

**DEPARTAMENT DE PATOLOGIA I PRODUCCIO ANIMALS
FACULTAT DE VETERINARIA
UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA**

CONGELACION DE CUAJADAS DE LECHE DE OVEJA

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTOR**

ESTHER SENDRA NADAL

Bellaterra, noviembre de 1995

MONTSERRAT MOR-MUR FRANCESC y REYES PLA SOLER, Profesoras Titulares de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN : Que la licenciada en Veterinaria Esther Sendra Nadal ha realizado bajo su dirección, en la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la U.A.B., el trabajo titulado: "Congelación de cuajadas de leche de oveja", que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente certificado en Bellaterra, a diecisiete de noviembre de mil novecientos noventa y cinco,



Montserrat Mor-Mur Francesch



Reyes Pla Soler



Facultat de Veterinària

Data 17 NOV. 1995

Entrada núm. 97

Sortida núm. 1406

INDICE DE MATERIAS

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Biblioteca General

Edifici A

08193 Bellaterra (Barcelona) Espanya

I. INTRODUCCION	1
<u>1. LA CONGELACION EN LA CONSERVACION DE ALIMENTOS</u>	1
1.1. PROCESO DE CONGELACION	2
1.2. CONGELACION CRIOGENICA	4
1.3. DESCENSO DE TEMPERATURA Y MANTENIMIENTO EN CONGELACION	5
1.4. DESCONGELACION	7
1.5. ENVASADO Y CONGELACION	7
1.6. CALIDAD DE LOS ALIMENTOS CONGELADOS	8
1.7. INTERES ECONOMICO DE LA CONGELACION	10
2. PRODUCCION DE LECHE DE OVEJA	12
2.1. DESTINO DE LA LECHE DE OVEJA	14
2.2. ESTACIONALIDAD DE LA LACTACION DE LA OVEJA	15
2.3. DESESTACIONALIZACION DE LA PRODUCCION DE QUESO DE OVEJA	16
<u>3. ELABORACION DE QUESO</u>	18
3.1. TRATAMIENTOS PREVIOS DE LA LECHE	18
3.2. COAGULACION DE LA LECHE	19
3.2.1. Coagulación ácida	20
3.2.2. Coagulación enzimática	21
3.2.3. Coagulación mixta	22
3.3. DESUERADO	23
3.4. SALADO	25
3.5. MADURADO	25
3.5.1. Glicolisis	27
3.5.2. Proteolisis	29
3.5.3. Lipolisis	31
3.5.4. Maduración acelerada	33
<u>4. DESESTACIONALIZACION EN LA PRODUCCION DE QUESO: CONGELACION DE CUAJADA Y QUESO</u>	36
4.1. CONGELACION DE CUAJADA Y QUESO	38
4.2. EFECTO EN LAS CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS Y ORGANOLEPTICAS	40
4.2.1. Efecto en la composición global	40
4.2.2. Efecto en la actividad enzimática	41
4.2.3. Efecto en la degradación proteica	41
4.2.4. Efecto en los lípidos	42
4.2.5. Efecto en el pH	43
4.2.6. Modificaciones en las características organolépticas	43
4.3. EFECTO SOBRE LA FLORA MICROBIANA DEL QUESO	45
II. OBJETIVOS	46

III. MATERIAL Y METODOS	49
<u>1. ELABORACION DE QUESO</u>	50
<u>2. ENVASADO</u>	51
<u>3. CONGELACION</u>	51
3.1. FLUCTUACIONES DE TEMPERATURA EN CONGELACION	51
<u>4. TOMA DE MUESTRAS</u>	52
<u>5. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS</u>	52
<u>6. COMPOSICION GLOBAL DE LECHE Y QUESO:</u>	
<u>ANALISIS FISICO-QUIMICO</u>	53
6.1. DETERMINACION DEL EXTRACTO SECO TOTAL	53
6.2. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CENIZAS	53
6.3. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN GRASA	53
6.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CLORUROS	53
6.5. DETERMINACION DEL pH	53
6.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA (a _w)	53
6.7. NITROGENO TOTAL Y FRACCIONES NITROGENADAS	
DE LECHE Y QUESO	54
6.7.1. Nitrógeno total	54
6.7.2. Nitrógeno soluble a pH 4,6: nitrógeno	
no caseínico (nnc)	54
6.7.3. Nitrógeno soluble en tricloroacético	
(nTCA)	54
6.7.4. Nitrógeno soluble en ácido	
fosfotúngstico (nFT)	54
<u>7. ESTUDIO DE LA FRACCION LIPIDICA</u>	55
7.1. ACIDEZ DE LA GRASA	55
7.2. ACIDOS GRASOS TOTALES, DETERMINACIÓN POR	
CROMATOGRAFIA DE GASES	55
7.3. ESTABILIDAD DE LA GRASA A LA OXIDACIÓN	
(Rancimat)	56
7.4. INDICE DEL ACIDO TIOBARBITURICO (TBA)	57
<u>8. EVOLUCION DEL PESO DURANTE LA MADURACION</u>	58
<u>9. ANALISIS DE LA TEXTURA</u>	59
<u>10. MICROESTRUCTURA</u>	60
10.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS CRISTALINAS	60
<u>11. DETERMINACION DEL COLOR</u>	61
<u>12. ANALISIS SENSORIAL</u>	61

13. PLANIFICACION DE LAS EXPERIENCIAS	65
13.1. PRIMERA EXPERIENCIA	65
13.2. SEGUNDA EXPERIENCIA	66
13.3. TERCERA EXPERIENCIA	67
14. ESTUDIO ESTADISTICO	68
III. RESULTADOS Y DISCUSION	69
1. RESULTADOS Y DISCUSION DE LA PRIMERA EXPERIENCIA	72
1.1. CARACTERISTICAS DE LA LECHE DE OVEJA	73
1.2. PROCESO DE CONGELACION	73
1.3. EFECTO DE LA CONGELACION EN LAS CUAJADAS	74
1.3.1. Composición global	74
1.3.2. Fracciones nitrogenadas: degradación proteica	77
1.3.3. Acidez de la grasa	79
1.3.4. Actividad del agua	80
1.4. EVOLUCION DEL PESO DURANTE LA MADURACION	82
1.5. EFECTO EN LOS QUESOS PROCEDENTES DE CUAJADAS CONGELADAS	83
1.5.1. Composición global	83
1.5.2. Fracciones nitrogenadas: degradación proteica	85
1.5.3. Acidez de la grasa	88
1.5.4. Actividad del agua	89
2. RESULTADOS Y DISCUSION DE LA SEGUNDA EXPERIENCIA	95
2.1. EFECTO DE LA CONGELACION SOBRE LOS RECUENTOS MICROBIANOS EN LAS CUAJADAS	95
2.2. EFECTO DE LA CONGELACION SOBRE LOS RECUENTOS MICROBIANOS EN LOS QUESOS	96
2.3. EFECTO DE LA CONGELACION EN LA TEXTURA DE LA CUAJADA	97
2.3.1. <i>Texture Profile Analysis (TPA)</i>	97
2.3.2. Resistencia al corte	99
2.4. EFECTO DE LA CONGELACION EN LA TEXTURA DEL QUESO	99
2.4.1. <i>Texture Profile Analysis</i>	99
2.4.2. Resistencia al corte	100
2.5. EFECTO DE LA CONGELACION EN EL COLOR DE LAS CUAJADAS	102
2.6. EFECTO DE LA CONGELACION EN EL COLOR DE LOS QUESOS	103
2.7. EFECTO DE LA CONGELACION EN LA MICROESTRUCTURA DE LAS CUAJADAS	104
2.8. MICROESTRUCTURA DE LOS QUESOS	104
2.8.1. Inclusiones cristalinas en cuajada y queso	105
2.9. EFECTO DE LA CONGELACION EN LAS CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DEL QUESO	106

3. RESULTADOS Y DISCUSION DE LA TERCERA EXPERIENCIA	108
3.1. FLUCTUACIONES DE TERMPERATURA	108
3.2. COMPOSICION GLOBAL DE LAS CUAJADAS	108
3.3. COMPOSICION GLOBAL DE LOS QUESOS	109
3.4. FRACCIONES NITROGENADAS DE LAS CUAJADAS	110
3.5. FRACCIONES NITROGENADAS DEL QUESO	111
3.6. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS TOTALES	112
3.7. LIPOLISIS EN LAS CUAJADAS Y QUESOS	113
3.8. INDICE DEL ACIDO TIOBARBITURICO TBA	114
3.9. INDUCCION A LA OXIDACION DE LA GRASA DEL QUESO (Rancimat)	115
3.10. EFECTO DE LAS FLUCTUACIONES EN EL pH DE CUAJADA Y QUESO	116
3.11. ACTIVIDAD DEL AGUA DEL QUESO	117
3.12. RECUENTOS MICROBIOLÓGICOS DE LAS CUAJADAS	118
3.13. RECUENTOS MICROBIOLÓGICOS DEL QUESO	119
3.14. INFLUENCIA DE LAS FLUCTUACIONES DE TEMPERATURA EN LOS PARAMETROS DEL TPA DEL QUESO	120
3.15. RESISTENCIA AL CORTE	120
3.16. MICROESTRUCTURA DE LA CUAJADA Y QUESO (MEB)	121
3.17. EFECTO DE LAS FLUCTUACIONES EN EL COLOR DEL QUESO ..	122
3.18. ANALISIS SENSORIAL	122
IV. CONCLUSIONES	124
V. BIBLIOGRAFIA	128

INTRODUCCION

1. LA CONGELACION EN LA CONSERVACION DE ALIMENTOS

El descubrimiento accidental de animales congelados probablemente originó la práctica de la congelación de alimentos, al decidir el hombre utilizarla para guardar los productos de la caza y acumular alimentos que serían consumidos en épocas menos favorables (congelación climática). Esta técnica, cuya sofisticación ha ido aumentando con los años, en principio sólo era factible en ciertas latitudes y durante ciertos meses del año debido a las condiciones climatológicas. Los avances que han permitido el uso industrial de la congelación son relativamente recientes. En 1834 Perkins patentó una máquina de refrigeración basada en la descompresión de vapor precomprimido. En 1861 Piper patentó un sistema para la congelación de alimentos utilizando mezclas de hielo y sal. La era del almacenamiento industrial en frío empezó en 1898, en que Stevenson experimentó con la expansión de amoníaco precomprimido como fuente de frío de los refrigeradores para congelación de pescado (Pugnale, 1992).

Los primeros alimentos que se congelaron a nivel industrial fueron carne, pescado, pollo, huevos y fruta. A partir de los años 30, tras trabajos de investigación como los de Birdseye, se desarrolló la congelación de hortalizas (Jul, 1984). Dichos trabajos supusieron una gran aportación a la congelación de alimentos, ya que establecieron que la velocidad de congelación determina la calidad final del alimento descongelado e introdujeron el concepto de "congelación rápida" (Brennan, 1980). La importancia en el mercado de los alimentos congelados ha ido en aumento e influido en los hábitos alimentarios y el sistema de vida de toda la humanidad.

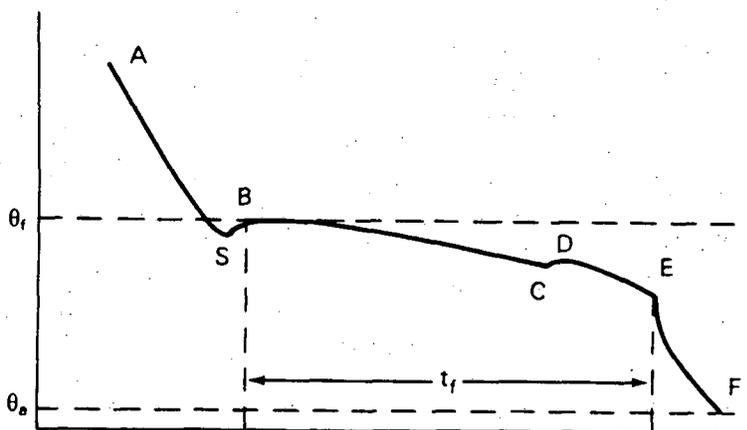
1.1. PROCESO DE CONGELACION

La congelación es la operación unitaria en que la temperatura de un alimento se reduce por debajo de su punto de congelación y una proporción del agua sufre un cambio de estado

para formar cristales de hielo (Fellows, 1988). La inmovilización del agua en forma de hielo y la concentración consecuente de los solutos lleva a la disminución de la actividad del agua. El efecto conservante de la congelación viene dado por la combinación de baja temperatura (disminución de la reactividad química y del metabolismo microbiano) y reducción de la actividad del agua. Si el proceso de congelación y mantenimiento son correctos los cambios en la calidad nutricional y sensorial son muy leves (Fellows, 1988).

El proceso de congelación es energéticamente costoso pues en la mayoría de los alimentos el agua está presente en una elevada proporción. El agua tiene un elevado calor específico (4200 J/(kg·K)) y un elevado calor latente de fusión (335 kJ/kg). Además del agua, los alimentos contienen muchos otros componentes que también deben ceder calor.

En un alimento -considerado una solución acuosa de múltiples componentes- la disminución de la temperatura durante la congelación está relacionada con la presencia de solutos según la ley de Raoult. Si se monitoriza la temperatura de un alimento en su centro térmico a lo largo del proceso de enfriamiento-congelación, se obtiene una curva característica o curva tipo de congelación (Figura 1).



En ella se diferencian 6 zonas:

- AS* la temperatura inicial desciende hasta un valor por debajo del punto de congelación, (S) denominado sobrefusión,
- SB* la temperatura asciende hasta la temperatura de formación del primer cristal de hielo estable en equilibrio con el agua que le rodea (B),
- BC* la temperatura desciende lentamente y la solución va concentrándose, hasta llegar al punto en que el primer soluto alcanza su concentración de saturación (C),
- DE* la temperatura sigue descendiendo y continúa la cristalización de agua y solutos hasta que el último soluto llega a saturarse (E); éste es el punto eutéctico del alimento,
- EF* la temperatura del alimento desciende hasta la temperatura del medio de congelación.

En la práctica industrial no se observan claramente estas etapas al verse enmascaradas unas con otras por la gran variabilidad intrínseca de los alimentos y porque con las temperaturas empleadas habitualmente en congelación no se alcanza el punto eutéctico, pues el agua fuertemente ligada no llega a congelarse (Meryman, 1966). Si se monitorizan un punto cercano a la superficie del alimento y su centro térmico, se observa que la curva de la superficie tiene una mayor pendiente.

Se denomina punto de congelación de un alimento a la temperatura a la cual aparece el primer cristal de hielo estable en equilibrio con el agua circundante (*B* en la figura). Para que se forme un cristal de hielo debe haber un núcleo, es decir que la nucleación precede a la cristalización. Hay dos tipos de nucleación: homogénea (ordenada y formada por moléculas de agua) y heterogénea (alrededor de partículas en suspensión o restos celulares), siendo ésta la que se da en la congelación de alimentos. La intensidad y duración del sobreenfriamiento dependen

de la velocidad de transferencia de calor que determina el número y tamaño de los cristales de hielo. El crecimiento de los cristales depende de la transferencia de calor y sólo pasa a depender de la transferencia de masa al final de la congelación, momento en que los solutos están más concentrados (Fellows, 1988). La concentración de solutos durante la congelación conlleva cambios en el pH, viscosidad y potencial redox del concentrado que queda sin congelar. Conforme disminuye la temperatura, los solutos que contiene el alimento pueden alcanzar su punto de saturación y cristalizar de forma individual.

Las propiedades térmicas de los alimentos (punto medio de congelación, calor latente y calor específico) dependen de su composición y estructura, aceptándose valores aproximados (Mallett, 1993).

1.2. CONGELACION CRIOGENICA

La congelación criogénica se basa en la utilización de la absorción de calor que experimentan los fluidos criogénicos en el cambio de estado. Este cambio se produce cuando pasan a presión atmosférica al ser pulverizados sobre los alimentos. Dichos fluidos se almacenan a presión para mantener su estado líquido. Las características principales de los equipos criogénicos son: alta velocidad de congelación, escasa deshidratación del producto, bajo coste de instalación, facilidad de puesta en marcha, flexibilidad de carga y alto coste del fluido criogénico. Por otra parte, nitrógeno y dióxido de carbono son gases inertes que evitan el contacto del oxígeno con los alimentos durante el proceso de congelación, lo cual previene oxidaciones que pueden dar lugar a cambios indeseables como por ejemplo alteraciones del color (Tomlins, 1995).

1.3. DESCENSO DE TEMPERATURA Y MANTENIMIENTO EN CONGELACION

La predicción del tiempo de congelación es de gran importancia, por una parte por motivos de calidad y por otra, porque determina la capacidad de producción de un equipo concreto, y por tanto, el rendimiento del proceso (Brennan, 1980). Para definir el tiempo de congelación es necesario establecer previamente el momento de inicio y el momento en que el proceso se da por terminado. En realidad, en un mismo alimento la congelación se produce a diferentes velocidades. Siempre hay un punto en que el intercambio de calor es más lento, punto conocido como *centro térmico* y utilizado para seguir su historia térmica.

El tiempo de congelación se puede definir teniendo en cuenta diversos aspectos:

- **connotaciones de calidad:** el Instituto Internacional del Frío define como 'tiempo de congelación nominal' al transcurrido desde que la superficie del producto alcanza los 0°C hasta que el centro térmico se encuentra a 10°C por debajo del punto de congelación (Ashrae, 1990),
- **connotaciones económicas:** 'tiempo efectivo de congelación' sería el tiempo necesario para reducir la temperatura inicial del producto hasta un valor dado en el centro térmico (Anónimo, 1972).

A partir de la ecuación de Plank (1916) e introduciendo desarrollos matemáticos, se han descrito numerosos modelos para el cálculo del tiempo de congelación con los que se obtiene un tiempo estimado que difiere del real. El cálculo del tiempo teórico de congelación es complicado porque la temperatura inicial del alimento es variable, así como la forma y tamaño de las piezas individuales; a su vez el punto de congelación y la cinética de formación de cristales es distinta en las diferentes zonas de un mismo alimento; además la densidad, la conductividad térmica, el calor específico y la difusividad térmica cambian al disminuir la

temperatura (Fellows, 1988).

Hori (1982) propuso calcular el tiempo real de congelación determinando la velocidad del frente de congelación (*ice front velocity*, IFV) mediante la monitorización del proceso con la colocación de sondas termopares en el interior del producto y conociendo sus dimensiones reales.

En caso de estar presente, el envase ejerce un papel importante por ser una resistencia añadida a la transferencia de calor, siendo mayor si existe una cámara gaseosa entre el envase y el producto. Por ello, Mallett (1993) argumentó que para alimentos envasados la congelación es más rápida en congelador de placas que por aspersion con líquido criogénico.

La temperatura final de congelación afecta la calidad final del producto, sin embargo, no es conveniente congelar a temperatura inferior a la de mantenimiento puesto que posteriormente aumentará hasta igualarse con ella con la consiguiente recrystalización del hielo (Jul, 1984). Dado que la velocidad de congelación varía en los diferentes puntos del producto, al congelar es poco efectivo esperar a que el centro térmico llegue a la temperatura final de congelación, pues conlleva un gasto excesivo de energía. Con el mantenimiento todos los puntos alcanzarán la misma temperatura, por lo tanto, si la temperatura de la parte externa es suficientemente baja, en la práctica ya se podría pasar al almacenamiento (sin esperar al descenso total de la temperatura del centro térmico) (Jul, 1984).

La historia térmica del proceso y mantenimiento en congelación deben registrarse y estar a disposición de las autoridades sanitarias para garantizar la adecuada conservación de los alimentos. Este registro es obligatorio para los alimentos ultracongelados destinados

directamente al consumidor final, debiéndose guardar los registros al menos durante un año (DOCE, 1992).

1.4. DESCONGELACION

La descongelación no es el proceso inverso de la congelación ya que el agua y el hielo tienen diferentes propiedades térmicas. El agua tiene mayor calor específico y menor conductividad térmica que el hielo y por lo tanto peor difusividad térmica. Durante la descongelación, el agua ejerce de aislante en las capas externas del producto.

Una vez extraída el agua de su posición original, no vuelve exactamente al mismo lugar que ocupaba. La aptitud de un alimento a ser congelado puede valorarse por el grado en que los cambios que ocurran durante la congelación reviertan en la descongelación (Jul, 1984). Interesa que tras la descongelación se obtenga un producto lo más semejante posible al producto fresco de partida. En general se aconseja descongelar los alimentos a temperatura ligeramente por encima de su punto de congelación para preservar al máximo la calidad del alimento (Fellows, 1988).

1.5. ENVASADO Y CONGELACION

La disminución de la actividad del agua (a_w) y de la temperatura en la congelación inhiben el metabolismo microbiano y enlentece un gran número de reacciones químicas. En cambio, las reacciones de oxidación pueden darse en alimentos de baja a_w . Por ello, para alimentos ricos en grasa que deban mantenerse en congelación durante períodos prolongados de tiempo es recomendable envasar en ausencia de oxígeno.

Por otra parte, el coste de las pérdidas de peso por deshidratación puede superar al coste

del proceso de congelación, sin embargo, con un envase adecuado (envase barrera) estas pérdidas suponen prácticamente un 0%, mientras que en un envase de cartón que no esté suficientemente lleno la deshidratación puede ser importante (superior al 2%) (Mallett, 1993).

De entre los criterios para la elección del material de envase cabe considerar la posibilidad de mecanización del proceso, la resistencia a la manipulación, la posibilidad de impresión con tinta, la adecuación al producto y al tratamiento a que vaya a ser sometido y el impacto ambiental.

1.6. CALIDAD DE LOS ALIMENTOS CONGELADOS

A menor temperatura de conservación, menor velocidad de las reacciones de deterioro y por tanto, mejor mantenimiento de la calidad. Esta afirmación no es cierta para todos los alimentos y en realidad depende de la relación PPP (*Product-Process-Packaging*), es decir, la calidad del alimento congelado depende de la calidad del alimento crudo, del método de procesado y del envase.

Otro factor importante que define las condiciones de mantenimiento de un alimento en congelación es la relación TTT (*Time-Temperature-Tolerance*). Esto indica que cada alimento tiene para una temperatura dada un tiempo límite de mantenimiento, rebasado el cual los cambios en la calidad son apreciables. Es importante destacar que los cambios habidos en el almacenaje y distribución de los alimentos congelados son acumulables e irreversibles (Mallett, 1993). En cambio, no se puede considerar que la congelación siempre disminuya la calidad del producto (Löndahl, 1993). Las principales alteraciones se producen en el almacenamiento en congelación más que en el propio proceso de congelación (Jul, 1984). Excepto para los alimentos cuya textura se afecte gravemente por la congelación, no es fácil diferenciar un

alimento fresco de otro congelado e inmediatamente descongelado. Se ha visto que no siempre es mejor una velocidad de congelación rápida (inmersión en fluidos criogénicos) pues en algunos alimentos provoca resquebrajamientos ya que la parte externa actúa de caparazón y no soporta la expansión del interior. Estas roturas se producen siempre, si bien no conducen necesariamente a rotura aparente y además facilitan las pérdidas por deshidratación (Lorentzen y Roesvik, 1959).

Las alteraciones más comunes en el mantenimiento en congelación son la recrystalización (los cristales grandes aumentan su tamaño y los pequeños tienden a desaparecer); la migración de agua a la superficie y la cristalización de solutos y cambio de pH. Otros fenómenos que pueden darse son: insolubilización de proteínas, alteraciones en la actividad enzimática, oxidación de lípidos, agregación de polímeros y oxidación o hidrólisis de pigmentos (Mallett, 1993).

Durante el almacenamiento en congelación puede haber fluctuaciones de temperatura. Es poco habitual encontrar recrystalización a temperatura inferior a -12°C (Strachan, 1983 y Jul, 1984). Fennema y col. (1973) y Bevilacqua y Zaritzky (1980), sólo encontraron crecimiento de cristales a temperaturas superiores a -10°C . Según Ulrich (1981), los almacenes de congelados tienen pocas fluctuaciones ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), que no producen un gran efecto en la calidad. No ocurre lo mismo en los puntos de venta o instalaciones no industriales donde las oscilaciones de temperatura son mucho mayores.

La descongelación es, en potencia, una fuente de alteraciones de mayor importancia que el propio proceso de congelación (Fennema, 1975), aunque no está siempre claro si las alteraciones y el daño celular se producen durante la congelación o la descongelación (Mallett,

1993). Durante la descongelación, los fenómenos de recristalización (en una descongelación muy lenta) y la pérdida de exudado (en descongelación forzada, especialmente en alimentos con estructura tisular, en los que el agua no puede ser reabsorbida por la estructura) pueden dar lugar a una considerable pérdida de la calidad del alimento.

Expuestas las alteraciones más importantes que pueden darse en el proceso de congelación, mantenimiento y descongelación, se concluye que las principales variaciones se van a reflejar en la textura y en pérdidas por deshidratación (Hori, 1982), lo que se constata mediante análisis sensorial y medidas objetivas de los cambios texturales.

1.7. INTERES ECONOMICO DE LA CONGELACION

La congelación es un proceso de elevado coste económico pero que, por el contrario, permite mantener la calidad de los alimentos a un precio adecuado, con independencia de la época del año, geografía, etc. (Löndahl, 1993); conlleva una gran inversión y tiene un impacto considerable en el precio del producto final. Mallett (1993) calculaba que este impacto representaba algo más del 2% del coste del producto final para productos que se congelan, distribuyen y mantienen en congelación en los puntos de venta. En el caso del queso no es necesaria la distribución en congelación ni en los puntos de venta, con lo que la repercusión en el producto final es menor. Por otra parte, es de esperar que permita mantener este tipo de queso en el mercado en las épocas de menor producción.

Los materiales de envasado y embalaje suponen un aumento del coste, pero a su vez constituyen una buena barrera para el vapor de agua evitando las pérdidas de peso por deshidratación. En los alimentos que van a llegar congelados al consumidor final, el envase es determinante en la presentación, personalización e imagen del producto.

El almacenamiento es siempre más caro que el proceso de congelación. Optimizar el mantenimiento de los equipos disminuye los costes de energía. Se ha discutido con mucha frecuencia la disminución de costes energéticos en el almacenamiento de productos congelados con el aumento de la temperatura durante dicho periodo. Sin embargo, la temperatura ha demostrado ser esencial no sólo en el almacenamiento de materias primas para su posterior procesado, sino también en productos destinados al consumidor final. Un aumento de la temperatura de almacenamiento pondrá, sin duda, en peligro la calidad de un gran número de alimentos congelados limitando su tiempo de vida (Löndahl, 1992).

2. PRODUCCION DE LECHE DE OVEJA

Las principales especies de ordeño por orden decreciente de volumen de producción son: vaca, búfala, cabra y oveja. La explotación del ganado ovino y la elaboración de queso son actividades agrarias antiguas, mayoritariamente localizadas en los países mediterráneos, poco favorables a la producción de leche de vaca. En la Tabla 1 se exponen los censos de ovino en la Unión Europea (Eurostat, 1994) y la producción de leche (FAO, 1993).

Según Treacher (1989), las estadísticas subestiman la producción de leche de oveja, especialmente en países en desarrollo debido al gran número de explotaciones familiares, cuyas producciones no entran nunca en la cadena de comercialización y no se contabilizan. A nivel mundial se ordeñan del orden de 250 millones de ovejas, cuya producción representa aproximadamente un 2% del total de leche.

Tras la adhesión de España y Portugal, la Unión Europea (UE) se convirtió en el mayor productor mundial de carne de ovino y caprino, así como en el principal importador de estos tipos de carne. A su vez, produce del 21 al 22% del total de leche de oveja, centrada mayoritariamente, y por orden, en: Grecia, Italia, España, Francia y Portugal (Buxadé, 1993). Actualmente la UE concede primas al mantenimiento de ovejas de carne y leche en zonas desfavorecidas (DOCE, 1995)

Tabla 1. Censos de ovino (miles de cabezas) y producción de leche de oveja (1000 MT) en la Unión Europea

	ovino	ovejas	producción de leche
Total UE	98.619	71.239	2.566 (Europa)
Mundial	-	-	7.766
Alemania	2.386	1.691	-
Bélgica	129	110	-
Dinamarca	102	95	-
Grecia	10.108	6.723	620
España	24.575	18.304	275
Francia	10380	7.734	206
Irlanda	6.125	4.806	-
Italia	10.403	7.618	650
Luxemburgo	7	4	-
Holanda	1.580	1.190	-
Portugal	3.348	2.253	90
Reino Unido	29.477	20.647	-

El subsector ovino de leche en España tiene una producción que ronda las 250.000 t/año lo que supone de un 3 a 3,5% de la producción total de leche. La leche de oveja procede de tres orígenes: rebaños especializados, rebaños de doble aptitud (leche-carne) y ordeño de razas no lecheras en épocas favorables. Los dos últimos son los principales responsables de las fluctuaciones en la producción de leche de oveja.

La cabaña ovina española experimentó un descenso hasta 1979, año en que tocó fondo e inició su recuperación, motivada por las esperanzas puestas por el sector ante la entrada de España en la UE y por el apoyo de la Administración al cebo de corderos y reproducción de razas autóctonas en zonas desfavorecidas (Buxadé, 1988).

La producción de la leche de oveja en España es claramente regional, cinco comunidades autónomas: Castilla-León, Castilla-La Mancha, Madrid, Euskadi y Navarra, centran el 95% de la producción (Montoro y Angulo, 1991).

La industrialización y el aumento de calidad de vida han hecho aumentar la demanda de productos derivados de leche de oveja, cuya evolución futura dependerá de su capacidad para competir con los derivados de leche de vaca. El consumo de queso en los estados de la UE es muy heterogéneo. En algunos de ellos no se ha llegado al nivel de saturación, países donde los productores de queso de oveja tienen un mayor mercado y han de competir con otros tipos ofreciendo calidad. Si bien el mercado potencial es grande, el sector debe superar la mala fama de los quesos frescos de oveja, por asociación con riesgo de brucelosis, por la carencia de calidad, homogeneidad, presentación y relación calidad/precio adecuadas.

Por otra parte el hecho que a corto-medio plazo no se prevea ningún tipo de limitación a la producción de leche de oveja y sus productos en el marco de la UE, supone una gran ventaja para el sector (Buxadé, 1993).

