración, siendo superiores los valores de los quesos obtenidos con cuajo en pasta de cordero de 45 días (53,85 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y el menor en el mismo tipo de queso al inicio de la maduración. No se hallan valores comparativos de este AGL en las referencias bibliográficas consultadas.

Ácido palmítico

Las concentraciones más elevadas se alcanzan en los quesos elaborados con cuajo en pasta ($1.458,00 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) a los 45 días y la mínima en estos mismos quesos al inicio de la maduración ($819,27 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso).

Diversos investigadores determinan valores más elevados a los señalados en este estudio así FONTECHA *et al.* (1990) señalan $29.937,50 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso Majorero de leche cruda a los 60 días de maduración; FRANCO *et al.* (2003) $1.803,91 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso Babia-Laciana; GEORGALA *et al.* (2005) $2.519,53 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en Feta de oveja y cabra; YILMAZ *et al.* (2005) $1.694,14 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso con lipasas microbianas de 60 días de maduración y valores entre $2.992,19$ - $4.488,28 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ en quesos de cabra españoles (POVEDA *et al.*, 2006).

Concentraciones inferiores hallan (FRANCO *et al.*, 2003; GOBBETTI *et al.*, 2002 y MALLATOU *et al.*, 2003) en quesos Babia-Laciana al inicio de la maduración ($735,94 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso), Caciocavallo-Pugliese ($625,00 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y Teleme de cabra ($683,59 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) a los 60 días, comparados con los quesos elaborados en este trabajo.

Ácido palmitoleico

Observamos concentraciones de $C_{16:1}$ muy bajas en todos los quesos de este estudio comparadas con el resto de AGL, no mostrando diferencias estadísticas significativas durante el período de maduración considerado. Un valor superior se alcanza a los 45 días en los quesos elaborados con cuajo en pasta ($31,39 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y uno inferior ($6,30 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en los quesos con cuajo de ternera a los 2 días de maduración.

En queso Cheddar de 150 días DE WIT *et al.* (2005) determinan un valor superior de $129,01 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso comparado con los quesos de este trabajo de investigación.

Ácido esteárico

Las concentraciones determinadas en los quesos estudiados no muestran diferencias significativas durante la maduración. Un valor máximo de $375,28 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso se encuentra en los quesos elaborados con cuajo comercial a los 45 días de maduración y un mínimo al inicio de la maduración ($228,45 \mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en aquellos elaborados con cuajo en pasta. Una concentración similar a las señaladas en

este estudio determinan MALLATOU *et al.* (2003) en queso Teleme de cabra a los 60 días de maduración (327,46 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso).

FONTECHA *et al.* (1990) encuentran concentraciones 17 veces más elevadas (6.359,15 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) -comparadas con los quesos de este trabajo- en queso de cabra Majorero de leche cruda a los 60 días de maduración. Otros autores también determinan valores superiores de C_{18} (466,20 y 944,72 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en queso Babia-Laciana de 3 y 60 días de maduración (FRANCO *et al.*, 2003); 3.507,04 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso Feta de oveja y cabra (GEORGALA *et al.*, 2005); 484,15 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en queso con lipasas microbianas a los 60 días de maduración (YILMAZ *et al.*, 2005) y 1.080,99-1.514,08 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en muestras de quesos de cabra españoles (POVEDA *et al.*, 2006), mientras que GOBBETTI *et al.* (2002) hallan niveles inferiores a los de este estudio en queso Caciocavallo-Pugliese de 60 días de maduración (70,42 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso).

Ácido oleico

El ácido oleico junto con el ácido palmítico presenta una de las concentraciones más elevadas de AGL determinadas en los quesos de este estudio. También se observa que la concentración del $\text{C}_{18:1}$ aumenta en todos los quesos desde el inicio hasta el final de la maduración. Los valores encontrados de $\text{C}_{18:1}$ no muestran diferencias significativas entre los quesos durante el período de tiempo estudiado, correspondiendo el valor medio más elevado a los quesos obtenidos con cuajo comercial (A y B) al final de la maduración (914,91 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso), y el más bajo (465,55 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) a los elaborados con cuajo en pasta (C y D) al comienzo de la misma. FONTECHA *et al.* (1990) encuentran un valor medio más elevado (19.652,48 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en queso Majorero de leche cruda a los 60 días de maduración. Otros investigadores hallan valores de $\text{C}_{18:1}$ superiores (1.470,21 y 4.182,62 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) en quesos Babia-Laciana de 3 y 60 días de maduración (FRANCO *et al.*, 2003); 2.691,49 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ en Feta elaborado con leche de oveja y cabra (GEORGALA *et al.*, 2005); 1.496,45 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso en queso con lipasas microbianas de 60 días de maduración (YILMAZ *et al.*, 2005).

POVEDA *et al.* (2006) investigan en quesos de cabra españoles hallando niveles más elevados de $\text{C}_{18:1}$ con un rango comprendido entre 3003,55-5226,95 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$. Sin embargo, GOBBETTI *et al.* (2002) encuentran valores de $\text{C}_{18:1}$ inferiores a los determinados en esta Memoria en queso Caciocavallo-Pugliese (514,18 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$), al

igual que MALLATOU *et al.* (2003) en queso Teleme de leche de cabra a los 60 días de maduración (354,61 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso).

Ácido linoleico

No se determinan para el $\text{C}_{18:2}$ diferencias estadísticamente significativas en los quesos estudiados durante la maduración. Además, se observa un incremento en los valores del $\text{C}_{18:2}$ en los quesos obtenidos con cuajo comercial (A y B) desde el principio hasta el final de la maduración alcanzando un valor máximo de 183,03 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso, mientras que en los quesos elaborados con cuajo en pasta (C y D) se encuentra un comportamiento similar hasta el día 45, disminuyendo ligeramente hacia el final de la maduración (**Tabla 34**). El valor mínimo para este AGL (73,18 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) lo presentan los quesos con cuajo comercial a los 2 días de maduración.

Varios autores (FRANCO *et al.*, 2003; MALLATOU *et al.*, 2003 y GEORGALA *et al.*, 2005) determinan valores de ácido linoleico superiores a los encontrados en los quesos de este trabajo de investigación al final del proceso de maduración en quesos Babia-Laciana de 3 días (398,93 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y 60 días (983,93 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso), Teleme (257,14 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y Feta de oveja y cabra (271,43 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) también a los 60 días de maduración respectivamente, mientras que GOBBETTI *et al.* (2002) hallan un valor medio inferior en queso de vaca Caciocavallo-Pugliese (89,29 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) de 60 días.

Ácido linolénico

Este AGL se detecta solamente al final de la maduración. El valor superior, 3,90 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso, se determina en los quesos elaborados a partir de cuajo comercial (A y B) que no tiene diferencias significativas con el obtenido en los quesos con cuajo en pasta C y D. Algunos investigadores (GOBBETTI *et al.*, 2002 y FRANCO *et al.*, 2003) determinan valores mayores a los de este estudio en quesos Caciocavallo-Pugliese de 60 días (64,75 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso) y Babia-Laciana de 3 y 60 días (182,37-296,04 $\mu\text{Mol kg}^{-1}$ queso).

Los AGL no mencionados y que aparecen en la **Tabla 34** (isobutírico, isovalérico, isocaproico, nonadecanoico y araquídico) no se detectan, y los AGL valérico, nonanoico y margárico, han sido empleados como patrones internos.

De lo observado se concluye que el cuajo en pasta de cordero tiene un efecto lipolítico (especialmente en los ácidos grasos de cadena corta), significativamente

mayor que el cuajo de ternera en los Quesos de Murcia al Vino estudiados en esta Memoria de Tesis Doctoral.

Además, de acuerdo con los niveles de AGL determinados por varios autores, en quesos elaborados a partir de leche cruda manifiestan una actividad lipolítica más intensa que los obtenidos a partir de leche pasteurizada, tanto al inicio como a los 60 días de maduración, lo que coincide parcialmente con lo descrito por BUSTAMANTE (2002) que señala que la actividad lipolítica en Queso Idiazábal elaborado con leche de oveja cruda es significativamente superior a aquellos elaborados a partir de leche pasteurizada, solamente a partir de los 180 días de maduración.

Diferentes autores agrupan los ácidos grasos para su estudio según el número de carbonos que componen su cadena lineal y generalmente lo hacen de forma arbitraria. En nuestro caso esta asociación se realiza de acuerdo con lo expuesto en la **Tabla 35**.

Los AGL de cadena corta se corresponden con los ácidos grasos volátiles y tienen valores porcentuales significativamente superiores en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero, coincidiendo con CHÁVARRI (1999) y VIRTO *et al.* (2003) en Queso Idiazábal empleando el mismo tipo de cuajo en pasta.

Tabla 35. Evolución durante la maduración de los grupos de AGL (%) en los quesos elaborados

Quesos	Cadena corta C ₄ - C ₁₀ (%)			Cadena media C ₁₁ - C ₁₅ (%)			Cadena larga C ₁₆ - C _{18:3} (%)		
	2 d	45 d	60 d	2 d	45 d	60 d	2 d	45 d	60 d
Cuajo comercial	17,59 ^b ± 1,28	25,59 ^b ± 2,03	28,69 ^b ± 3,25	20,00 ^a ± 2,98	17,78 ^a ± 1,82	17,15 ^a ± 2,17	62,41 ^a ± 3,87	56,63 ^a ± 2,45	54,16 ^a ± 1,43
Cuajo en pasta	22,02 ^a ± 0,61	34,54 ^a ± 1,98	36,15 ^a ± 0,78	17,97 ^a ± 1,15	16,11 ^a ± 0,58	16,08 ^a ± 0,46	60,01 ^a ± 1,60	49,36 ^b ± 2,38	47,78 ^b ± 1,15

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente distintos (P<0.05)

No se observan diferencias significativas en los ácidos grasos de cadena media, pero los valores son inferiores en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero experimental.

En los porcentajes de los AGL de cadena larga se observa que al inicio de la maduración, no existen diferencias significativas entre los quesos fabricados con o sin cuajo en pasta. Sin embargo las diferencias son significativas a los 45 y 60 días de maduración, observándose que los niveles alcanzados son superiores en los quesos

obtenidos con cuajo comercial, que coincide con lo publicado por VIRTO *et al.* (2003) en queso de oveja a los 90 días de maduración.

Si comparamos los valores de los distintos AGL de cada uno de los grupos de forma separada y para un mismo tipo de cuajo a lo largo de la maduración, vemos que el comportamiento de los quesos elaborados con o sin cuajo en pasta es similar frente a los AGL de cadena corta que incrementan su valor desde el día 2 al 60.

Los AGL de cadena media y larga disminuyen desde el día 2 hasta el 60 en los quesos elaborados tanto a partir de cuajo en pasta como bovino.

A partir de los datos que se reflejan en la **Tabla 35** se puede calcular el incremento o disminución del contenido de AGL de cadena corta y larga a los 60 días de maduración entre los quesos elaborados y así poder compararlos con los publicados por De RENOBABLES *et al.* (2005) que emplean el mismo cuajo ALF en la elaboración de Quesos Idiazábal, Zamorano y Manchego. En nuestro caso, -que son los únicos quesos elaborados a partir de leche cabra- se observa un incremento del 7,5% de los AGL de cadena corta en los quesos elaborados con cuajo en pasta a los 60 días, que es inferior al determinado a los 180 días en quesos Manchego (19%) e Idiazábal (27%), así como el observado a los 240 días en Queso Zamorano (19%). Para los AGL de cadena larga, se observa un comportamiento inverso con una disminución de los valores en los quesos obtenidos con cuajo en pasta. En Queso de Murcia al Vino de 60 días, determinan una disminución del 6,38%, inferior a la reseñada a los 180 días en los quesos Manchego (17%) e Idiazábal (21%) y a los 240 días Queso Zamorano (15%). Los valores de la actividad lipolítica son superiores en los quesos con un mayor tiempo de maduración, siendo superior en el Queso Idiazábal mientras que la menor corresponde al Queso de Murcia al Vino de menor tiempo de maduración.

De lo expuesto anteriormente se concluye que el cuajo en pasta de cordero manifiesta una mayor actividad lipolítica comparado con el cuajo líquido bovino durante la elaboración de Queso de Murcia al Vino, y su efecto fundamentalmente es más acusado en el proceso de hidrólisis de los triglicéridos hacia la formación de ácidos grasos de cadena corta, la intensidad de la misma es menor que la que se observa en los quesos elaborados a partir de leche de oveja. Este hecho corrobora una vez más que los quesos elaborados con este tipo de cuajo en pasta maduran en un tiempo menor. Similares conclusiones publican YILMAZ *et al.* (2005) en queso Tulum elaborado con leche de vaca, utilizando cultivos iniciadores y coagulantes microbianos con agregado de lipasa comercial, destacando además que la inclusión de lipasas comerciales a la

leche para obtener queso, podría recomendarse en aquellos casos donde es necesario acelerar la aparición de ácidos grasos libres.