Sería necesaria una reestructuración del sector teniendo como objetivos la calidad, tipificación y homogeneidad de las producciones. En cuanto a la producción de leche se ha empezado por la mejora genética de nuestras razas, alimentación y manejo, para continuar con especial cuidado de la obtención y conservación de la leche y controlar así su composición y carga microbiana.

2.1. DESTINO DE LA LECHE DE OVEJA

De una producción total de 305.5 millones de litros de leche de oveja, los destinos

posibles son (MAPA, 1992):

- leche para el consumo directo humano 0.7 millones de litros,
- fabricación de queso en la explotación 39.6 millones de litros,
- fabricación de queso en la industria 265.2 millones de litros.

La leche de oveja es poco apreciada para su consumo directo pero en cambio resulta muy rentable para la elaboración de queso. El destino industrial de la leche va en aumento debido a la problemática que presenta la elaboración de queso en la propia explotación. En conjunto, los principales problemas con los que se encuentra la producción artesanal son: deficiente estructura productiva, estacionalidad de la producción de leche, falta de homogeneidad del producto obtenido, problemas sanitarios derivados de la utilización de leche cruda y deficiente estructura comercial (Calahorra y Rouco, 1994a).

El sector transformador podría clasificarse en quesería artesanal e industria quesera. La primera asociada a mano de obra familiar, con problemas para crear su propio mercado por dificultades en mantener la homogeneidad y continuidad en su producción. La segunda necesitada de equilibrar su dimensión y tecnificación con su producción para que sea rentable. Muchas de las industrias queseras en España son de un tamaño tan reducido que verán peligrar su continuidad a corto-medio plazo (Montoro y Angulo, 1991).

El 97% de la leche de oveja se destina a la producción de queso, correspondiendo un 15% a la producción artesanal y un 85% a la industrial. En su mayor parte la industria la utiliza como aromatizante en la elaboración de quesos de mezcla, dando lugar a quesos de gran consumo de categoría comercial relativamente baja o quesos con una alta heterogeneidad. Según datos del MAPA en 1992 España importó 55.244 t de queso, junto con la producción propia

queso que según datos estimativos de Buxadé (1993) se repartió como sigue:

- 110.000 t queso de vaca y mezclas,
- 40.000 t queso de oveja y mezcla oveja-cabra,
- 25.000 t queso de cabra.

2.2. ESTACIONALIDAD DE LA LACTACION DE LA OVEJA

Las razas ovinas españolas presentan una acusada estacionalidad pese a poder considerarse poliéstricas continuas. Esto es debido al carácter cíclico de la disponibilidad de los alimentos (importante en las explotaciones de ovino que están muy ligadas al medio); a las condiciones climáticas que afectan al mantenimiento de la leche hasta su recogida y a factores económicos, especialmente la cotización del cordero lechal (Rouco y col., 1994a). Con la intensificación de las explotaciones estas fluctuaciones tienden a suavizarse, pero no es previsible que desaparezcan dada la deficiente estructura productiva con que se cuenta.

El mercado de la leche de oveja es un mercado no intervenido, condicionado por la demanda de la industria quesera, con importantes fluctuaciones de precios que no es previsible que desaparezcan. Estas fluctuaciones se deben a que la industria está dispuesta a pagar mejor la leche recogida en temporada fría por su mayor calidad higiénica y máximos índice quesero y contenido en materia grasa.

2.3. DESESTACIONALIZACION DE LA PRODUCCION DE QUESO DE OVEJA

La industria quesera, y en especial la de queso de oveja, se caracteriza por su bajo nivel de aprovechamiento de las instalaciones, reducida dimensión, dispersión y atomización. Es un sector de gran importancia socio-económica por estar muy localizado en las zonas de producción y con predominio de empresas de tipo familiar. Según Montoro y Angulo (1991), en 1988, de

las más de 400 queserías tan sólo 50 procesaron más de 100 Tm. Debido a la estacionalidad en la producción de leche estas industrias no utilizan plenamente su capacidad productiva, quedando infrautilizadas incluso en un 80% con los consiguientes problemas de rentabilidad. En cambio, las grandes industrias tienden a la elaboración de quesos de mezcla para así mantener la homogeneidad y constancia de su producción.

Para vencer la estacionalidad se han probado diversos métodos actuando sobre la leche (p. e.: concentración, ultrafiltración, congelación) y sobre las cuajadas. La congelación es el único método a gran escala que permite desestacionalizar y suplir las variaciones oferta-demanda de alimentos crudos. Además, posibilita el movimiento de grandes cantidades de alimentos a grandes distancias (Mallett, 1993). Swartling (1968) y Dalles y col. (1984) apuntaron que la congelación era un buen método para suplir las fluctuaciones estacionales en la producción de queso.

El consumo estimado de queso de todo tipo en España es de 8.15 kg por habitante y año, distante de los 13 kg de media comunitaria (FIL, 1995). Esto hace prever un aumento en el consumo de queso en nuestro país. Para que este aumento incida en el consumo de queso de leche de oveja de nuestra cabaña y no en la importación de leche o queso, hay que solucionar los ya mencionados problemas del sector. Estos son algunos de los objetivos que se pretenden conseguir con los quesos con Denominación de Origen aparte de mantener un producto ligado a la cultura del país y de importancia socio-económica en sus zonas de producción.

3. ELABORACION DE QUESO

El queso se define, tecnológicamente, como una matriz continua e hidratada de caseína, que contiene gotas discretas de grasa (Green, 1984). Las distintas variedades difieren en las cantidades de agua, grasa, sales y ácidos asociados a la caseína, microestructura y grado de maduración. Varios procesos intervienen en la transformación de la leche en queso, básicamente el tratamiento de la leche, la coagulación, el desuerado, el salado y la maduración.

3.1. TRATAMIENTOS PREVIOS DE LA LECHE

La composición química de la leche y su calidad bacteriológica condicionan la cantidad y calidad de queso fabricado, los procesos de preparación también influyen en el producto final. Tras el ordeño, la leche se filtra, refrigera y almacena en refrigeración hasta su recogida por las industrias lácteas. Con estos tratamientos se pretende reducir la velocidad de crecimiento de los microorganismos y evitar con ello las modificaciones físico-químicas y microbiológicas que provocan.

A continuación puede tener lugar la estandarización de la leche, ajustando la relación grasa/proteína por eliminación o adición de grasa, por adición de leche en polvo, caseínas, proteínas del lactosuero o por ultrafiltración (Tingely y Perdonet, 1985). Con ello se pretende homogeneizar la calidad de la producción, corrigiendo las fluctuaciones en la composición de la leche. Esta práctica es frecuente en las industrias que trabajan con grandes volúmenes de leche, pero casi inexistente en las elaboraciones artesanales.

La leche contiene materiales extraños en suspensión que deben ser eliminados, proceso que puede realizarse por filtración grosera en papel o en mallas de nylon, con separación de la

suciedad macroscópica; por centrifugación, con la que se eliminan también leucocitos y algunas bacterias y se disgregan agrupaciones bacterianas; por centrifugación a alta velocidad - "bactofugación"- se eliminan células bacterianas, al igual que por microfiltración mediante membranas de alta resolución. Sólo la filtración es habitual en las producciones artesanales (Tamime, 1986 y Chapman y Sharpe, 1987).

Algunos quesos se elaboran con leche cruda, otros muchos son elaborados con leche tratada térmicamente: combinaciones tiempo/temperatura que van desde la termización (generalmente por debajo de 70°C con objeto de eliminar flora sicrotrofa sin conseguir inactivar la fosfatasa alcalina, por tanto no equivale a la pasteurización a efectos legales); a la propia pasteurización muy generalizada en los quesos industriales y menos en los artesanos; con ella se pretende la eliminación de la flora patógena o causante de problemas, intentando la mínima alteración de las características de la leche y la obtención de buenos rendimientos queseros. Los mejores resultados se obtienen con la aplicación de los tratamientos de alta temperatura-corto tiempo (HTST) (Scott, 1986 y Tamime, 1986).

3.2. COAGULACION DE LA LECHE

La caseína gelifica dando lugar a un coágulo liso y uniforme, una red tridimensional en la que quedan atrapados los glóbulos grasos y la fase acuosa. La caseína es una proteína compleja formada por 4 polipéptidos: α_{s1} , α_{s2} , β y κ agrupados en las denominadas micelas de caseína. La unión entre estas subunidades proteicas viene dada por interacciones iónicas de grupos ácidos, principalmente fosfato y citrato, también glutamato y aspartato e iones calcio.

Dentro del equilibrio físico de la leche la caseína se encuentra en dispersión coloidal, por efecto de la κ -caseína, una glicoproteína que presenta una parte hidrófila. Las caseínas son

proteínas ácidas con carga negativa al pH de la leche debido a los grupos fosfato esterificados con restos de serina y otros aminoácidos ácidos. La carga negativa de las micelas al pH de la leche provoca la existencia de fuerzas electrostáticas de repulsión que aseguran la estabilidad del sistema coloidal.

La coagulación de la leche durante la fabricación de queso puede obtenerse por varios mecanismos, clasificándose en ácida, enzimática y combinación de ambas.

3.2.1. Coagulación ácida

Generalmente, la acidificación progresiva de la leche se obtiene por fermentación de la lactosa a ácido láctico llevada a cabo por microorganismos, frecuentemente bacterias lácticas homofermentativas (presentes en la leche o añadidas), dando lugar a la formación de un coágulo liso y homogéneo que ocupa el volumen inicial de la leche.

Dicha disminución del pH de la leche produce reducción de la carga de las caseínas y de su capa de hidratación y por lo tanto de las fuerzas de repulsión. Esto conduce a la coagulación por interacciones hidrofóbicas, disminuyendo a la vez el poder secuestrante de las caseínas con el consiguiente aumento de la solubilidad de las sales cálcicas (Brulé y Lenoir, 1987 y Bringe y Kinsella, 1990). La tendencia de las micelas a la coagulación es máxima a pH 4,6 e inexistente a pH 5,1 o inferior a 3,9 (Bringe y Kinsella, 1990). Como consecuencia, se produce una importante desorganización de las micelas y la modificación de la estructura cuaternaria de las caseínas. La magnitud de la separación de una fase acuosa con las sales minerales dependerá de la velocidad de acidificación (Brulé y Lenoir, 1987).

Los nudos de la malla proteica están formados por submicelas de caseína unidas por

enlaces de naturaleza electrostática e hidrofóbica lo que explica la gran fragilidad del coágulo láctico (Brulé y Lenoir, 1987). Dicha textura es, también, función del tipo de ácido láctico producido (D, L, o ambos) según las bacterias implicadas en el proceso (de Roissart, 1986 y Tamime, 1986). Acostumbra a ser un proceso lento (a partir de 5 horas) dependiendo de la cantidad de inóculo bacteriano empleado (Shaw, 1986).

3.2.2. Coagulación enzimática

Existen diversos enzimas proteolíticos, de origen animal, vegetal o microbiano, que provocan la coagulación de la leche (Berankova y col., 1987). A nivel industrial el más empleado de ellos es el cuajo animal o renina, extracto obtenido del abomaso de los rumiantes lactantes formado por la mezcla de dos enzimas, quimosina y pepsina. Por este mecanismo, la coagulación se produce en dos fases:

- **fase primaria o enzimática**, en la que el cuajo hidroliza la κ -caseína en un punto específico de rotura (Phe105-Met106), dando lugar a un péptido libre (caseinomacropéptido) que contiene todos los restos glucídicos de la molécula inicial y a un segmento que se mantiene unido a la micela (para- κ -caseína) de características distintas a la fracción κ inicial, con pérdida de la capacidad estabilizante (Green, 1984),
- **fase secundaria o de coagulación**, en la que se forma un gel por agregación de las micelas caseínicas modificadas (Green, 1984 y Brulé y Lenoir, 1987). El mecanismo interno de esta fase secundaria es muy poco conocido (Carlson y col., 1987).

La acción del cuajo depende de varios factores cuyas variaciones llegan a impedir la fuera de ciertos límites. El tiempo de coagulación disminuye al aumentar la concentración de cuajo. Por debajo de 10°C no se produce coagulación (aunque sí es posible la hidrólisis de la κ -caseína) y por encima de 65°C tampoco por inactivación del enzima; la mayor velocidad se

produce a 40-42°C, siendo la influencia de la temperatura mucho más importante sobre la fase de agregación que sobre la de hidrólisis. Al descender el pH respecto al propio de la leche disminuye el tiempo de coagulación, siendo el pH óptimo del enzima 5,5; por encima de pH 7 el enzima es inactivado rápidamente y no se produce la coagulación (Brulé y Lenoir, 1987).

Las características reológicas del gel también dependen de las variables de coagulación. A medida que aumenta la temperatura y disminuye el pH por debajo del normal de la leche aumenta la dureza del gel (Green, 1984 y Scott, 1986).

3.2.3. Coagulación mixta

Se produce por acción conjunta de la acidificación microbiana y la hidrólisis enzimática. Habitualmente se utilizan concentraciones elevadas de cultivos iniciadores de las mismas características que en la coagulación ácida y bajas concentraciones de cuajo, a temperatura inferior a la óptima del crecimiento microbiano y muy por debajo de la óptima de actuación del enzima (20-25°C).

El tiempo global de coagulación por esta vía acostumbra a ser largo y muy variable (más de 8 horas) según el queso, prácticamente no se produce desuerado y el producto obtenido, quesos de pasta blanda, tiene unas características reológicas intermedias respecto a las de los sistemas anteriores.

3.3. DESUERADO

Se realiza durante los procesos de cortado, moldeado y prensado de la cuajada y llega a su fin con el salado. Es un fenómeno complejo por el cual se obtiene, a partir del coágulo, la cuajada y el lactosuero. Se considera que se dan dos procesos sucesivos: la "sinéresis" o

concentración del coágulo y la separación del lactosuero que es expulsado al exterior (Weber, 1987). El mecanismo de desuerado varía en función de la coagulación previa, de los tratamientos a que se someta la leche y de los que se apliquen al coágulo. Del grado de contracción depende en gran medida la cantidad de agua retenida y sustancias en solución (Scott, 1986).

El desuerado se ve afectado por:

- **composición y tratamiento de la leche:** elevado contenido de caseínas y grasa, y su grado de dispersión enlentecen el desuerado. Un alto contenido en proteínas solubles desnaturalizadas por calor disminuye la aptitud a la sinéresis. El uso de leche mamílica da lugar a un coágulo débil por tener un pH elevado, mayor concentración de iones sodio y cloruro, más proteínas solubles, menos calcio y fósforo iónicos y caseína (Lenoir y Schneid, 1987). Si la leche ha sido refrigerada se enlentece la coagulación y da lugar a cuajadas más débiles por aumento de la solubilidad del calcio, fosfatos y β -caseína;

- **tipo de coágulo:**

enzimático: la sinéresis de las cuajadas enzimáticas puede considerarse como el resultado de una interacción proteína-proteína, posibilitada por la acción del enzima y la deshidratación progresiva de la micela (Green, 1987). Las primeras interacciones son por puentes de hidrógeno y en etapas avanzadas de la sinéresis por puentes disulfuro (Weber, 1984);

ácido: Weber (1987) considera que destruida la estructura micelar, el desuerado se produce por escurrido a través de una masa porosa, dando lugar a una cuajada con gran cantidad de agua retenida;

mixto: influyen la acción enzimática y la acidificación, depende pues del

porcentaje de cada tipo de coagulación.

Es necesario favorecer el desuerado de los quesos, excepto en los de pasta blanda, para obtener la textura adecuada. Esto puede lograrse sometiendo la cuajada a diversos tratamientos:

- **calentamiento:** aumenta el desuerado al facilitar la acción del enzima coagulante, acelerar la formación de enlaces y activar la fermentación láctica (Weber, 1987). A mayor temperatura (de 30 a 55°C), mayor velocidad de desuerado, firmeza y consistencia. La temperatura a aplicar dependerá de la firmeza buscada y de la termofilia del cultivo empleado;
- **corte:** al fraccionar el coágulo aumenta la superficie de expulsión de suero. El tamaño de grano va desde unos 3 mm para la obtención de quesos duros, hasta el corte débil - consistente en la transferencia de la cuba a los moldes- para quesos de pasta blanda (Scott, 1986). En las cuajadas enzimáticas, la mayor parte de las bacterias de los fermentos queda retenida en la cuajada tras el corte. A mayor actividad de aquellas, antes aparece el ácido láctico, favoreciendo la disolución del fosfato cálcico, contrayendo así la cuajada y facilitando la eliminación del suero (Chapman y Sharpe, 1987);
- **agitación:** necesaria cuando hay tendencia a la sedimentación y repolimerización;
- **moldeado y prensado:** el formato, la intensidad y el tiempo varían con la variedad de queso.

3.4. SALADO

A todos los quesos se les adiciona cloruro sódico: frotando sal seca en superficie, por inmersión en salmuera o incorporando sal a la leche o a la cuajada una vez cortada. En todos los casos la sal se disuelve en la fase acuosa del queso formando una salmuera que difunde por

la masa lográndose una distribución final bastante uniforme y una concentración dependiente de la cantidad añadida que oscila entre 0,25 y 15% según la variedad elaborada (Guinee y Fox, 1987).

El salado tiene diversas funciones:

- ayuda al desuerado y cortezado (Hardy, 1987);
- da sabor y lo potencia (Chapman y Sharpe, 1987 y Hardy, 1987);
- modifica las características físico-químicas (Tamime, 1986);
- actúa sobre la flora microbiana y su actividad enzimática (directamente o por reducción de la actividad del agua), controlando, por tanto, la maduración (Chapman y Sharpe, 1987 y Hardy, 1987);
- controla la producción de ácido -por inhibición de bacterias lácticas- manteniendo el pH de la cuajada después de añadida la sal (Guinee y Fox, 1987).

3.5. MADURADO

Los quesos son química, microbiológica y enzimáticamente sistemas dinámicos, de modo que su proceso de maduración es altamente complejo (Khalid y Marth, 1990). Este es el proceso final en la elaboración del queso durante el cual se producen numerosas transformaciones bioquímicas de los constituyentes de la cuajada por acción de los enzimas. Su duración es variable, desde algunas semanas hasta varios meses. Como resultado, la cuajada se transforma en un queso de características inherentes a cada variedad.

Los fenómenos involucrados en la maduración han sido muy estudiados, principalmente en los quesos de leche de vaca, pero es de esperar que la mayor parte de los fenómenos conocidos sean muy similares en los quesos de diversos orígenes, por la similitud de la flora

microbiana implicada, fuente de los enzimas degradativos. Según Fernández-García y col. (1990) las caseínas de leche de oveja sufren una menor degradación que las de leche de vaca durante la maduración.

Las reacciones que rigen la maduración son debidas a tres tipos de enzimas:

- enzimas endógenos de la leche, proteasas alcalina y ácida y lipasas,
- enzimas del cuajo, es decir enzimas proteolíticos,
- enzimas provenientes de la flora microbiana,

y los sustratos que intervienen en todo este proceso son los nutrientes presentes en la cuajada: hidratos de carbono, proteínas y lípidos.

Además la maduración está supeditada a múltiples factores, algunos inherentes a la composición química de la cuajada, determinada por la leche utilizada; el tipo de coagulación (enzima coagulante en su caso); la flora láctica ya sea natural o añadida en forma de cultivos iniciadores; el contenido en agua y la a_w , determinados por el desuerado y el salado; el pH, cuyo valor, condicionado por la fermentación de la lactosa disminuye al principio y sube al final por la acción de productos alcalinos procedentes de la peptidolisis. Como factores externos destacan la temperatura, que condiciona la velocidad de todas las reacciones, y la humedad, responsable de la evolución del contenido en agua y la a_w en el queso.

3.5.1. Glicolisis

La lactosa, hidrato de carbono mayoritario de la leche, es degradada por las bacterias ácido-lácticas siguiendo las vías propias de cada grupo dando lugar a diferentes productos, mayoritariamente ácido láctico. El empleo de fermentos de composición conocida pretende dirigir el tipo de fermentación, sin embargo también se incluyen otras bacterias lácticas no

iniciadoras para favorecer el gusto y el aroma principalmente, siendo en ocasiones difícil controlar la presencia de otros microorganismos que causan fermentaciones indeseadas de la lactosa por distintas vías.

La velocidad de degradación de la lactosa está relacionada inversamente con la humedad de la cuajada (Chapman y Sharpe, 1987) y directamente con la coagulación ácida y mixta. El 98% de la lactosa de la leche se elimina con el suero como lactosa o ácido láctico; el resto se metaboliza en las primeras etapas de la maduración (Fox y col., 1990).

El descenso de pH provocado por la fermentación de la lactosa afecta la sinéresis, la cantidad de cuajo retenida, su actividad y el crecimiento de microorganismos. Este descenso no es descontrolado sino limitado por la capacidad tamponante de la cuajada -debida principalmente a las caseínas y en parte a la presencia de citrato y fosfato inorgánico soluble- e influido por el tipo de coagulación, la flora microbiana y la leche de partida (Fox y col., 1990). La acidez desarrollada bloquea la posterior multiplicación de las bacterias lácticas. La producción de ácido láctico se mantiene en la fase logarítmica (Choisy, 1987) de modo que a lo largo de la maduración se observa una sucesión de la flora microbiana en los grupos implicados en función del pH. Sin embargo, la presencia de levaduras en el interior del queso lleva a un aumento del pH por consumo de ácido láctico que permite de nuevo el desarrollo de bacterias ácido-sensibles previamente inhibidas (Choisy y col., 1987b).

Los cultivos homofermentadores dan lugar a ácido láctico y trazas de otros compuestos carbonílicos. Los heterofermentadores son además productores de CO₂ siendo los más ampliamente utilizados *Leuconostoc* spp. y algunas especies de *Lactobacillus*.

Otras vías de degradación de la lactosa son: fermentación propiónica llevada a cabo por *Propionibacterium* spp.; fermentación butírica por numerosas especies de *Clostridium*; fermentación ácida mixta y fermentación butanodiólica por bacterias coliformes. En cada caso se liberan al medio diversos ácidos característicos y CO₂. También el piruvato es utilizado por diversos grupos bacterianos: a través del ciclo de Krebs es oxidado por micrococcos, corineformes, hongos miceliares y levaduras, obteniéndose CO₂ y H₂O. Todo ello tiene importancia por los niveles de gas aparecidos pues mientras en algunos casos resulta interesante (p.e. fermentación propiónica del Gruyère), en muchos otros es causa de graves defectos (Choisy y col., 1987a,b).

Los grupos microbianos que degradan citrato a diacetilo son importantes por su aportación al aroma de los quesos. *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* y *Leuconostoc* spp., que son especies de nuestro interés, metabolizan el citrato, producen diacetilo y CO₂; algunas especies de lactobacilos mesófilos dan lugar a diacetilo y fórmico (Fox y col., 1990). Asimismo, el diacetilo es inhibidor de bacterias patógenas y/o productoras de defectos, con más efectividad frente a gram negativas (Gilliland, 1985a).

3.5.2. Proteolisis

La cuajada es una matriz proteica, por tanto su degradación afectará a las propiedades organolépticas, químicas, pH y capacidad de retención de agua. Las proteasas de la leche que han sido descritas son: plasmina o proteasa alcalina y proteasa ácida. La primera da lugar a las γ -caseínas a partir de la β , mientras que la segunda actúa sobre la α_{s1} . Dan lugar a una fracción de proteínas insolubles a pH 4,6 y a pequeñas cantidades de aminoácidos y de péptidos solubles. Son importantes en los quesos de pasta prensada y afinado lento, en cambio en los de pasta blanda las proteasas microbianas ejercen un mayor efecto (Grappin y col., 1985). La retención

de las proteasas de la leche en la cuajada durante el desuerado está directamente condicionada por el pH (Lawrence y col., 1987).

La actividad proteolítica de los enzimas del cuajo continúa durante la maduración pese a quedar tan sólo cantidades residuales en la cuajada, ya que las condiciones físico-químicas del queso así lo permiten (Desmazeaud y Gripon, 1977). Estos enzimas se retienen más cuanto menor es el pH (Lawrence y col., 1987) y actúan liberando péptidos de elevado peso molecular que permanecen en la fracción insoluble a pH 4,6 junto con algunos productos de degradación en la fase soluble (Rank y col., 1985).

La actividad proteolítica de los microorganismos está condicionada por la localización de sus enzimas, intra o extra-celulares. Aunque las bacterias se lisen, no es seguro que liberen sus enzimas intracelulares, ya que depende del estado de la matriz caseínica; con todo, para los quesos de flora bacteriana se necesitan tiempos largos de maduración comparativamente a los de flora fúngica superficial (Visser, 1993). La actividad proteolítica es variable según las especies e incluso cepas microbianas.

Según Khalid y Marth (1990) las peptidasas en los lactobacilos son mayoritariamente intracelulares y en los lactococos están ligadas a la membrana. Las peptidasas de las bacterias lácticas originan grandes cantidades de péptidos de cadena corta y aminoácidos libres (Laan y col., 1989).

Los hongos miceliales y levaduras poseen numerosos enzimas extracelulares que permiten el madurado rápido de los quesos de degradación fúngica como son los de pasta blanda y semiblanda (Chapman y Sharpe, 1987).

Los enzimas de bacterias siccótrofas dan lugar a defectos por exceso de proteolisis, hecho que puede constatarse tanto en quesos de leche cruda como pasteurizada, debido a la alta termorresistencia de sus enzimas (Guamis y col., 1987).

Conforme evoluciona la degradación de péptidos y aminoácidos aparecen compuestos que intervienen en la formación del aroma y sabor (Aston y Creamer, 1986). La aparición de gustos amargos -en que están implicados péptidos de bajo peso molecular, particularmente hidrofóbicos- se ha relacionado con la acción del cuajo y diferentes cepas de bacterias lácticas, con proteasas que pueden tanto generar como hidrolizar estos péptidos, siendo determinantes en el gusto final del queso (Choisy y col., 1987a). Según Fernández-García y col. (1990) en la proteolisis de leche de oveja hay poca tendencia a la formación de péptidos amargos.

3.5.3. Lipolisis

La materia grasa de la leche está formada mayoritariamente por triglicéridos, de cuya hidrólisis se originan di-, mono-glicéridos y ácidos grasos libres (AGL). Los AGL, especialmente los de cadena corta, contribuyen de forma decisiva al desarrollo del aroma característico del queso. Además, son precursores de otros productos aromáticos como alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres y lactonas (Alonso y Martín-Hernández, 1987). Por otra parte, la grasa actúa como disolvente de componentes del aroma modificando los umbrales de detección, participa en la textura, genera sustancias tensoactivas y por lo tanto modifica las interacciones de ciertos componentes con el agua (Choisy y col., 1987a).

La leche posee una lipasa natural que es activa a pH 5-6, actúa específicamente sobre los enlaces ésteres primarios y los triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta y es sensible a la temperatura, por ello su efecto es sólo importante en los quesos elaborados con leche cruda.

(Reiter y col., 1969).

El cuajo de origen animal tiene muy poca actividad lipolítica, es más, los extractos enzimáticos de buena calidad deben estar desprovistos de actividad lipolítica (Fox y Law, 1991).

Las bacterias lácticas tienen una débil actividad lipolítica. Según estudios de Kamaly y Marth (1989) y Khalid y Marth (1990) los lactococos tienen mayor actividad lipolítica que los lactobacilos y ambos grupos más actividad esterásica que lipásica, por lo que actúan más fácilmente sobre la materia grasa parcialmente hidrolizada, siendo en su mayoría enzimas intracelulares. Los enzimas lipolíticos de los micrococos son extracelulares y algunos intracelulares, en general capaces de hidrolizar ácidos grasos de cadena larga. Intervienen en la aparición de los aromas de los quesos madurados por bacterias, pues aunque decrezcan en número a lo largo de la maduración dan lugar a compuestos más fácilmente atacables por las bacterias lácticas (Ordóñez y Ortiz-Apodaca, 1977).

Los microorganismos sicrótrofos son muy lipolíticos. Sus lipasas son extracelulares, activas a pH 5 y muy termorresistentes, afectando por tanto a los quesos de leche cruda y pasteurizada (Choisy y col., 1987a).

Los hongos miceliares presentan lipasas, en general extracelulares, causantes de los aromas característicos de los quesos de vena azul y de los madurados superficialmente con hongos miceliares (Kinsella y Hwang, 1976; Gripon, 1987 y Fox y Law, 1991). Los sistemas lipolíticos de las levaduras, generalmente estererasas, son menos conocidos.

Hay otras vías que dan lugar a la formación de AGL de cadena corta: fermentación de

la lactosa (butírico) y degradación de los aminoácidos y azúcares, variables según las variedades de quesos, aunque para Lin y Jeon (1987) es mayoritaria la vía lipolítica enzimática. A partir de los ácidos grasos se producen reesterificaciones que afectan principalmente a los de cadena corta y media así como oxidaciones por las que se forman metilcetonas y alcoholes secundarios (Choisy y col., 1987a).

Glicolisis, proteolisis y lipolisis son los mecanismos primarios de la maduración y como tales son los principales responsables de los cambios texturales y del aroma básico. Existen numerosas transformaciones concomitantes que son las principales responsables de los aspectos más específicos del aroma de cada queso y que también modifican la textura (Fox y Law, 1991). Los mecanismos que permiten estas transformaciones son principalmente: los cambios en el lactato durante la maduración, el metabolismo del citrato y la proteolisis y lipolisis debidas a microorganismos no constituyentes del cultivo iniciador, siendo objeto de numerosos estudios en la actualidad (p.e. Ortiz de Apodaca y col. (1993) estudian las actividades proteolítica y lipolítica de micrococos aislados de queso).

3.5.4. Maduración acelerada

En los últimos años ha crecido el interés de la industria quesera por los procesos encaminados a lograr maduraciones más rápidas (especialmente para quesos duros), manteniendo en lo posible las características organolépticas del queso original. Su objetivo es acelerar las reacciones deseables del proceso de maduración, controlando a su vez las indeseables. Se presentan algunas posibles soluciones: en primer lugar el aumento en la temperatura de maduración con el que se han obtenido buenos resultados pero que la industria es reticente a emplear (Núñez y col., 1986 y Fox, 1988); otras opciones de mayor aceptación son la adición de cultivos iniciadores modificados y/o extractos enzimáticos que controlan alguno(s) de los

procesos degradativos de la maduración (Trépanier y col., 1991, 1992a,b; Ha y Lindsay, 1993 y Visser, 1993).

La adición de elevadas proporciones de bacterias lácticas para aumentar el nivel proteolítico en los quesos conlleva una excesiva producción de ácido. Para solventarlo se incluyen cepas de bacterias lácticas mutantes lactosa-negativa pero que mantienen intactas sus funciones proteo- y lipolíticas (Nakajima y col., 1991); ésta sería la mejor opción para Visser (1993).

Otros métodos consisten en la adición de proteasas y peptidasas a la leche o a la cuajada. En general son extractos de enzimas extracelulares de hongos miceliares, levaduras y algunas bacterias, siendo los resultados contradictorios según los autores y los quesos objeto de estudio (Kosikowski y Iwasaki, 1974; Ardö y Pettersson, 1988; Fernández-García y col., 1988, 1993 y 1994a,b).

Para acelerar la aparición de aromas, se añaden lipasas y esterases, generalmente junto con los enzimas degradantes de proteínas, con resultados contradictorios respecto a la calidad final y los niveles de detección de rancidez y sabores amargos (Kosikowski y Iwasaki, 1974 y Andersen, 1989). La adición de lipasas se generaliza en quesos con bajo contenido en grasa, pues en estos casos la aparición de aromas queda modificada (Omar y col., 1987 y Banks y col., 1989).

Si se quieren mantener las peculiaridades de los quesos, debe estudiarse la actividad de los sistemas enzimáticos para cada tipo de leche y sistema de fabricación, para así determinar los cultivos iniciadores idóneos (Fernández-García y col., 1990). En queso tipo Manchego

elaborado con mezcla de leche de oveja y vaca se han obtenido buenos resultados con la adición de un preparado enzimático extraído de *Aspergillus oryzae* (Fernández-García y col., 1993, 1994) y con la adición de combinaciones de enzimas microbianos purificados se han obtenido resultados de diferente éxito (Fernández y col., 1994b).

4. DESESTACIONALIZACION EN LA PRODUCCION DE QUESO: CONGELACION DE CUAJADA Y QUESO

Se han estudiado diversas opciones para regular el mercado de queso de oveja, como son: el uso de leche reconstituida, el uso de leche congelada y la congelación de cuajadas y queso.

La elaboración de queso a partir de leche en polvo reconstituida presenta problemas de coagulación y el queso obtenido defectos de sabor (Luquet, 1983).

La congelación de la leche conlleva alteraciones en el equilibrio físico-químico. Se han planteado diversas hipótesis sobre el mecanismo de desestabilización de la leche por congelación. Según Swartling (1968) la concentración de solutos obtenida provocaría disminución del pH y/o aumento localizado de la concentración de calcio, alterando el complejo de fosfocaseinato cálcico, con la consiguiente desestabilización de las proteínas. En la misma línea Minson y col. (1981) y Lonergan y col. (1982) argumentaron que la criodesestabilización de la leche se debe a un fenómeno de entrecruzamiento de las micelas por puentes de calcio, por la evidencia que la disminución de los niveles de calcio previa a la congelación incrementa la estabilidad de la leche al frío. Por el contrario, Roberts y col. (1986) observaron que la deplección total de calcio y fosfato que se produce en la leche congelada es resultado de la desestabilización proteica y no a la inversa.

Otro efecto observado durante el almacenamiento de leche en congelación es la pérdida de dobles enlaces, junto con el aumento de grupos -OH y -NH₂ en las caseínas, es decir apertura de enlaces peptídicos y desnaturalización proteica (Fuster, 1970). Esta disgregación de

la caseína dentro de la micela la hace especialmente susceptible de proteolisis (Fox, 1970).

Respecto a la materia grasa de la leche congelada, Antifantakis y col. (1980) observaron un aumento en la lipolisis y oxidación, posteriormente Needs (1992) puntualizó que la intensidad de la lipolisis depende de la temperatura y el tiempo de mantenimiento en congelación. Otros autores han descrito la aparición de cristales de lactosa y de agregados de caseína que dan lugar a defectos de coagulación y sabor (Nakanishi e Itoh, 1965 y Lagoni y Peters, 1966).

Pese a que los estudios citados expusieron la posible aparición de defectos, Tulloch y Cheney (1984) obtuvieron resultados aceptables al congelar leche pasteurizada para consumir líquida y Decio (1989) logró buenos resultados elaborando queso Pecorino con mezcla de leche fresca y congelada. También hay trabajos sobre congelación de leche previamente concentrada por ósmosis inversa (Chin-Wen Lin y col., 1994), por ultrafiltración (Pannetier, 1979; Lonergan y col., 1981 y Koschack, 1981) y por evaporación al vacío (Lacasa, 1989) con resultados aceptables (Pannetier, 1979; Lacasa, 1989 y Luquet, 1983). Pese a todo, la congelación de leche supone un elevado coste económico.

En la literatura científica se encuentran trabajos de congelación de cuajada y queso con resultados diversos como se expone a continuación.

4.1. CONGELACION DE CUAJADA Y QUESO

El punto de congelación del queso varía entre -1 y -10°C dependiendo principalmente del contenido en sal, humedad y grado de maduración -que determinan la capacidad de retención del agua (Winder y Price, 1964)-, así como del tipo y tamaño del queso. En realidad, conservar

en frío justo por encima del punto de congelación previene la aparición de alteraciones pero el período de conservación es menor (Lück, 1977; Ramanauskas y col., 1978; Ramanauskas, 1984 y Filchakova, 1986). Se ha observado que los quesos con baja humedad soportan mejor la congelación y un elevado contenido en grasa preserva de los cambios texturales debido a que los cristales de hielo se mantienen en tamaños inferiores a 50 micras (Lück, 1977).

Willart y col. (1966) congelaron leche y cuajada fresca de oveja y observaron más defectos en las cuajadas obtenidas de leche congelada; Harper (1958) y Palo y col. (1964) obtuvieron mejores resultados al congelar el queso de oveja sin madurar. Según Kasprzak y col. (1994) la congelación resulta de mayor interés para quesos frescos o de poca maduración, pues los madurados son bastante estables en refrigeración, si bien sí sería conveniente para evitar sobremaduraciones.

Respecto al contenido en sal, Micev y Lazarevska (1966) observaron más modificaciones en los quesos congelados salados que en los salados al descongelar. Willart y col. (1966) detectaron problemas de oxidación en cuajada congelada salada. En cambio, otros autores no observan que el momento del salado tenga efecto alguno en la maduración consiguiente de las cuajadas descongeladas (Jarmul, 1985; Martín-Hernández, 1987 y Fontecha, 1991).

La congelación del agua contenida en el queso provoca daño mecánico. Según Fuster (1970), la formación de cristales durante la congelación puede romper enlaces dejando la estructura del queso más abierta y menos resistente a la compresión, disminuyendo en su caso la cohesión de las partículas de cuajada. La velocidad de congelación afecta a la formación de cristales de hielo y por tanto a la integridad de la malla estructural. Se ha descrito que en geles

proteicos el crecimiento de cristales de hielo se realiza en planos paralelos a la dirección del flujo térmico y en estructura dendrítica, siendo el tamaño de los cristales menor a mayor velocidad del frente de congelación (Miyawaki y col., 1992). De este modo, no se recomienda la congelación lenta, pues la formación de cristales de gran tamaño altera la red estructural del queso (Tiersonnier, 1970); tampoco es recomendable una congelación muy rápida al poder provocar rupturas macroscópicas (Emmons y col., 1968). Emaldi (1983) y Juárez y Goicoechea (1987) apuntaron que a 0,26 cm/h se altera la malla estructural provocando disminución de la capacidad de retención de agua (CRA) y mayor proteolisis, mientras que velocidades de 1,4-1,8 cm/h dan lugar a cambios insignificantes en las propiedades de las proteínas, pueden disminuir la CRA pero las características organolépticas y la proteolisis son semejantes al control. Por el contrario Fontecha y col. (1994) evidencian aumento de la CRA en los quesos procedentes de cuajadas congeladas respecto a los controles. Karpac y col. (1968) congelaron y mantuvieron queso fresco a -17 y -35°C, obteniendo mejores resultados para la temperatura más baja, en cambio Dalles y col. (1984), en quesos de pasta blanda, no observaron diferencias causadas por la velocidad de congelación. En general, se recomienda una congelación rápida y mantenimiento entre -20 y -30°C, sin oscilaciones y en ausencia de oxígeno (Alichanidis y col., 1981; Alonso y col., 1987; Martín-Hernández y col., 1990 y Buyanov y col., 1994).

Envasando antes de congelar se evitan pérdidas por deshidratación. Trabajos de Portman y col. (1966, 1967, 1970), en queso de cabra, mostraron buenos resultados si se congelaba desuerado y envuelto en películas plásticas. Cervantes y col. (1983) congelaron Mozzarella envasado al vacío; Fontecha y col. (1994) congelaron cuajadas de leche de oveja desueradas, saladas y envasadas al vacío. También en Mozzarella Ghosh y Singh (1992a, b), obtuvieron mejores resultados con un envase barrera (PVdC de Cryovac) que con polietileno y al vacío que con aire, destacando que la influencia del envase es mucho mayor en el mantenimiento en

refrigeración que en congelación.

Es conveniente que la descongelación se realice ligeramente por encima del punto de congelación. Tiersonnier (1970) y recientemente Buyanov y col. (1994) recomiendan descongelar lentamente, a baja temperatura durante el tiempo necesario.

Una vez considerada la congelación globalmente, detallaremos los efectos que tiene sobre las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas, que son debidas principalmente al cambio de estado del agua, retraso de las reacciones químicas, solidificación de triglicéridos y enlentecimiento del crecimiento microbiano.

4.2. EFECTO EN LAS CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS Y ORGANOLEPTICAS

4.2.1. Efecto en la composición global

En general son pocos los autores que observan modificaciones en la composición cuantitativa del queso en cuanto a componentes principales: materia seca, proteína total, grasa y cenizas. En quesos obtenidos de cuajadas descongeladas -que se habían mantenido a -20°C - se observa descenso en la actividad del agua y aumento de la capacidad de retención del agua respecto a los controles (Fontecha y col., 1994). Micev y Lazarevska (1966) tras la congelación de queso fresco a -17°C y mantenimiento durante 4 meses, Alichanidis y col. (1981) en queso Teleme congelado a -40°C y mantenimiento a -20°C durante 1, 2 y 6 meses y Ghosh y Singh (1991, 1992a, b), en Mozzarella congelado entre -10 y -15°C y con un mantenimiento de 3 meses, evidenciaron pérdida de agua durante el mantenimiento en congelación, esta observación tal vez se deba a la temperatura de congelación y mantenimiento empleadas, superiores a las

empleadas por otros autores.

4.2.2. Efecto en la actividad enzimática

La congelación provoca un retraso de las reacciones químicas. Hôte-Baudart (1969) en queso tipo Camembert puso en evidencia la presencia de actividad enzimática entre -15 y -20°C , y según Portman (1970) ni aún rebajando la temperatura hasta -30°C se inhibe completamente (en cuajadas de leche de cabra congeladas). La intensidad de la actividad enzimática en el mantenimiento en congelación depende de la temperatura de mantenimiento (menor a menor temperatura), el contenido en enzimas (menor en quesos frescos) y el tiempo de maduración del queso, siendo el efecto menor en quesos frescos o poco madurados (Coppens, 1968; Portman, 1970 y Anquez, 1974), aunque también se han observado resultados satisfactorios congelando quesos madurados como Gorgonzola (Ottogalli y col., 1973) y Provolone (Ottogalli y Rondini, 1974).

4.2.3. Efecto en la degradación proteica

La proteólisis no se detiene ni con la congelación, aunque Juárez y Goicoechea (1987) defienden que a temperatura inferior a -20°C la actividad proteolítica es prácticamente despreciable. En general, se observa un aumento de diferentes fracciones nitrogenadas y, en especial, del nitrógeno soluble en los quesos madurados provenientes de cuajadas descongeladas (Pejic y col., 1964; Kral, 1965; Micev y Lazarevska, 1966; Alichanidis y col., 1981; Jarmul y col., 1985; Martín-Hernández y col. 1990; Fontecha, 1991 y Kasprzak y col., 1994); en cambio, otros autores como Dalles y col. (1984) no observaron que la proteólisis se vea afectada por la congelación. En Cabrales Alonso y col. (1987a, 1987b) y Ramos y col. (1987) evidenciaron una disminución del nitrógeno amínico respecto al control que sugieren puede deberse a la diferente respuesta de la flora fúngica ante el sustrato modificado por la

congelación. En cualquier caso, el resultado es muy variable dependiendo del tipo de queso estudiado.

4.2.4. Efecto en los lípidos

Un gran número de autores y entre ellos Portman y col. (1969) y Alonso y col. (1987a, 1987b) coinciden en que el grado de lipólisis no se ve afectado por la congelación, en cambio Micev y Lazarevska (1966) y Ottogalli y col. (1972) observaron un aumento del nivel de ácidos grasos libres y Jarmul y col. (1985) encontraron que los cambios en los lípidos durante la maduración posterior al mantenimiento en congelación son más rápidos que en los controles. Cabe destacar que los trabajos que han puesto en evidencia aumento de la lipólisis son estudios sobre cuajadas y quesos salados antes de la congelación. También se ha observado un ligero aumento de la lipólisis al congelar quesos con flora superficial (Jarmul y col., 1985; Alonso y col., 1987 y Martín-Hernández y col., 1990). No se han encontrado referencias en la bibliografía al efecto de la congelación en la oxidación de la materia grasa en cuajada y queso.

4.2.5. Efecto en el pH

Sobre el efecto que la congelación tiene en el pH del producto final hay disparidad de resultados: algunos autores observan que permanece inalterado (Dalles y col., 1984; Ramos y col., 1987; Alonso y col. 1987a, 1987b y Martín-Hernández y col., 1988), otros que tiende a disminuir (Jarmul y col., 1985 y Ghosh y Singh, 1991, 1992) y otros que aumenta (Alichanidis y col., 1981; Martín-Hernández y col., 1990; Fontecha, 1991 y Valle y col., 1992). El tipo de queso y la temperatura de mantenimiento en congelación son los principales responsables de esta diversidad.

4.2.6. Modificaciones en las características organolépticas

Los cambios organolépticos que puedan darse por efecto de la congelación son poco perceptibles mediante análisis sensorial. El sabor no suele verse afectado, incluso McDowall (1938) sugiere que podría evitar la aparición de sabores amargos en Cheddar. Sin embargo, otros estudios sí observan alteraciones del sabor (Richards, 1966 y Oberg y col., 1992), siempre dependiendo del tipo de queso y las condiciones de procesado. Se considera que en condiciones óptimas -congelación rápida y mantenimiento sin fluctuaciones de temperatura- se previenen los fenómenos de oxidación y por tanto el sabor a oxidado (Portman, 1970; Tiersonnier, 1970; Alichanidis y col., 1981 y Alonso y col. 1987a, 1987b).

Respecto a los cambios en la textura, en quesos Feta y Teleme obtenidos a partir de cuajadas congeladas Alichanidis y col. (1981) observaron textura deficiente, maduración más rápida y más proteolisis que en los controles en las mediciones objetivas, pero organolépticamente se apreciaron pocas diferencias. En estudios semejantes de Portman y col. (1966), Portman (1970) y Tiersonnier (1970) sobre queso Chavignol, se recomienda mezclar cuajada descongelada con cuajada fresca, en lugar de utilizar únicamente la descongelada ya que provoca defectos de textura.

En general las características organolépticas de quesos para fundir no se ven afectadas por la congelación, por lo que ésta ha demostrado ser un proceso adecuado de conservación (Thomas y col., 1980). En la misma línea, en quesos de pasta blanda, Dozet y col. (1983), Filchacova y col. (1983) y Dalles y col. (1984) obtuvieron resultados satisfactorios, así como en quesos con maduración fúngica como Camembert (Jarmul, 1985) y Cabrales (Alonso y col., 1987).

Kasprzak y col. (1994) realizaron un estudio sobre Cheddar, congelando hasta -20°C,

con mantenimiento a -18°C durante 4 meses y descongelación a 7°C durante 48 horas y teniendo como variables los contenidos en grasa, agua y sal. Los resultados obtenidos por estos autores son coincidentes con los mencionados hasta el momento, observando a su vez algunos defectos de textura, especialmente en los lotes con mayor contenido en agua. Defectos consistentes en harinosidad¹ que argumenta coincidiendo con Webb y Arbuckle (1977) que podría ser debida a la aglomeración y deshidratación de las proteínas, y menor aptitud a la fusión² en aparente contradicción con el mayor nivel de proteolisis observado. Estos resultados coinciden con los observados por Oberg y col. (1992) en Mozzarella con bajo contenido en agua y grasa. En el aumento de proteolisis en congelación coinciden también Coker y Creamer (1993) que apuntan que a -18°C continúa la proteolisis, aunque no va acompañada de grandes cambios en la textura. Concluyen que se obtienen buenos resultados dependiendo especialmente del porcentaje de agua en el queso exento de grasa.

Oberg y col. (1992) apreciaron que a mayor tiempo de mantenimiento en congelación más defectos de textura y sabor, en cambio no observaron cambios en el color. Por su parte, Cervantes y col. (1983) no obtuvieron diferencias significativas en la textura debidas a la congelación.

En quesos de pasta dura, Richards (1966), Alichanidis y col., (1981) y Peláez (1983) encontraron pequeños cambios en la textura que no fueron detectados por catadores. Los estudios realizados sobre queso Manchego y otros semiduros evidenciaron la viabilidad de aplicación del proceso (Jiménez, 1978; Jiménez y col., 1979; Peláez, 1981; Martín-Hernández, 1987 y Fontecha, 1991).

¹ *mealiness*, traducción según Drake (1989)

² *meltability*, traducción según Drake (1989)

Finalmente debemos considerar que si bien la textura es la característica organoléptica que más suele verse afectada por la congelación, diversos autores defienden que la maduración revierte las modificaciones ocasionados por la congelación (Shannon (1974) en Cheddar; McDowall (1938) y Dahlstrom (1978) en Mozzarella; Valle y col. (1992) en Prato (pasta semicocida) y Fontecha y col. (1994) en queso semiduro de leche de oveja). Por el contrario, congelando lentamente Richards (1966) encontró defectos de textura y sabores amargos, apreciando que estas alteraciones no revertían con la maduración, tal vez por el daño sufrido con la congelación lenta.

4.3. EFECTO SOBRE LA FLORA MICROBIANA DEL QUESO

El efecto de la congelación sobre los microorganismos de los alimentos se debe a la baja actividad del agua de los alimentos congelados que no permite el crecimiento y que provoca la destrucción de algunos microorganismos; dependiendo su supervivencia de:

- **la cantidad inicial** de flora, propia o inoculada,
- **el tipo de microorganismos**: las bacterias gram positivas son más resistentes que las gram negativas, termófilos y mesófilos más sensibles que siccótrofos, y dentro de la flora láctica lactobacilos más sensibles que lactococos. Richards (1966) obtuvo disminución de mesófilos y lactobacilos, ausencia de coliformes y recuentos irregulares de mohos y levaduras. Alichanidis y col. (1981) observaron disminución de la flora microbiana, especialmente bacterias lácticas, mohos y en menor grado bacterias proteolíticas. Mor-Mur (1991) tras la congelación y mantenimiento de cuajadas de leche de cabra evidenció disminución de los recuentos bacterianos y recuentos fúngicos prácticamente nulos,
- **la fase de crecimiento** en que se encuentren: en la fase estacionaria los microorganismos son más resistentes que en la logarítmica (Speck y Ray, 1977; Peláez,

1983 y Juárez y Goicoechea, 1987),

- **la composición y consistencia del alimento:** mejor supervivencia en alimentos ricos en grasa, proteínas y glúcidos y que sean viscosos; mayor destrucción en alimentos ricos en iones, sales, ácidos y enzimas,

- **el procesado:** los microorganismos son más sensibles a la congelación en los alimentos que han sido previamente tratados, bien sea calentados, refrigerados, salados, irradiados o acidificados. Micev y Lazarevska (1966) observaron mayor supervivencia de la flora microbiana en aquellas cuajadas y quesos que se habían congelado sin salar. Por su parte, la congelación a velocidad lenta y fluctuaciones de temperatura en presencia de oxígeno ayudan a la destrucción de la flora (Speck y Ray, 1977 y Peláez, 1983).

La actividad microbiana es prácticamente nula a temperaturas de conservación por debajo de -10°C . En congelación puede darse lisis microbiana y por ello la flora total tiende a disminuir con el tiempo de mantenimiento. En cambio, Casla y col. (1995) no observaron cambios en la viabilidad microbiana tras la congelación de cuajadas de leche de oveja. En estudios en congelación de queso Cendrat del Montsec Mor-Mur (1991) y en queso Prato Valle y col. (1992) observaron que la evolución de la flora microbiana durante la maduración posterior era similar entre descongelados y controles y se obtenían quesos con niveles microbianos equiparables. Por su parte Fontecha y col. (1994) evidenciaron en quesos obtenidos de cuajadas de leche de oveja descongeladas un descenso de la viabilidad microbiana más pronunciado que en los controles.

Por lo descrito hasta el momento se deduce que hay que buscar las condiciones óptimas de congelación para cada tipo de queso.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como se desprende del capítulo anterior, la producción de queso de leche de oveja se concentra en un periodo aproximado de 6 meses, lo cual provoca la heterogeneidad en las características de algunos quesos típicos españoles, siendo igualmente patente su escasez en algunas épocas del año. La finalidad de este trabajo es aportar una vía de solución a la problemática expuesta partiendo de los objetivos que se exponen a continuación.

Desestacionalizar el abastecimiento de queso semiduro de leche de oveja, mediante la conservación de las cuajadas sin madurar.

Establecer una premisas de trabajo a partir de los estudios publicados que permitan realizar una mejor planificación de las experiencias.

Obtener queso de las mismas características que el obtenido por elaboración clásica y a la vez una mayor homogeneidad del producto en el mercado (evitar acumulación de queso con maduración prolongada). Comprobar la idoneidad de la congelación de cuajadas para la obtención de queso de leche de oveja. La evaluación de la validez del método se deberá realizar en función de:

- parámetros de maduración: composición de los quesos obtenidos tras la congelación de cuajadas, sus índices de proteolisis, composición y características de la fracción lipídica,
- microestructura de los quesos obtenidos,
- textura y color de dichos quesos evaluados mediante equipos objetivos,
- comparación con las apreciaciones de un panel de catadores.

Con la finalidad de desarrollar una metodología de conservación adecuada:

- realizar el seguimiento de la congelación de la cuajada para establecer el intervalo de velocidades de congelación conveniente,
- fijar las condiciones de envasado más adecuadas para la manipulación y almacenamiento de las cuajadas,
- evaluar el efecto de la conservación de las cuajadas a baja temperatura dentro de un intervalo de tiempo lógico.

Una vez establecidas las condiciones de congelación y tiempo de conservación que sean convenientes, profundizar en el efecto que puedan ocasionar al queso posibles variaciones de temperatura en el mantenimiento de las cuajadas.

MATERIAL Y METODOS

1. ELABORACION DE QUESO

A partir de 1.350 litros de leche de oveja se elaboraron quesos de 20 cm de diámetro y 9 ± 1 cm de altura, con un peso aproximado de 2,5 kg. Se utilizó leche procedente del rebaño de las granjas de experimentación de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (Producción Animal), rebaño de 125 cabezas, compuesto en un 80% ovejas de raza manchega y un 20% de raza lacaune.

La leche se pasteurizó a $76 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 segundos en pasteurizador de placas y calentó en la cuba de cuajar hasta $30 \pm 1^\circ\text{C}$, momento en el que se estandarizó el pH a 6,3 ($28 \pm 1^\circ\text{Dornic}$) con la adición de ácido láctico si era necesario. Posteriormente se añadió el cultivo iniciador al 1%, cloruro cálcico (0,056 g/l) y cuajo microbiano comercial (0,07 ml/l) de actividad 1:15000 (Renifor 15/E, Lamirsa). La coagulación tuvo lugar a $32\text{-}34^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. La cuajada se cortó en granos del tamaño de un garbanzo, se calentó hasta 37°C y se mantuvo durante 5 minutos, tras los cuales se procedió al desuerado y moldeado en moldes cilíndricos con capacidad para 3 kg de cuajada. El prensado se llevó a cabo en prensa neumática durante 1 hora a 1 kg/cm^2 de presión y seguidamente durante 16 horas a 2 kg/cm^2 , en cámara a 14°C de temperatura media. El salado se realizó en salmuera de densidad 1,143 g/ml durante 15 horas en la misma cámara. La maduración se realizó en cámara controlada a 14°C y 85% HR durante 60 días.

El cultivo iniciador se obtuvo a partir de fermentos liofilizados (Lacto-Labo SMADL: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 75%, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 10%, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 10% y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 5%), inoculados en leche descremada reconstituida al 10% (pasteurizada a 80°C durante 30 minutos) e incubada a 30°C durante 18 horas, que dió lugar al fermento madre (pH $4,3 \pm 0,2$ y $65 \pm 3^\circ\text{D}$). Para la obtención del fermento industrial se inoculó el fermento madre al 20% en leche de las mismas características, incubándose a 30°C durante 18 horas, hasta los mismos valores de pH y acidez Dornic.

La partición de los diferentes lotes se realizó antes del salado, de forma que las cuajadas se envasaron y congelaron sin salar. Las cuajadas descongeladas se salaban del mismo modo que los controles.

2. ENVASADO

Aquellas cuajadas que se iban a congelar se envasaron de tres modos distintos:

- en bolsa de polietileno de baja densidad, con aire y cierre manual (pe),
- al vacío en bolsa bb4.1 de Cryovac (Grace) (material multicapa barrera al agua y al aire) en equipo EVA-9 (Tecnotrip) (vac),
- en atmósfera de CO₂ al 100% (Aligal 2 de Sociedad Española del Oxígeno, SEO) en bb4.1 de Cryovac (Grace) en equipo EVA-9 (Tecnotrip) (gas).

Desde la salida de prensa hasta el envasado y posterior congelación, las cuajadas se mantuvieron a 14°C.

3. CONGELACION

Se llevó a cabo en un armario congelador de nitrógeno líquido (Cryosas, SEO). La cinética del proceso se siguió con sondas termopares tipo K (níquel-cromel-alumel) mediante un registrador Shinko HR-106, con lectura a intervalos de 5 segundos y registro cada 30 segundos. Con los valores obtenidos se realizaron los cálculos de la velocidad de congelación según Hori¹ (1982), clasificándose como media (1,5 cm/h), rápida (5,4 cm/h) y ultra-rápida (12 cm/h) según Fellows² (1988). Dado que estudiamos tres velocidades, para simplificar la lectura las denominaremos lenta (L), media (M) y rápida (H) respectivamente. Las cuajadas así congeladas se mantuvieron a $-23 \pm 1^\circ\text{C}$ en un arcón congelador por compresión. La descongelación completa se llevó a cabo en un incubador (Hot Cold S, Selecta) a 0°C y con convección de aire durante un tiempo aproximado de 48 horas.

3.1. FLUCTUACIONES DE TEMPERATURA EN CONGELACION

Las fluctuaciones de temperatura en congelación (tercera experiencia) se realizaron en

¹ Hori (1982), *ice front velocity* = $h/2z$, donde h (metros) es el grosor del objeto y z (horas) es el tiempo invertido desde que el centro térmico llega al punto de congelación hasta que la temperatura desciende 5°C por debajo de este punto.

² Fellows (1988): velocidad de congelación según velocidad de avance del frente de congelación: lenta 0,2 cm/h; media 0,5-3 cm/h; rápida 5-10 cm/h y ultra-rápida 10-100 cm/h.

armario congelador, de manera que se inyectaba nitrógeno hasta que la temperatura ambiente igualaba a la de las cuajadas; a continuación cesaba la entrada de nitrógeno, manteniéndose el aire en circulación hasta alcanzar -10°C en el centro del alimento, en un tiempo aproximado de 5 horas. En este punto las cuajadas eran devueltas al arcón congelador a $-23 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para monitorizar los procesos de congelación, descongelación y fluctuaciones se utilizó un registrador Data Logger KM1410 con lectura a intervalos de 5 segundos, dotado de una sonda de las mismas características que el anterior.

4. TOMA DE MUESTRAS

A la salida de prensa se tomaron las muestras de cuajadas control. Las muestras de las cuajadas restantes se tomaron inmediatamente tras la descongelación. Se consideró el producto acabado a las 8 semanas de maduración, momento en que se tomó la muestra de queso.

Se tomaron porciones algo mayores que un cuarto del queso. Se desechó la corteza y algo más de un centímetro de queso adherido a ella. En condiciones de esterilidad se tomaron alícuotas de 20 g de muestra para las determinaciones microbiológicas y el resto se trituró y guardó en frascos conservados en cámara fría ($2-4^{\circ}\text{C}$), hasta la realización de los análisis físico-químicos.

5. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

A 20 g de muestra se añadieron 180 ml de citrato sódico atemperado a 45°C y se trituró durante 2 minutos con un homogeneizador estéril. Se hizo un banco de diluciones con solución de Ringer 1/4 y se realizaron las siembras en placa en los diferentes medios (Kosikowski y Brown, 1973).

Recuento de bacterias aerobias mesófilas revivificables, por inclusión en Plate Count Agar (PCA) (Oxoid) incubadas a 30°C , 72 horas (ICMSF, 1983).

Recuento de hongos en superficie, en Agar Extracto de Malta (Oxoid), incubados a 28°C , 5 días (Beerens y Luquet, 1987).

Recuento de microorganismos siccótrofos, por inclusión en PCA incubadas a 7°C , 10 días (Richardson, 1985).

6. COMPOSICION GLOBAL DE LECHE Y QUESO: ANALISIS FISICO-QUIMICO

6.1. DETERMINACION DEL EXTRACTO SECO TOTAL

Por desecación de la muestra en estufa a $103 \pm 1^\circ\text{C}$ según Método del Ministerio de Sanidad y Consumo (1985).

6.2. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CENIZAS

Por calcinación en horno a 550°C según Método del Ministerio de Sanidad y Consumo (1985).