IV. 2.2. Parámetros microbiológicos

La importancia y control de los parámetros microbiológicos en un queso nos permite conocer por un lado el riesgo para la salud del consumidor, y por otro lado, la influencia de la flora contaminante (o secundaria) presente en el desarrollo del flavor final durante la maduración.

La toma de muestras se realiza los días 2, 45 y 60. Los resultados de la evolución de los parámetros obtenidos se discuten a continuación.

Aerobios mesófilos

A los 2 días de maduración, se aprecia que los quesos A y B (cuajo comercial) tienen recuentos semejantes entre sí, mientras que los quesos elaborados con cuajo en pasta (C y D) muestran diferencias significativas entre ambos siendo menor la concentración en el queso C ($4,51 \log \text{ufc g}^{-1}$) y mayor en el D ($5,54 \log \text{ufc g}^{-1}$) (**Tabla 36**). ZÁRATE *et al.* (1997) y OLARTE *et al.* (2000) encuentran en los quesos de cabra Tenerife y Cameros valores mucho más altos a los 2 días de maduración ($9,26$ y $8,08 \log \text{ufc g}^{-1}$, respectivamente) y en queso Feta de 3 días MOATSOU *et al.* (2004) obtienen un recuento aún más elevado ($9,53 \log \text{ufc g}^{-1}$).

A medida que la maduración evoluciona, los valores se nivelan de forma significativa en todos los quesos correspondiendo el valor más bajo al queso A ($4,36 \log \text{ufc g}^{-1}$), y el más alto al D ($4,62 \log \text{ufc g}^{-1}$) a los 45 días, y a los 60 días el menor valor lo alcanza el queso A ($4,45 \log \text{ufc g}^{-1}$) y el mayor el B ($5,06 \log \text{ufc g}^{-1}$). En este mismo tiempo de maduración OLARTE *et al.* (2000) determinan valores similares ($4,32$ y $4,38 \log \text{ufc g}^{-1}$) en queso Cameros y niveles superiores señalan DEIANA *et al.* (1980) en Fiore Sardo ($9,20 \log \text{ufc g}^{-1}$), ZÁRATE *et al.* (1997) en queso Tenerife ($8,74 \log \text{ufc g}^{-1}$) y MARINO *et al.* (2003) en queso de vaca Montasio ($5,73 \log \text{ufc g}^{-1}$).

Para este parámetro microbiológico, no se contemplan valores máximos en la legislación vigente, y está influenciado mayoritariamente por las bacterias lácticas iniciadoras agregadas antes del cuajado de la leche.

Tabla 36. Evolución de los parámetros microbiológicos en el queso (log ufc g⁻¹)

Queso	Aerobios mesófilos			Enterobacterias			<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>C. sulfito reductores</i>			Mohos y levaduras		
	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d	2d	45d	60d
A	4.79 ^b ±0.12	4.36 ^a ±0.36	4.45 ^a ±0.23	4.22 ^{ab} ±0.21	SD	SD	1.00 ^c ±0.00	SD	SD	SD	SD	SD	1.00 ^c ±0.00	1.15 ^a ±0.17	SD	SD	SD	SD
B	4.88 ^b ±0.07	4.43 ^a ±0.85	5.06 ^a ±0.41	4.59 ^a ±0.05	2.05 ^a ±0.27	1.39 ^a ±0.45	2.43 ^b ±0.31	2.33 ^a ±0.38	1.24 ^a ±0.28	SD	SD	1.30 ^b ±0.00	1.45 ^b ±0.17	SD	SD	1.65 ^b ±0.06	1.52 ^a ±0.60	1.00 ^b ±0.00
C	4.51 ^c ±0.07	4.61 ^a ±0.15	4.93 ^a ±0.05	3.79 ^b ±0.13	SD	SD	2.22 ^b ±0.26	SD	SD	SD	SD	SD	1.74 ^a ±0.05	SD	SD	2.26 ^a ±0.19	SD	SD
D	5.54 ^a ±0.05	4.62 ^a ±0.18	4.65 ^a ±0.31	4.79 ^a ±0.50	SD	SD	3.93 ^a ±0.07	SD	SD	1.89 ^a ±0.14	2.23 ^a ±0.16	2.45 ^a ±0.11	1.87 ^a ±0.10	1.00 ^a ±0.00	SD	2.40 ^a ±0.27	2.04 ^a ±0.16	1.39 ^a ±0.10

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes (P< 0.05); SD: Sin desarrollo

Enterobacterias

Al principio de la maduración todos los quesos contienen estas bacterias notándose que las diferencias significativas se producen entre el queso C y los quesos B y D, teniendo la mayor concentración el queso D (4,79 log ufc g⁻¹) y la menor el C (3,79 log ufc g⁻¹) como se aprecia en la **Tabla 36**. Para este mismo período de maduración un nivel mucho mayor determinan ZÁRATE *et al.* (1997) en queso Tenerife (6,98 log ufc g⁻¹), aunque valores inferiores (2,38 log ufc g⁻¹) hallan OLARTE *et al.* (2000) en queso Cameros y MOATSOU *et al.* (2004) en queso Feta de 3 días (2,57 log ufc g⁻¹).

A partir de los 45 días no se detecta desarrollo en los quesos A, C y D, aunque sí en el queso B, pero en una concentración más baja que a los 2 días de maduración coincidiendo con OLARTE *et al.* (2000) que también detectan cierta persistencia de estos microorganismos.

A los 60 días, las enterobacterias persisten en el queso B (1,39 log ufc g⁻¹), pero a una concentración baja. También a los 60 días diversos autores (ZÁRATE *et al.*, 1997; DEIANA *et al.*, 1980 y MANOLOPOULOU *et al.*, 2003) señalan valores más elevados en quesos, cuyos resultados son: 3,31, 4,30 y 1,87 log ufc g⁻¹ respectivamente. No obstante, otros autores (OLARTE *et al.*, 2000; MARINO *et al.*, 2003; MANOLOPOULOU *et al.*, 2003 y MOATSOU *et al.*, 2004) encuentran niveles inferiores: <1, 0,89, 0,81 y 0,88 log ufc g⁻¹, respectivamente.

La supervivencia de estas bacterias en el queso B podría explicarse teniendo en cuenta el valor de pH más elevado de este queso a lo largo de la maduración, ya que estas bacterias son sensibles a valores de pH ~5,50 o inferiores como puede observarse en la (**Tabla 27**). A partir de los 45 días, -tiempo en que los Quesos de Murcia al Vino para este formato pueden comercializarse- todos los quesos elaborados se encuentran dentro de lo estipulado por la reglamentación vigente que recomienda como máximo un valor de 10⁵ ufc g⁻¹ de enterobacterias en quesos elaborados a base de leche tratada térmicamente.

MORALES *et al.* (2003) resaltan que las enterobacterias -normalmente encontradas en altas concentraciones como bacterias contaminantes dentro de la leche- pueden afectar el proceso de la proteólisis secundaria durante la maduración del queso.

Escherichia coli

Al inicio de la maduración este indicador microbiológico muestra diferencias significativas entre los quesos A y D con B y C (**Tabla 36**), no apreciándose diferencias

estadísticamente significativas entre estos dos últimos. La menor concentración de este indicador higiénico -de origen fecal- le corresponde al queso A ($1,00 \log \text{ ufc g}^{-1}$) y la mayor al queso D ($3,93 \log \text{ ufc g}^{-1}$). Para el mismo período de maduración (2 días), ZÁRATE *et al.* (1997) señalan valores superiores en queso Tenerife ($4,59 \log \text{ ufc g}^{-1}$), mientras que OLARTE *et al.* (2000) hallan valores inferiores en queso Cameros ($< 0,48 \log \text{ ufc g}^{-1}$).

Transcurridos los 45 días desde la elaboración, se observa la desaparición de estas bacterias en los quesos A, C y D quedando un remanente en el queso B hasta el final de la maduración, lo que coincide con OLARTE *et al.* (2000). Este hecho puede justificarse siguiendo el mismo criterio empleado para enterobacterias, ya que la *E. coli* pertenece a este grupo de bacterias y su presencia es incompatible a valores de pH $\sim 5,50$ o menores.

A partir de los 45 días todos los quesos se sitúan dentro de lo tolerado en la actual normativa, que exige como máximo un valor de 10^3 ufc g^{-1} .

Al final de la maduración solo se detecta desarrollo en una concentración de $1,24 \log \text{ ufc g}^{-1}$ en el queso B (**Tabla 36**), que concuerda con lo señalado por MARINO *et al.* (2003) en queso de vaca Montasio, pero la mayoría de los autores consultados lo determinan a niveles inferiores o no la detectan.

Recientemente se ha publicado en el **Diario Oficial de la Unión Europea (2005)**, el Reglamento de la Comunidad Europea relativo a los criterios y directivas a seguir de acuerdo con los niveles microbiológicos que se aplican a los productos alimenticios, entre ellos los relacionados con la leche y productos lácteos. En este Reglamento se puede observar en el caso de los quesos a base de leche sometida a pasteurización o tratamiento térmico más intenso, la categorización del alimento a través de una numeración, los microorganismos a tener en cuenta, un plan determinado para la toma de muestras y sus límites, valores de recuentos microbianos inferiores y superiores tolerables, el método analítico de referencia, la fase de elaboración en la que se detalla el criterio de toma de muestras y la acción a tomar en caso de resultados insatisfactorios, así como los procedimientos a seguir por el fabricante para demostrar a las autoridades competentes que el alimento no plantea un riesgo para la salud del consumidor. Este Reglamento escoge a *E. coli* como microorganismo de referencia, aceptando 2 muestras con recuentos comprendidos entre 10^2 - 10^3 ufc g^{-1} en un plan de 5 muestras. Según esta reciente legislación, los Quesos de Murcia al Vino de este estudio cumplen la exigencia a partir de los 45 días de maduración.

Salmonella spp.

Estas bacterias no desarrollan en 25 g de ningún queso durante todo el período estudiado, coincidiendo con lo establecido por la legislación vigente.

Según KAAN TEKINSEN *et al.* (2005) una de las bacterias que se halla con frecuencia en las infecciones de tipo epidémico derivadas del consumo de alimentos procesados en condiciones deficientes de higiene es la salmonella, asociada generalmente con alimentos elaborados a partir de leche cruda, o a un inadecuado tratamiento térmico de algunos elaborados lácteos. TAMAGNINI *et al.* (2005) inoculan *S. typhimurium* en queso Crottin –queso de pasta blanda y coagulación ácida obtenido a partir de leche de cabra pasteurizada- y posteriormente lo conservan a distintas temperaturas. Las observaciones realizadas, demuestran que la bacteria a 25°C se desarrolla en el interior del queso hasta los 10 días, disminuyendo la concentración desde 10^7 hasta 10^1 ufc g⁻¹ queso a los 35 días. Finalmente concluyen que la ausencia de *Salmonella* spp. en el queso es el resultado de una adecuada acción sanitaria de los animales y el espacio que los rodea así como del establecimiento elaborador, una pasteurización adecuada de la leche empleada y una correcta temperatura de conservación del queso hasta su consumo.

Staphylococcus aureus

A los 2 días de maduración, este microorganismo se desarrolla en el queso D, mientras que en el resto de los quesos está ausente (**Tabla 36**). También a los 2 días ZÁRATE *et al.* (1997) encuentran esta bacteria en queso elaborado a partir de leche cruda de cabra en una concentración superior ($3,14 \log$ ufc g⁻¹) empleando cuajo en pasta caprino.

A los 45 días se determina su presencia en el mismo queso D en una concentración superior, no desarrollándose en el resto de los quesos.

A los 60 días se mantiene viable en el queso D y además aparece un desarrollo en el queso B con un valor significativamente menor al anterior, mostrando la adaptabilidad desarrollada por esta bacteria en el Queso de Murcia al Vino frente a concentraciones crecientes de NaCl incluso a los 60 días de maduración. Similares niveles e incluso superiores detectan a los 60 días DEIANA *et al.* (1980) y MARINO *et al.* (2003) en quesos Fiore Sardo y Montasio, respectivamente.

Los niveles alcanzados por esta bacteria en los quesos se hallan dentro de los valores tolerables por la legislación en vigencia que admite en los quesos entre 10^2 - 10^3 ufc g^{-1} .

Clostridium sulfito-reductores

Se observan diferencias significativas entre los quesos elaborados con cuajo comercial (A y B) con los elaborados con cuajo en pasta (C y D) al inicio de la maduración (**Tabla 36**). Se aprecia que los valores más altos corresponden a los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero, que podría ser debido a un aporte adicional de estas bacterias a través del extracto acuoso agregado a la leche (**Tabla 25**).

A los 45 días, las bacterias de este grupo no desarrollan en los quesos B y C, observándose que los niveles alcanzados en los quesos A y D no muestran diferencias significativas entre sí. A los 60 días no se detecta el desarrollo de *Clostridium* sulfito-reductores en ningún queso analizado, por lo que se puede concluir que este grupo de bacterias desaparece de este tipo de queso en un período de 60 días y, por lo tanto, desaparecería el riesgo de hinchazones, malos olores, etc. que estos quesos podrían sufrir durante la etapa de comercialización. Por otro lado, a los 60 días DEIANA *et al.* (1980) señalan una concentración de $0,65 \log \text{ ufc } g^{-1}$ en queso Fiore Sardo utilizando cuajo en pasta ovino.

Este parámetro higiénico, a pesar de ser tan exigente en lo que a cuajos y otras enzimas coagulantes se refiere (máximo $1 \text{ ufc } g^{-1}$), para los quesos no se encuentra especificado en la legislación vigente.

Listeria monocytogenes

Estas bacterias no desarrollan en 25 g de ningún queso durante todo el período estudiado, siendo la exigencia legal de ausencia en 25 g de queso.

Este bacilo Gram positivo que resiste mejor el calor que la salmonella, y debido a su naturaleza psicrófila, puede crecer a temperaturas de refrigeración, tiene un rango de temperatura de crecimiento entre $0-45^{\circ}\text{C}$ y valores de pH comprendidos entre 4,4-9,4; además, se desarrolla a valores de a_w igual a 0,92 o superiores. Su hábitat puede ser en las granjas, el medio ambiente de las industrias alimentarias, la tierra, superficie de las plantas, heces, aguas residuales y también el agua, pudiendo llegar al hombre a través de los alimentos contaminados como vegetales, pescado, productos cárnicos y principalmente la leche cruda y elaborados lácteos (AYGUN *et al.*, 2005). Su presencia

es más frecuente en quesos elaborados a partir de leche cruda (ROGGA *et al.*, 2005) aunque muchas veces se ha debido a contaminaciones cruzadas. De forma opuesta, RUDOLF *et al.* (2001) estudian quesos de corteza roja de seis países de Europa en los que sorprendentemente encuentran una mayor incidencia de *L. monocytogenes* en quesos con leche pasteurizada que en los fabricados con leche cruda, lo que atribuyen a contaminaciones cruzadas causadas por una mala práctica de higiene.

Esta bacteria patógena puede sobrevivir dentro de los quesos durante un tiempo prolongado como señalan SOLANO-LÓPEZ *et al.* (2000) en queso Feta (90 días), en queso Colby (140 días) y en Cheddar (superior a 12 meses).

MAKINO *et al.* (2005) comentan que tanto en los Estados Unidos como en Europa se han comunicado casos de listeriosis humana a partir de alimentos contaminados que llegaron incluso a terminar con la vida de varias personas. Además menciona que en Japón en 2001 y como consecuencia de un mayor control rutinario de esta bacteria en alimentos para consumo humano, encontraron entre 123 quesos comerciales uno de pasta lavada que contenía esta bacteria.

Mohos y levaduras

A los 2 días la concentración hallada para los hongos refleja la ausencia de diferencias significativas entre los quesos elaborados con cuajo en pasta experimental (C y D) (**Tabla 36**), que tienen los valores más altos determinados (2,26 y 2,40 log ufc g⁻¹ respectivamente). Los quesos obtenidos con cuajo bovino (A y B) son significativamente distintos a los quesos C y D, y al mismo tiempo son significativamente diferentes entre sí, teniendo un valor de 1,65 log ufc g⁻¹ el B y ausencia de desarrollo el queso A.

A los 45 días solamente se detecta el desarrollo de hongos en los quesos B y D que no muestran diferencias significativas entre sí.

Finalmente a los 60 días las diferencias significativas son similares a las comentadas para los 45 días, no existiendo desarrollo en los quesos A y C, mientras que en los quesos B y D se determinan unos valores significativamente diferentes entre sí siendo menor en el queso B (1,00 log ufc g⁻¹) en relación con el queso D (1,39 log ufc g⁻¹).

Es importante destacar, que la observación de las placas durante el recuento de colonias para los hongos, muestran un predominio en el desarrollo a favor de las

levaduras en todos los recuentos realizados en los quesos. La legislación vigente no contempla límites máximos para hongos.

Las determinaciones microbiológicas y observaciones efectuadas en cada uno de los quesos analizados, permiten concluir que los quesos (en el período considerado de comercialización), son bajo el punto de vista microbiológico aceptables para el consumo humano.

IV. 2. 3. Características organolépticas

La percepción humana de un alimento se describe como un proceso que se inicia con impulsos visuales y que se confrontan con nuestras observaciones anteriores. Los aspectos aparentes como el color, tamaño, forma y estructura anteceden a nuestra interacción física con el mismo, pero los impulsos visuales suelen proporcionar información sobre la viscosidad y el aspecto de un alimento semisólido o gelatinoso (ROSENTHAL, 2001).

Las pruebas para determinar los atributos organolépticos de los cuatro Quesos de Murcia al Vino se realizan a través de pruebas instrumentales para la textura y mediante el análisis sensorial llevado a cabo por un panel de expertos en cata de este tipo de queso.

IV. 2. 3. 1. Textura

La textura, se define como la propiedad sensorial de los alimentos que es detectada por los sentidos del tacto, la vista y el oído, y que se manifiesta cuando el alimento es sometido a una presión deformadora. La textura de un alimento para FOEGEDING *et al.* (2003), son todos aquellos atributos reológicos y estructurales (geométricos y superficiales) perceptibles por ayuda mecánica, táctil y cuando sea apropiado, por receptores visuales y auditivos. De acuerdo con esta definición, todos los productos lácteos tienen una “textura” que define el tipo de producto y su calidad.

La determinación de la textura puede realizarse mediante el empleo de pruebas instrumentales diversas, siendo las más sencillas y de mayor fiabilidad las pruebas de compresión uniaxial y de relajación del esfuerzo, que se complementan con el análisis sensorial. El instrumental utilizado para la determinación de la textura de los Quesos de

Murcia al Vino elaborados se detalla en el apartado IV. 4. 3. 1. del capítulo Material y Métodos de esta Tesis Doctoral.

Prueba de compresión uniaxial

Se determinan tres parámetros: el esfuerzo de fractura (σ_f), la deformación de fractura (ε_f) y el trabajo o energía de fractura (W_f).

La metodología empleada, así como la preparación de las muestras a ensayar, se detallan en el apartado IV. 4. 3. 1. 1. del capítulo Material y Métodos de esta Tesis Doctoral.

Los resultados obtenidos para el esfuerzo de fractura, de la deformación de fractura, y del trabajo de fractura, para los cuatro quesos elaborados se reflejan en la siguiente **Tabla 37**.

Tabla 37. Prueba de compresión uniaxial de los Quesos de Murcia al Vino elaborados

Esfuerzo de fractura (kPa)		
QUESO	45 días maduración	60 días maduración
A	34,80 ± 8,21 ^a	28,45 ± 2,77 ^c
B	22,35 ± 3,28 ^b	22,20 ± 3,10 ^c
C	40,99 ± 7,71 ^a	36,75 ± 5,31 ^b
D	38,58 ± 4,22 ^a	50,08 ± 5,66 ^a
Deformación de fractura (adimensional)		
QUESO	45 días maduración	60 días maduración
A	0,45 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,01 ^a
B	0,47 ± 0,03 ^a	0,39 ± 0,01 ^a
C	0,40 ± 0,01 ^b	0,32 ± 0,03 ^b
D	0,40 ± 0,02 ^b	0,35 ± 0,02 ^b
Trabajo (kJ m⁻³)		
QUESO	45 días maduración	60 días maduración
A	0,91 ± 0,20 ^a	0,67 ± 0,13 ^b
B	0,61 ± 0,07 ^b	0,56 ± 0,05 ^b
C	0,96 ± 0,24 ^a	0,78 ± 0,17 ^b
D	0,88 ± 0,09 ^{ab}	1,14 ± 0,17 ^a

Valores medios en la misma columna con distintos superíndices son significativamente distintos ($P < 0.05$)

El *esfuerzo de fractura* es la presión necesaria para que la matriz del queso se rompa. Cuanto menor sea el valor del esfuerzo necesario para romper el queso, más fracturable (o frágil) será su estructura y viceversa. Los resultados se expresan en kPa.

A los 45 días, el esfuerzo de fractura en los quesos A, C y D muestra un comportamiento similar sin diferencias significativas, mientras que el queso B, que tiene un valor menor (22,35 kPa) es significativamente el más frágil de todos los quesos. A los 60 días, se determina que los quesos elaborados con cuajo comercial (A y B) son significativamente más frágiles que los quesos obtenidos con cuajo en pasta (C y D), que requieren una presión significativamente mayor para alcanzar el punto de fractura, debido a sus texturas más firmes que se producen como consecuencia de una maduración más rápida. También se aprecia que el queso D exhibe el mayor valor para el esfuerzo de fractura (50,08 kPa), mientras que el queso B el más fracturable (22,20 kPa). PAVIA *et al.* (1999), elaboran queso Manchego y a los 60 días obtienen un valor para el esfuerzo de fractura de 73 kPa que es superior al determinado en el queso D (50,08 kPa). Para este mismo tiempo de maduración, GOBBETTI *et al.* (2002) señalan un valor de 129,2 kPa en queso Caciocavallo Pugliese elaborado con leche de vaca y cuajo en pasta bovino.

Con la excepción del queso D que aumenta su valor del esfuerzo de fractura desde el día 45 al 60 de maduración (**Tabla 37**) el resto de los quesos no coinciden con BUFFA *et al.* (2001), al señalar que el valor del esfuerzo de fractura de un queso se incrementa durante la maduración. Además, los niveles alcanzados para el esfuerzo de fractura a los 60 días de maduración en este trabajo de investigación, no coinciden con los resultados obtenidos por los autores anteriormente señalados al obtener queso curado de cabra M-G un valor casi tres veces superior (170,15 kPa) al máximo determinado por nosotros para el queso D (50,08 kPa).

La disminución del contenido de agua de un queso durante su maduración, da lugar a una deshidratación de la proteína que se traduce en un menor grado de libertad de movimiento de las moléculas proteicas y por lo tanto, una mayor firmeza de la matriz del queso (BUFFA *et al.*, 2001). Esta apreciación posiblemente podría explicar la obtención de valores más bajos obtenidos para el esfuerzo de fractura en aquellos quesos con un contenido más elevado de agua como los Quesos de Murcia al Vino (29,73% de humedad para el queso D, cf. **Tabla 27**) frente a los publicados por BUFFA *et al.*, (2001) que reportan en queso de cabra M-G un nivel de humedad del 28,03%.

Otros autores también encuentran valores de σ_f superiores en quesos Cheddar, AK *et al.* (1992) de 20 días (48 kPa) y HORT *et al.* (2001) de 60 días de maduración (90 kPa) comparados con los quesos de este trabajo de investigación.

La *deformación de fractura* (adimensional o expresada en %) describe la propiedad de deformabilidad del queso, que se relaciona con las propiedades de cohesividad; un valor más alto de deformación indicará una mayor deformabilidad del queso y en consecuencia una menor cohesividad entre las moléculas de su matriz. Generalmente, se observa que la deformación disminuye al aumentar el tiempo de maduración de los quesos, fenómeno que se relaciona con la elasticidad producida por las estructuras químicas de las sustancias en el interior del queso y por el grado de hidratación de las proteínas (BUFFA *et al.*, 2001).

El valor de la deformación de fractura es el resultado de una relación matemática en forma de fracción entre valores de medidas de longitud (adimensional), que también puede expresarse como un valor porcentual cuando el valor de dicha fracción es multiplicado por el factor 10^2 .

Cuando se determinan los valores para la deformación máxima, alcanzada en el momento de la fractura de los diferentes quesos al cumplirse los 45 días de maduración, se concluye que aquellos quesos obtenidos a partir de cuajo comercial (46%) son significativamente más elevados a los elaborados con cuajo en pasta de cordero (40%). Ante este hecho se deduce que los quesos elaborados a partir de cuajo en pasta de cordero son menos deformables ya que maduran más rápidamente que los obtenidos con cuajo comercial. La mayor deformación corresponde al queso B (0,47) y la menor a los quesos C y D (0,40 en ambos casos).

Transcurridos los 60 días de maduración, el comportamiento observado es similar al descrito anteriormente, siendo los quesos elaborados con cuajo bovino (A y B) más deformables (39% en ambos quesos) y significativamente diferentes a los quesos obtenidos con cuajo en pasta (C y D), que adquieren valores inferiores de 32 y 35% respectivamente. Trabajando en las mismas condiciones, un valor mucho más bajo de 0,23 (23%) de deformación obtiene BUFFA *et al.* (2001) en queso curado de cabra M-G a los 60 días de maduración. HORT *et al.* (2001), en queso Cheddar de 20 días, obtienen una deformación del 56% (a los de 60 días 80%), mientras que los quesos de este trabajo muestran una deformación media a los 45 días del 43%, y los de 60 días un 36% antes de fracturarse, por lo que lógicamente los Quesos de Murcia al Vino son menos elásticos y por lo tanto más frágiles como se ha comentado anteriormente.