6.3. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN GRASA

Mediante el método de Gerber para leche y también para queso pero modificado según Van Gulik (Richardson, 1985).

6.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CLORUROS

Por valoración colorimétrica según Casado (1982).

6.5. DETERMINACION DEL pH

En leche las determinaciones se realizaron directamente con un electrodo de combinación, pH-metro Crison micro-pH 2001; mientras que en queso se preparó un homogeneizado de 30 g de queso con 70 g de agua destilada.

6.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA (a_w)

Se realizó por dos métodos:

- determinación automática por higrómetro eléctrico TH2/RTD-33/BS *Novasina Thermoconstanter*, a 20°C (Fett, 1973),
- método de interpolación gráfica (Landrock y Proctor, 1951) utilizando células de

Conway y como sales de referencia: nitrato potásico (KNO_3) a_w :0,932, potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4) a_w :0,965 y potasio dicromato ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a_w :0,982. Las muestras se mantuvieron a 20°C durante 48 horas (Bousquet-Ricard y col., 1980).

6.7. NITROGENO TOTAL Y FRACCIONES NITROGENADAS DE LECHE Y QUESO

6.7.1. Nitrógeno total

Las determinaciones cuantitativas del nitrógeno total y sus fracciones en leche y queso se hicieron según Kjeldhal modificación semiautomática (IDF, 1964).

6.7.2. Nitrógeno soluble a pH 4,6: nitrógeno no caseínico (nnc)

Leche: para la obtención del nitrógeno no caseínico, se separó la caseína por precipitación a pH 4,6 con tampón acético-acetato sódico (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1985).

Queso: la extracción de la fracción soluble y la separación del nnc -fracción que contiene proteínas del suero, proteosomas-peptonas, péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres- se realizaron según Kuchroo y Fox (1982).

6.7.3. Nitrógeno soluble en tricloroacético (nTCA)

A partir de la fracción soluble de leche y queso se separó el nitrógeno soluble en TCA al 12% según Kuchroo y Fox (1982). Esta fracción se utilizó como estimación del nitrógeno no proteico y contiene péptidos pequeños (2-20 residuos) y aminoácidos (Fox, 1989). Según Firtsch y col. (1992) esta fracción es el mejor indicador de la intensidad de la proteólisis.

6.7.4. Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (nFT)

Partiendo de las fracciones solubles, tanto de leche como del queso, se valoró el contenido en nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (nFT) según Gripon y col. (1975). Esta fracción se utilizó como estimación del nitrógeno amínico, contiene aminoácidos libres y péptidos de peso molecular inferior a 600 Daltons (Christensen y col., 1991).

7. ESTUDIO DE LA FRACCION LIPIDICA

La extracción de la materia grasa del queso para la determinación de la acidez y del perfil de ácidos grasos se realizó según Wolff y Castera-Rossignol (1987), que consiste en la extracción y procesado en frío de la muestra.

10 gramos de muestra pesados con exactitud de 0,1 g se desliaron con 15 ml de acetona en un mortero de vidrio por un tiempo entre 3 y 5 minutos. Se añadieron aproximadamente 12 g de sodio sulfato anhidro, removiendo de nuevo la mezcla. A continuación se añadieron 70 ml de la mezcla de disolventes hexano e isopropanol (HIP) (3:2), manteniendo en agitación. La mezcla se filtró en papel de filtro fino (Whatman 2) y se realizaron dos lavados con 15 ml de HIP. El extracto así obtenido se guardó en frascos Pyrex con cierre teflonado y en congelación hasta su procesado para la determinación de acidez y el análisis cromatográfico.

7.1. ACIDEZ DE LA GRASA

10 ml de extracto se valoraron con hidróxido potásico 0,1 N utilizando fenoftaleína como indicador.

7.2. ACIDOS GRASOS TOTALES, DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA DE GASES

A 1 ml del extracto de grasa en HIP se añadieron 500 μ l de disolución de ácido margárico (de concentración 4 mg C17:0/ml HIP, utilizado como patrón interno) y 500 μ l de HIP. Posteriormente se añadió 1 ml de la mezcla recién preparada de ácido sulfúrico 96% y alcohol isopropílico (1:4). La derivatización para la obtención de ésteres isopropílicos se realizó a 100°C durante 90 minutos, transcurridos los cuales se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de agua destilada (para mejorar la separación de fases), la mezcla se agitó vigorosamente y se dejó en reposo durante 5 minutos, en este momento se recuperó la fase etérea. 0,5 μ l de la fase etérea se inyectaron para la separación de ácidos grasos. Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu CG9 modificado para su adaptación a columna capilar, con detector de ionización a la llama (FID) y un integrador Hewlett Packard 3395. La separación se realizó en columna capilar Stabilwax, Restek Co., de 0,53 mm de diámetro y 60 metros de longitud,

utilizando helio como gas portador. Las condiciones de trabajo fueron:
cromatógrafo:

temperatura del inyector: 230°C
temperatura del detector: 240°C
flujo del gas portador: 18,5 m/min
temperatura inicial: 70°C
gradiente de temperatura: 3°C/min
temperatura final: 220°C

integrador:

zero: 5
atenuación: 4
velocidad del papel: 2 mm/min
área de rejilla: 1.000
anchura de pico: 0,04
ruido de fondo: 3
duración: 56 min

Los cálculos se realizaron a partir de la relación área pico/ área C17:0 y de las rectas de calibración obtenidas para los ácidos grasos: C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2 (95% de pureza mínima Chem Service).

7.3. ESTABILIDAD DE LA GRASA A LA OXIDACION (Rancimat)

El método Rancimat para determinar la estabilidad de la grasa a la oxidación se basa en una determinación conductimétrica de los productos volátiles generados por las grasas y aceites al ser sometidos a burbujeo de aire a elevada temperatura. El equipo determina el inicio del deterioro de la muestra y el resultado debe interpretarse como el tiempo de inducción de la oxidación a la temperatura a que se realiza la prueba. Según Metrohm UK Ltd. los resultados que se obtienen coinciden con los de la determinación del oxígeno activo.

La determinación se realiza directamente en grasas y aceites, y sobre la grasa extraída en éter de petróleo 40/60 en aquellas muestras que contengan otros componentes. En cualquier caso se debe proceder de forma que la muestra esté exenta de agua. En caso de tener que

almacenar la grasa por un corto periodo de tiempo antes de ser analizada habrá de hacerse en ausencia de aire, protegida de la luz y en frío.

La extracción de la grasa para este análisis se hizo a partir de 30 g de queso triturado a los que se añadieron unos 150 ml de éter de petróleo 40/60 hasta quedar cubierto, manteniéndose durante 12 horas en agitación, a temperatura ambiente y en ausencia de luz; se filtró el extracto obtenido a través de sodio sulfato anhidro posteriormente se desecó en rotavapor a 50°C y en ausencia de luz. Se utilizó un equipo 617 Rancimat (Metrohm Herisau), la prueba de oxidación acelerada se realizó a 120°C sobre 3 g de la grasa extraída, en un total de 6 réplicas por lote.

7.4 INDICE DEL ACIDO TIOBARBITURICO (TBA)

La oxidación de las grasas da lugar a la aparición de productos de degradación. Habitualmente se estima el grado de oxidación de la grasa de un alimento por la determinación del índice de peróxidos, que se determina previa extracción de la grasa con solventes orgánicos y valoración con tiosulfato sódico. Este método pese a ser oficial para esta determinación presenta algunos problemas, principalmente la cinética de formación-degradación de los peróxidos, pues la evolución de su concentración en el tiempo presenta una curva parabólica. De esta forma para un mismo valor del índice de peróxidos el alimento puede estar en perfectas condiciones o estar en un estado de alteración avanzado. No ocurre lo mismo con el malonaldehído, producto secundario de la oxidación de las grasas, cuya cinética de formación y degradación es lineal (hasta una concentración determinada, en que se estabiliza, dependiendo del tipo de grasa).

La determinación del contenido en malonaldehído puede realizarse mediante el índice del ácido tiobarbitúrico (TBA). El malonaldehído reacciona con el TBA dando un compuesto coloreado que absorbe a una longitud de onda de 531 nm. Yu y Sinnhuber (1967) y previamente Dahle y col. (1962) observaron una relación directa entre el índice de TBA y el índice de peróxidos de diversos tipos de grasa.

Para establecer si el índice de TBA puede ser utilizado para un alimento hay que tener en cuenta su composición en ácidos grasos. Grasas con un contenido bajo o nulo en ácidos

grasos insaturados (especialmente poliinsaturados) no es de esperar que presenten valores de TBA representativos de su estado de oxidación aunque presenten un elevado índice de peróxidos. El contenido en ácidos grasos insaturados de la grasa láctea es suficiente y diversos autores han propuesto la aplicación del TBA en productos lácteos (Biggs y Bryant, 1953 y King, 1962 entre otros). Kishida y col. (1993) estudiaron la relación entre TBA y consumo de oxígeno en ácidos grasos insaturados observando relación lineal entre ambos parámetros (hasta 600-700 $\mu\text{m/L}$); este es un bajo nivel de oxidación e indica que este parámetro es muy adecuado para evaluar el grado de oxidación en los estadios iniciales. Es de esperar que el queso objeto de nuestro estudio que presente niveles muy bajos de oxidación y por tanto este índice sería muy adecuado para detectar diferencias sutiles.

Se han descrito diversos métodos para realizar la determinación de este índice, de diversa complejidad y coste, que van desde el uso de técnicas de HPLC (Bird y col., 1983) hasta la reacción directa en ebullición (Sinnhuber y Yu, 1958). Uno de los métodos más ampliamente utilizados por su sencillez y por la alta correlación de sus resultados con los obtenidos por métodos más complejos (Pikul y col., 1983) y con la evaluación sensorial (Salih y col., 1987) es la extracción acuosa en medio ácido.

En nuestro caso utilizamos el método descrito por Salih y col. (1987) que como antioxidante utiliza butil-hidroxi-anisol (BHA), como agente oxidante ácido perclórico y como mimetizante del malonaldehído el tetra-etoxi-propano (TEP), puesto que el malonaldehido puro resulta muy inestable. Las medidas espectrofotométricas se realizaron a 531 nm de longitud de onda (Shimadzu OV-120-01). Se tomaron muestras por triplicado de cada unidad y por duplicado para cuantificar la recuperación.

Con posterioridad a la realización de nuestro trabajo fueron publicadas variaciones de la extracción ácida que al parecer optimizan los resultados y en las que se hace especial referencia a productos lácteos (Botsoglou y col., 1994).

8. EVOLUCION DEL PESO DURANTE LA MADURACION

Para realizar esta determinación todas las unidades se marcaron y separaron de forma que se pudo llevar a cabo un control individual de todos los quesos de cada uno de los lotes.

Semanalmente se pesaron todas las unidades para calcular la pérdida de peso de cada lote, momento que se aprovechaba para realizar el volteo de los quesos.

9. ANALISIS DE LA TEXTURA

Se realizó con un equipo TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems) sobre queso atemperado a 20°C durante 2 horas aproximadamente, desechando la corteza y un centímetro alrededor. De cada muestra se analizaron 8 réplicas de geometría cilíndrica de 1 pulgada de diámetro y 20 mm de altura. Se determinaron los parámetros texturales³ (elasticidad, adhesividad, masticabilidad, gomosidad, cohesividad y dureza), por *Texture Profile Analysis* (TPA) test de doble compresión (Bourne, 1978). Los cilindros se comprimieron, dos veces consecutivas, con una célula de 1 pulgada de diámetro, hasta un 50% de su altura inicial a una velocidad de 60 mm/min.

Los parámetros del TPA fueron definidos por Szczesniak (1975):

- **dureza** como la fuerza máxima en la primera compresión y estaría relacionada con la fuerza al primer bocado, es una medida de fuerza ($\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$),
- **cohesividad** es la relación entre las áreas positivas del primero y segundo ciclo, y está relacionada con el grado de deformación de la muestra antes de la ruptura, es adimensional,
- **adhesividad** es la fuerza negativa tras el primer ciclo de compresión, representa el trabajo necesario para separar el alimento de la sonda tras la primera compresión y en su caso de la boca, es una medida de trabajo ($\text{kg}\cdot\text{m}^2/\text{s}^2$),
- **elasticidad** es la altura que recupera el alimento desde que acaba la primera compresión hasta que empieza la segunda en el tiempo de reposo entre los dos ciclos y, por asociación, entre los dos primeros bocados, se trata pues de una distancia (m),
- **gomosidad** se obtiene del producto dureza por cohesividad, y se refiere a la medida de la proporción en la que el alimento recupera su forma inicial tras las primeras 2-3 masticaciones, es una medida de fuerza ($\text{kg}\cdot\text{m}/\text{s}^2$),
- **masticabilidad** se obtiene del producto dureza por cohesividad y por elasticidad, e

³ *Springiness, adhesiveness, chewiness, gumminess, cohesiveness y hardness*, según Drake (1989)

intenta reflejar el tiempo necesario para mantener una muestra a fuerza constante hasta adquirir una consistencia adecuada para ser tragada. Es una medida de trabajo ($\text{kg}\cdot\text{m}^2/\text{s}^2$).

Se determinó la resistencia al corte en 8 réplicas de cada muestra de las mismas dimensiones que las utilizadas en el *TPA*, mediante una célula con un hilo de corte de 4 cm de longitud, descendiendo a 120 mm/min hasta 10 mm de profundidad. En ambos casos los cálculos se realizaron con el *software* del equipo.

10. MICROESTRUCTURA

Las cuajadas y los quesos, controles y tratados, se observaron por microscopía electrónica de barrido (MEB). Se tomaron muestras de 1mm^3 aproximadamente y se prepararon según Kiely y col. (1992) (con la variación del desengrasado y la supresión de la criofractura por imperativos técnicos) procediendo como sigue,

- **fijación:** por inmersión en solución de glutaraldehído al 3,5% en tampón de fosfato sódico (pH 7,2), durante 18 horas a 4°C. A continuación las muestras se sometieron a 4 lavados en tampón de fosfato sódico (pH 7,2),
- **deshidratación:** en soluciones de concentración creciente de etanol (10, 25, 50, 75, 90, 100% v/v) durante 10 minutos cada una,
- **desengrasado:** en cloroformo (3 cambios de 30 minutos) para volver a baño de etanol, que gradualmente se cambió a acetato de isoamilo para mejorar la siguiente etapa (deseccación en punto crítico),
- **deseccación:** en punto crítico con CO_2 líquido en un equipo Polaron.
- **montaje:** en soportes de aluminio y **metalización** con oro-paladio en equipo SEM Coating Unit E-5000 (Polaron Equipment, Ltd.),
- **examen:** en un microscopio Hitachi S-570 SEM, utilizando un voltaje de 15Kv.

10.1. IDENTIFICACION DE LAS SUSTANCIAS CRISTALINAS

Durante el estudio de MEB se observaron muestras que presentaban formaciones cristalinas, de las cuales se prosiguió el estudio preparando muestra de forma similar a las de MEB y en mayor cantidad, deteniendo el proceso en la última etapa de la deshidratación con

etanol. En este punto las muestras se desecaron en estufa a 102°C (hasta peso constante) y se molieron en mortero. Se realizó un estudio de la naturaleza de los cristales por difracción de rayos X y comparación del espectro obtenido con espectros tipo de sustancias cristalinas (JCPDS, 1991). El espectro de difracción de rayos X fue registrado en un difractor automático de polvo (Siemens D-500E) utilizando radiación de cobre monocromatizada por un cristal de grafito ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$).

11. DETERMINACION DEL COLOR

Las mediciones se realizaron con un colorímetro de superficie de esfera integradora, área de medición de 25 mm, iluminante 65D y observador 10 (Miniscan Hunterlab). Se determinaron las coordenadas *Hunter L*, *a*, *b* donde *L* representa la luminosidad desde negro (0) a blanco (100), *a* representa el color desde rojo (+) a verde (-) y *b* desde amarillo (+) a azul (-), el *software* del equipo calculó el índice de blancura *Wi E313*. Se calcularon según Hunter (1942) los índices *hue angle* $\tan^{-1}(b/a)$ referente al tono de la muestra y *chroma* $(a^2 + b^2)^{1/2}$ referente a la pureza del color por su grado de dilución con la luz blanca. Grassman (1853) postuló que *L* (luminosidad), *hue* (tono) y *chroma* (saturación) son los atributos de color de los que el ojo humano tiene percepción visual. Para comparar cuajada y queso tratados con los controles se calcularon los ΔE según Scofield (1943) ($\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$).

De dos quesos de cada lote atemperados a 20°C durante 2 horas se extrajo una cuña del tamaño de un tercio del queso. Las mediciones se realizaron en superficies lisas recién creadas, obtenidas al efectuar cortes consecutivos paralelos al plano de corte inicial. Se realizaron 16 mediciones por muestra estudiada.

12. ANALISIS SENSORIAL

Fue realizado por personal voluntario de la Facultad de Veterinaria, ampliamente familiarizado con este tipo de queso por los numerosos estudios realizados en quesos de características similares. Las muestras se presentaron en cuñas de 5 mm de grosor a temperatura ambiente. Se realizaron pruebas discriminatorias triangulares, ordenaciones hedónicas y cartas descriptivas para la calificación de atributos distribuidos en grupos: apariencia, aroma, gusto/sabor, textura en la boca y aceptabilidad general según FIL (1987) pero reduciendo el número de atributos que contempla la norma; las valoraciones se realizaron en una escala

matemática no estructurada, a la que posteriormente se adjudicó numeración de 0 a 5. Los catadores cumplieron fichas con los siguientes formatos:

Prueba discriminativa triangular:

Fecha: _____ Nombre: _____	Sexo: _____ Hora: _____
Después de examinar las tres muestras detenidamente indique la muestra que encuentre diferente de la tríada:	
códigos muestras: _____ _____ _____	código muestra diferente: _____ _____ _____
observaciones:	
Gracias por su colaboración	

Ordenación hedónica:

Nombre: _____ Fecha: _____
<p>Ordena las siguientes muestras por orden de preferencia (de mayor a menor)</p> <p>código ___ > código ___ > código ___ > código ___</p> <p>observaciones:</p> <p style="text-align: right;">Gracias por su colaboración</p>

Prueba descriptiva:

Nombre:	
Fecha:	
Código de la muestra:	
aspecto	desagradable-----excelente
color	claro-----intenso
aroma	suave-----intenso
fuerza al morder	blando-----duro
granulosidad	nula-----intensa
plasticidad	nula-----intensa
cremosidad	nula-----intensa
sabor	desagradable-----excelente
rancidez	nula-----intensa
salado	nulo-----excesivo
calificación global:	0-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10
observaciones:	
Gracias por su colaboración	

13. PLANIFICACION DE LAS EXPERIENCIAS

El trabajo se organizó en tres experiencias. La **primera** consistió en el estudio de la maduración de queso de leche de oveja cuyas cuajadas se habían sometido a las siguientes variables:

- 3 velocidades de congelación,
- 3 envases para el mantenimiento en congelación,
- 2 tiempos de mantenimiento en congelación.

Tras examinar los resultados obtenidos, para la **segunda** experiencia el estudio se centró en dos velocidades de congelación y dos tipos de envases.

Finalmente y tras seleccionar una velocidad de congelación y un envase, se planificó una **tercera** experiencia en la que se estudiaron los efectos de las fluctuaciones de la temperatura en el almacenamiento en congelación sobre la calidad del producto final.

13.1. PRIMERA EXPERIENCIA

Para esta primera experiencia se utilizaron 650 l de leche de oveja. De las cuajadas obtenidas se separaron 3 unidades que constituyeron el lote **0** o control (se salaron y pusieron a madurar sin ningún tratamiento). Las cuajadas restantes se distribuyeron en tres grupos: unas se envasaron en bolsas de polietileno (**pe**), otras al vacío (**vac**) y las restantes en atmósfera de CO₂ (**gas**). De cada tipo de envasado se congelaron cuajadas a velocidad lenta (**L**), media (**M**) y rápida (**H**), obteniendo las siguientes combinaciones:

pe L	vac L	gas L
pe M	vac M	gas M
pe H	vac H	gas H

que pasaron a mantenimiento en congelación.

Transcurridos 4 meses de almacenamiento se descongelaron la mitad de las cuajadas, constituyendo los lotes:

pe L 1 vac L 1 gas L 1

pe M 1	vac M 1	gas M 1
pe H 1	vac H 1	gas H 1

que se salaron y pusieron a madurar. Un número igual de cuajadas se reservó hasta los 10 meses en que se descongelaron, salaron y pusieron a madurar, constituyendo de igual modo los lotes:

pe L 2	vac L 2	gas L 2
pe M 2	vac M 2	gas M 2
pe H 2	vac H 2	gas H 2

De estas cuajadas y sus correspondientes quesos con 60 días de maduración se realizaron las siguientes determinaciones: extracto seco total, cenizas, grasa, proteína, **nt**, **nnc**, **nTCA**, **nFT**, cloruros, acidez de la grasa y actividad del agua. Se calcularon los índices: **g/est**, **a/esm**, **cl/a**, **nnc/nt**, **nTCA/nt** y **nFT/nt**. Se realizó el análisis sensorial de los quesos obtenidos.

En esta experiencia se tomaron dos unidades de cada lote para realizar las determinaciones analíticas por duplicado, dando un total de 4 réplicas por lote.

13.2. SEGUNDA EXPERIENCIA

A partir de 400 l de leche se elaboraron cuajadas, 6 de ellas se tomaron como lote **0** control, las restantes se dividieron en dos grupos que se envasaron en **pe** y **gas** respectivamente. De cada tipo de envasado se congelaron cuajadas a velocidad lenta (**L**) y media (**M**), obteniendo las siguientes combinaciones:

pe L	gas L	L 0
pe M	gas M	M 0

los lotes **L 0** y **M 0** corresponden a cuajadas que se descongelaron inmediatamente tras la congelación y, por tanto no se vieron afectadas por el envase ni la conservación en congelación. El resto de cuajadas se almacenaron durante 4 meses, transcurridos los cuales se descongelaron y se siguió el procedimiento descrito hasta la obtención de queso.

De las cuajadas y queso de esta experiencia se realizaron recuentos microbiológicos de mesófilos, hongos y sicrotrofos, estudios de la textura por *TPA* y resistencia al corte, de la microestructura por *MEB* y del color mediante un colorímetro de superficie, igualmente se

realizó el análisis sensorial de los quesos obtenidos.

En esta experiencia se tomaron al menos 2 unidades por lote, realizando para cada determinación el número de réplicas descrito.

13.3 TERCERA EXPERIENCIA

De las cuajadas recién salidas de prensa (obtenidas de 300 l de leche) se hicieron 5 lotes. El primero, denominado lote 0 o control, se puso a salar y madurar. El resto de cuajadas se envasaron en bolsas de polietileno y se congelaron en armario congelador a velocidad media. Una vez congelados se trasladaron a un arcón congelador a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

El 1 se mantuvo durante 4 meses en el arcón sin sufrir variaciones de temperatura. 30 días después de congelar las cuajadas los lotes 2, 3 y 4 se sometieron a 1 fluctuación de temperatura hasta -10°C en el centro térmico y se devolvieron al arcón. A los 60 días de la congelación los lotes 3 y 4 sufrieron una nueva fluctuación y vuelta al mantenimiento, mientras que a los 90 días sólo el 4 padeció una nueva oscilación. Todas las cuajadas se mantuvieron en frío hasta cumplirse 4 meses de su congelación, momento en que se descongelaron en las mismas condiciones descritas en anteriores experiencias.

Se tomaron muestras por triplicado de cada uno de los lotes de cuajadas antes de salar y se realizaron 3 repeticiones por lote de cada determinación, dando un total de 9 réplicas por lote.

En las cuajadas se realizaron las siguientes determinaciones: extracto seco total, proteína, grasa, nt, nnc, nTCA, nFT y pH, y se calcularon los índices g/est, a/esm, nnc/nt, nTCA/nt y nFT/nt. De la grasa del queso se determinaron la acidez por valoración colorimétrica, su grado de oxidación por medio del índice del ácido tiobarbitúrico y su composición en ácidos grasos totales. Se realizaron recuentos de la flora aerobia mesófila revivificable, mohos y levaduras y flora siccótrofa. Se estudió de la microestructura por MEB.

Las cuajadas descongeladas se salaron y pusieron a madurar, dando el proceso por acabado a los 60 días, momento en que se tomaron las muestras de queso siguiendo el mismo

modelo que en las cuajadas (9 réplicas por lote).

En los quesos se realizaron las siguientes determinaciones extracto seco total, **proteína, grasa, nt, nnc, nTCA, nFT, a_w y pH** se calcularon los índices **g/est, a/esm, nnc/nt, nTCA/nt y nFT/nt**. Se determinó la acidez de la grasa por valoración colorimétrica. Se midió la oxidación de las grasas determinando el índice del ácido tiobarbitúrico, y también la aptitud a la oxidación de estas grasas por un método de inducción de la oxidación (Rancimat). Se determinó la composición en ácidos grasos totales por cromatografía de gases. Se midieron los parámetros de color con un colorímetro de superficie. Se evaluaron los parámetros texturales por *TPA* y estudio de la resistencia al corte, a la vez que se realizó una prueba discriminatoria entre lotes congelados y sometidos a diferente número de oscilaciones en un panel de catadores. Se estudió su microestructura por **MEB**.

14. ESTUDIO ESTADISTICO

El estudio estadístico se realizó con el paquete SAS statistical system CARY, NC. Las comparaciones entre tratamientos control y congelados se efectuaron mediante *Anova oneway* (opción del procedimiento proc GLM) y se realizaron comparaciones pareadas de la medias con el test de Tukey. Con el fin de conseguir el objetivo del trabajo, seleccionar el proceso más ventajoso de condiciones de envasado, velocidad de congelación y tiempo de mantenimiento en congelación, se realizó un estudio de efectos principales. Se excluyeron los valores del control para no desequilibrar el modelo y se aplicó un análisis de la varianza de múltiples factores (proc GLM). Las comparaciones pareadas de las medias se realizaron con el test de Tukey y de las medias estimadas (*least square means*) por pdiff en los modelos equilibrados y no equilibrados respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de facilitar la exposición se detallan a continuación las abreviaturas y nomenclaturas utilizadas en el trabajo:

a) códigos de muestras:

0: control sin congelar,

L1: cuajada congelada a velocidad lenta y mantenida en congelación durante 4 meses y quesos obtenidos,

M1: cuajada congelada a velocidad media y mantenida en congelación durante 4 meses y quesos obtenidos,

H1: cuajada congelada a velocidad rápida y mantenida en congelación durante 4 meses y quesos obtenidos,

L2: cuajada congelada a velocidad lenta y mantenida en congelación durante 10 meses y quesos obtenidos,

M2: cuajada congelada a velocidad media y mantenida en congelación durante 10 meses y quesos obtenidos,

H2: cuajada congelada a velocidad rápida y mantenida en congelación durante 10 meses y quesos obtenidos.

gas: envasado en atmósfera de CO₂.

pe: envasado en polietileno,

vac: envasado al vacío,

b) definiciones:

Cuajada: producto intermedio de la elaboración de queso, fresco y sin salar, procedente de leche pasteurizada inoculada con fermentos lácticos, coagulada, desuerada, escurrida y prensada.

Queso: producto procedente de la cuajada salada y madurada durante 8 semanas a temperatura media de 14°C y humedad relativa del 85%.

Lote: agrupación de unidades que tienen en común envase, velocidad de congelación y tiempo de mantenimiento en congelación,

c) abreviaturas de parámetros:

a_w: actividad del agua,

a/esm: agua vs extracto seco magro,

cl/a: cloruros vs agua,

est: extracto seco total,

esm: extracto seco magro (extracto seco total menos grasa),

g/est: fracción grasa vs extracto seco total,

nFT: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico y sulfúrico,

nnc: nitrógeno no caseínico, soluble a pH 4,6,

nt: nitrógeno total,

nTCA: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético,

std: desviación estandar,

La exposición de los resultados se ha organizado en tres apartados correspondientes a las tres experiencias llevadas a cabo, en cada uno de los cuales se realiza la discusión de los mismos.

1. RESULTADOS Y DISCUSION DE LA PRIMERA EXPERIENCIA

En la primera experiencia, se decidió congelar las cuajadas frescas y sin salar en el interior de un envase, tomando como variables las condiciones de envasado, la velocidad de congelación y el tiempo de mantenimiento a baja temperatura. A continuación se exponen las razones por las que se partió de estas consideraciones:

- se congeló la cuajada fresca ya que diversos autores obtuvieron mejores resultados de la congelación sobre quesos frescos de leche de oveja que sobre madurados (Harper, 1958 y Palo y col., 1964). También en quesos de leche de vaca y cabra se recomienda congelar el queso antes de la maduración (Portman, 1970; Luquet, 1983; Jarmul y col., 1986 y Kasprak y col., 1994),
- la congelación se realizó con anterioridad al salado, pues en la literatura científica se encontraron trabajos que evidenciaban la aparición de defectos relacionados con el salado previo a la congelación (Mizev y Lazarevska, 1966 y Willart y col., 1966), si bien otros autores congelaron tras el salado obteniendo buenos resultados (Jarmul y col., 1985; Martín-Hernández y col., 1990 y Fontecha y col., 1994),
- todas las piezas se congelaron en el interior de un envase, principalmente para evitar pérdidas por deshidratación. Para ello, se estudió el envasado con cierre manual en bolsa de **polietileno** de baja densidad, por su economía y simplicidad. También se estudió el envasado al **vacío**, empleado ya por otros autores (Cervantes y col., 1983 y Fontecha y col., 1994), para el que utilizamos un envase barrera; el mismo envase fue utilizado para envasar en atmósfera de **CO₂**, puesto que Ghosh y Singh (1992a,b) pusieron de manifiesto un diferente comportamiento del queso congelado dependiendo del material y atmósfera de envasado (vacío-aire),
- se probaron 3 velocidades de congelación con la intención de emular las velocidades obtenidas por diferentes equipos de congelación: **lenta** semejante a los equipos convencionales de refrigeración por compresión (temperatura ambiente del congelador - 25°C), **media** que podría conseguirse con diversos equipos (temperatura ambiente - 54°C) y **rápida** sólo alcanzable con nitrógeno líquido (-110°C ambiente),
- se evaluaron los efectos de dos tiempos de mantenimiento en congelación (**4 y 10 meses**) para determinar la posible existencia de limitación del tiempo de conservación en congelación dentro de un intervalo lógico (inferior a un año).