CREAMER *et al.* (1982) consideran que este parámetro reológico es un indicador del comportamiento de las estructuras de las redes del gel formado por la acción de los

distintos cuajos y que podría estar relacionado con el contenido de α_{s1} -caseína intacta del queso.

El *trabajo de fractura* es la medida de la energía necesaria para fracturar 1 m³ de queso. Se expresa en kJ m⁻³.

Analizando los valores hallados para el *trabajo de fractura* que se recogen en la **Tabla 37**, observamos que a los 45 días el queso B es el más blando de todos, ya que le corresponde el valor más bajo (0,61 kJ m⁻³), que es significativamente diferente a los quesos A y C. Al final de la maduración, se observan diferencias significativas entre el queso D y los restantes quesos, alcanzando los valores más altos los elaborados con cuajo en pasta C (0,78 kJ m⁻³) y D (1,14 kJ m⁻³). De lo expuesto, se puede concluir que para fracturar un mismo volumen de queso, aquellos elaborados con cuajo en pasta necesitan una mayor energía en relación con los quesos elaborados con cuajo comercial, lo que confirma que los primeros maduran en un tiempo menor.

La presencia de pequeñas grietas y ojos de tipo mecánico, observados en el interior de algunos quesos, generan zonas heterogéneas que se traducen en importantes variaciones (elevada desviación estándar) en los resultados obtenidos mediante el análisis de textura instrumental. Es por ello que a veces la ausencia de diferencias significativas entre los valores hallados, no concuerdan con la apreciación sensorial, coincidiendo con FARKYE *et al.* (1990), que mencionan que en las distintas variedades de quesos e incluso dentro de un mismo tipo de queso, existe mucha heterogeneidad debida a la presencia de ojos y fracturas dentro de la matriz que causan problemas en la determinación a nivel instrumental.

No se encuentran en la bibliografía científica consultada trabajos de investigación que relacionen la W_f en quesos de cabra, por lo que los resultados obtenidos se relacionan con otros tipos de queso. Los valores medios publicados para W_f en queso Cheddar de 20 días es de 33 kJ m⁻³ (HORT *et al.*, 2001) y 61 kJ m⁻³ a los 60 días, mientras que la media alcanzada en este estudio en Quesos de Murcia al Vino de 45 días es de 0,84 kJ m⁻³, lo que demuestra que este queso tiene menor capacidad de absorber la energía deformante y por lo tanto son más frágiles.

Prueba de relajación del esfuerzo

La presión o esfuerzo de relajación se podría describir como la habilidad que presenta un queso, para reducir o soportar una presión impuesta durante un tiempo, manteniendo una deformación constante.

Cuando se aplica una fuerza al queso este acumula dicha energía deformándose como si de un material elástico se tratara, y además parte de esa energía la disipa en forma de calor cuando se produce un flujo viscoso (comportamiento visco elástico del queso). La prueba de la relajación se utiliza habitualmente para estudiar estos dos efectos comentados. El parámetro r se relaciona con el comportamiento elástico de un material, con valores entre 0 y 1 s^{-1} . Sustancias con valores bajos o cercanos a 0 indicarán un comportamiento elástico ideal y próximos a 1 indicarán un comportamiento opuesto. El parámetro e , derivado de la prueba de relajación del esfuerzo puede alcanzar también valores entre 0 y 1 (adimensional). Cuando los valores se aproximan a 0 indica que el material se comporta como un sólido rígido más firme y cuando adquiere niveles cercanos a 1 indica un comportamiento viscoso típico de los líquidos al fluir y por lo tanto menos firme.

A través de esta prueba donde se producen grandes deformaciones de la muestra, el resultado del esfuerzo o presión de relajación realizada sobre la red del gel del queso puede seguirse en función del tiempo (MESSENS *et al.*, 2000).

La **Tabla 38**, muestra los valores de los parámetros de relajación (r y e) obtenidos para los quesos elaborados, a los 45 y 60 días de maduración.

Tabla 38. Valores de los parámetros de relajación “r” y “e” para los quesos, a los 45 y 60 días de maduración

r (s^{-1})		
QUESO	45 días maduración	60 días maduración
A	0,184 ± 0,004 ^a	0,193 ± 0,004 ^a
B	0,180 ± 0,014 ^a	0,157 ± 0,016 ^b
C	0,175 ± 0,007 ^a	0,188 ± 0,024 ^{ab}
D	0,186 ± 0,011 ^a	0,176 ± 0,008 ^{ab}
e (Adimensional)		
QUESO	45 días maduración	60 días maduración
A	0,885 ± 0,008 ^a	0,891 ± 0,005 ^a
B	0,884 ± 0,008 ^a	0,896 ± 0,030 ^a
C	0,883 ± 0,004 ^a	0,927 ± 0,062 ^a
D	0,872 ± 0,004 ^a	0,872 ± 0,006 ^a

Valores medios en la misma columna con distintos superíndices son significativamente distintos ($P < 0.05$)

La observación de la tabla anterior, muestra que no existen diferencias significativas entre los quesos para el parámetro r a los 45 días de maduración y por lo tanto todos muestran el mismo comportamiento elástico, mientras que a los 60 días sólo se aprecian diferencias significativas entre los quesos elaborados con cuajo comercial

entre sí (A y B), correspondiendo el mayor valor obtenido al queso A ($0,193 \text{ s}^{-1}$) y el menor a B ($0,157 \text{ s}^{-1}$). A los 60 días, el queso B es el más elástico de todos los quesos, seguido de los elaborados con cuajo en pasta (C y D) que tienen un grado menor de elasticidad pero no son significativamente diferentes al queso A. Este último queso (A) manifiesta un comportamiento menos elástico y por lo tanto es el más rígido. PAVIA *et al.* (1999), en queso Manchego elaborado a partir de cuajo bovino hallan un valor r de $0,068 \text{ s}^{-1}$ ($\sim 2,6$ veces menor) a los 60 días de maduración y por lo tanto una elasticidad mayor que la determinada en los Quesos de Murcia al Vino para el mismo período de maduración. BUFFA *et al.* (2001) determinan en queso curado de cabra M-G de 60 días, un valor medio inferior ($0,032 \text{ s}^{-1}$) por lo que dichos quesos deberían ser mucho más elásticos ($\sim 5,5$ veces) que los estudiados en este trabajo de investigación. Los últimos autores además sostienen que la variación en los valores de r podrían asociarse al mayor o menor grado de debilidad presentado por la matriz del queso como consecuencia de la intensidad del proceso proteolítico, lo que a su vez debería estar reflejado en variaciones de los valores de la WSN a lo largo de la maduración y a la pérdida de humedad experimentada por los quesos en la etapa de maduración. Por otra parte, el queso B, que muestra una mayor elasticidad que el A, tiene un valor de humedad mayor (35,46%) frente al queso A (33,70%) (**Tabla 27**) y por lo tanto un grado de hidratación mayor de la matriz proteica, que se traduce en un queso más elástico, coincidiendo con lo reportado por los anteriores autores.

FOEGEDING *et al.* (2003) mencionan que los cambios de la textura de un queso a medida que avanza su maduración, se atribuyen al pH de la masa y a la cantidad de caseína no hidrolizada que se halla en la fase acuosa. Por ejemplo, en el queso Cheddar la dureza y la elasticidad están directamente relacionadas con la proteólisis, mientras que en el queso Camembert y Brie se deben en parte a las grandes variaciones del pH, pero también se requiere un cierto grado de proteólisis para la obtención de la textura deseada. En nuestro caso, a los 60 días de maduración el valor de r del queso B es de $0,157 \text{ s}^{-1}$ que lo sitúa como el queso más elástico, tiene además un valor de pH de 5,46 que es diferente y significativamente superior al resto de los quesos analizados (**Tabla 27**), coincidiendo con FOEGEDING *et al.* (2003).

El parámetro de relajación e muestra la ausencia de diferencias significativas en los valores obtenidos en cada uno de los quesos durante el período de maduración estudiado, coincidiendo con lo reportado por PAVIA *et al.* (1999) que trabajan con queso Manchego y BUFFA *et al.* (2001) en queso curado de cabra M-G.

La media alcanzada para e a los 60 días (0,90) es similar al valor determinado por PAVIA *et al.* (1999) en queso Manchego a los 60 días de maduración (0,95).

Teóricamente, si estos quesos se sometieran a una maduración mucho más prolongada, los valores de e en el tiempo serían menores debido a la paulatina ruptura de la estructura espacial de las proteínas, como consecuencia del proceso de deshidratación que transformaría a los quesos en sólidos mucho más firmes.

IV.2.3. 2. Análisis sensorial

Existen dos tipos de pruebas para evaluar sensorialmente un queso. Por un lado están las llamadas pruebas afectivas, las cuales nos dan una información general de la aceptabilidad o rechazo del alimento, o sea que nos informan de la tendencia global de una población. Por otra parte se encuentran las pruebas analíticas –como las realizadas en este trabajo de Tesis Doctoral- que necesitan jueces entrenados o personas preseleccionadas para tal fin, y cuyas respuestas pueden ser consideradas como valores de referencia. Esta última prueba puede ser de tipo discriminativa o descriptiva, siendo esta última la más acertada en el caso de la textura para poder compararla con los resultados derivados del análisis de tipo instrumental.

Para la evaluación del comportamiento sensorial del extracto de cuajo comercial normalmente utilizado, y del cuajo de cordero en pasta, empleados durante la elaboración de los Quesos de Murcia al Vino, la estrategia desarrollada consiste en la realización de pruebas de análisis sensorial con quesos que contengan uno u otro tipo de cuajo para poder estudiar la influencia del cuajo empleado. Es de suponer que el juicio en relación a la calidad sensorial del queso final obtenido siempre será más severo en la región de origen (DE JONG, 1990); por tal motivo se decidió realizar las pruebas de la cata de los quesos, a través de un panel de jueces integrados en el Consejo Regulador de las Denominaciones de Origen Protegidas del queso de Murcia al Vino, dependiente de la Consejería de Agricultura de la Región de Murcia.

El estudio estadístico de los puntajes obtenidos para cada atributo sensorial analizado y por cada muestra de queso se encuentra reflejado en la **Tabla 39**. En esta tabla los quesos A y B corresponden a los quesos elaborados a partir de cuajo vacuno y los quesos C y D a partir de cuajo en pasta de cordero. Los resultados de cada uno de los parámetros analizados se discuten por separado como se detalla a continuación:

Tabla 39. Características sensoriales de los quesos analizados por el panel de cata

Queso	Forma		Corteza		Color de la pasta		Ojos		Textura		Olor		Gusto		Gusto final		Puntuación total	
	45 d	60d	45d	60d	45d	60d	45d	60d	45d	60d	45d	60d	45d	60d	45d	60d	45d	60d
A	14.00 ^a ±4.00	15.00 ^b ±1.94	13.80 ^a ±2.20	14.80 ^b ±1.40	5.60 ^a ±1.90	5.60 ^a ±1.35	8.30 ^a ±1.25	6.70 ^a ±1.70	17.40 ^a ±2.37	19.80 ^a ±4.29	13.60 ^a ±2.46	13.40 ^a ±1.35	19.80 ^a ±2.90	18.90 ^a ±2.85	13.00 ^a ±1.94	12.20 ^{ab} ±2.57	105.50 ^{ab} ±9.05	106.40 ^{ab} ±11.37
B	16.40 ^a ±1.26	16.80 ^a ±1.03	16.00 ^a ±1.63	16.40 ^a ±0.84	6.10 ^a ±1.52	6.40 ^a ±1.43	8.00 ^a ±1.41	7.30 ^a ±0.95	20.40 ^a ±4.20	21.60 ^a ±2.76	13.20 ^a ±3.16	13.00 ^a ±2.87	19.50 ^a ±3.24	21.30 ^a ±2.98	13.00 ^a ±1.41	14.20 ^a ±1.99	112.60 ^a ±10.06	117.00 ^a ±8.65
C	16.20 ^a ±1.14	15.80 ^{ab} ±1.14	15.80 ^a ±1.14	15.60 ^{ab} ±0.84	6.20 ^a ±4.05	5.70 ^a ±1.57	6.80 ^a ±1.93	6.10 ^a ±1.20	15.60 ^a ±4.65	16.20 ^a ±4.94	10.60 ^a ±4.22	13.00 ^a ±1.41	13.50 ^b ±6.82	13.50 ^b ±5.52	9.00 ^b ±3.80	9.40 ^b ±3.78	93.70 ^b ±21.64	95.30 ^b ±13.40
D	15.80 ^a ±1.14	16.00 ^{ab} ±0.94	14.40 ^a ±2.46	15.40 ^{ab} ±1.35	5.00 ^a ±2.21	5.50 ^a ±1.96	7.00 ^a ±1.63	5.50 ^a ±1.65	16.20 ^a ±3.79	16.50 ^a ±4.95	11.00 ^a ±2.36	13.20 ^a ±2.15	15.60 ^{ab} ±3.41	18.00 ^{ab} ±3.74	10.40 ^{ab} ±2.46	12.40 ^{ab} ±2.07	95.40 ^{ab} ±9.23	102.50 ^{ab} ±12.38

Medias con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Forma del queso: No existen diferencias significativas entre los quesos de 45 días, que sí se observan entre los quesos elaborados con cuajo vacuno a los 60 días de maduración.