La temperatura de mantenimiento en congelación ($-23 \pm 1^\circ\text{C}$) escogida está dentro del intervalo de temperaturas recomendadas para la conservación de queso en congelación (-20 a -30°C) (Alichanidis y col., 1981; Alonso y col., 1987; Martín-Hernández y col., 1990 y Buyanov y col., 1994), y a su vez es la habitual en los almacenes de alimentos congelados. Por último, las condiciones de descongelación son las recomendadas para alimentos de estructura tisular y reticular, es decir, descongelar a temperatura ligeramente superior al punto de congelación del alimento y durante todo el tiempo necesario (Tiersonnier, 1970 y Buyanov y col., 1994).

1.1. Características de la leche de oveja

Las características físico-químicas y de composición de la leche utilizada para la realización del estudio fueron:

- extracto seco total.....	17,01 %
- cenizas.....	0,92 %
- grasa.....	7,2 %
- nitrógeno total.....	0,863 %
- nitrógeno no caseínico.....	0,140 %
- nitrógeno soluble en tricloroacético	0,051 %
- nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico.....	0,040 %
- acidez Dornic.....	23°D
- densidad.....	1,035 kg/l
- pH de la leche pasteurizada.....	6,64

Estos resultados están dentro de los valores medios descritos por Juárez y col. (1984) para leche de oveja en España. Para nuestras condiciones de elaboración, el tiempo de coagulación de la leche fue de 31 minutos, valor normal para este tipo de queso según Nuñez y col. (1989).

1.2. Proceso de congelación

En las Figuras 2-4 se presentan las gráficas de registro de temperatura obtenidas al

monitorear los diferentes procesos de congelación estudiados.

El punto de congelación observado en las cuajadas estudiadas estuvo entre -1 y -2°C en su centro térmico. Al tratarse de un producto fresco sin salar este valor es más alto que los determinados en quesos madurados como el obtenido por Diefes y col. (1993) en queso Mozzarella que lo situaron entre -3 y -5°C . Tan importante como el punto de congelación es el intervalo de temperatura denominado zona crítica, intervalo de temperaturas en que se congela la mayor parte del agua (Cervantes y col., 1983 y Diefes y col. 1993), que fue de 170 ± 15 minutos en la congelación lenta, 55 ± 10 minutos en la media y 30 ± 5 minutos en la rápida, tiempos suficientemente distantes como para esperar que originen efectos diferentes en las cuajadas.

Las dimensiones de los quesos estudiados fueron de 20 cm de diámetro por 9 ± 1 cm de altura y las sondas termopares se colocaron a 2 cm de profundidad y en el centro del queso. En cada proceso se determinó el tiempo invertido en disminuir 5°C la temperatura de su centro térmico a partir del punto de congelación. Con la altura de las cuajadas y el gráfico de evolución de la temperatura en el centro térmico se calcularon las velocidades de congelación según Hori (1982), que fueron $1,4 \pm 0,2$ cm/h (L), $4,8 \pm 0,5$ cm/h (M) y $10,2 \pm 2$ cm/h (H).

La temperatura escogida como punto final de congelación fue de -25°C y la temperatura de mantenimiento de $-23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. La duración aproximada de la descongelación fue de 48 horas.

1.3. Efecto de la congelación en las cuajadas

1.3.1. Composición global

En la Tabla 2 se presentan los resultados de composición global de las cuajadas descongeladas una vez transcurridos 4 y 10 meses de mantenimiento en congelación y en la Tabla 3 los índices relativos habitualmente utilizados para facilitar las comparaciones.

El extracto seco total (est) de las cuajadas congeladas fue estadísticamente igual al del control, salvo en un caso (pe L2) que fue significativamente menor. Consideramos que el intervalo de valores obtenidos para el est de todas las cuajadas estudiadas es estrecho y, por lo

tanto, las diferencias observadas no implican cambios en las características del producto. El análisis de la varianza de los tres factores -envase, velocidad y tiempo de mantenimiento- demostró que ninguno de ellos ejerció un efecto diferenciador sobre el *est*.

El contenido en cenizas de los lotes congelados no se diferenció de forma significativa del control, a excepción de los lotes *pe L2* y *pe M2*, reducción coherente con la disminución del *est* observada. En el estudio de efectos principales, la velocidad de congelación no causó modificaciones de este parámetro. En cambio, se observó que los lotes envasados en *gas* presentaron un mayor contenido en cenizas que los restantes. Respecto al tiempo de mantenimiento se observó un mayor contenido a los 4 meses.

El contenido en grasa no se vió modificado a causa de la congelación, sólo los lotes *pe H1* y *gas L1* resultaron significativamente inferiores al control. En el índice *g/est* observamos el mismo comportamiento. Consideramos digna de mención la dificultad de separación de la grasa por el método Gerber en las cuajadas sometidas a congelación, probablemente a causa de las modificaciones en la membrana del glóbulo graso por cristalización de la grasa en congelación. De entre los efectos principales sólo el tiempo de mantenimiento resultó diferenciador, siendo los valores de grasa y *g/est* superiores a los 10 que a los 4 meses.

EL contenido en proteína de los lotes congelados, en general, fue similar al del control, excepto en 4 ocasiones en que fue significativamente inferior. La tendencia a la disminución del contenido en proteína fue observada también por Alichanidis y col. (1981) en cuajadas de queso Teleme. Envase y velocidad no ocasionaron diferencias en este parámetro, mientras que fueron superiores los valores observados a los 4 que a los 10 meses de mantenimiento.

El índice *a/esm* permaneció inalterado en todos los tratamientos respecto al control, aunque fue mayor para el envasado en polietileno, velocidad lenta de congelación y 10 meses de mantenimiento.

Así pues, según el global de nuestros resultados a los 4 meses de mantenimiento en congelación y con los envases y velocidades utilizados no se puede afirmar que haya diferencias sustanciales en la composición global de las cuajadas. A los 10 meses de mantenimiento en congelación se producirían ligeras modificaciones en algunos parámetros aunque no representan

cambios importantes. Según Lawrence y col. (1987), al exponer las características de un queso sería más correcto utilizar un intervalo de valores para cada parámetro, pues nos acerca más a la realidad de la toma de muestra, errores de método, etc. Todos los valores de los parámetros de composición global observados en este estudio estarían dentro de este intervalo. La mayor parte de trabajos sobre congelación de queso coinciden en esta apreciación, así, Alonso y col. (1987) no observaron diferencias de composición global en Cabrales congelado en armario de placas a -40°C y conservado a -20°C durante 4 y 8 meses. Martín-Hernández y col. (1988, 1990) no encontraron cambios en los parámetros de composición global debidos a la congelación para 4 tipos de queso de cabra, uno de ellos de características semejantes al nuestro, queso semiduro de mezcla de leche de vaca y cabra congelado en armario de placas a -40°C y mantenido a -20°C durante 4 meses. También Fontecha y col. (1994) obtuvieron resultados semejantes en queso semiduro de leche de oveja, congelando en armario de placas a -35°C y con nitrógeno líquido a -80°C y manteniendo en ambos casos a -20°C durante 4 meses.

Sin embargo, otros autores evidenciaron disminución del contenido de agua debida al proceso y mantenimiento en congelación. Entre ellos, Micev y Lazarevska (1966) en queso fresco de leche de oveja congelado y conservado en congelación a -17°C durante 4 meses observaron este efecto y señalaron que fue más pronunciado en queso salado antes de la congelación que tras ella. Por su parte, Alichanidis y col. (1981) en queso Teleme congelado a -40°C durante 12 horas y mantenido a -20°C durante 1, 2 y 6 meses observaron ligeras pérdidas de agua en las cuajadas descongeladas. En la misma línea, Ghosh y Singh (1991 y 1992b) en queso Mozzarella congelado entre -10 y -15°C y almacenado a la misma temperatura durante 3 meses observaron pérdida progresiva del contenido en agua con el tiempo de mantenimiento. Las pérdidas observadas en estos últimos trabajos pueden ser debidas a que la congelación se realizó a velocidad más lenta que la de nuestro estudio y las empleadas en los estudios que coinciden con nuestros resultados. Las menores temperaturas de congelación necesariamente dan lugar a una congelación muy lenta y previsiblemente, una gran alteración de la malla estructural. Resulta fundamental conocer la velocidad real de congelación para poder comparar los resultados de diferentes estudios, aunque en la mayoría de los trabajos no se especifican la velocidad utilizada ni el seguimiento de la temperatura realizado.

Las cuajadas envasadas al vacío y congelados a velocidad lenta sufrieron diversas fluctuaciones durante el mantenimiento en congelación, de modo que no se exponen los

resultados correspondientes. No se consideró procedente la repetición de las pruebas porque cualquiera de las cuajadas envasadas al vacío con el envase barrera utilizado y congeladas, independientemente de la velocidad de congelación, experimentaron cambios extremos de su superficie -desaparición de las marcas de la pleita y aspecto céreo-, modificaciones que no desaparecieron ni mejoraron con la maduración. Estos defectos llevaron a la desestimación de este tipo de envase en la siguiente experiencia.

1.3.2. Fracciones nitrogenadas: degradación proteica

En la Tabla 4 se exponen los resultados correspondientes a las fracciones nitrogenadas de las cuajadas y en la Tabla 5 sus índices. Los índices relativos expuestos en las tablas son indicadores de proteólisis más comparables que los valores absolutos de dichos parámetros, puesto que eliminan la variabilidad debida a la composición global, y por ello son utilizados por numerosos autores, entre otros Alichanidis y col. (1981), Martín-Hernández y col. (1990) y López-Fandiño y col. (1994).

Como hemos apuntado anteriormente el contenido en nitrógeno total (**nt**) y por tanto de proteína, fue significativamente menor en algunos lotes congelados, esta disminución está relacionada con el descenso del **est** observado.

Por su parte el nitrógeno no caseínico (**nnc**) no experimentó cambios a causa de la congelación, no siendo ningún lote significativamente diferente al control. El índice **nnc/nt** no se vió alterado por efecto de la congelación, no observándose diferencias entre el control y los lotes congelados. En el estudio de los efectos principales se puso en evidencia que los valores de **nnc** fueron significativamente mayores a los 10 que a los 4 meses de mantenimiento, y mayores en los envasados en polietileno. La velocidad no afectó a este parámetro.

La fracción de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (**nTCA**) fue significativamente mayor para todos los lotes congelados excepto **pe H1** y **pe M2**, también mayores pero en el límite de la significación. De igual forma, el índice **nTCA/nt** fue significativamente superior para todos excepto **pe H1**. En el análisis de la varianza de los efectos principales se pone de manifiesto que el envasado en **pe** y la velocidad lenta de congelación hicieron aumentar el valor de la fracción **nTCA** y del índice **nTCA/nt**. El tiempo de mantenimiento no mostró efecto diferenciador en el valor absoluto del **nTCA**, pero el índice **nTCA/nt** fue mayor a los 10 meses

de mantenimiento. El aumento de la fracción extraíble en ácido tricloroacético indica una mayor proteólisis en los lotes congelados, posiblemente debida a una mayor alteración de la estructura y/o liberación de enzimas microbianos por lisis causada por la congelación.

La fracción de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico y sulfúrico (**nFT**) fue significativamente superior al control en todos los lotes congelados y con 4 meses de mantenimiento, además del lote **gas L2**. En el estudio de los efectos principales, las condiciones de envasado y velocidad de congelación no afectaron en este parámetro, sí lo hizo el tiempo de mantenimiento como ya se ha comentado. Este mismo comportamiento fue observado para el índice **nFT/nt**. Aunque en principio resulta sorprendente observar que a los 4 meses los valores de **nFT** y **nFT/nt** fueran superiores al control y en cambio la mayoría de los lotes con 10 meses no fueran diferentes del control, también Ramos y col. (1987) obtuvieron contenidos en nitrógeno amínico poco coherentes. En sus estudios en queso Cabrales realizaron la determinación del nitrógeno amínico por solubilidad en ácido sulfosalicílico y obtuvieron a los 4 meses de mantenimiento valores inferiores al control mientras que a los 8 meses no fueron significativamente diferentes.

Como hemos visto, los índices de proteólisis evaluados fueron mayores en los lotes congelados que en los controles, excepto la fracción **nnc/nt** que no experimentó variaciones. El aumento de estos índices apoya la teoría de que la proteólisis no se detiene con la congelación sino que sigue aunque de forma más lenta (Jarmul y col. 1985).

Nuestros resultados están en la misma línea que los obtenidos por Martín-Hernández y col. (1990), que a los 4 meses de conservación constataron aumento de los índices de proteólisis -en queso semiduro de leche de cabra y vaca-; Ghosh y Singh (1991 y 1992b) en Mozzarella (de leche de búfala) observaron además que este efecto se dió por igual con independencia del envase utilizado. Los mismos resultados obtuvieron Kasprzak y col. (1994) en Mozzarella (de leche de vaca). Mayoritariamente evidenciaron un aumento del **nTCA**, péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos, lo cual indica que los principales enzimas implicados en la proteólisis ocurrida en el mantenimiento en congelación fueron peptidasas microbianas (Fox, 1989).

En nuestro estudio se aprecia que la proteólisis afectó principalmente a la fracción

soluble del queso mientras que la fracción caseínica se vió poco o nada afectada puesto que su contenido permaneció prácticamente invariable. Jarmul y col. (1985) en Camembert observaron que a -27°C la actividad proteásica no estaba inhibida y sugirieron que la degradación de los péptidos de la fracción soluble se debe a la acción de exopeptidasas microbianas. Por su parte Frey y col. (1986) apuntaron que, por efecto de la congelación, los microorganismos dañados o destruidos pueden liberar sus endoenzimas al medio provocando un aumento en el nivel de aminoácidos libres, tal y como se ha observado en el presente estudio. Según Fox (1989), en el sistema proteolítico del queso las principales responsables de la formación de pequeños péptidos y aminoácidos libres (fracciones nTCA y nFT) son las proteasas y peptidasas - mayoritariamente intracelulares- de los cultivos iniciadores. En cambio su contribución sería escasa para la formación de péptidos de gran tamaño, y por ello su acción no se vería reflejada en un aumento de la fracción nnc.

1.3.3. Acidez de la grasa

En la Tabla 6 se presenta la acidez de la grasa de las cuajadas congeladas.

Tabla 6. Acidez de la grasa de cuajadas control y congeladas

		acidez (mg KOH/g grasa)			
		media	std		
control		9,58	1,04		
		4 meses mantenimiento		10 meses mantenimiento	
pe	L	10,83	0,43	9,83	0,05
	M	11,47	1,25	9,44	1,03
	H	10,54	1,81	9,15	0,35
vacío					
	L				
	M	10,85	0,90	8,88	0,71
	H	10,48	0,58	8,57	0,39
gas					
	L	11,45	0,23	9,61	0,59
	M	11,11	0,91	9,41	0,52
	H	10,58	0,51	9,15	0,12

— $p < 0,05$

La acidez de la grasa no se vió afectada a causa de la congelación, excepto para los lotes **gas L1**, **gas M1** y **gas H1**, cuyos valores fueron significativamente superiores al control. En el estudio de efectos principales, mediante análisis de la varianza, el envasado con **gas** y la conservación de las cuajadas durante 4 meses dieron valores significativamente superiores a las restantes opciones. La velocidad de congelación no influyó sobre la acidez de la grasa de las cuajadas.

Las diferencias observadas fueron leves y no conllevaron modificación alguna de las características organolépticas como expondremos más adelante. Por lo tanto, consideramos que el grado de lipólisis no se vió afectado a causa de los tratamientos aplicados. Coincidiendo con nuestros resultados, Portman y col., 1969 en queso fresco de cabra; Alonso y col., 1987a en Cabrales y Martín-Hernández y col., 1988 en queso semiduro de mezcla (con condiciones de maduración semejantes al nuestro) evidenciaron que el grado de lipólisis no se afectaba para periodos de mantenimiento en congelación inferiores a 8 meses. En cambio, otros autores estudiando quesos de maduración fúngica observaron que la acidez de la grasa aumentaba a causa de la congelación, Ottogalli y col. (1972); Jarmul y col. (1985) en Camembert y Martín-Hernández y col. (1990) en queso de cabra con flora superficial. Swartling (1968) y Lück (1977) argumentan que pueden darse modificaciones en las grasas por las alteraciones que el glóbulo graso padece a causa de la cristalización de la grasa a baja temperatura.

1.3.4. Actividad del agua

Como se indicó en el capítulo de Material y métodos se utilizaron dos métodos para la determinación de la actividad del agua (a_w), la razón de ello fue la dificultad manifiesta de realizar determinaciones de la a_w para valores que oscilan entre 0,980 y 1,000 (Fett, 1973 y Marcos y col., 1985). Al método gravimétrico se le otorga mayor credibilidad frente al higrómetro eléctrico que es un método automático que según Fett (1973) para valores de $a_w > 0,900$ presentaba una precisión máxima de $\pm 0,01$ (su estudio hace referencia a los primeros sensores, cuyas prestaciones se han ido mejorando) y en ocasiones presenta problemas de saturación de agua en el sensor. A continuación, en la Tabla 6 se presenta la actividad del agua de las cuajadas según ambos métodos.

Tomando como valores de referencia los obtenidos por el método gravimétrico se observó que la a_w de las cuajadas congeladas en algunos lotes permaneció inalterada y en otros disminuyó de forma significativa respecto al control. Tras el análisis de la varianza de los factores envase, velocidad y tiempo de mantenimiento, observamos que estos no ejercieron un efecto apreciable en este parámetro. El descenso observado en la a_w es coherente con el aumento de la proteólisis causado por la congelación, puesto que las fracciones nitrogenadas ejercen una gran influencia en la a_w de cuajadas y quesos (Marcos y col., 1981).

1.4. Evolución de peso durante la maduración

En las Figuras 5, 6 y 7 se presentan las curvas de pérdida de peso del queso a lo largo de la maduración, procedentes de las cuajadas envasadas en polietileno, al vacío y en atmósfera de CO_2 respectivamente.

En la Figura 5 se observan pocas diferencias entre los lotes congelados y el control, aunque en general los congelados presentan pérdidas de peso ligeramente superiores, siendo mayores para la congelación lenta y rápida que para la media, que incluso a los 10 meses de mantenimiento en congelación experimenta menores pérdidas que el control. Estas ligeras diferencias resultan fácilmente explicables por los cambios que se producen en la microestructura del queso por el proceso de congelación y que serán expuestos más adelante.

En la Figura 6 se aprecian diferencias de pérdida de peso final entre los lotes congelados y el control, excepto para el lote M1 que iguala la pérdida de peso del control. El efecto global observado fue el mismo para ambos tiempos de mantenimiento en congelación. En especial los lotes congelados a velocidad rápida experimentaron pérdidas mayores debidas a las grietas producidas por la congelación, defecto que como expondremos más adelante supuso la eliminación de este nivel de variable del estudio.

De la Figura 7 deducimos que al envasar en atmósfera de CO_2 las pérdidas de peso son similares entre el lote control y los congelados a velocidad lenta y media. Sin embargo el lote de congelación rápida presenta diferencias mucho mayores por la gran formación de grietas en estas unidades. En general, todos los lotes de este grupo presentan un menor porcentaje de pérdida de peso que los anteriores y el mismo comportamiento para ambos tiempos de

mantenimiento.

En general, si se escoge una velocidad de congelación entre la lenta y media del presente estudio, el proceso de congelación no implica una mayor deshidratación y por tanto pérdida de peso respecto a la elaboración clásica de queso. Los resultados obtenidos para el extracto seco total de los diferentes lotes corroboran estas observaciones como se expondrá más adelante.

1.5. Efecto en los quesos procedentes de cuajadas congeladas

1.5.1. Composición global

En la Tabla 8 se presentan los resultados de composición global de los quesos procedentes de cuajadas congeladas y en la Tabla 9 los índices relativos de los datos de composición. En ellas se puede apreciar que no figuran los resultados correspondientes a los lotes **L1**, **L2** del grupo envasado al vacío por la razón anteriormente expuesta, ni los lotes **H2** al vacío y **H1**, **H2** del grupo envasado en atmósfera de CO₂ debido a que las grandes grietas que presentaban las cuajadas originales por efecto de la congelación resultaron imposibles de subsanar durante la maduración dando lugar a un producto inaceptable.

La maduración conlleva deshidratación progresiva del queso y, en consecuencia, concentración de sus componentes. Para valorar los cambios ocurridos durante la maduración se ejecutó el procedimiento *Anova oneway* sobre los lotes de cuajada y queso control. Todos los parámetros de composición global del queso aumentaron de forma significativa respecto a las cuajadas, también lo hicieron sus índices relativos excepto *g/est* y *a/esm* que disminuyeron por la maduración. Los resultados obtenidos para el queso estudiado coinciden con los descritos por Marcos y col. (1985) para queso Manchego de leche pura de oveja.

El contenido en extracto seco total no experimentó variaciones en gran parte de los quesos procedentes de cuajadas congeladas, aunque algunos lotes resultaron significativamente inferiores al control. En cuanto a la influencia de los efectos principales, los envasados en **pe** presentaron valores significativamente inferiores a los restantes. La velocidad de congelación no mostró efecto diferenciador. Los valores de *est* fueron superiores a los 4 meses de mantenimiento.

El mayor contenido en agua observado en algunos quesos procedentes de cuajadas congeladas ha sido apreciado por otros autores y explicado por Jarmul y col. (1985) como consecuencia del aumento de la porosidad de la estructura debido a la congelación. Esto facilitaría la deshidratación de la corteza en las primeras etapas de la maduración dificultando la posterior evaporación de agua procedente del interior del queso. Esto es así pese a que la evolución de la pérdida de peso no mostró una tendencia ascendente en los lotes congelados, lo que se explica porque en el estudio de la evolución se refleja el peso total de la unidad y en cambio en la determinación del extracto seco las muestras fueron tomadas de la parte comestible del queso desechando la corteza que en algunos casos estaba aumentada debido a las grietas formadas.

El contenido en cenizas no se vió afectado por los tratamientos aplicados, tan sólo un lote fue significativamente superior al control. Tras el análisis de la varianza de los factores envasado, velocidad de congelación y tiempo de mantenimiento observamos que no causaron modificaciones en las cenizas.

El contenido en grasa disminuyó en todos los lotes, pero sólo en seis casos se observaron valores significativamente inferiores al control. Este descenso es coherente con la disminución del *est* observada y en parte puede ser debido a la dificultad ya expuesta para la determinación de la grasa por el método Gerber. El índice *g/est* no fue diferente del control en ninguno de los tratamientos estudiados. Envase, velocidad y tiempo de mantenimiento no causaron modificaciones en el contenido en grasa ni en el índice *g/est*.

El contenido en proteína permaneció invariable para los tratamientos aplicados, a excepción de los lotes **gas L1** y **gas M1** con valores significativamente mayores al control. En el estudio de los efectos principales observamos que ninguno de ellos afectó de forma significativa en este componente.

El índice *a/esm* permaneció inalterado en la mayor parte de lotes, excepto: **pe L2**, **pe M2**, **pe H2** y **gas M2**, que mostraron valores significativamente superiores. En su mayoría se corresponden con los lotes que mostraron un descenso significativo del *est*. En el estudio de los efectos principales observamos que el envasado en **pe** y la conservación durante 10 meses provocaron un aumento en el índice *a/esm*. La velocidad de congelación no afectó de forma

significativa.

El contenido en cloruros de los diversos lotes no se diferenció del control de forma significativa, aunque se observó una tendencia al aumento a los 10 meses de mantenimiento en congelación, puesto de manifiesto posteriormente en el estudio de los efectos principales según el cual el tiempo de mantenimiento fue el único efecto diferenciador. El origen de esta mayor incorporación de sal puede deberse a la alteración que se produce en la microestructura del queso por efecto de la congelación, que sería mayor conforme aumenta el tiempo de mantenimiento y facilitaría la absorción de la salmuera. Las alteraciones microestructurales serán tratadas más adelante. La relación cloruros en agua (cl/a) no se vió alterada por los tratamientos aplicados, ni por ninguno de los efectos principales.

La mayor parte de trabajos sobre congelación de cuajada o queso coinciden en que la congelación no produce modificaciones de la composición global debidas a la congelación (Richards, 1966; Alonso y col. 1987a,b; Ramos y col. 1987 y Martín-Hernández y col., 1988). En nuestro estudio se encontró un mayor contenido en agua en algunos quesos al igual que Jarmul y col. (1985) ya habían descrito en Camembert. Como ya se ha indicado, este cambio no implica alteración alguna de las características de composición y calidad propias de este queso como se detallará en el apartado de análisis sensorial. Fontecha y col. (1994) observaron el mismo efecto en queso de las mismas características que el de nuestro estudio, puntualizando que a partir de los 90 días de maduración este mayor contenido en agua desaparecía e incluso el extracto seco aumentaba.

En cambio, otros autores observaron el efecto contrario. Así, Micev y Lazarevska (1966) en queso blando, Alichanidis y col. (1981) en queso duro de mezcla y Ghosh y Singh (1991, 1992a,b) en Mozzarella apuntaron que los quesos procedentes de cuajadas congeladas experimentaron una pérdida de humedad mayor que los controles, con el consiguiente efecto de concentración de los componentes principales. Estas diferencias de apreciación pueden ser debidas al grado de maduración y a los diferentes tipos y formatos de los quesos estudiados, que pueden dificultar en mayor o menor medida la deshidratación, así como los procesos de congelación utilizados.

1.5.2. Fracciones nitrogenadas: degradación proteica

En las Tablas 10 y 11 se presentan las fracciones nitrogenadas de los quesos y sus índices relativos.

La maduración ocasiona un aumento de las fracciones nitrogenadas (**nnc**, **nTCA** y **nFT**) a causa de los fenómenos proteolíticos que se producen, bien sea por acción de los enzimas coagulantes o a causa de los enzimas microbianos. Los índices relativos indicadores de proteolisis (**nnc/nt**, **nTCA/nt** y **nFT/nt**) aumentaron por efecto de la maduración. Los valores obtenidos para el índice **nnc/nt** en el queso con 60 días de maduración son coincidentes con los obtenidos por Ramos y Martínez-Castro (1976) en queso Manchego y los valores de **nTCA/nt** y **nFT/nt** con los de Fernández-García y col. (1993) también en Manchego, siendo ligeramente inferiores a los de Fontecha y col. (1994) en queso semiduro de leche de oveja.

La fracción **nnc** fue superior al control en todos los quesos procedentes de cuajadas congeladas, aunque sólo fue estadísticamente significativo en 6 ocasiones. El mismo comportamiento se observó para el índice **nnc/nt**. Los efectos envase y tiempo de mantenimiento afectaron de forma significativa: los valores de los lotes envasados en **vac** fueron superiores a los envasados en **pe** y ambos, a su vez, que **gas**; el contenido en **nnc** fue mayor a los 4 que a los 10 meses de mantenimiento.

La fracción **nTCA**, al igual que el índice **nTCA/nt** fue significativamente mayor al control en todos los lotes procedentes de cuajadas congeladas. Mientras que el valor absoluto sólo se vio afectado por el tiempo de mantenimiento, no fue así para el índice **nTCA/nt** que también experimentó variaciones a causa del envase, presentando los envasados en **pe** valores superiores al **vac** y ambos superiores que **gas**. Ambos parámetros fueron mayores en los lotes con 4 que con 10 meses de mantenimiento.

Todos los tratamientos estudiados dieron valores de **nFT** y del índice **nFT/nt** superiores al control. De entre los efectos principales sólo el tiempo de mantenimiento afectó de forma significativa, de manera que los valores obtenidos a los 4 fueron superiores.

Es evidente que el proceso de congelación afectó de forma estadísticamente significativa a la proteolisis, siendo los valores de las fracciones nitrogenadas significativamente superiores en quesos procedentes de cuajadas congeladas. Las condiciones de envasado afectaron de forma

diferente a las fracciones nitrogenadas según se ha comentado, por tanto, no podemos considerar que ninguno de los envasados utilizados sea determinante en la proteólisis. La velocidad de congelación no influyó en las fracciones nitrogenadas.

El tiempo de mantenimiento en congelación de las cuajadas tuvo una influencia marcada en la proteólisis de los quesos obtenidos; así los quesos procedentes de cuajadas mantenidas durante 4 meses presentaron mayor proteólisis que los de 10 meses. Este efecto fue descrito por Alichanidis y col. (1981) en Teleme y propusieron como explicación que los cambios ocurridos en la estructura proteica a causa de la conservación prolongada incapacitarían a la caseína para ser hidrolizada rápidamente. La hidrólisis ocurrida hasta los 60 días de maduración -momento del análisis- tan sólo habría dado lugar a péptidos de peso molecular elevado e insolubles a pH 4,6. Según Fennema y col. (1973), a causa de la congelación, las proteínas podrían compactarse o interaccionar irreversiblemente por puentes disulfuro por la exposición a las soluciones supersaturadas que quedan sin congelar. Debido a que cuanto mayor es el tiempo de almacenamiento en congelación mayor es la exposición a estas soluciones podría justificarse la menor proteólisis observada en los quesos procedentes de cuajadas almacenadas durante 10 que tras 4 meses.

En general, la mayor parte de trabajos sobre congelación de queso coinciden en señalar un aumento de la proteólisis, entre ellos, Pejic y col. (1964), Kral (1965), Micev y Lazarevska (1966) en queso blando, Alichanidis y col. (1981) en Teleme, Jarmul y col. (1985) en Camembert, Martín-Hernández y col. (1988,1990) y Fontecha y col. (1994) en quesos duros y semiduros y Kasprzak y col. (1994) en Mozzarella. Por el contrario, Alonso y col. (1987a) y Ramos y col. (1987) en Cabrales observaron un descenso de la proteólisis en quesos procedentes de cuajadas congeladas, que explican por una diferente interacción de la flora fúngica con el sustrato modificado por la congelación. En estos estudios sobre Cabrales, comparando tiempos de mantenimiento de 4 y 8 meses constataron niveles de proteólisis mayores a los 8 meses. Dichos autores argumentaron que se habría dado una mayor liberación de enzimas microbianos al medio que facilitarían la proteólisis. Dichos resultados contrastan con los obtenidos en nuestro estudio aunque las características de los quesos estudiados son muy diferentes y por ello poco comparables.