Corteza del queso: La valoración de los jueces para este parámetro sigue la tendencia comentada anteriormente.

Color de la pasta: No existen diferencias significativas entre los quesos de 45 días y los de 60 días. Al finalizar la cata, los catadores expusieron los quesos a la luz natural para saber que ocurriría ya que notaban un color que no era el óptimo en todos los quesos, de ahí que los puntajes para este parámetro no han llegado a valores superiores, y de haberse empleado una luz adecuada hubiera sido posible obtener una mayor puntuación en todos los casos.

Formación de ojos en la pasta: No se observan diferencias entre los diferentes tipos de queso a 45 y 60 días.

Textura: No hay diferencias significativas entre los quesos analizados, tanto para 45 como para 60 días de maduración. A pesar de lo afirmado anteriormente, al finalizar la sesión de cata, los catadores en general coincidían en que el queso con mejor textura era el de 45 días elaborado con cuajo comercial y leche del segundo día (queso B) que reológicamente es el más frágil y elástico de todos los quesos estudiados (**Tabla 37**).

Olor: No existen diferencias significativas para el olor entre los quesos a los 45 y 60 días de maduración.

Gusto: Para 45 y 60 días, se observan diferencias significativas entre los quesos elaborados con cuajo comercial y sólo uno de los fabricados con cuajo en pasta (queso C), obteniendo mayor puntuación en general los realizados con cuajo de origen vacuno.

Gusto final: En este caso para los quesos de 45 días se da el mismo caso que lo anteriormente comentado para “gusto”, pero a los 60 días sólo hay diferencias significativas entre un queso elaborado con cuajo comercial (B) y otro con cuajo en pasta (C). Para el panel de cata el mejor es el realizado con cuajo comercial con la leche del primer día (queso A de 45 días).

Puntuación total del queso: Es la suma de las calificaciones parciales de los parámetros estudiados durante la cata. Tanto para los 45 como 60 días, sólo existen diferencias entre los quesos B y C que corresponden a uno fabricado con cuajo comercial (mayores puntuaciones) y otro con cuajo en pasta respectivamente (menores puntuaciones).

El Consejo Regulador de las D.D.O.O. Protegidas para el queso de Murcia al Vino, clasifica estos quesos de acuerdo con la puntuación total adjudicada por el panel de cata según se detalla en el apartado III. 4. 3. 2. del capítulo Material y Métodos de esta Memoria de Tesis Doctoral. De acuerdo con la calificación obtenida, los quesos estudiados se clasifican como se muestra en la **Tabla 40**.

La clasificación obtenida para cada uno de los quesos de Murcia al Vino, encuadra a los quesos obtenidos mediante el empleo de cuajo en pasta de cordero, como aceptables para su comercialización a partir de los 60 días de maduración, tiempo que habitualmente es utilizado como el adecuado para su comercialización.

Los criterios empleados para la valoración de estos quesos fueron las características organolépticas que definen al queso de Murcia al Vino, penalizando todos aquellos atributos que difieren de los establecidos. De ahí que los quesos elaborados con cuajo en pasta no alcancen la calificación habitualmente obtenida por los quesos elaborados con cuajo comercial.

Tabla 40. Clasificación de los quesos según el análisis sensorial

QUESO	MADURACIÓN (Días)	PUNTUACIÓN	CLASIFICACIÓN
Cuajo vacuno			
A	45	105.50	Aceptable
A	60	106.40	Aceptable
B	45	112.60	Bueno
B	60	117.00	Bueno
Cuajo en pasta			
C	45	93.70	Regular
C	60	95.30	Aceptable
D	45	95.40	Aceptable
D	60	102.50	Aceptable

Los quesos fabricados con cuajo en pasta de cordero presentan un sabor un poco amargo y ligeramente picante en relación con los elaborados con cuajo bovino, que coincide con BUSTAMANTE (2002). Esta autora señala que los sabores “picantes” característicos observados en Queso Idiazábal elaborado con cuajo en pasta de cordero son el resultado de una mayor actividad lipolítica con liberación de ácidos grasos libres de cadena corta, principalmente ácido butírico; esta observación coincide con nuestros

resultados ya que se aprecia un mayor contenido de ácidos grasos libres de cadena corta (**Tabla 35**) en los quesos elaborados con cuajo en pasta en relación con los obtenidos con cuajo comercial. Sin duda alguna, los sabores ligeramente picantes de los quesos con cuajo en pasta pueden ser atribuidos a esta mayor concentración de estos ácidos grasos libres.

Todos los jueces señalaron que los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero eran diferentes a los habituales, pero constituyen una alternativa de gran interés para la diversificación de los quesos de cabra elaborados en la Región de Murcia.

PRIMERA.- En la fabricación de cuajos de cordero en pasta se elaboran cuatro tipos de cuajo experimental mediante distintas opciones tecnológicas, con posibilidades de utilización en la industria quesera.

SEGUNDA.- La caracterización de los cuatro tipos de cuajo obtenidos permite seleccionar aquel que combina de forma más equilibrada las actividades coagulante y lipolítica. En este estudio el tipo de cuajo seleccionado corresponde al elaborado con abomasos llenos y frescos.

TERCERA.- El tipo de cuajo empleado afecta de forma significativa al pH de los Quesos de Murcia al Vino a los 60 días de maduración, siendo inferiores los valores obtenidos en los elaborados con cuajo en pasta de cordero.

CUARTA.- El cuajo influye significativamente en el extracto seco al final de la maduración en los Quesos de Murcia al Vino, siendo superiores en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero, lo que indica que éstos maduran en un tiempo menor comparado con los elaborados con cuajo comercial.

QUINTA.- Las bacterias ácido-lácticas, empleadas como cultivo iniciador, desarrollan niveles de pH inferiores en los Quesos de Murcia al Vino elaborados con cuajo en pasta de cordero en relación a los elaborados con cuajo comercial, debido a una mayor velocidad de formación de aminoácidos tal como se refleja en los valores de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico.

SEXTA.- La velocidad de difusión del NaCl en la fase acuosa de los Quesos de Murcia al Vino elaborados con cuajo en pasta de cordero es mayor que en los elaborados con cuajo bovino comercial.

SÉPTIMA.- En los quesos de Murcia al Vino estudiados, el indicador del grado de proteolisis más sensible es el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12%, que permite diferenciar el efecto de los distintos tipos de cuajo en los quesos desde el inicio de la maduración, , seguido del nitrógeno soluble en etanol al 28,5% a partir de los 45 días.

OCTAVA.- Los Quesos de Murcia al Vino elaborados con cuajo en pasta de cordero exhiben al final de la maduración una actividad proteolítica significativamente mayor que los obtenidos con cuajo de ternera comercial, debido a la actividad quimosina, manifiestada en los valores de nitrógeno soluble a pH 4.4 y a la actividad exopeptidasa microbiana, deducida de los datos de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12%.

NOVENA.- Se determina una relación inversa entre la fracción de nitrógeno soluble en agua y el pH en los Quesos de Murcia al Vino elaborados, donde valores más bajos de pH se corresponden con niveles superiores de esta fracción de nitrógeno soluble.

DÉCIMA.- El cuajo en pasta de cordero manifiesta una mayor actividad lipolítica que el cuajo líquido bovino durante la elaboración Queso de Murcia al Vino, favoreciendo especialmente la producción de ácidos grasos libres de cadena corta.

UNDÉCIMA.- Los cuajos empleados, en pasta de cordero o líquido bovino, no diferencian los parámetros microbiológicos analizados en los quesos.

Aunque el cuajo en pasta de cordero seleccionado en este estudio no reúne los requisitos microbiológicos establecidos en la legislación, los quesos elaborados sí que alcanzan los niveles microbiológicos exigidos a partir del período de su comercialización.

DUODÉCIMA.- El tipo de cuajo utilizado influye en la deformación de fractura de los Quesos de Murcia al Vino a los 45 y 60 días de maduración, siendo los elaborados con cuajo en pasta de cordero menos deformables y, por lo tanto, menos elásticos que los fabricados con cuajo comercial.

DECIMOTERCERA.- El esfuerzo de fractura solamente es afectado por el tipo de cuajo empleado, a los 60 días de maduración, alcanzándose valores significativamente más altos en los quesos elaborados con cuajo en pasta de cordero, que indica que éstos son más duros que aquellos obtenidos con cuajo de ternera comercial.

DECIMOCUARTA.- De acuerdo con los resultados del análisis sensorial de los quesos de Murcia al Vino se concluye que el empleo de cuajo natural en pasta de cordero puede ser utilizado como una alternativa para la obtención de nuevos tipos de queso de mayor aceptación comercial con sabores interesantes.

- A**BD EL-SALAM, M. H., EL-SHIBINY, S., MAHFOUZ, M. B., EL-DEIN, H. F., MEHANNA, N. (1987). Evaluation of Fresh and Dried Vells as a Source of Calf Rennet Extract. *Asian J. Dairy Res.* **6** 181-186.
- ADDIS, M., PIREDDA, G., PES, M., Di SALVO, R., SCINTU, M. F., PIRISI, A. (2005a). Effect of the use of three different lamb paste rennets on lipolysis of the PDO Pecorino Romano Cheese. *International Dairy Journal* **15** 563-569.
- ADDIS, M., PIRISI, A., Di SALVO, R., PODDA, F., PIREDDA, G. (2005b). The influence of the enzymatic composition of lamb rennet paste on some properties of experimentally produced PDO Fiore Sardo Cheese. *International Dairy Journal* **15** 1271-1278.
- AGANGA, A. A., AMARTEIFIO, J. O., NKILE, N. (2002). Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk. *Journal of Food Composition and Analysis* **15** 533-543.
- ALAIS, C. (1970). *Ciencia de la leche*. Compañía Editorial Continental S.A. México.
- AMIGO GARRIDO, L. (1989). Fenómenos de coagulación de la leche y su influencia en los quesos. *Alimentación Equipos y Tecnología* **julio-agosto** 157-165.
- ANIFANTAKIS, E. (1976). Contribution to the study of rennet from lamb's and kid's abomasa. Thesis. Agricultural College of Athens, Greece.
- ANONIMO, (2001). Applications of lipases. AU-KBC Research Centre. <http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html>

- ANUARIO ESTADÍSTICO DE LA REGIÓN DE MURCIA (2004). Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Dirección General de Industrias y Asociacionismo Agrario. Centro Regional de Estadística. Evolución de la producción de leche por especie.
- ARO, A., ANTOINE, J. M., PIZZOFERRATO, L., REYKDAL, O., Van POPPEL, G. (1998). *Trans Fatty Acids in Dairy and Meat Products from 14 European Countries: The TRANSFAIR Study*. Journal of Food Composition and Analysis **11** 150-160.
- ASTON, J. W., CREAMER, L. K. (1986). Contribution of the Components of the Water-soluble Fraction to the Flavour of Cheddar Cheese. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology. **21** 229-248.
- AWAD, S., QIAO-QIAN LÜTHI-PENG, PUHAN, Z. (1998). Proteolytic activities of chimosin and porcine pepsin on buffalo, cow, and goat whole and β -casein fractions. J. Agric. Food Chem. **46** (12) 4997-5007.
- AYGUN, O., PEHLIVANLAR, S. (2005). *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. Food Control In Press, Corrected Proof, Available on line September 2005.

BALLESTER, P. (2005). La sal y los quesos. Revista Industrias Lácteas Españolas

Septiembre 2005 17-20.

- BALLESTEROS, C., POVEDA, J. M., GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A., CABEZAS, M. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. Food Control **17** 249-255.
- BARZAGHI, S., DAVOLI, E., RAMPILLI, M., CONTARINI, G. (1997). La lipolisi nel formaggio Provolone: ruolo del caglio in pasta. Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria **48** (2) 146-156.
- BARZAGHI, S., RAMPILLI, M. (1996). Valutazione Delle Caratteristiche Enzimatiche Di Cagli In Pasta Commerciali. Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria. **47** 171-181.
- BERNARDO, A. (1991). Aspectos fundamentales para la elaboración industrial de quesos artesanales. Nuevos métodos tecnológicos para productos lácteos. Centro de Investigaciones Agrarias. Coruña. Editorial Venus 127-138.