El aumento en los índices de proteólisis, aunque importante, no fue apreciado por los

catadores, tal y como expondremos en el apartado de análisis sensorial.

1.5.3. Acidez de la grasa

En la Tabla 12 se detalla la acidez de la grasa de los quesos. Los resultados obtenidos para nuestro queso son coincidentes con los descritos por Marcos y col., (1985) para queso Manchego de leche de oveja. La acidez de la grasa no sufrió modificaciones importantes a causa de la congelación, excepto para algunos lotes en que resultó significativamente superior (vac M1, vac H1, gas L1, gas M1 y vac M2). En el estudio de los efectos principales observamos que envasado y velocidad de congelación no afectaron de forma significativa, en cambio el tiempo de conservación originó diferencias apreciando mayor acidez a los 4 meses. El aumento de acidez observado en algunos lotes no implica cambios apreciables en las características organolépticas del queso como expondremos más adelante.

También Martín-Hernández y col. (1988,1990) en quesos semiduros de leche de cabra y mezcla no observaron diferencias en el grado de lipólisis por la congelación. En cambio, estudios realizados en queso blando con flora fúngica superficial apuntan aumento de la acidez de la grasa a causa de la congelación (Jarmul y col., 1985 y Martín-Hernández y col., 1990).

Consideramos que en el queso estudiado, al igual que los quesos de pasta dura, el proceso de lipólisis es lento y el contenido en ácidos grasos libres es bajo y no es por lo tanto buen indicador de maduración (Ramos y Martínez-Castro, 1976). Como ejemplo, Fernández-García y col. (1994) en queso Manchego observaron que el efecto de la liberación de ácidos grasos en el desarrollo de aromas era muy inferior al de aminoácidos.

Tabla 12. Acidez de la grasa del queso

		acidez (mg KOH/g grasa)			
		media	std		
control		8,41	0,33		
		4 meses mantenimiento		10 meses mantenimiento	
pe	L	8,75	0,15	9,27	1,83
	M	8,05	0,56	8,54	0,41
	H	7,66	2,22	9,52	0,27
vacío	L				
	M	12,74	0,58	9,92	0,21
	H	12,57	0,46		
gas	L	13,48	1,26	9,36	0,44
	M	10,56	1,07	9,01	0,58
	H				

— $p < 0,05$

1.5.4. Actividad del agua

En la Tabla 13 se presentan los resultados de la a_w determinada por el método gravimétrico y por higrómetro eléctrico.

La a_w de todos los quesos madurados se situó en el intervalo 0,930-0,956, dentro de los valores descritos por Marcos y col. (1985) para queso Manchego. Los resultados obtenidos por el método gravimétrico y por *Novasina* no fueron significativamente diferentes.

Es sabido que a causa de la maduración la a_w disminuye, a lo que contribuyen principalmente el salado, la deshidratación y la intensidad de la proteólisis que hacen disminuir el agua disponible, como ha quedado patente en nuestro estudio.

Se observó una tendencia al descenso de la a_w en los quesos procedentes de cuajadas

congeladas, aunque no todos los lotes mostraron valores significativamente diferentes al control. En el estudio de los efectos principales observamos que no se podían atribuir diferencias a las condiciones de envasado, en cambio las velocidades lenta y media obtuvieron valores de a_w inferiores a la rápida, y el mantenimiento durante 4 meses valores menores que a los 10.

El descenso apreciado en la a_w puede explicarse por la mayor proteolisis observada en los lotes procedentes de cuajadas congeladas, puesto que los productos originados por la proteolisis provocan un descenso en los valores de la a_w (Marcos y col., 1981). Nuestros resultados coinciden con Fontecha y col. (1994) que encontraron disminución de la actividad del agua en los quesos tratados, atribuida igualmente a la mayor proteolisis.

Tabla 13. Actividad del agua del queso control y procedente de cuajadas congeladas

		a _w			
control		0,951(0,96)	0,948		
		4 meses mantenimiento gravim Novasina		10 meses mantenimiento gravim Novasina	
pe	L	0,936(0,82)	0,927	0,942(0,93)	0,939
	M	0,943(0,90)	0,939	0,953(0,96)	0,946
	H	0,950(0,98)	0,935	0,951(0,82)	0,942
vacío	L				
	M	0,938(0,78)	0,931	0,942(0,74)	0,938
	H	0,949(0,87)	0,931		
gas	L	0,939(0,92)	0,933	0,948(0,89)	0,939
	M	0,939(0,97)	0,931	0,953(0,98)	0,949
	H				

coeficiente de correlación r^2 entre paréntesis

las determinaciones realizadas en *Novasina* están sujetas a una variación de $\pm 0,001$

1.5.5. Características organolépticas

Dada la elevada cantidad de muestras coincidentes en el tiempo y para simplificar el trabajo de los catadores planteamos el estudio ordenado de la siguiente forma:

a) prueba descriptiva del queso control (Tabla 14),

b) prueba discriminatoria triangular en que se enfrentó el lote control a cada una de las velocidades de congelación, tomando quesos procedentes de cuajadas congeladas e inmediatamente descongeladas. En este caso, al igual que en el siguiente no pudo valorarse el efecto del mantenimiento en congelación pero se realizó como prueba orientativa debido a la diferencia en el tiempo entre quesos control y conservados en congelación,

0 vs L: 13 aciertos/ 23 catadores

0 vs M: 15 aciertos/ 23 catadores

0 vs H: 12 aciertos/ 23 catadores

el resultado fue de 2/3 de aciertos aproximadamente, por lo que postulamos que fue difícil para los catadores diferenciar controles de quesos procedentes de cuajadas congeladas e inmediatamente descongeladas.

c) ordenación hedónica: control frente a congelados e inmediatamente descongelados a las velocidades L, M y H.

	1ª posición	2ª posición	3ª posición	4ª posición
queso control	1/28	4/28	6/28	18/28
queso L	10/28	8/28	8/28	2/28
queso M	8/29	7/28	9/28	4/28
queso H	9/28	9/28	5/28	4/28

Como puede deducirse de los resultados de la prueba triangular los quesos de lotes congelados ocuparon las mismas posiciones con probabilidades semejantes, en cambio el queso control fue menos apreciado por los catadores. Al igual que en la prueba anterior estos resultados son meramente indicativos puesto que no valoran el efecto del mantenimiento en congelación.

Cuando se dispuso del queso procedente de cuajadas conservadas durante 4 meses:

d) pruebas triangulares para establecer posibles diferencias debidas a la velocidad de congelación (dentro de cada tipo de envasado),

L vs M: 6 aciertos/ 10 catadores

L vs H: 5 aciertos/ 10 catadores

M vs H: 4 aciertos/ 10 catadores

observamos un 50% aproximadamente de aciertos al establecer diferencias entre velocidades de congelación para las mismas condiciones de envasado, en este caso se había escogido el envasado en gas.

e) pruebas triangulares de comparación de las diversas condiciones de envasado para la misma velocidad de congelación (M),

pe vs gas

pe vs vac

vac vs gas: 5 aciertos/ 10 catadores

se observó la misma capacidad de discriminación entre velocidades de congelación que entre condiciones de envasado (50%)

f) con la finalidad de simplificar el trabajo de los catadores seleccionamos los siguientes lotes para realizar la prueba descriptiva: **pe M1, vac M1, vac H1 y gas M1**, cuyos resultados se exponen en la Tabla 14.

Con el queso de cuajadas conservadas durante 10 meses:

g) triangular para observar diferencias entre velocidades de congelación, no se consideró la velocidad H por las alteraciones que presentaron

L vs M: 2 aciertos/13 catadores

h) ordenación hedónica entre quesos con las diversas condiciones de envasado ensayadas,

	1ª posición	2ª posición	3ª posición
queso pe	6/14	4/14	4/14
queso vac	3/14	5/14	6/14
queso gas	5/14	6/14	4/14

a partir de ella se deduce la gran similitud existente cuando la variable que se compara es el

envase.

i) los lotes seleccionados para realizar la calificación global fueron: **gas L1** y **gas M1** (Tabla 14).

En la Tabla 14 se exponen los resultados de la calificación por atributos (puntuados de 0 a 5) de los quesos anteriormente citados. Como puede observarse tras el estudio estadístico *anova oneway* y comparación de medias no se encontraron diferencias significativas entre los lotes estudiados (ni respecto al control ni entre congelados) para ninguno de los atributos calificados. Al evaluar el efecto producido por las condiciones de envasado, velocidad y tiempo de conservación observamos que ninguno de ellos afectó de forma significativa a estos atributos.

Si consideramos las variaciones del contenido en agua y el aumento de los indicadores de proteolisis observados en lotes procedentes de cuajadas congeladas y la ausencia de diferencias significativas entre los atributos donde podrían verse reflejados (fuerza al morder, aroma y sabor) podemos afirmar que las diferencias observadas en la composición y fracciones nitrogenadas no conllevaron cambios en las características organolépticas del queso. La evaluación sensorial de los quesos correspondientes a la primera experiencia pone de manifiesto el buen mantenimiento de las características propias del queso pese al proceso de congelación sufrido.

2. RESULTADOS Y DISCUSION DE LA SEGUNDA EXPERIENCIA

Como consecuencia de los resultados obtenidos en la primera experiencia se prosiguió el estudio reduciendo los niveles de variable de estudio. Se escogieron las condiciones de envasado en polietileno y en atmósfera de CO₂ y quedó eliminado el envasado al vacío por los cambios de aspecto provocados. Se mantuvieron las velocidades de congelación lenta y media, pues la rápida utilizada en la primera experiencia provocó grietas importantes en las cuajadas.

En esta ocasión y en los parámetros en que fue posible se compararon las cuajadas control con cuajadas congeladas e inmediatamente descongeladas para evaluar el efecto de la congelación propiamente dicha y posteriormente con las conservadas en frío durante 4 meses en que los posibles cambios pueden ser debidos al proceso y/o mantenimiento.

2.1.Efecto de la congelación sobre los recuentos microbianos en las cuajadas

En la Tabla 15 se presentan los recuentos de flora mesófila, fúngica y sicrótrofa de los lotes de cuajadas estudiados.

La flora mesófila de las cuajadas se vió afectada por los tratamientos estudiados, observándose una reducción significativa de los recuentos de viables en todos los lotes congelados. La congelación a velocidad media dió lugar a recuentos significativamente menores que la lenta. Por otra parte la reducción de la flora mesófila fue mayor en los lotes envasados en polietileno que en los envasados en atmósfera de CO₂. Este hecho podría explicarse por el efecto protector del frío que ejerce el envasado en ausencia de oxígeno y que fue descrito por Speck y Ray (1977). El descenso en el recuento de flora aerobia mesófila revivificable en cuajadas congeladas fue observado también por Richards (1966), Alichanidis y col. (1981), Mor-Mur (1991) y Fontecha y col. (1994), mientras que Casla y col. (1995) en cuajadas de leche de oveja no apreciaron que la viabilidad de la flora microbiana se viera afectada.

En cuanto a la flora fúngica de las cuajadas congeladas encontramos que en la mayoría de los casos no se detectó crecimiento. Con el método utilizado no podemos detectar crecimiento fúngico por debajo de 100 UFC/g, puesto que se extienden en superficie 0,1 ml de la dilución 10⁻¹. No hay que olvidar que las muestras fueron tomadas del interior y que ya las

cuajadas control presentaron valores muy bajos de forma que en algunas placas no había crecimiento. Estas razones pueden explicar el hecho de que para 3 lotes de cuajadas congeladas estuviéramos por debajo del límite de detección y no pudieramos valorar la presencia de flora fúngica. En el único lote de cuajadas en que se obtuvo algún crecimiento (pe M), los recuentos no se distinguieron de los observados para las cuajadas control. Evidentemente para el resto de lotes las diferencias con el control fueron significativas. Alichanidis y col. (1981) y Mor-Mur (1991) observaron descenso importante de viabilidad de la flora fúngica.

Las condiciones de envasado influyeron significativamente en los recuentos de flora sicrótrofa, siendo en las cuajadas envasadas en pe menores que en gas y en el lote control; no así la velocidad de congelación. La lectura de estos resultados fue muy dudosa: a los 10 días se obtenía un punteado fino que en ocasiones era imperceptible, si tras la incubación a 7°C durante 10 días las placas se incubaban a 30°C durante 3 días las colonias antes observadas con dificultad ofrecían el mismo aspecto que las observadas en el recuento de mesófilos.

2.2. Efecto de la congelación sobre los recuentos microbianos en los quesos

En la Tabla 16 se presentan los recuentos de flora mesófila, fúngica y sicrótrofa de los quesos. El proceso de maduración origina una reducción paulatina en la población microbiana, debido principalmente al descenso en la a_w ocasionado por la deshidratación y la formación de productos de proteolisis.

Los quesos procedentes de cuajadas congeladas evolucionaron de igual forma que los controles: a los 60 días de maduración, los recuentos de flora mesófila de los lotes tratados no presentaron diferencias respecto al control, excepto el lote pe M. El sistema de envasado previo y la velocidad no tuvieron un efecto significativo en este parámetro. En general, nuestros resultados coinciden con Fontecha y col. (1994), que observaron que la evolución de la flora fue semejante en controles y congelados y aunque los recuentos finales de los congelados fueron levemente inferiores esta diferencia no fue significativa, y no ocasionó variación alguna en la transformación de la cuajada en queso. Coincidiendo también con nuestros resultados, Mor-Mur (1991) y Valle y col. (1992) obtuvieron tras la maduración recuentos semejantes para controles y congelados.

La flora fúngica de los quesos no se vió afectada por los tratamientos aplicados. Las condiciones de envasado determinaron que los quesos previamente envasados en **pe** obtuvieran recuentos inferiores a los de **gas**. La velocidad de congelación no tuvo influencia. La presencia de flora fúngica fue baja incluso en los controles, y al igual que sucediera para las cuajadas los valores obtenidos se situaron en el límite de detección, hecho a considerar al interpretar los resultados. Además en todos los lotes hubo alguna placa en la que el recuento fue nulo. La toma de muestra fue siempre del interior del queso y aunque en él no se observa claramente un descenso de la flora fúngica, el aspecto externo de la superficie de los quesos procedentes de cuajadas congeladas en ningún caso presentó un desarrollo fúngico equiparable al de los controles que maduraron normalmente.

Al igual que para la flora mesófila, los recuentos obtenidos para la flora sicrótrofa fueron también menores que en las cuajadas. Ninguno de los tratamientos aplicados produjo resultados significativamente diferentes al control. Envasado previo y velocidad de congelación no causaron variaciones en la evolución ni recuentos de sicrótrofos.

2.3. Efecto de la congelación en la textura de la cuajada

2.3.1 Texture Profile Analysis (TPA)

En la Tabla 17 se exponen los resultados del *TPA* de las cuajadas, distinguiéndose entre cuajadas control, congeladas e inmediatamente descongeladas y congeladas y almacenadas 4 meses en congelación.

Como se ha descrito anteriormente, el *TPA* es un estudio de doble compresión en que a partir de las áreas descritas en el sistema de coordenadas fuerza vs tiempo obtenemos una serie de parámetros indicadores de las características texturales.

Se observó un descenso significativo de los valores de dureza en todos los lotes congelados a velocidad lenta respecto al control (**L 0**, **gas L** y **pe L**), probablemente debido a la mayor desorganización observada en el estudio microestructural que los haría más quebradizos. El mantenimiento en congelación y el sistema de envasado no afectaron.

La elasticidad no experimentó variaciones respecto al control a causa del proceso de

congelación, excepto el lote **gas L** que fue significativamente inferior. No se observaron diferencias entre los lotes inmediatamente descongelados y los conservados durante 4 meses. En el estudio de efectos principales se observó que las condiciones de envasado no tuvieron influencia, pero sí la velocidad de congelación, siendo la elasticidad de la lenta significativamente menor.

Respecto a la cohesividad, observamos que el hecho de congelar (sólo descenso de temperatura) da lugar a valores marcadamente inferiores que los del control. También son significativamente menores, aunque menos intensamente los de las cuajadas congeladas a velocidad lenta y conservadas durante 4 meses, mientras que las congeladas a velocidad media no presentaban diferencias. Por lo tanto, globalmente las modificaciones sufridas durante la conservación en congelación, un probable aumento de la rigidez de la estructura proteica, conducen a una recuperación de los valores de cohesividad. El envasado no ejerció efecto diferenciador.

Como era de esperar vistos los resultados de dureza y cohesividad, la gomosidad disminuyó respecto al control de forma significativa en los lotes **L 0** y **pe L**; el lote **gas L**, aunque menor, quedó en el límite de la significación. La conservación y el envasado no ocasionaron variaciones y la velocidad lenta dió lugar a valores significativamente inferiores. Dada su dependencia, la masticabilidad mostró el mismo comportamiento que la gomosidad.

La adhesividad obtenida para este producto fue baja como puede verse en los valores de la Tabla 17; es por ello que pequeñas variaciones representaron grandes desviaciones estándar. Estos resultados son lógicos dadas las características de las cuajadas que no se caracterizan por su adhesividad. Tan sólo el lote **pe M** resultó significativamente inferior al control, aunque sin valor aparente dadas las grandes desviaciones. Conservación, envasado y velocidad de congelación no ejercieron efecto alguno sobre este parámetro.

La mayoría de los cambios ocurridos en la textura de las cuajadas se producen por el propio proceso de congelación, puesto que no se han observado diferencias entre cuajadas congeladas e inmediatamente descongeladas y las mantenidas durante 4 meses. Sólo la cohesividad mostró valores significativamente menores para las cuajadas no almacenadas en congelación. En general, las cuajadas congeladas a velocidad media no presentaron diferencia

alguna respecto al control, y las congeladas a velocidad lenta dieron valores inferiores de los parámetros texturales.

2.3.2. Resistencia al corte

Los valores obtenidos en el estudio de la resistencia al corte se presentan en la Tabla 18. La fuerza máxima de corte no se vió afectada por los tratamientos aplicados, sólo resultó significativamente diferente del control para los lotes M 0 y pe L (superior e inferior respectivamente). Dada la incoherencia de estas desviaciones, no relacionadas con los factores estudiados, asumimos que estas diferencias están dentro de la variabilidad normal de estas cuajadas. Ninguno de los factores influyó de forma significativa.

La fuerza media de corte no se modificó a causa de los tratamientos estudiados, salvo el lote M 0 que fue superior al control, tampoco las condiciones de envasado y velocidad de congelación afectaron significativamente. El área descrita bajo el gráfico de corte mostró el mismo comportamiento que la fuerza media.

El gradiente de la fuerza aplicada presentó una desviación estándar muy importante y no se vió afectado por los procesos ensayados. Sus variaciones se deben a que dicha fuerza presentó un comportamiento en forma de sierra, es decir que la muestra oponía resistencia continua a ser cortada. No exponemos los valores del gradiente.

2.4. Efecto de la congelación en la textura del queso

2.4.1. Texture Profile Analysis

En la Tabla 19 se presentan los parámetros del *TPA* de los quesos. En los quesos duros la maduración provoca aumento de la dureza, básicamente debido a la deshidratación y compactación de la estructura proteica (Stanley y Emmons, 1977). Comparando los resultados de las cuajadas y quesos observamos que a causa de la maduración los parámetros del *TPA* se ven afectados de la siguiente manera: dureza y adhesividad aumentan, y disminuyen en mayor o menor grado elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad.

La dureza de los quesos procedentes de cuajadas congeladas fue superior al control,

excepto el lote gas L que presentó una gran variabilidad de resultados entre réplicas y por tanto una alta desviación estándar. Las condiciones de envase y velocidad de congelación no ocasionaron cambios de dureza.

La elasticidad y cohesividad del queso no se vieron modificadas por los tratamientos aplicados. El envasado previo no condicionó la elasticidad, que sí se vio aumentada por la velocidad media. Las condiciones de envasado y velocidad no ocasionaron variaciones de cohesividad, es decir que la maduración revirtió las diferencias de cohesividad observadas a causa de la velocidad de congelación.

En consecuencia con los resultados expuestos -sobre dureza, cohesividad y elasticidad-masticabilidad y gomosidad se comportaron de igual manera: los lotes gas M, pe L y pe M mostraron valores superiores al control. No se vieron afectadas por el envase ni por la velocidad de congelación, sí por el proceso de congelación, pues ambas aumentaron en los lotes congelados.

La adhesividad, al igual que ocurriera en las cuajadas, presentó desviaciones estándar elevadas, pues es poco característica de este tipo de queso y los valores obtenidos son bajos. No se vió afectada por ninguno de los tratamientos ni efectos estudiados.

En resumen, la tendencia general observada es que la congelación provocó el aumento de los parámetros masticabilidad, gomosidad y dureza. Los efectos principales estudiados no dieron lugar a diferencias estadísticamente significativas en los parámetros del *TPA*.

2.4.2. Resistencia al corte

Los resultados del estudio de la resistencia al corte del queso con 60 días de maduración se exponen en la Tabla 20. Comparados con los de la Tabla 18, los parámetros: fuerza máxima, fuerza media y área se vieron significativamente aumentados por efecto de la maduración, hecho esperable debido a la compactación producida por la deshidratación.

Tras la congelación no se detectaron cambios en los parámetros de resistencia al corte respecto a los quesos elaborados clásicamente. Sí es destacable la alta variabilidad observada entre réplicas como se observa en las desviaciones estándar. Los efectos principales, envase y

velocidad de congelación, no mostraron efecto alguno sobre la resistencia al corte de los quesos. Respecto al gradiente de fuerza, al igual que ocurriera en las cuajadas, presentó grandes desviaciones estándar y no mostró relación con los tratamientos aplicados.

Los cambios observados en la textura de las cuajadas, donde la congelación a velocidad lenta dió lugar a valores inferiores de los parámetros texturales no se vieron reflejados en el queso madurado, pues no se pudo atribuir efecto alguno a la velocidad utilizada y no se observaron cambios en la cohesividad. Por lo tanto, la maduración iguala las modificaciones atribuidas a la velocidad pero provoca aumento de dureza, gomosidad y masticabilidad respecto al queso control, aumento que no se había observado en las cuajadas.

Los parámetros texturales son muy diferentes entre los diferentes tipos de queso, y el efecto que los tratamientos puedan tener en la textura son poco extrapolables de un queso a otro, así, por efecto de la congelación encontramos una gran disparidad de resultados en función del queso estudiado, el tiempo o grado de maduración y el método de estudio aplicado. Entre los trabajos realizados sobre Mozzarella, Ghosh y Singh (1991) utilizando el *TPA* observaron una disminución, aunque leve, de todos los parámetros texturales por efecto de la congelación, a excepción de la adhesividad que al igual que se ha visto en el presente estudio permaneció inalterada. Tunick y col. (1991), también en Mozzarella, apreciaron menor dureza, gomosidad y elasticidad, mayor cohesividad, mientras que adhesividad y masticabilidad permanecieron inalteradas. En estudios del mismo queso pero por compresión simple Cervantes y col. (1983) no encontraron diferencias significativas debidas a la congelación (es de destacar que realizaron las determinaciones texturales en frío). Kasprak y col. (1994) observaron disminución de la dureza tras la descongelación y que los cambios ocurridos en la textura se disimulaban (mejoraban) con la maduración. Resultados claramente distintos a los anteriores y también referidos a Mozzarella fueron los de Diefes y col. (1993) que observaron que con el tiempo de mantenimiento en congelación aumentaban la dureza, de forma semejante a la observada en nuestro estudio, y la elasticidad. Atribuyeron este aumento de la dureza al hecho de que las proteínas tras la descongelación serían incapaces de religar toda el agua que se habría extraído durante la congelación.

En queso semiduro de características semejantes al nuestro Martín-Hernández y col. (1988) realizando compresión simple con célula de Kramer y observaron que si bien la dureza

aumentaba por efecto de la maduración, en los lotes congelados y en contraposición con nuestros resultados el aumento fue menor que en los controles. Atribuyeron este efecto a la mayor proteolisis observada en los lotes congelados. Sin embargo, en los quesos duros un aumento de la proteolisis no implica necesariamente menor dureza puesto que son predominantes otros factores (deshidratación y compactación de la estructura), así estaríamos de acuerdo con Picón y col. (1995) que en un estudio sobre la utilización de lipasas y proteasas en queso Manchego observaron mayor dureza y elasticidad en los quesos con enzimas añadidos a pesar de su mayor proteolisis. También en nuestro estudio los lotes congelados presentaron mayor proteolisis y mayor dureza que atribuimos a la mayor compactación de la estructura.

2.5. Efecto de la congelación en el color de las cuajadas

Se han evaluado los parámetros Hunter L , a , b donde L representa la luminosidad desde negro (0) a blanco (100), a representa el color desde rojo (+) a verde (-) y b desde amarillo (+) a azul (-), así como el índice de blancura W_i calculado directamente por el equipo. Se han calculado los índices *hue angle* referente al tono de la muestra y *chroma* referente al grado de saturación del color y el diferencial ΔE para comparar congelados respecto al control.

En la Tabla 21 se presentan los resultados obtenidos para las cuajadas de esta experiencia. En este caso se comparan controles, cuajadas congeladas e inmediatamente descongeladas y cuajadas mantenidas durante 4 meses en congelación.

Los cambios ocasionados por la congelación y conservación en frío fueron prácticamente inapreciables. Tuvo lugar un ligero descenso de L , sólo significativo en los lotes $g_{as} L$, $pe L$ y $pe M$. Consideramos que esta modificación tuvo lugar durante la conservación en congelación puesto que las cuajadas inmediatamente descongeladas no se desviaron respecto al control.

Los valores de a y b permanecieron inalterados (excepto a significativamente superior para $L0$). El índice de blancura, W_i , no sufrió modificaciones a causa de los tratamientos aplicados, sólo fue mayor para $M0$. *Hue* se vió ligeramente aumentado, de forma estadísticamente significativa en las cuajadas conservadas en congelación. *Chroma* no sufrió modificaciones estadísticamente significativas.

En ningún caso las condiciones de envasado y la velocidad de congelación ocasionaron modificaciones en los parámetros de color, mientras que atribuimos los cambios observados en *L* y *hue* al mantenimiento en congelación. El diferencial ΔE de las cuajadas inmediatamente descongeladas fue inferior al 1 % mientras que para las cuajadas mantenidas en congelación se situó entre 1-2 %.

2.6. Efecto de la congelación en el color de los quesos

En la Tabla 22 se presentan los resultados de los parámetros de color estudiados en los quesos. Comparando con los valores de la Tabla 21 deducimos que a causa de la maduración se produce un descenso de *L*; reducción importante del índice de blancura *Wi*; aumento de *a* (disminución del verde) en el control, *b* (aumento de amarillo) y saturación de color (*chroma*), a la vez que el tono (*hue*) permanece prácticamente inalterado. Además estos cambios ocasionados por la maduración son más marcados en los quesos procedentes de cuajadas congeladas que en los controles.

La congelación provocó un descenso importante de *L*, significativo para todos los lotes, al igual que del índice de blancura. Al contrario que sucediera en el lote control la *a* no disminuyó tras la maduración sino que mantuvo su valor o aumentó ligeramente su tendencia al verde, por lo que fue significativamente superior al control para todos los lotes congelados (excepto *gas L*). La *b*, el tono y la saturación permanecieron inalterados respecto al control. El diferencial de color ΔE se situó entre 8-12 % para todos los lotes congelados. Consideramos muy útil este parámetro desde el punto de vista aplicado ya que es altamente intuitivo y además se corresponde muy bien con las apreciaciones de los catadores que serán comentadas posteriormente.

El envase previamente utilizado y las velocidades de congelación ensayadas no dieron lugar a variaciones en los parámetros de color.

No hacemos referencia a valores obtenidos por otros autores por no haber encontrado en la literatura científica estudios de color en quesos semejantes al nuestro, ni estudios de evaluación del color tras la congelación. En su mayor parte los trabajos existentes versan sobre quesos de leche de vaca, en su mayoría ahumados o con colorantes, y no hay que olvidar que

por las características de la leche de origen los quesos de oveja y cabra son más blancos que los de leche de vaca.

2.7. Efecto de la congelación en la microestructura de las cuajadas

En las fotografías 1-4 se presentan imágenes correspondientes a la visión por MEB de la estructura de las cuajadas. El aspecto mostrado por la estructura de la cuajada es el de una masa porosa capaz de retener una gran cantidad de agua y sustancias solubles en su interior, con unas concavidades donde en condiciones normales se alojarían los glóbulos de grasa que, a causa de la técnica preparativa fueron eliminados con el desengrasado de las muestras. La estructura del queso es una matriz compleja de proteína láctea, grasa, minerales y otros componentes incluyendo agua (Lawrence y col., 1987), en quesos duros la caseína constituye el material estructural primario con grasa atrapada en su interior (Mistry y Anderson, 1993). La matriz caseínica a la salida de prensa ofrece un aspecto esponjoso.

Las razones por las que se decidió el desengrasado de las muestras fue por el elevado contenido y la naturaleza de la grasa (mayoritariamente saturadas) de las mismas. Pese a realizar pruebas de fijación con tetróxido de osmio y, al no disponer de un sistema de observación en lecho frío, las grasas enmascaraban la estructura de las cuajadas y quesos que se presentaban como masas amorfas carentes de organización. Asimismo la eliminación de las grasas mejora la observación de la red de caseínas.

La estructura observada en los lotes congelados (Fotografías 3-4) fue básicamente la misma que para el control. El proceso de congelación dió lugar a la formación de grietas en la estructura de las cuajadas, no observadas en el control. Mientras que las congeladas a velocidad media presentaron pocas diferencias respecto al control, en los de velocidad lenta la presencia de grietas fue mayor. Esto se vio reflejado en la textura, pues tal y como hemos comentado las cuajadas congeladas a velocidad lenta obtuvieron valores significativamente inferiores al control para los parámetros texturales. En cambio, no se apreciaron diferencias debidas al envase utilizado. Con independencia de los tratamientos aplicados se observaron formaciones cristalinas, en algunos casos abundantes de las que trataremos ampliamente en un próximo apartado.

2.8. Microestructura de los quesos

En la Fotos 5-8 se observan imágenes de la estructura observada por MEB en los quesos. Tras el salado y 60 días de maduración, la matriz caseínica ofrece un aspecto contraído o compactado, presenta una menor porosidad que la cuajada que se corresponde con el menor contenido en agua del queso respecto a ella (Fotos 1 y 5). También se aprecian las cavidades debidas a los glóbulos grasos.

Los quesos procedentes de cuajadas congeladas presentaron una gran similitud con el control, aunque se observaron algunas grietas y una cierta irregularidad en la distribución de espacios huecos, como observaran Oneca y col. (1994) en queso Roncal sometido a congelación. En conjunto las diferencias observadas fueron leves y al parecer la maduración revertiría en parte los cambios apreciados en las cuajadas, donde las grietas fueron más abundantes. Al igual que ocurriera en las cuajadas observamos inclusiones cristalinas en un gran número de muestras.

2.8.1. Inclusiones cristalinas en cuajada y queso

En el queso pueden encontrarse un gran número de inclusiones cristalinas, cuyo origen físico-químico es la nucleación y crecimiento de cristales a partir de una solución sobresaturada. La composición de la leche, el proceso de elaboración, las sustancias añadidas, la actividad microbiana y el grado de maduración son los principales factores que afectan la composición y formación de cristales en aquellos microambientes donde se den las condiciones adecuadas (Morris y col., 1988).

En algunos casos, cuando las inclusiones cristalinas se concentran en las líneas de fusión de partículas de cuajadas y persisten tras la maduración resulta en una fusión incompleta con distribución irregular del color y en que el queso se desmenuza al ser cortado. Este fenómeno puede darse en quesos duros por formación de cristales de fosfato cálcico (Conochie y Sutherland, 1965 y Brooker y col., 1975), así como de lactato cálcico (Dybing y col., 1988) y tirosinato de calcio en queso madurado a causa de la actividad microbiana (Blanc y col., 1980).

En las Fotografías 9-12 se aprecian en detalle algunas de las formaciones cristalinas observadas. En el estudio por difracción de rayos X se obtuvieron espectros como el de la Figura 8, en ella se observa una importante línea base en la zona del ángulo 2θ y los espacios interplanares corresponden a Brushita syn ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (JCPDS 9-77). La elevada línea base

observada se debe probablemente a la matriz orgánica en que están atrapados los cristales.

Algunos autores observaron con anterioridad inclusiones cristalinas de fosfato cálcico (Conochie y Sutherland, 1965; Brooker y col., 1975; Kaláb, 1979; Botazzi y col., 1982 y Morris y col., 1988), en particular Conochie y Sutherland (1965) identificaron estos cristales como brushita al igual que hemos observado en nuestro estudio. La presencia de estos cristales no estuvo relacionada con defecto alguno de textura o aspecto del queso.

2.9. Efecto de la congelación en las características organolépticas del queso

En la Tabla 23 se presentan las calificaciones obtenidas para los diversos atributos sensoriales evaluados en los quesos. Como se observa en ella ninguno de los lotes congelados ofreció un aspecto general diferente del control a juicio de los catadores. Coincidiendo con los resultados obtenidos en la medición objetiva de los parámetros de color se observó un color más intenso en los lotes congelados que en el control. Este aumento fue significativo para los lotes **pe M**, **gas L** y **gas M**, mientras que los resultados del lote **pe L** quedaron al límite de la significación. Envase y velocidad de congelación no ocasionaron variaciones de significación.

La evaluación realizada del aroma de los quesos no mostró diferencias de intensidad para los diferentes lotes. Los efectos principales envase y velocidad no influyeron en este parámetro.

Los catadores consideraron que el lote control ofrecía una sensación de granulosidad considerable, también presente en los lotes **pe L** y **pe M**. En cambio los lotes **gas L** y **gas M** obtuvieron unos valores muy bajos de granulosidad que fueron estadísticamente significativos. En el extremo opuesto, la plasticidad fue baja en el lote control y lotes **pe L** y **pe M** mientras que fue significativamente mayor en los lotes **gas L** y **gas M**. La cremosidad fue semejante para todos los lotes, sólo **gas L** fue calificado como significativamente más cremoso que el control. La velocidad de congelación no provocó variaciones en estos parámetros.

Sabor, rancidez e intensidad de salado fueron semejantes en todos los lotes y en ningún caso resultaron diferentes del control. En cuanto al sabor, podría ser lógico que en los quesos procedentes de cuajadas congeladas fuera más intenso que el obtenido del control pues tal y como se expuso en los resultados de la primera experiencia la proteólisis es más intensa en estos

lotes y por tanto el contenido de sustancias aromáticas es mayor. Sin embargo, los catadores no mostraron apreciaciones diferentes aunque en el caso del envasado en atmósfera de CO₂ fueron superiores sin ser significativos. Las sensaciones de rancidez y salado no se vieron afectadas por el envase. La velocidad de congelación no influyó en los parámetros de sabor.

La calificación global obtenida por los quesos no fue significativamente diferente entre el control y los distintos tratamientos. Envase y velocidad de congelación no ejerció efecto alguno.

Por lo tanto, consideramos que la calidad organoléptica de los quesos procedentes de cuajadas congeladas es equiparable a la de los quesos obtenidos por el método tradicional, y por tanto la congelación de cuajadas para su posterior maduración es un método viable al menos para las velocidades y tiempos de mantenimiento utilizados en nuestro estudio.

Nuestros resultados están en la línea de los obtenidos por Richards (1966), Alichanidis y col., (1981) y Peláez (1983) que en quesos de pasta dura observaron ligeras alteraciones de la textura no apreciadas por los catadores. También coinciden con los obtenidos de queso Manchego y otros semiduros que apenas encontraron leves variaciones (Jiménez, 1978; Jiménez y col., 1979; Peláez, 1981; Martín-Hernández, 1987 y Fontecha, 1991). Al contrario que Oberg y col. (1992) que no observaron cambios en el color, en nuestro estudio se puso de manifiesto por métodos objetivos y subjetivos un aumento en la intensidad del color a causa de la congelación.

3. RESULTADOS Y DISCUSION DE LA TERCERA EXPERIENCIA

A la vista de los resultados de las anteriores experiencias, consideramos la congelación de cuajadas como un método viable para prolongar su conservación y por tanto, abastecer el mercado de queso semiduro de leche de oveja de forma mejor distribuida a lo largo de todo el año.

Un aspecto muy importante al tratar con productos conservados en congelación es el mantenimiento de la cadena de frío. Aunque se intente preservar el correcto funcionamiento de esta cadena, diversas causas pueden llevar a que se rompa, provocando fluctuaciones en la temperatura. Resulta de gran interés valorar el efecto que estas fluctuaciones puedan tener en la cuajada y de forma especial en el queso madurado (producto final). Con la finalidad de evaluar este efecto se planificó la tercera experiencia.

Se escogió como modelo de estudio un grupo de cuajadas envasadas en bolsa de polietileno y congeladas a velocidad media, por ser el envasado más económico y porque la velocidad combinaba tiempos cortos de congelación y menores diferencias de textura respecto al control.

3.1. Fluctuaciones de temperatura

Las fluctuaciones de temperatura consistieron en situar las cuajadas congeladas en el armario de congelación criogénica a -25°C , simulando una cámara de conservación en congelación y cesar la inyección de nitrógeno manteniendo la circulación de aire hasta que la temperatura en el centro térmico de la cuajada llegara a -10°C (en este momento la temperatura en la superficie era de $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$), proceso en que se invertían $4 \text{ h} \pm 10 \text{ min}$. En este punto las cuajadas se devolvían al arcón congelador a $-23 \pm 1^{\circ}\text{C}$; en un tiempo aproximado de 24 horas las cuajadas recuperaban la temperatura inicial de -23°C . La evolución de la temperatura vs tiempo puede verse en la Figura 9.

3.2. Composición global de las cuajadas

En la Tabla 24 se exponen las características de composición global de las cuajadas.

El extracto seco total no se vió afectado por la congelación, los lotes 2 y 4 presentaron

valores significativamente superiores al control. Esta variación del *est* fue de aproximadamente 1,5 puntos y no resultó organolépticamente detectable. Lawrence y col. (1984) recomiendan referirse a intervalos de composición en lugar de valores concretos, pues en realidad existe un intervalo de valores para cada parámetro dentro de los cuales el queso no experimenta variaciones apreciables, por otra parte la propia toma de muestra y los errores de precisión de los ensayos dan lugar a variaciones. En el caso que nos ocupa, los valores obtenidos para todos los tratamientos estarían dentro del intervalo de composición de la cuajada. Es de destacar que el número de fluctuaciones sufridas no afectó de forma significativa al *est* de las cuajadas.

El contenido en grasa de los lotes congelados fue significativamente inferior al del control, diferencia que creemos relacionada con la dificultad en la separación de la grasa por el método Gerber, así mismo se observaron mayores desviaciones estándar en los lotes congelados que en el control. Las oscilaciones en la temperatura no mostraron efecto alguno en este parámetro. El índice *g/est* resultó significativamente menor para todos los lotes congelados debido al menor contenido en grasa detectado en estos lotes.

El contenido en proteína no experimentó variaciones por efecto de la congelación, ni diferencias entre tratamientos.

El índice *a/esm* fue significativamente menor en todos los lotes tratados frente al control, pero entre ellos no resultaron diferentes. Este hecho puede explicarse por el mayor *est* observado en los lotes congelados, adicionalmente el menor contenido en grasa obtenido para estos lotes conlleva que el *esm* se valore en exceso.

3.3. Composición global de los quesos

En la Tabla 25 se presenta la composición global de los quesos procedentes de cuajadas sometidas a fluctuaciones de temperatura.

El contenido en extracto seco total permaneció inalterado para los lotes 3 y 4 y fue significativamente superior para los lotes 1 y 2, las diferencias fueron leves, entre 1 y 2% y al igual que se comentó para las cuajadas, los valores de *est* de todos los lotes estuvieron dentro de los aceptados para este queso. No se observaron diferencias atribuibles al número de fluctuaciones.

El contenido en grasa sólo fue significativamente diferente del control para el lote 2. El índice g/est no se vio afectado por la congelación ni por ninguno de los tratamientos aplicados.

El contenido en proteína no experimentó variaciones tras los tratamientos aplicados, no siendo afectado por la congelación ni por las fluctuaciones efectuadas durante el mantenimiento en congelación.

El índice a/esm resultó significativamente inferior al control en todos los lotes sometidos a congelación sin presentar diferencias entre ellos pese al número de oscilaciones sufridas, estos lotes no mostraron diferencias significativas entre ellos.

3.4. Fracciones nitrogenadas de las cuajadas

En la Tabla 26 se exponen los resultados obtenidos en el estudio de las fracciones nitrogenadas de las cuajadas.

El contenido en nt no experimentó variaciones a causa de la congelación ni por los diferentes ciclos de oscilación de temperatura efectuados.

El contenido en nnc fue significativamente superior al control en los lotes 1 y 3. Aunque en realidad este aumento es muy leve no se había observado en las anteriores experiencias. Si bien los lotes 1 y 3 resultaron significativamente diferentes al control, no lo fueron respecto a los lotes 2 y 4. A su vez el índice nnc/nt fue significativamente superior al control para los lotes 1, 3 y 4, pero no se vio afectado por los diferentes fluctuaciones.

La fracción $nTCA$ observada para los diferentes lotes de cuajadas no se diferenció de forma significativa de los valores del control, tampoco se observaron diferencias para el índice $nTCA/nt$. Estos resultados contrastan con los observados en la primera experiencia en que tanto la fracción como el índice se vieron aumentados. Asumimos que todos los valores observados están dentro del intervalo característico de las cuajadas y por tanto estas diferencias carecen de importancia.

El contenido en nFT no se vio afectado por la congelación y oscilaciones sufridas, salvo

que el lote 1 fue significativamente inferior al control, para el índice nFT/nt se observaron los mismos resultados. Al igual que sucediera con la fracción $nTCA$ no aumentó tras la conservación en congelación como se había constatado en la primera experiencia, esto apoya la afirmación de que los cambios ocurridos en el mantenimiento en congelación son leves y de poca repercusión en el producto final

3.5. Fracciones nitrogenadas del queso

En la Tabla 27 se presentan resultados del estudio de las fracciones nitrogenadas del queso procedente de cuajadas sometidas a fluctuaciones de temperatura.

Tal y como se había descrito en anteriores experiencias todas las fracciones nitrogenadas se vieron aumentadas por efecto de la maduración. La congelación, por su parte, también ocasionó un aumento de estas fracciones.

Mientras que el nt no se vio modificado por ninguno de los tratamientos estudiados, el nnc resultó significativamente mayor que el control en todos los lotes congelados. No se observaron diferencias entre los lotes congelados pese a haber sufrido diferentes oscilaciones de temperatura. El índice nnc/nt , aunque aparentemente mayor en los lotes congelados no resultó significativamente diferente del control.

Como ya habíamos observado en la primera experiencia, la fracción $nTCA$ aumentó a causa de la maduración, este aumento fue significativamente mayor en los lotes 1, 2, 3 y 4 frente al control. El hecho de haber sufrido fluctuaciones y el número de veces que se efectuaron no ejerció efecto diferenciador sobre este indicador de la proteólisis. En la misma línea, el índice $nTCA/nt$ resultó significativamente superior al control en todos los lotes congelados, sin observarse diferencias a causa de las oscilaciones.

Los valores obtenidos para la fracción nFT se vieron incrementados a causa de la congelación, de modo que los lotes 1, 2, 3 y 4 presentaron valores significativamente superiores al control. En cambio, no se observaron diferencias entre los diversos tratamientos. El índice nFT/nt presentó el mismo comportamiento, fue significativamente mayor en los lotes congelados que en el control, pero no se observaron diferencias entre tratamientos.

Los resultados obtenidos para las fracciones nitrogenadas en esta tercera experiencia son coherentes con los obtenidos en las anteriores experiencias. En los quesos procedentes de cuajadas congeladas se observaron cantidades significativamente superiores al control de todas los índices $nTCA/nt$ y nFT/nt , y por tanto mayores niveles de proteolisis. Sin embargo, oscilaciones de temperatura hasta $-10^{\circ}C$ un máximo de 3 veces, no demostraron afectar a los parámetros de proteolisis.

3.6. Composición en ácidos grasos totales

La composición en ácidos grasos totales de cuajadas y queso se presentan en la Tabla 28, junto con los coeficientes de correlación r^2 obtenidos de las rectas de calibración calculadas para cada uno de los ácidos grasos estudiados. Los cálculos se realizaron a partir del cociente entre el área descrita por cada ácido y el área del patrón interno -ácido margárico añadido a razón de 2 miligramos a cada ml de extracto de muestra- y se expresan como porcentaje de cada ácido graso por gramo de grasa extraída.

Los resultados obtenidos son coincidentes con los descritos por Marcos y col. (1985) y de la Fuente y Juárez (1993) para queso Manchego de leche de oveja. Al estudiar la composición en ácidos grasos totales de las cuajadas observamos que no hubo modificación alguna a causa de los tratamientos aplicados, tan sólo el lote 3 presentó un contenido en C15:0 inferior al control, desviación que no consideramos relevante puesto que está dentro de los valores normales de composición de la grasa de leche de oveja. Estos resultados eran previsibles puesto que el proceso de congelación y mantenimiento no se ha asociado a alteraciones de la composición de la grasa y aunque se hubiera observado aumento de la acidez libre no se reflejaría necesariamente en un cambio del perfil de ácidos grasos totales; en caso de darse fenómenos oxidativos importantes podrían detectarse cambios en el contenido en ácidos grasos insaturados, pero esto no ha ocurrido.

Expresar los resultados del perfil de ácidos grasos totales por gramo implica que no se observen diferencias entre cuajadas y queso pues no tiene en cuenta la concentración de componentes que tiene lugar por deshidratación del queso. Se admite que la composición en ácidos grasos totales del queso no se modifica sustancialmente durante el proceso de maduración, hecho constatado por diversos autores (Rafecas y col., 1985), salvo en quesos de lipolisis intensa (Nájera y col., 1993). Tampoco se han observado diferencias significativas entre

queso control y los quesos tratados. Como hemos apuntado en la primera experiencia, la fracción lipídica de los quesos duros sufre pocas modificaciones durante la maduración; por otra parte, de los resultados de nuestro estudio puede deducirse que la congelación y conservación incluso hasta con 3 oscilaciones de temperatura no origina modificaciones en el perfil de ácidos grasos totales del queso.

3.7. Lipólisis en las cuajadas y quesos

En la Tabla 29 se recogen los valores de acidez de la grasa obtenidos para las cuajadas y quesos sometidos a fluctuaciones de temperatura.

Tabla 29. Acidez de la grasa de las cuajadas y queso control y sometidas a tratamientos de congelación

	cuajada	std	queso	std
lote 0	7,21	(0,45)	9,77	(0,34)
lote 1	7,16	(0,32)	9,12	(0,43)
lote 2	7,46	(0,77)	9,24	(0,52)
lote 3	6,78	(0,47)	9,55	(0,60)
lote 4	7,38	(1,02)	9,78	(0,59)

Se observa claramente que la congelación no dió lugar a variaciones en los niveles de lipólisis observados en las cuajadas. Ninguno de los lotes sometidos a fluctuaciones de temperatura fue significativamente diferente al control, tampoco observamos diferencias entre lotes congelados. Podemos concluir que las fluctuaciones de temperatura realizadas en nuestro estudio no provocaron alteraciones en la lipólisis observada en las cuajadas.

Coincidiendo con los resultados obtenidos en la primera experiencia se observó un aumento en el índice de acidez de la grasa a causa de la maduración. La acidez obtenida no se diferenció de forma significativa entre lotes, congelación y los tratamiento de fluctuación aplicados no mostraron afectar a este parámetro.

3.8. Índice del ácido tiobarbitúrico TBA

En la Tabla 30 se exponen los resultados obtenidos para el índice de TBA en cuajada y queso, expresados en mg de malonaldehído (MDA), así como el porcentaje de recuperación obtenido para cada lote.

Como puede observarse las cuajadas y el queso control presentaron contenidos en MDA por debajo del límite de determinación del método para este producto. Según Thier y Zeumer (1987) el límite de determinación de un test de evaluación del TBA es la concentración mínima de un compuesto añadido a una muestra en análisis y que cumple los siguientes requisitos: (a) ser mayor o igual al límite de detección, (b) que su recuperación sea mayor o igual al 70 % y (c) que el coeficiente de variación para el límite de determinación sea igual o inferior al 20 %. Asimismo establecen que la concentración del compuesto en estudio puede determinarse con fiabilidad si se encuentra a concentración 5 veces superior al límite de determinación (como ejemplo, Raharjo (1992) comprobó que el límite de determinación de la extracción acuosa en medio ácido descrita por los citados autores es de 0,36 mg /kg de carne).

Tabla 30. Índice del TBA (mg de MDA/kg de queso)

	mg MDA/kg queso	std	recuperación
cuajada 0	n. d.	-	42 %
cuajada 1	n. d.	-	48 %
cuajada 2	n. d.	-	48 %
cuajada 3	n. d.	-	48 %
cuajada 4	n. d.	-	48 %
queso 0	n. d.	-	46 %
queso 1	1,542	(0,0508)	72 %
queso 2	1,452	(0,0424)	72 %
queso 3	1,467	(0,0662)	72 %
queso 4	1,447	(0,0478)	72 %

Los lotes en los que los resultados estuvieron por debajo de este límite obtuvieron una lectura cercana a 0 en el espectrofotómetro y el porcentaje de recuperación fue inferior al 70 % indicado. Esto no implica que las muestras contengan concentración 0,00 de MDA, sino que el método no ofrece suficiente precisión a las concentraciones de MDA que supuestamente contiene la muestra.

Centrando la atención sobre los lotes para los que se obtuvieron resultados sorprende que estos sean tan elevados -Prieto y col., (1994) en queso de León de leche de vaca encontraron valores de $0,142 \pm 0,105$ mg MDA por kg de queso, 0,070 mg de MDA por kg de leche de vaca, y 3,2 mg de MDA por kg de mantequilla rancia, realizando la extracción de MDA por destilación- y que siendo la muestra de las mismas características que el queso control el porcentaje de recuperación sea mayor (72-74 %), destacando la buena repetición obtenida entre réplicas del mismo lote.

Al valorar las incidencias del proceso es de destacar que tras la ebullición del extracto con solución de TBA se observó aparición de turbidez en todas las muestras. Puesto que esta turbidez podía interferir en la lectura de los resultados los extractos se centrifugaron durante 5 minutos a 15.000 g para clarificar el medio y proceder a su posterior lectura espectrofotométrica. Una vez finalizado este trabajo experimental Botsoglou y col. (1994) publicaron un extenso trabajo sobre la aplicación del índice del TBA para la determinación de la oxidación de la grasa en alimentos, en que estudian entre otros un grupo de productos lácteos -incluyendo cuatro tipos de queso: azul, Kaseri, Feta y fundido- y observan que el método de extracción por ebullición en medio ácido no permite obtener resultados fiables para quesos azules y Kaseri a causa de la turbidez. Sí que obtienen resultados para Feta y fundido (0,850 y 2,191 mg/kg respectivamente) pero con las modificaciones que proponen para este método las lecturas que obtienen son muy inferiores (0,146 y 1,408 mg/kg). Consideramos que la turbidez de los extractos provocó una distorsión de los resultados, que no se pudo solucionar totalmente con la centrifugación de dichos extractos, siendo a la vez la causa de los elevados valores de MDA obtenidos para el queso procedente de cuajadas congeladas.

3.9. Inducción a la oxidación de la grasa del queso (Rancimat)

A continuación se exponen los resultados del test de oxidación inducida Rancimat para

la determinación de la estabilidad de la grasa a la oxidación.

El lote 1, congelado pero no sometido a fluctuaciones de temperatura en el mantenimiento en congelación lo tomamos como lote control frente a los congelados que sufrieron oscilaciones. No se dispone de resultados del lote 0 al no disponer de muestra en el momento en que se tuvo acceso al equipo, al haber 4 meses de diferencia entre dicho lote y los descongelados. No se consideró oportuna la conservación de muestras en congelación al tratarse del proceso estudiado, ni obtener estos valores de otros quesos sin tratar, por corresponder a una lactación diferente y por tanto tratarse de una materia prima diferente.

Tabla 31. Estabilidad de la grasa del queso determinada a 120°C

	Tiempo	std
lote 1	3 h 25 min	(22 min)
lote 2	3 h 43 min	(18 min)
lote 3	3 h 27 min	(25 min)
lote 4	3 h 38 min	(13 min)

Como puede observarse la estabilidad de la grasa del queso a la oxidación, expresada en horas a 120°C, no se vió influida por las fluctuaciones de temperatura sufridas en el mantenimiento en congelación al no encontrar diferencias significativas entre lotes. No podemos entrar en apreciaciones sobre la estabilidad de esta grasa al no disponer de datos bibliográficos sobre grasa de queso de leche de oveja, tan sólo valores proporcionados por Metrohm UK Ltd. (1995) para un estudio en las mismas condiciones en mantequilla (4 h 10 min \pm 6 min) y en grasa extraída de leche en polvo recién elaborada (de 4 h 47 min a 5 h 54 min).

3.10. Efecto de las fluctuaciones en el pH de cuajada y queso

En la Tabla 32 se presentan los valores obtenidos para el pH de cuajadas y quesos con 60 días de maduración.

Tabla 32. pH de cuajada y queso. Media y desviación estándar.

	Cuajada	std	Queso	std
lote 0	5,42	(0,27)	5,24	(0,03)
lote 1	<u>5,00</u>	(0,12)	5,25	(0,02)
lote 2	5,26	(0,16)	5,32	(0,07)
lote 3	5,57	(0,10)	5,21	(0,03)
lote 4	5,52	(0,03)	5,25	(0,01)

No se observaron diferencias significativas entre las cuajadas congeladas y sometidas a fluctuaciones con respecto al control, tan sólo el lote 1 que no sufrió oscilaciones de temperatura resultó significativamente inferior al control. Como hemos apuntado con anterioridad existe una gran disparidad de resultados sobre el efecto de la congelación en el pH, así, en quesos de características semejantes al nuestro observaron que el pH permanecía inalterado; en cambio, Fontecha y col. (1994) observaron descenso del pH en las cuajadas congeladas e inmediatamente descongeladas y aumento en las cuajadas conservadas en congelación, en todo caso estas diferencias no superaron las 0,1 unidades.

La maduración provocó un descenso en el pH de entre 0,2 y 0,3 unidades en la mayor parte de los lotes, excepto en los lotes 1 y 2 donde el pH observado en las cuajadas fue sorprendentemente bajo. Los valores de pH obtenidos en queso madurado coinciden con los descritos por Marcos y col. (1985) y García y Cabezas (1995) en queso Manchego.

Por lo que respecta al pH del queso no se observaron diferencias significativas entre los lotes estudiados. La congelación y las fluctuaciones de temperatura sufridas por las cuajadas no provocaron cambios en el pH del queso obtenido. Este resultado es coherente con el desarrollo observado en la flora aerobia mesófila revivificable que fue el mismo para todos los lotes con independencia de los tratamientos aplicados. La maduración revirtió las diferencias observadas en el pH de las cuajadas del lote 1.

3.11. Actividad del agua del queso

En la Tabla 33 se presentan los valores de a_w del queso determinados por higrómetro eléctrico *Novasina*.

Decidimos realizar esta determinación con el higrómetro eléctrico al haber constatado en la primera experiencia una buena correspondencia entre los valores obtenidos por este método y por el método gravimétrico para los valores de a_w del queso madurado, además por su comodidad y rapidez frente al gravimétrico.

Tabla 33. Actividad del agua del queso procedente de cuajada sometida a varias oscilaciones de temperatura.

	a_w	std
lote 0	0,942	(0,002)
lote 1	<u>0,933</u>	(0,002)
lote 2	<u>0,932</u>	(0,002)
lote 3	<u>0,936</u>	(0,001)
lote 4	<u>0,935</u>	(0,001)

— (Pr > F < 0,05)

Coincidiendo con los resultados de la primera experiencia, se observó un descenso significativo de los valores de a_w a causa de la congelación. En cambio, y al igual que se ha ido detallando para otros parámetros, las oscilaciones de temperatura aplicadas en esta tercera experiencia no ocasionaron diferencias en la a_w del queso. En realidad, este resultado es coherente con los datos de est y fracciones nitrogenadas, determinantes de la a_w , que no presentaron variaciones importantes a causa de las fluctuaciones.

3.12. Recuentos microbiológicos de las cuajadas

En la Tabla 34 se presentan los resultados de los recuentos efectuados en las cuajadas de la tercera experiencia.

Al igual que se había observado en la segunda experiencia, la congelación ocasionó un

descenso significativo de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas revivificables, de una unidad logarítmica respecto al control, que resultó significativo para los lotes 1, 3 y 4. Por el contrario, no se observaron diferencias entre lotes congelados y sometidos a fluctuaciones.

Los recuentos de hongos no se vieron afectados de forma significativa por la congelación ni por el número de fluctuaciones. Al igual que destacamos en la segunda experiencia los valores obtenidos están en el límite de detección de la técnica.

Los recuentos de flora siccótrofa no mostraron diferencias a causa de los tratamientos aplicados.

Se puede concluir que las fluctuaciones de hasta -10°C y un máximo de 3 ciclos no tuvieron incidencia en la viabilidad de la flora microbiana. El descenso observado lo atribuimos enteramente a la congelación y no a las fluctuaciones, puesto que también se dió en el lote 1 y ya se había observado en la segunda experiencia.

3.13. Recuentos microbiológicos del queso

En la Tabla 35 se presentan los resultados del estudio microbiológico del queso procedente de cuajadas sometidas a fluctuaciones de temperatura.

A causa de la maduración los recuentos de bacterias aeróbias mesófilas disminuyeron en 2,5 unidades logarítmicas, como ya habíamos observado y argumentado en la segunda experiencia. Las cuajadas congeladas y sometidas a cambios de temperatura en conservación, tras 60 días de maduración, presentaron recuentos de mesófilos similares y que no se diferenciaron del control. La maduración revertió los cambios ocurridos en la flora aerobia mesófila a causa de la congelación y las fluctuaciones de temperatura, al parecer, no afectaron a la viabilidad posterior de la flora puesto que los recuentos no fueron diferentes para ninguno de los lotes.

Los recuentos de hongos fueron significativamente menores en todos los lotes sometidos a congelación, donde no se detectó y, por tanto, suponemos que su contenido es inferior a 100 UFC/g. Hay que destacar que los recuentos en el queso control fueron muy bajos.

Los recuentos de flora sicrótrofa mostraron una tendencia a ser mayores en los lotes de queso procedentes de cuajadas congeladas respecto al control. Este aumento sólo fue significativo para el lote 3 que había sufrido 2 fluctuaciones. En cambio entre los lotes congelados, independientemente de las fluctuaciones sufridas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

3.14. Influencia de las fluctuaciones de temperatura en los parámetros del TPA del queso

En la Tabla 36 se detallan los valores de los parámetros del TPA obtenidos para el queso. En la misma línea que los resultados obtenidos en la segunda experiencia, observamos que, a causa de la congelación los parámetros masticabilidad, gomosidad y dureza aumentaron. Elasticidad y cohesividad también incrementaron su valor, aunque este aumento no fue significativo para todos los lotes. Por su parte la adhesividad, poco característica de este tipo de queso, no se vió afectada de forma significativa y presentó unas desviaciones estándar muy importantes.

Los lotes sometidos a fluctuaciones de temperatura no se diferenciaron de forma significativa del lote 1. Observamos que un aumento de la temperatura hasta -10°C repetidos un máximo de tres veces no afectaron de forma significativa a los parámetros texturales del queso en el estudio por TPA. Todos los lotes congelados se comportaron de la misma manera pese al aumento de los valores texturales, las características del queso fueron aceptables para los catadores que, como expondremos más adelante, consideraron estos quesos de gran calidad.

De este modo, los parámetros masticabilidad, gomosidad y dureza fueron significativamente superiores al control en todos los lotes congelados con independencia de las fluctuaciones sufridas. Elasticidad y cohesividad experimentaron leves incrementos respecto al control que no resultaron significativos en todos los lotes. La adhesividad no resultó diferente de forma estadísticamente significativa entre los lotes estudiados.