- BIDAT, E., RANCÉ, F., BARANÉS, T., GOULAMHOUSSEN, S. (2003). Goat's milk and Sheep's milk allergies in children in the absence of cow's milk allergy. *Revue Française D'allergologie et D'immunologie Clinique* **43** 273-277.
- BIRSCHBACH, P. (1994). Origins of lipases and their characteristics. *Bulletin of the IDF* **294** chapter 2.
- B.O.E. *Boletín Oficial del Estado*. (26 de Febrero de 1996). Orden de 20 de Febrero de 1996 del Ministerio de la Presidencia, por la que se modifica la Norma general de identidad y pureza para el cuajo y otras enzimas coagulantes de leche destinados al mercado interior, aprobada por Orden de 14 de enero de 1988.
- B.O.R.M. *Boletín Oficial de la Región de Murcia*. (21 de Julio de 2001). Orden nº **168** de 11 de Julio de 2001, de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente por la que se aprueba el reglamento de las denominaciones de origen "Queso de Murcia" y "Queso de Murcia al Vino" y se constituye su Consejo Regulador.
- BOROS, V., STEVONKOVA, E. (1990). Fatty acid composition of goats' milk fat and variation in fatty acid composition during lactation. *Zivocisna Vyrova* **35** 825-831.
- BOYAZOGLU, J., MORAND-FEHR, P. (2001). Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. A critical review. *Small Ruminant Research* **40** 1-11.
- BROOME, M. C., LIMSOWTIN, G. K. Y. (1998). Milk coagulants. *The Australian Journal of Dairy Technology*. **53** 188-190.
- BRUN, A., CASTILLA, J., TORRES, J. M. (2005). Encefalopatías espongiiformes transmisibles en animales.
<http://neurología.rediris.es/congreso-1/conferencias/priones-2.html>
- BUFFA, M. N., TRUJILLO, A. J., PAVIA, M., GUAMIS, B. (2001). Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *International Dairy Journal* **11** 927-934.
- BUFFA, M., GUAMIS, B., PAVIA, M., TRUJILLO, A. J. (2001). Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk. *International Dairy Journal* **11** 175-179.
- BUFFA, M., GUAMIS, B., SALDO, J., TRUJILLO, A. J. (2004). Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **37** 247-253.

- BUSTAMANTE, M., CHÁVARRI, F., SANTISTEBAN, A., CEBALLOS, G., HERNÁNDEZ, I., MIGUÉLEZ, M. J., ARANBURU, I., BARRÓN, L. J. R., VIRTO, M., DE RENOBALLES, M. (2000). Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet pastes. *Journal of Dairy Research* **67** 393-402.
- BUSTAMANTE, M. A. (2002). El cuajo de cordero en pasta: Preparación y efecto en los procesos proteolíticos y lipolíticos de la maduración del Queso Idiazabal. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco, Vitoria-Gasteiz.
- BÜTIKOFER, U., RÜEGG, M., ARDÖ, Y. (1993). Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **26** 271-275.
- CALVO, M. M. (2002). Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropptide formation. *Eur. Food Res. Technol.* **214** 182-185.
- CAMPOS, M. S., ALFÉREZ, M. J. M., LÓPEZ-ALIAGA, I. (2004). Beneficial effects of goat milk on the nutritional utilization of iron and cooper in malabsorption syndrome. IDF International Symposium The future of the sheep and goat Dairy Sectors, Zaragoza, España, 28-30 octubre.
- CARRERA, E., GAYA, P., MEDINA, M., NUÑEZ, M. (1999). *Milchwissenschaft* **54** 146-149.
- CARRETERO, C., MOR-MUR, M., PLA, R., GUAMIS, B. (1992). SDS-PAGE study of pH 4.6 soluble proteins during ripening of goat milk cheese. *Milchwissenschaft.* **47** (5) 292-295.
- CASIRAGHI, E. M., BAGLEY, E. B., CHRISTIANSON, D. D. (1985). Behavior of Mozzarella, Cheddar and processed cheese spread in lubricated and bonded uniaxial compression. *Journal of Texture Studies* **16** 281-301.
- CASTILLO, I., CALVO, M. V., ALONSO, L., JUÁREZ, M., FONTECHA, J. (2005). Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and a defined strain starter. *Food Chemistry In Press, Corrected Proof, Available on line December 2005.*
- CASTILLO, M., JORDÁN, M. J., BAÑÓN, S., GARRIDO, M. D., LAENCINA, J., LÓPEZ, M. B. (1998). Effect of different coagulants enzymes in Murciano-Granadina fresh goat cheese. Influence on cheese Yield. Basis of the quality of

- typical Mediterranean animal products. Series Monográficas de la E. A. A. P. Publication N° **90** 244-248. Ed. Wageningen Pers.
- CASTILLO, M., JORDÁN, M. J., GODOY, A., LAENCINA, J., LÓPEZ, M. B. (2000). Kinetics of syneresis in fresh goat cheese. *Milchwissenschaft* **55** 566-569.
- CASTILLO, M. (2001). Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.
- CASTILLO, M., PAYNE, F. A., LÓPEZ, M. B., FERRANDINI, E., LAENCINA, J. (2004a). Sensores ópticos para la monitorización y control de procesos en la elaboración de queso. III Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Pamplona 15 al 17 de Septiembre 10 páginas.
- CASTILLO, M., GONZÁLEZ, R., PAYNE, F. A., LAENCINA, J., LÓPEZ, M. B. (2005). Optical monitoring of milk coagulation and inline cutting time prediction in Murcian Al Vino Cheese. *Applied Engineering in Agriculture, American Society of Agricultural Engineers*, **21** (3) 465-471.
- CERUTTI, G., FINOLI, C., VEECHIO, A. (1978). Latte di buffala, di pecora e di capra. Composizione e residui cloroorganici. *Latte* **3** 310-318.
- CHÁVARRI, F., VIRTO, M., MARTÍN, C., NÁJERA, A. I., SANTISTEBAN, A., BARRÓN, L. J. R., DE RENOBALLES, M. (1997). Determination of free fatty acids in cheese: comparison of two analytical methods. *Journal of Dairy Research* **64** 445-452.
- 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 N° 35, Gobierno Vasco, Departamento de Industria, Agricultura y Pesca, Vitoria-Gasteiz.
- COLLINS, Y. F., McSWEENEY, P. L. H., WILKINSON, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* **13** 841-866.
- CONSEJO REGULADOR DENOMINACIONES DE ORIGEN PROTEGIDAS QUESO DE MURCIA Y QUESO DE MURCIA AL VINO (2005). Día de los quesos de Murcia con Denominación de Origen. Resultados 2004, 10 de marzo 2005, Murcia.
- CONTRERAS, A., PAAPE, J.M., LUENGO, C., JIMÉNEZ, J., GARCIA, D., MIRANDA, R.D., SANCHEZ, A. (2001). La bromelaina como complemento de

- la dieta en ganado caprino: efecto sobre la infección intramamaria y la calidad de la leche. Revista ILE **mayo 2001** 54-55.
- CORRADINI, C., NEVIANI, E. (1994). Determination of lipolytic action in cheese. Bulletin of the IDF **294** chapter 4.
- CREAMER, L. K., OLSON, N. F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. Journal of Food Science **47** 631-646.
- D**A SILVA BOAVIDA CANADA, J. (2001). Caracterización sensorial y físico-química del Queijo Serpa. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, Cáceres.
- DEIANA, P., FARRIS, G. A., FATICHENTI, F., CARINI, S., LODI, R., TODESCO, R. (1980). Impiego di caglio di agnello e capretto in polvere nella fabbricazione di formaggio Fiore Sardo: aspetti microbiologici e tecnologici. Il Latte Vol. V Marzo 1980.
- D'ELIA, A. (2004). Influence of diet and age of kids on enzymatic activities of kid rennet pastes.
http://216.239.37.104/translate_c?hl=es&sl=en&u=http://web.uniud.it/dial/i-dottorati/W...
- DE JONG, L. (1990). Nuevo cuajo estándar. Alimentación equipos y tecnología. **Abril** 123-131.
- DEMETER, K. Y ELBERTZHAGEN, H. (1971). Elementos de microbiología lactológica. Editorial Acribia, Zaragoza.
- De RENOBALLES, M., LAENCINA, J., FERRANDINI, E., LÓPEZ, M. B., VIRTO, M., ALBISU, M., PEREZ ELORTONDO, F. J., BARRÓN, L. J. R., NÁJERA, A. I., GUERRA, A., DELGADO, C. (2005). Characterization of lamb rennet paste and optimization of processing methods to recover traditional flavours in sheep and goat milk cheeses. Special Issue of the International Dairy Federation **0501/Part 4**, 261-262.
- DESMAZEAUD, M. J., GRIPON, J. C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft* **32** (12).
- DE WIT, M., OSTHOFF, G., VILJOEN, B. C., HUGO, A. (2005). A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enzyme and Microbial Technology* **37** 606-616.

DIARIO OFICIAL DE LA UNIÓN EUROPEA (2005). Reglamento (CE) nº 2073 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. **L 338** 1-20.

ENGEL, E., NICKLAUS, S., SEPTIER, C., SALLES, C., LE QUERE, J. L. (2000). Taste Active Compounds in a Goat Cheese Water-Soluble Extract. 2. Determination of the Relative Impact of Water-Soluble Extract Components on Its Taste Using Omission Tests. *J. Agric. Food Chem.* **48** 4260-4267.

FALAGÁN, A., GONZÁLEZ, C., PÉREZ, S. J., GOICOECHEA, A., ROMERO, C. (1991). Composition and production curve in the goat's milk. *Chem. Mikrobiol. Techol. Lebensm.* **13** 76-82.

FARKYE, N. Y., FOX, P. F. (1990). Objective indices of cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology.* **Agosto** 37-40.

FENNEMA, O. R. (1982). *Introducción a la ciencia de los alimentos.* Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.

FERNÁNDEZ, C., SÁNCHEZ, A., GARCÉS, C. (2002). Modeling the lactation curve for test-day milk yield in Murciano-Granadina goats. *Small Ruminant Research* **46** 29-41.

FERRANDINI, E., CASTILLO, M., PRICE, A., ÁLVAREZ, D., MANSILLA, S., LÓPEZ, M. B. (2003). Características de la leche de cabra Murciano-Granadina en la Región de Murcia. II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Orihuela, Volumen **II** 413-416.

FOEGEDING, E. A., BROWN, J., DRAKE, M. A., DAUBERT, C. R. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal* **13** 585-591.

FONTECHA, J., PELÁEZ, C., JUÁREZ, M., REQUENA, T., GÓMEZ, C. (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *Journal Dairy Science* **73** 1150-1157.

FOX, P. F., LAW, J. (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology* **5** (3) 239-262.

FOX, P. F., WALLEY, B. F. (1971). Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin. *Journal Dairy Research* **38** 165-170.

- FOX, P.F.(1988). Rennets and Their Action in Cheese Manufacture and Ripening. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **10** 522-535.
- FRANCO, I., PRIETO, B., BERNARDO, A., GONZÁLEZ, J., CARBALLO, J. (2003). Biochemical changes throughout the ripening of a tradicional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *International Dairy Journal* **13** 221-230.
- 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** 1099-1116.
- FREITAS, A. C., FRESNO, J. M., PRIETO, B., MALCATA, F. X., CARBALLO, J. (1997). Effects of ripening time and combination of ovine and caprine milks on proteolysis of Picante cheese. *Food Chemistry* **60** (2) 219-229.
- FREITAS, A. C., MACEDO, A. C., MALCATA, F. X. (2000). Review: Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Sci. Tech. Int.* **6** (5) 351-370.
- FREITAS, C., XAVIER MALCATA, F. (2000). Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine. Protegee and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *Journal Dairy Science.* **83** 584-602.
- FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E., CARBALLO, J., GONZÁLEZ-PRIETO, J., BERNARDO, A. (1996). Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish craft goat's milk cheese (Armada variety). *Food Chemistry*, **55** (3) 225-230.

- G**ABORIT, P., MENARD, A., MORGAN, F. (2001). Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheeses. *International Dairy Journal* **11** 315-325.
- GARCÍA OLMEDO, R., CARBALLIDO, A., ARNAEZ ORTIZ, M. (1979). Contribución al estudio de la grasa de leche de cabra: ácidos grasos mayores y sus relaciones. *Ann. Bromatol.* **31** 227-270.
- GEORGALA, A., MOSCHOPOULOU, E., AKTYPIS, A., MASSOURAS, T., ZOIDOU, E., KANDARAKIS, I., ANIFANTAKIS, E. (2005). Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Food Chemistry* **93** 73-80.

- GESCHE, E., VALLEJOS, A., SAEZ, M. (2003). Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). Archivos de Medicina Veterinaria **35** (1) 11 páginas. ISSN 0301-732X.
- GLASSTONE, S. (1972). Tratado de química física. Editorial Aguilar, Madrid.
- GOBBETTI, M., MOREA, M., BARUZZI, F., CORBO, M. R., MATARANTE, A., CONSIDINE, T., DI CAGNO, R., GUINEE, T., FOX, P. F. (2002). Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. International Dairy Journal **12** 511-523.
- GREEN, M. L. (1977). Review of the progress of Dairy Science: milk coagulants. Journal of Dairy Research. **44** 159-188.
- GULATI, S. K., BYERS, E. B., BYERS, Y. G., ASHES, J. R., SCOTT, T. W. (1997). Effect of feeding different fat supplements on the fatty acid composition of goat milk. Animal Feed Science and Technology **66** 159-164.
- GUO, M. R., WANG, S., LI, Z., QU, J., JIN, L., KINDSTEDT, P. S. (1998). Ethanol stability of goat's milk. International Dairy Journal **8** 57-60.
- GUO, M., PARK, Y. W., DIXON, P. H., GILMORE, J. A., KINDSTEDT, P. S. (2004). Relationship between the yield of cheese (Chevre) and chemical composition of goat milk. Small Ruminant Research **52** 103-107.
- H**ADJIPANAYIOTOU, M. (1995). Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. Small Ruminant Research **18** 255-262.
- HAENLEIN, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research **51** 155-163.
- HAMILTON, S., HAMILTON, R.J., SEWELL, P.A. (1992). Extraction of lipids and derivative formation. In Lipid Analysis. A Practical Approach, 13-64, (Eds Hamilton, S. and Hamilton R. J.), Oxford University Press.
- HARBOE, M. K. (1994). Use of lipases in cheesemaking. Bulletin of the IDF **294** chapter 3.
- HARBOE, M. K., HORSHOLM, D. K. (1992). Coagulants of different origin. European Dairy Magazine. **2** 6-15.
- [Http://www.cheesefromspain.com/CFS/2_GuideE.htm](http://www.cheesefromspain.com/CFS/2_GuideE.htm).

HELLÍN, P., LÓPEZ, M. B., JORDÁN, M. J., LAENCINA, J. (1998). Fatty acids in Murciano-Granadina goats' milk. *Lait* **78** 363-369.

HORT, J., LE GRYS, G. (2001). Developments in textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal* **11** 475-481.

INDUSTRIAS LÁCTEAS ESPAÑOLAS (2005). Riqueza gastronómica de la Región de Murcia. *Revista* **316** Junio 43-45.

IRIGOYEN, A. (1999). Caracterización del Queso Roncal elaborado con diferentes tipos de cuajo. Tesis Doctoral, Universidad Pública de Navarra, Pamplona-Iruña.

IRIGOYEN, A., IZCO, J. M., IBÁÑEZ, F. C., TORRE, P. (2001). Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese. *Food Chemistry* **72** 137-144.

IRIGOYEN, A., IZCO, J. M., IBÁÑEZ, F. C., TORRE, P. (2002). Influence of calf or lamb rennet on the physicochemical, proteolytic, and sensory characteristics of an ewe's-milk cheese. *International Dairy Journal* **12** 27-34.

JANDAL, J. M. (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **22** 177-185.

JIN, Y. K., PARK, Y. W. (1995). Effects of aging time and temperature on proteolysis of comercial goat milk cheeses produced. *Journal Dairy Science* **78** 2598-2608.

JORDÁN, M. J. (1995). Caracterización Tecnológica de cuajos naturales y enzimas coagulantes de la leche. Tesis de Grado de Licenciatura en Químicas, Universidad de Murcia, Murcia.

JUAREZ, M. (1985). Composición y factores de variabilidad de la leche. *Alimentación Equipos y Tecnología* **4** 47-56.

JUAREZ, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, M. C. (1989). Características de leche y quesos de cabra españoles. *Alimentación, Equipos y Tecnología* **4** 133-137.

KAAN TEKINSEN K., ÖZDEMİR, Z. (2005). Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. *Food Control* In Press, Corrected Proof, Available on line April 2005.

- KALIT, S., HAVRANEK, J. L., KAPS, M., PERKO, B., CURIK, V. C. (2005). Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. *International Dairy Journal* **15** 619-624.
- KIRBY, C. J. (1989). Maduración acelerada de quesos. *Revista Española de Lechería*. **6** 42-49.
- KLOBASA, F., SENFT, B. (1970). Untersuchungen über das Fettsäurespektrum im Milchlipp von Ziegen. *Milchwissenschaft* **25** 453-456.
- KOSIKOWSKI, F. (1978). *Cheese and Fermented Milk Foods*, F. V. Kosikowski and Associates. New York, USA.
- KUCHROO, C. N., FOX, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*. **37** 331-335.
- L**LACASA, A. (1989). Panorama general de la producción de leche de cabra. *Alimentación, Equipos y Tecnología* **4** 144-148.
- LAENCINA, J., MORENO, M. D., OCIO, E., MORENO, R. (1982). Ácidos grasos de la leche de cabra murciana. XIV Jornadas de estudio, Economía y Técnica de la Producción de Leche de Oveja y Cabra. Zaragoza, Mayo.
- LAFUENTE, A., FALAGÁN, A., URRUTIA, B., CARRIZOSA, J. A. (1993). Notas preliminares sobre lactaciones normalizadas de cabras Murciano-Granadina en Murcia. II. Efecto número de parto. V Jornadas sobre producción animal. ITEA **I** 6-8.
- LAMBLIN, C., BOURRIER, T., ORLANDO, J. P., SAUVAGE, C., WALLAERT, B. (2001). Allergie aux laits de chèvre et brebis sans allergie associée au lait de vache. *Revue Française D'allergologie et D'immunologie clinique* **41** 165-168.
- LANE, C. N., FOX, P. F., JOHNSTON, D. E., McSWEENEY, P. L. H. (1997). Contribution of Coagulant to Proteolysis and Textural Changes in Cheddar Cheese During Ripening. *Int. Dairy Journal*. **7** 453-464.
- LOMHOLT, S. B., QVIST, K. B. (1999). Gel firming rate of rennet curd as a function of rennet concentration. *International Dairy Journal* **9** 417-418.
- LÓPEZ, M. B., VIDAL, M. C., MARÍN, F., GARRIDO, M. D., LAENCINA, J., LUNA, A. (1990). Nuevas posibilidades en la elaboración de queso de cabra Murciano-Granadina. I Congreso Internacional de Tecnología y Desarrollo Alimentarios *Actas* **3** 1017-1022.

- LÓPEZ, M. B. (1993). Cuajos y enzimas coagulantes en la elaboración de queso de cabra en la Región de Murcia. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.
- LÓPEZ, M. B., BOTET, M. J., HELLÍN, P., LUNA, A., LAENCINA, J. (1995). Effect of thermal treatment on goat milk clotting time. *Milchwissenschaft* **50** (3) 126-129.
- LÓPEZ, M. B., LUNA, A., LAENCINA, J., FALAGÁN, A. (1999). Cheese-making capacity of goats milk during lactation: influence of stage and number of lactations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79** 1105-1111.
- LUGINBÜHL, W. (1996). The effect of stress correction on fracture point coordinates in uniaxial compression tests of cheese. *Lebensm.-Wiss. U.- Technol.* **29** 433-437.
- M**AKINO, S. I., KAWAMOTO, K., TAKESHI, K., OKADA, Y., YAMASAKI, M., YAMAMOTO, S., IGIMI, S. (2005). An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food Microbiology* **104** 189-196.
- McCULLOUGH, F. S. W. (2004). Nutritional interest of goat's milk. Present information and future prospects. IDF International Symposium The future of the sheep and goat Dairy Sectors, Zaragoza, España, 28-30 octubre.
- MALLATOU, H., PAPPAS, E. C., BOUMBA, V. A. (2004). Proteolysis in Teleme cheese made from ewes', goats' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*. Aceptado **10 Marzo** 1-11.
- MALLATOU, H., PAPPAS, 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.
- MANOLOPOULOU, E., SARANTINOPOULOS, P., ZOIDOU, E., AKTYPIS, A., MOSCHOPOULOU, E., KANDARAKIS, G., ANIFANTAKIS, E. M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology* **82** (2) 153-161.
- MARINO, M., MAIFRENI, M., RONDININI, G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: análisis of its indigenous lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **229** 133-140.

- MARINO, M. (2004). Effect of proteolytic starters on the microbiological, textural and sensorial characteristics of Montasio cheese.
http://216.239.37.104/translate_c?hl=es&sl=en&u=http://web.uniud.it/dial/i-dottorati/W...
- MARQUÉS, F. (1977). Algunos parámetros lecheros de la agrupación Murciana-Granadina. Simp. Sobre la Cabra en los Países Mediterráneos. Málaga. 261-361.
- MARTIN-HERNANDEZ, M. C., JUAREZ, M., RAMOS, M. (1984). Producción y características de composición de la leche y quesos de cabra. Alimentación equipos y tecnología **julio-agosto** 61-71.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, C., JUÁREZ, M., RAMOS, M., MARTÍN ÁLVAREZ, P. J. (1988). Composición de la leche de cabra Murciana y Granadina. An. Bromatol. **10** 237-248.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, M. C., JUÁREZ, M. (1992). Biochemical characteristics of three types of goat cheese. Journal Dairy Science **75** 1747-1752.
- MAYES, J. J., SUTHERLAND, B. J. (1984). Coagulum firmness and yield in Cheddar cheese manufacture. The role of the curd firmness instrument in determining cutting time. The Australian Journal of Dairy Technology **June** 69-73.
- MEDINA, M., GAYA, P., GUILLÉN, A. M., NUÑEZ, M. (1992). Characteristics of Burgos and Hispánico cheeses manufactured with calf rennet or with recombinant chymosin. Food Chemistry **45** 85-89.
- MENDIOLA, F. J. (2000). Obtención y caracterización del coagulante de leche normalizado de origen vegetal (*Cynara cardunculus*) y su aplicación en la elaboración de queso de La Serena. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, Badajoz.
- MESSENS, W., Van de WALLE, D., AREVALO, J., DEWETTINCK, K., HUYGHEBAERT, A. (2000). Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese. International Dairy Journal **10** 359-367.
- MOATSOU, G., MOSCHOPOULOU, E., GEORGALA, A., ZOIDOU, E., KANDARAKIS, I., KAMINARIDES, S., ANIFANTAKIS, E. (2004). Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. Food Chemistry **88** 517-525.

- MOONEY, J. S., FOX, P. F., HEALY, A., LEAVER, J. (1998). Identification of the principal water-insoluble peptides in Cheddar cheese. *International Dairy Journal* **8** 813-818.
- MORALES, P., FERNÁNDEZ GARCÍA, E., NUÑEZ, M. (2003). Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Letters in Applied Microbiology*. **37** 410-414.
- MORAND-FEHR, P., LE JAOUEN, J. C. (1977). Influence de divers facteurs alimentaires sur la composition du lait et les caractéristiques du fromage de chèvre. *Simposium sobre la Cabra en los Países Mediterráneos*. Málaga 146-155.
- MORAND-FEHR, P., LEBBIE, S .H. B. (2004). Proposals for improving the research efficiency in goats. *Small Ruminant Research* **51** 145-153.
- MORAND-FEHR, P., BOUTONNET, J.P., DEVENDRA, C., DUBEUF, J.P., HAENLEIN, G.F.W., HOLST, P., MOWLEM, L., CAPOTE, J. (2004). Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research* **51** 175-183.
- MORGAN, F., GABORIT, P. (2001). The typical flavour of goat milk products: technological aspects. *International Journal of Dairy Technology* **54** N° 1 38-40.
- MORONI, P., CUCCURU, C., BRONZO, V., ANTONINI, M., RUFFO, G. (2001). Valoración de algunos parámetros de la leche de cabra en la Región de Lombardía. *Revista ILE mayo 2001* 56-59.
- MOSKOWITZ, G. J., NOELCK, S. S. (1987). Enzyme-modified cheese technology. *Journal Dairy Science* **70** 1761-1769.

NORMA AFNOR (Bio 12/5-01/99). Recuento de *E. coli* utilizando el medio cromogénico selectivo.

NORMA FIL-IDF 110A: 1987. Calf rennet and adult bovine rennet determination of chymosin and bovine pepsin contents (Chromatographic method).

NORMA FIL-IDF 110B: 1997. Determination des teneurs en chymosine et en pepsine bovine (Methode chromatographique).

NORMA FIL-IDF 157A : 1997. Milk- Determination of total milk-clotting activity in bovine rennets.

NORMA FIL-IDF 25:1964. Determination of the protein content of processed cheese products.

NORMA FIL-IDF 4A:1982. Cheese & processed cheese. Determination of the total solids content (reference method).

NORMA FIL-IDF 157:1992. Bovine rennets. Determination of total milk-clotting activity.

NORMA ISO 3432:1975. Determinación de materia grasa en quesos. Método de Van Gulik.

NORMA ISO 3433:1975. Determinación de materia grasa en quesos. Método de Van Gulik.

NORMA UNE 34-805/1983. Determinación del número de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra.

NORMA UNE EN ISO 5508 (1996). Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Análisis por cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

NORMA UNE EN ISO 6888-1: 2000. Método horizontal para recuento de estafilococos coagulasa positiva.

NORMA UNE EN ISO 6888-2: 2000. Método horizontal para recuento de estafilococos coagulasa positiva, que utiliza el medio de plasma de conejo y fibrinógeno.

O'CONNOR, C. J., BARTON, R. H., BUTLER, P. A. G., MacKENZIE, A. D.,

MANUEL, R. D., LAI, D. T. (1996). Ruminant pregastric lipases: experimental evidence of their potential as industrial catalysts in food technology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **7** 189-205.

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.

ORDEN 14/1/88, B. O. E. 20/1/88. Norma general de identidad y pureza para el cuajo y otras enzimas coagulantes de leche destinadas al mercado interior.

ORDEN 20/2/96, B. O. E. 26/2/98. Para cuajo y enzimas coagulantes de la leche.

PARODI, W. (1971). Detection of síntesis and adulterated butterfat. Triglyceride fatty acids analysis. *Aust. J. Dairy Technol.* **26** 155-159.

PAVIA, M., GUAMIS, B., TRUJILLO, A. J., 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** 91-98.
- PAVIA, M., TRUJILLO, A. J., GUAMIS B., FERRAGUT, V. (2000). Proteolysis in Manchego-Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation. *Journal Dairy Science*. **83** 1441-1447.
- PAVIA, M., TRUJILLO, A. J., GUAMIS B., FERRAGUT, V. (2000). Ripening control of SALT-reduced Manchego-type cheese obtained by brine vacuum-impregnation. *Food Chemistry* **70** 155-162.
- PEDAUYÉ, J. (1989). Curvas de lactación y composición de la leche en cabras Murciano-Granadinas. *Anal. Vet. Murcia* **5** 3-11.
- PÉREZ, S. J., GOICOECHEA, A., ROMERO, C., FALAGÁN, A., GONZÁLEZ, C. (1991). Technological aptitude and cheese yield of goat's milk. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **13** 83-88.
- PINHAS, Z. MARGALITH (1981). Dairy products. *Flavour Microbiology*. Publisher Charles C. Thomas.
- PIREDDA, G., ADDIS, M. (2003). Utilizzo Del Caglio In Pasta Di Agnello Nella Produzione Di Formaggi Sardi Da Latte Di Pecora. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*. **54** 225-235.
- PIRISI, A., COLIN, O., LAURENT, F., SCHER, J., PARMENTIER, M. (1994). Comparison of milk composition, cheesemaking properties and textural characteristics of the cheese from two groups of goats with a high or low rate of α_{s1} -casein synthesis. *International Dairy Journal* **4** 329-345.
- POVEDA, J. M., PÉREZ-COELLO, M. S., CABEZAS, L. (1999). Evolution of the free fatty acid fraction in Manchego cheese during ripening. *Milchwissenschaft* **54** (12) 685-687.
- POVEDA, J. M., GARCÍA, A., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., CABEZAS, L. (2004). Application of partial least squares (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese. *Food Chemistry* **84** 29-33.
- POVEDA, J. M., CABEZAS, M. (2006). Free fatty acid composition of regionally-produced Spanish goat cheese and relationship with sensory characteristics. *Food Chemistry* **95** 307-311.
- PRASAD, H., SENGAR, O. P. S. (2002). Milk yield and composition of the Barbari goat breed and its crosses with Jamunapari, Beetal and Black Bengal. *Small Ruminant Research* **45** 79-83.

- R.** D. *Real Decreto 1679* de 1994 publicado en el *Boletín Oficial del Estado* del 24 de Septiembre de 1994 que regula los parámetros microbiológicos para leche cruda de vaca para elaboración de productos lácteos sin tratamiento térmico y queso de pasta blanda (a base de leche tratada térmicamente).
- R. D. *Real Decreto 402* de 1996 publicado en el *Boletín Oficial del Estado* del 8 de Abril de 1996 que regula los parámetros microbiológicos para leche cruda de vaca para elaboración de productos lácteos sin tratamiento térmico y queso de pasta blanda (a base de leche tratada térmicamente).
- RAMPILLI, M., BARZAGHI, S. (1995). Il caglio in pasta: aspetti analitici. Il latte. **Mayo** 517-521.
- REIMERDES, E. H., KLOSTERMEYER, H. (1976). Determination of Proteolytic Activities on Casein Substrates. *Methods in Enzymology*. **16** 26-28.
- RHODIA FOOD INGREDIENTS (2001).
<http://www.marschall.com/faqs/question6.htm/>
- RHOM, H., JAROS, D., ROCKENBAUER, C., RIEDLER-HELLRIGL, M., UNIACKE-LOWE, T., FOX, P. F. (1996). Comparison of ethanol and trichloroacetic acid fractionation for measurement of proteolysis in Emmental cheese. *International Dairy Journal*. **6** 1069-1077.
- ROGGA, K. J., SAMELIS, J., KAKOURI, A., KATSIARI, M. C., SAVVAIDIS, I. N., KONTOMINAS, M. G. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. *International Dairy Journal* **15** 59-67.
- ROHM, H., JAROS, D., ROCKENBAUER, C., RIEDLER-HELLRIGL, M., UNIACKE-LOWE, T., FOX, P. F. (1996). Comparison of ethanol and trichloroacetic acid fractionation for measurement of proteolysis in Emmental cheese. *International Dairy Journal* **6** 1069-1077.
- ROSENTHAL, A. J. (2001). *Textura de los alimentos. Medida y percepción*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.
- RUDOLF, M., SCHERER, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* **63** 91-98.

- S**ALDO, J., FERNANDEZ, A., SENDRA, E., BUTZ, P., TAUSCHER, B., GUAMIS, B. (2003). High pressure treatment decelerates the lipolysis in a caprine cheese. *Food Research International* **36** 1061-1068.
- SALVADORI DEL PRATO, O., MOLINARI, A., MOLINARI, P. (1993). Prove Comparative Di Produzione Di Pecorino Romano Sardo Con Caglio In Pasta Artigianale Sardo E Caglio In Pasta Industriale Calibrato. *Il Latte*. **Diciembre** 1210-1220.
- SAPUTRA, D. (1992). Analysis of enzymatic hydrolysis of milk using diffuse reflectance of near infrared radiation. Ph. D. Thesis, University of Kentucky, Kentucky.
- SARANTINOPOULOS, P., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* **76** 93-105.
- SCHWARCZ, J. (2004). <http://www.eat-halal.com/articles/chymosin.shtml>
- SCOTT, R. (1991). Fabricación de queso, Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
- SHARMA, R. B., GUPTA, M. P., OGRA, J. L. (1995). Sensory quality of chhana prepared from goat milk using different coagulants, concentrations and temperatures. *Small Ruminant Research*. **17** 187-192.
- SIEZEN, R. J., van den BERG, G. (1994). Lipases and their action on milkfat. *Bulletin of the IDF* **294** chapter 1.
- SILVA, E. R., NAKANO, T., VERDALET, I., OZIMEK, L. (2004). Glycomacropeptide-Depleted goat whey, an innovative option for baby formulas. *IDF International Symposium The future of the sheep and goat Dairy Sectors*, Zaragoza, España, 28-30 octubre.
- SKJEVDAL, T. (1979). Flavour of goat's milk: a review of studies on the sources of its variations. *Livestock Production Science* **6** 397-405.
- SOLANO-LÓPEZ, C., HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **62** 149-153.

- SORYAL, K. A., ZENG, S. S., MIN, B. R., HART, S. P. (2004). Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk Domiati cheese. *Small Ruminant Research* **52** 109-116.
- SORYAL, K., BEYENE, F. A., ZENG, S., BAH, B., TESFAI, K. (2005). Effect of goat breed and milk composition on yield, sensory quality, fatty acid concentration of soft cheese during lactation. *Small Ruminant Research* **58** 275-281.
- SOUSA, M. J., ARDÖ, Y., McSWEENEY, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* **11** 327-345.
- SOUSA, M. J., MALCATA, F. X. (1997). Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. *Z Lebensm Unters Forsch A*. **205** 97-103.
- SOUSA, M. J., MALCATA, F. X. (1997). Ripening of ovine milk cheeses: effects of plant rennet, pasteurization, and addition of starter on lipolysis. *Food Chemistry* **3** 427-432.
- SPREER, E. (1975). *Lactología Industrial*, Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
- STANDAR METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS. 14th edition (1978). Elmer H. Marth, Ph. D., Editor.
- SUNG, Y. Y., WU, T. I., WANG, P. H. (1999). Evaluation of milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. *Small Ruminant Research* **33** 17-23.
- SVENSSON, I., HERNÁNDEZ, I., VIRTO, M., De RENOBALLES, M. (2006). Determination of lipase activity in cheese using trivalerin as substrate. *International Dairy Journal*, **16** 423-430.
- SWAMINATHAN, M., DANIEL, V. A. (1970). The chemical composition and nutritive value of goat's milk and its products. *Indian J. Nutr. Diet.* **7** 252-266.
- T**AMAGNINI, L. M., De SOUSA, G. B., GONZÁLEZ, R. D., REVELLI, J.,
BUDDE, C. E. (2005). Behavior of *Yersinia enterocolitica* and *Samonella typhimurium* in Crottin goat's cheese. *International Journal of Food Microbiology* **99** 129-134.
- TAVARIA, F. K., FRANCO, I., CARBALLO, F. J., MALCATA, F. X. (2003). Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*. **13** 537-545.

- TRUJILLO, A. J., BUFFA, M., CASALS, I., FERNANDEZ, P., GUAMIS, B. (2002). Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **3** 309-319.
- TRUJILLO, A. J., CARRETERO, C., GUAMIS, B. (1994). Los coagulantes en la industria quesera. *Revista de Alimentación, Equipos y Tecnología*. **Julio/agosto** 91-97.
- TUNICK, M. H. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal Dairy Science* **83** 1892-1898.
- U**RBACH, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal* **3** 389-422.
- USTUNOL, Z., HICKS, C. L. (1990). Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. *Journal of Dairy Science* **73** 8-16.
- UUSI-RAUVA, E., SIRPA, A., ANTILA, M. (1979). Die Zusammensetzung der finnischen Ziegenmilch. *Suom. Kem. B* **43** 178-182.
- V**ACAS FERNÁNDEZ, C. (2003). Evolución del sector caprino en la Región de Murcia (1986-2000) y su caracterización productiva al final del milenio. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.
- VALIVETY, R. H., HALLING, P. J., PEILLOW, A. D., MACRAE, A. R. (1992). Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1122** 143-146.
- Van HOOYDONK, A. C. M., de KOSTER, P. G., BOERRIGTER, I. J. (1987). The renneting properties of heated milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **41** 3-18.
- VIRTO, M., CHAVARRI, F., BUSTAMANTE, M. A., BARRON, L. J. R., ARAMBURU, M., VICENTE, M. S., PEREZ-ELORTONDO, F. J., ALBISU, M., de RENOBALLES, M. (2003). Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour. *International Dairy Journal*. **13** 391-399.
- VOLIKAKIS, P., BILIADERIS, C. G., VAMVAKAS, C., ZERFIRIDIS, G. K. (2004). Effects of a commercial oat- β -glucan concentrate on the chemical, physico-chemical and sensory attributes of a low-fat white-brined cheese product. *Food Research International* **37** 83-94.

- W**ALSTRA, P. (1987). Química y Física Lactológica, Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
- WHITAKER, J. R. (1994). Principles of Enzymology for the Food Sciences, pp. Marcel Dekker, INC. New York, USA.
- WINWOOD, J. (1989). Rennet and rennet substitutes. Journal of the Society of Dairy Technology. **42** N° 1 Febrero.
www.fenil.org/datos_sector/DOPO2.pdf
- Y**ILMAZ, G., AYAR, A., AKIN, N. (2005). The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. Journal of Food Engineering **69** 269-274.
- Z**ÁRATE, V., BELDA, F., PÉREZ, C., CARDELL, E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. International Dairy Journal **7** 635-641.
- ZENG, S. S., ESCOBAR, E. N. (1995). Effect of parity and milk production on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. Small Ruminant Research **17** 269-274.
- ZENG, S. S., POPHAM, T., ESCOBAR, E. N. (1999). Seasonal variation of somatic cell count and chemical composition in bulk tank goat milk. Dairy, Food and Environmental Sanitation **Vol. 19 No. 10** 685-690.
- ZHANG, R. H., MUSTAFA, A. F., ZHAO, X. (2005). Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. Animal Feed Science and Technology, In Press, Corrected Proof, Available on line September 2005 14 pages.