3.15. Resistencia al corte

En la Tabla 37 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros de resistencia al corte evaluados.

Tal y como se había descrito en la segunda experiencia, aunque en apariencia la

congelación provoca un aumento de fuerza máxima, fuerza media y área, este aumento no fue significativo. De igual modo, las fluctuaciones no dieron lugar a diferencias significativas entre los lotes sometidos a congelación. En cambio, el lote sometido a 3 fluctuaciones mostró valores significativamente superiores al control, confirmando la creencia de que las alteraciones que puedan darse en congelación provocan un aumento de la resistencia al corte.

3.16. Microestructura de la cuajada y queso (MEB)

En las fotografías 13-16 puede observarse la microestructura de las cuajadas sometidas a fluctuaciones de temperatura.

En la anterior experiencia habíamos observado que las cuajadas congeladas a velocidad media apenas se diferenciaban del control, así el lote 1 (Fotografía 13) mostró una estructura semejante a la observada en los controles (Fotografía 5-6). En cambio, como se aprecia en las fotografías (14-16) las cuajadas sometidas a fluctuaciones de temperatura mostraron una mayor alteración de la estructura, muy importante en las cuajadas sometidas a dos y tres fluctuaciones de temperatura. Así pues, las oscilaciones de temperatura provocadas con un aumento de hasta 16°C (la parte externa ascendía de -23 a -7°C) presumiblemente ocasionaron fenómenos de recristalización, con aumento en el tamaño de los cristales de hielo causantes de los grandes espacios huecos y la estructura irregular que se observan en las cuajadas así tratadas.

Los cambios ocasionados por una única oscilación de temperatura fueron leves, de forma que podemos sugerir que la cuajada tendría una cierta permisividad/resistencia a los cambios de temperatura dentro del límite estudiado.

Si bien en las cuajadas las diferencias en la microestructura a causa de las oscilaciones de temperatura fueron grandes, no sucedió así en los quesos (fotografías 17-20). Coincidiendo con las observaciones de la segunda experiencia, la estructura del queso congelado a velocidad media y no sometido a fluctuaciones de temperatura resultó semejante a la del queso control. En los quesos procedentes de cuajadas sometidas a fluctuaciones de temperatura puede observarse el rastro (huella, marca, señal) de la zona ocupada por cristales de hielo como puede observarse en la fotografía 19. Pese a la observación de estas marcas las diferencias observadas en quesos no fueron tan importantes como en las cuajadas, de modo que consideramos que la maduración revertió gran parte del daño microestructural ocasionado en las cuajadas por las

fluctuaciones. Si a estas observaciones añadimos los resultados obtenidos en los parámetros texturales, podemos afirmar que la maduración facilitó la recuperación de los cambios sufridos a causa de las fluctuaciones, pues no se diferenciaron entre ellos pese al diferente número de fluctuaciones sufrido, salvo los quesos procedentes de cuajadas con tres fluctuaciones que ofrecieron mayor resistencia al corte.

Vistos los cambios ocurridos en la estructura de las cuajadas y en los quesos obtenidos a causa de las fluctuaciones, y puesto que el cambio de temperatura provocado fue importante (aumento 13-16°C según la parte del queso) y muy superior a las fluctuaciones habituales en almacenes de congelados consideramos que el producto no precisa precauciones especiales de congelación y tal vez no sería necesario mantener en almacenes a tan baja temperatura y por tanto reducir costes de conservación por reducción de horas de funcionamiento de motores frigoríficos.

3.17. Efecto de las fluctuaciones en el color del queso

En la Tabla 38 se presentan los resultados de los parámetros de color del queso procedente de cuajadas congeladas y sometidas a fluctuaciones de temperatura.

Coincidiendo con los resultados obtenidos en la segunda experiencia, observamos un descenso de los parámetros *L* (luminosidad), *a* (aumento del color verde), *Wi* (índice de blancura) y *Hue* (tono). Mientras que *b* (amarillo) y *chroma* (pureza) permanecieron inalterados. Estas variaciones se produjeron por igual en los lotes 1, 2, 3 y 4, razón por la cual podemos atribuir la causa a la congelación y no a las fluctuaciones de temperatura sufridas, puesto que no dieron lugar a diferencias entre lotes. Por lo que respecta a los valores de ΔE se situaron entre 9 y 11 puntos sin presentar diferencias entre lotes.

3.18. Análisis sensorial

Se realizó una prueba discriminatoria triangular entre los lotes 1, 2, 3 y 4, cuyos resultados se presentan en la Tabla 39. En esta experiencia no se tuvo en cuenta el queso control puesto que en las anteriores experiencias ya se habían evaluado control y congelados comprobando la buena aceptación de los quesos procedentes de cuajadas congeladas. Además la diferencia en el tiempo entre la disponibilidad de controles y tratados imposibilitaba esta comparación.

Tabla 39. Prueba discriminatoria triangular

Lotes comparados	Aciertos
1 vs 2	2/10
1 vs 3	6/10
1 vs 4	3/10
2 vs 3	2/10
2 vs 4	3/10
3 vs 4	2/10
TOTAL	18/60

Los catadores realizaron un gran número de observaciones señalando en primer lugar, la dificultad para diferenciar las muestras, cuestionando si existían diferencias reales. Además de este comentario generalizado los catadores destacaron la gran calidad del queso en estudio, que calificaron como el mejor de los catados en todas las experiencias. Los resultados obtenidos de las pruebas triangulares confirman los comentarios de los catadores respecto a la dificultad en la diferenciación de los quesos pertenecientes a diferentes lotes; considerando el total de aciertos, que no suponen más del 30 %, prácticamente representan la probabilidad de acierto al responder al azar.

Las fluctuaciones de temperatura sufridas por las cuajadas no comportaron pérdidas de calidad organoléptica del queso ni ocasionaron diferencias entre lotes sometidos a diferente número de oscilaciones.

Figura 2. Congelación a velocidad lenta^a. Escala eje X: 10mm/h.

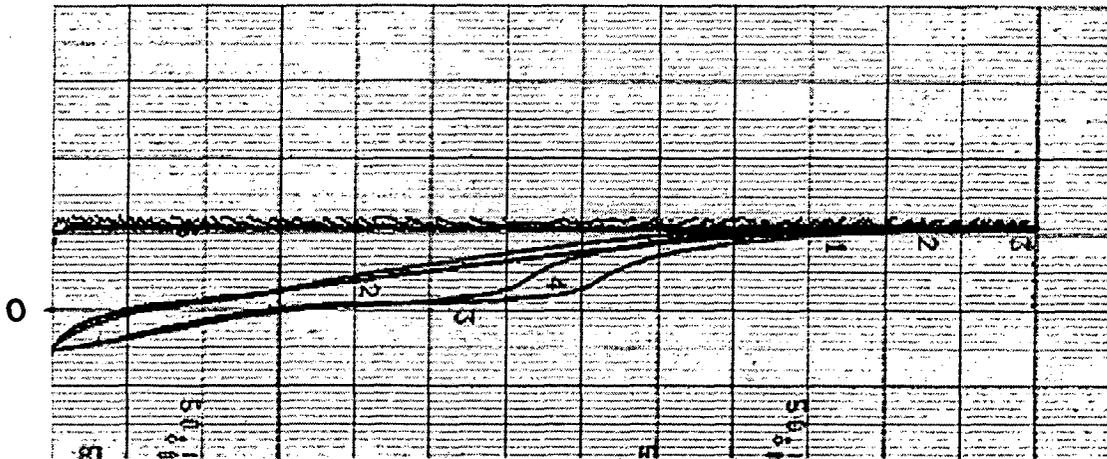


Figura 3. Congelación a velocidad media^a. Escala eje X: 30mm/h.

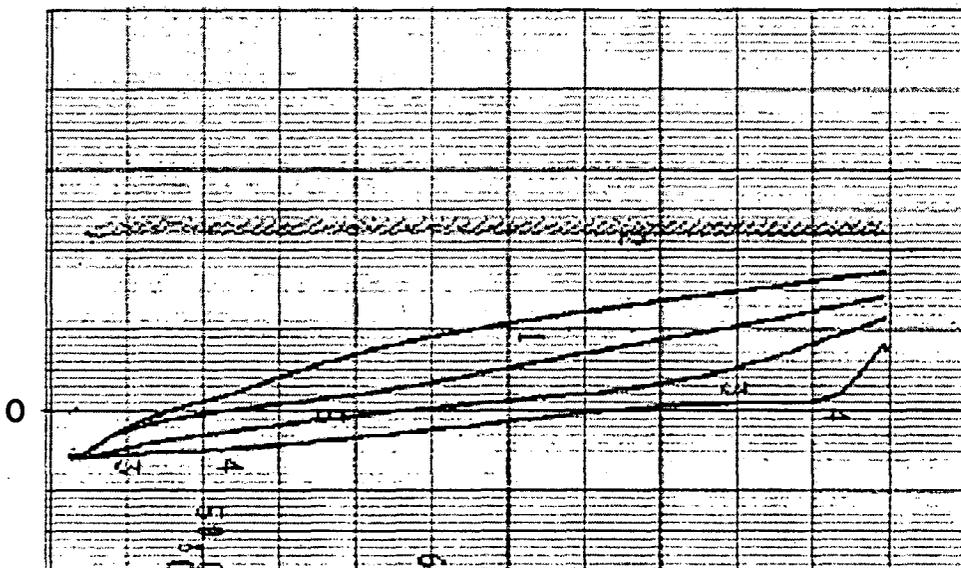
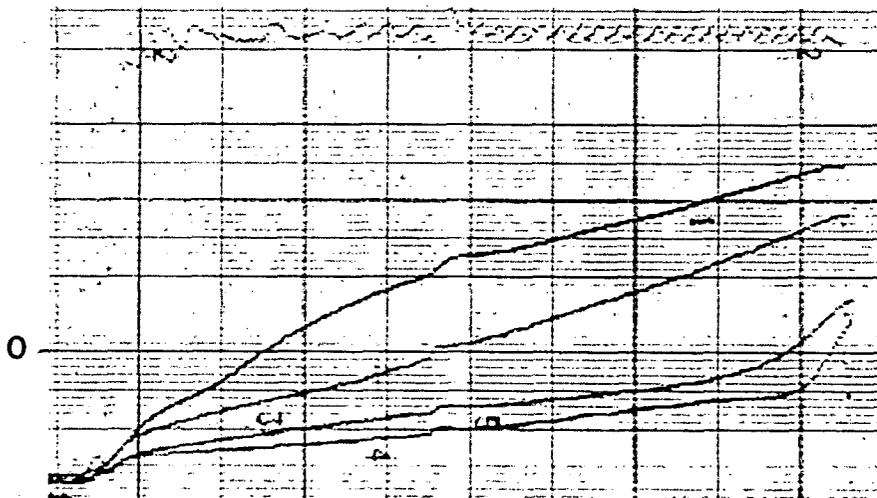


Figura 4. Congelación a velocidad rápida^a. Escala eje X: 50mm/h.

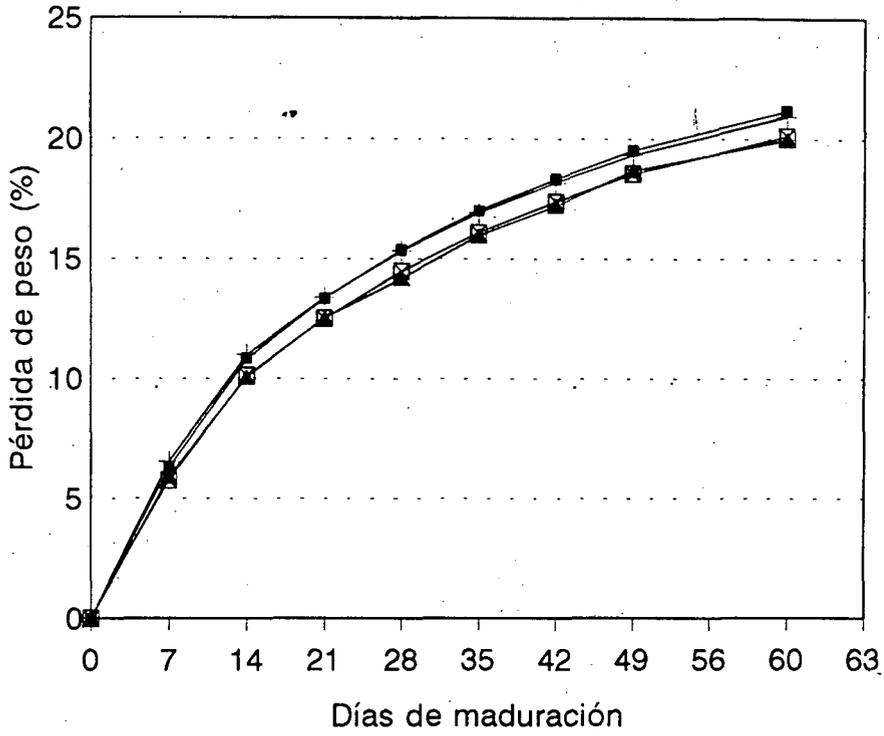


^aSeguimiento de la temperatura a diferentes profundidades de la cuajada. La línea superior corresponde a la temperatura del congelador.

Eje X: tiempo en horas.

Eje Y: temperatura (10mm/25°C).

4 meses de conservación



10 meses de conservación

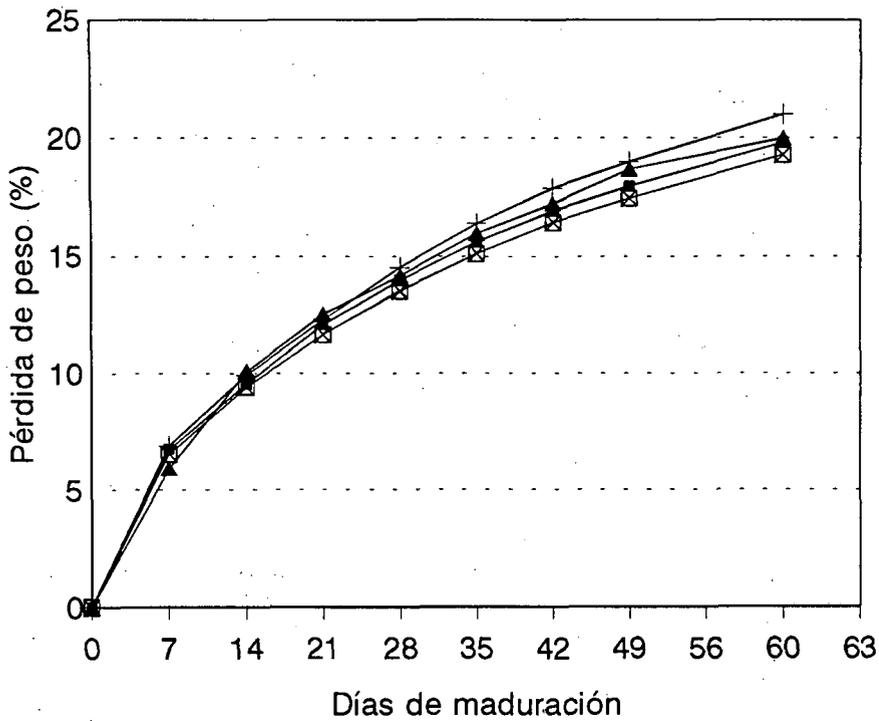
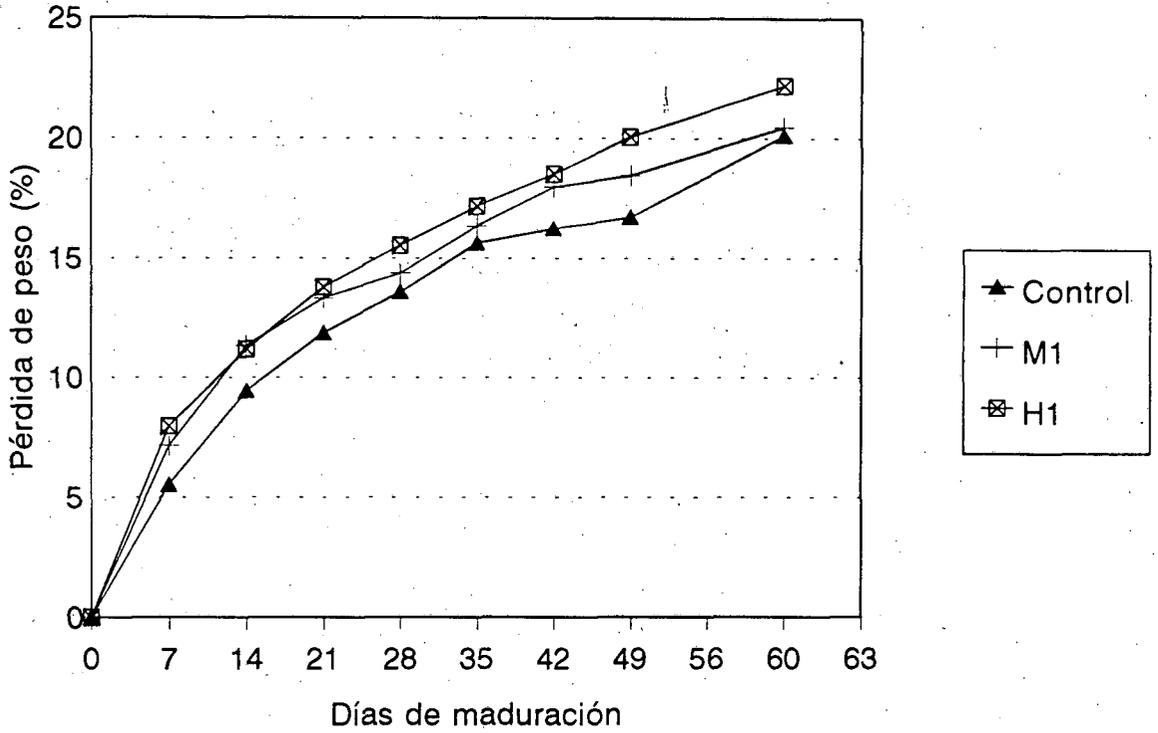


Figura 5. Envasados en polietileno

4 meses de conservación



10 meses de conservación

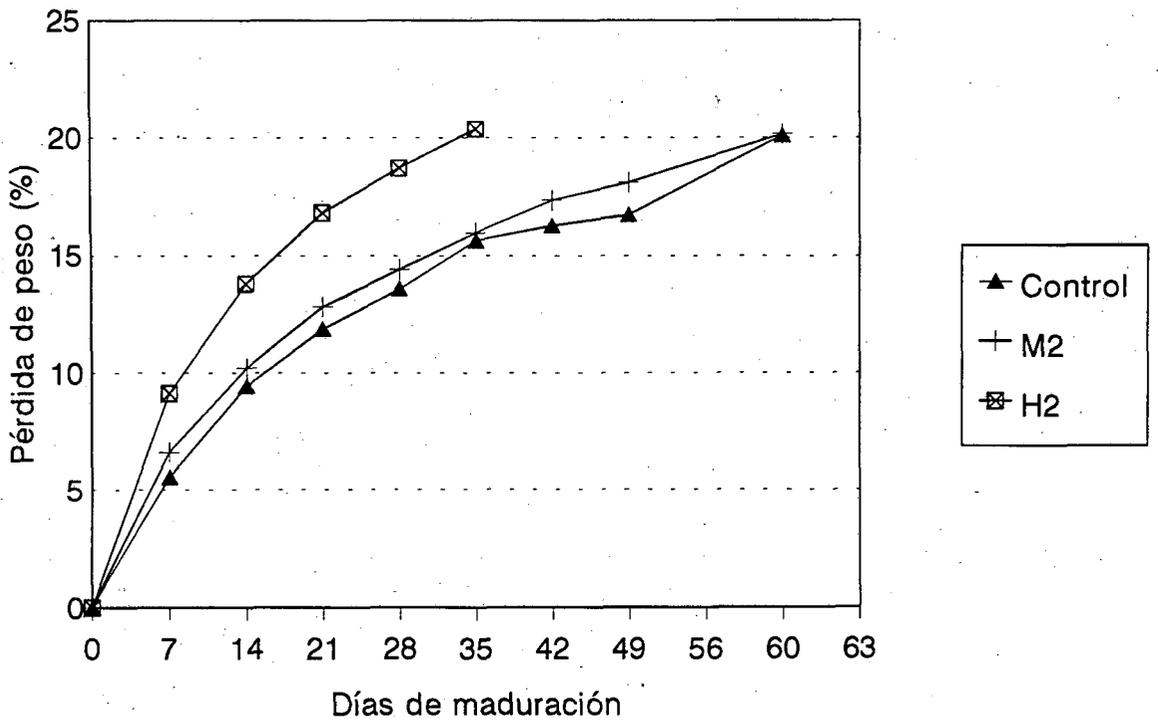
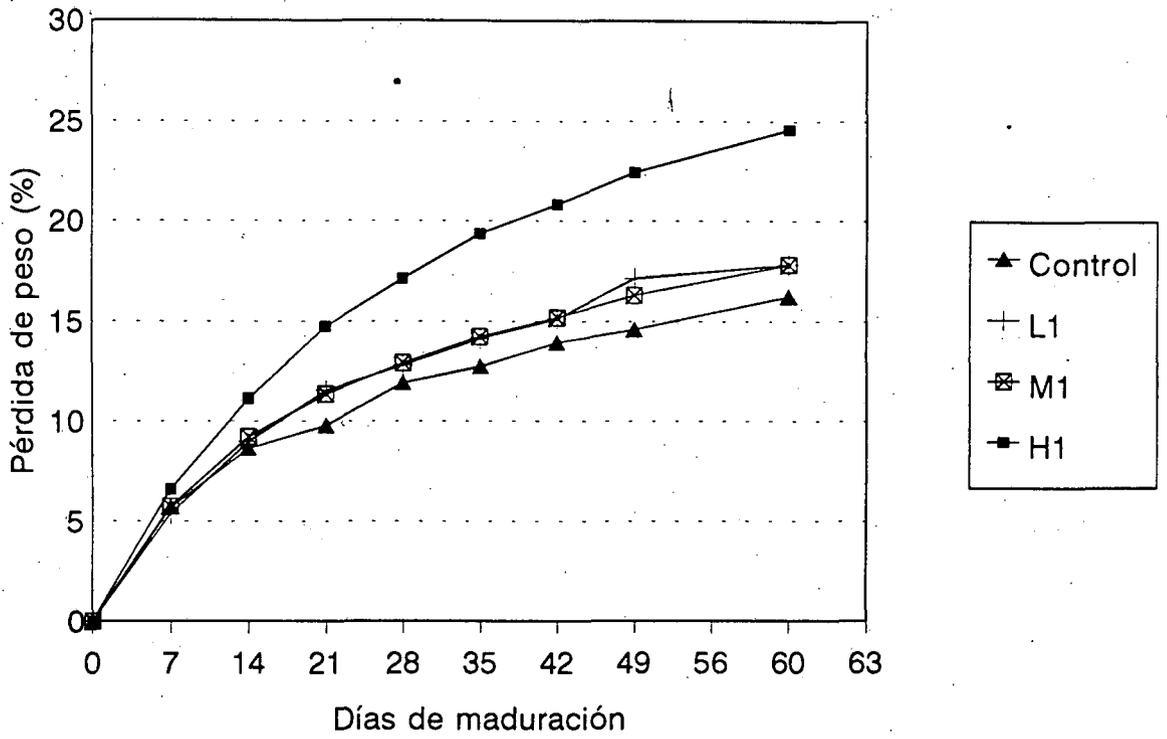


Figura 6. Envasados al vacío

4 meses de conservación



10 meses de conservación

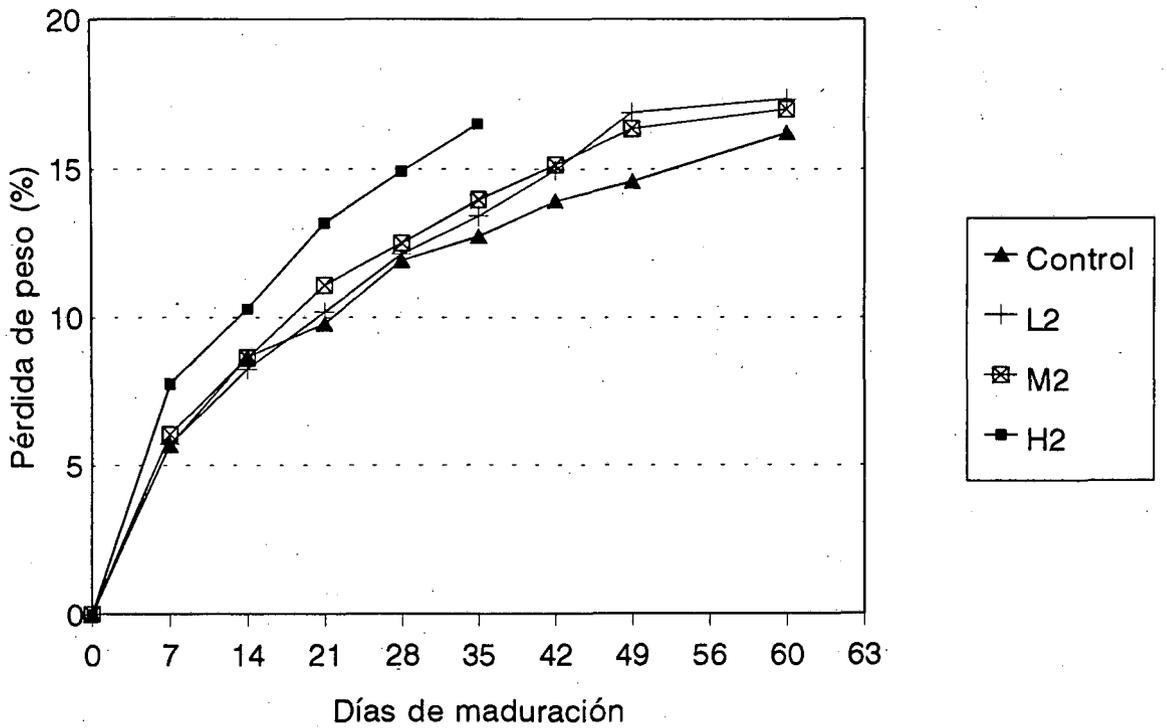


Figura 7. Envasados con gas

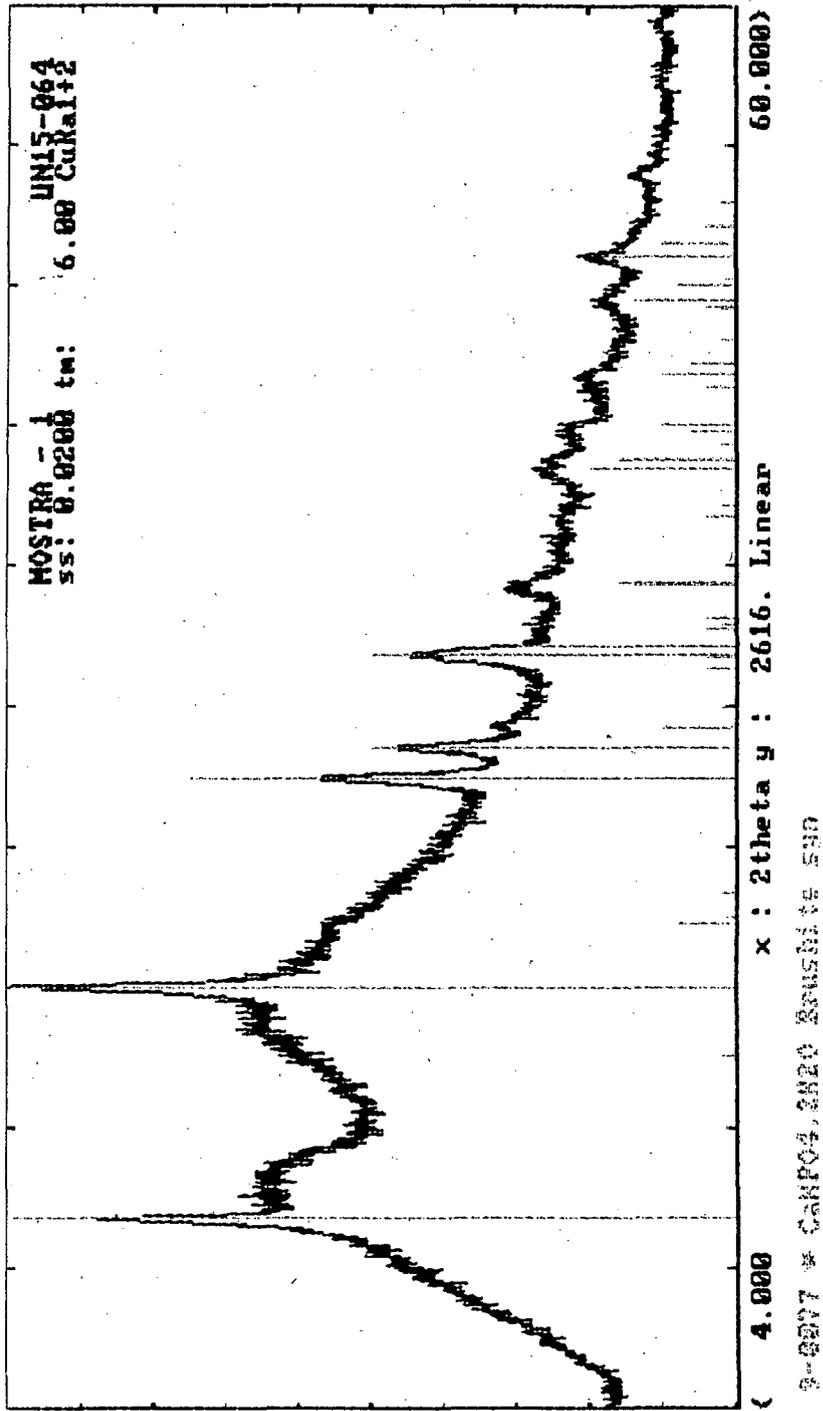


Figura 8. Espectro de difracción de rayos X de las muestras de cuajada con formaciones cristalinas, identificada como brushite syn (espectro tipo en la base de la figura).

Figura 9. Fluctuación de temperatura

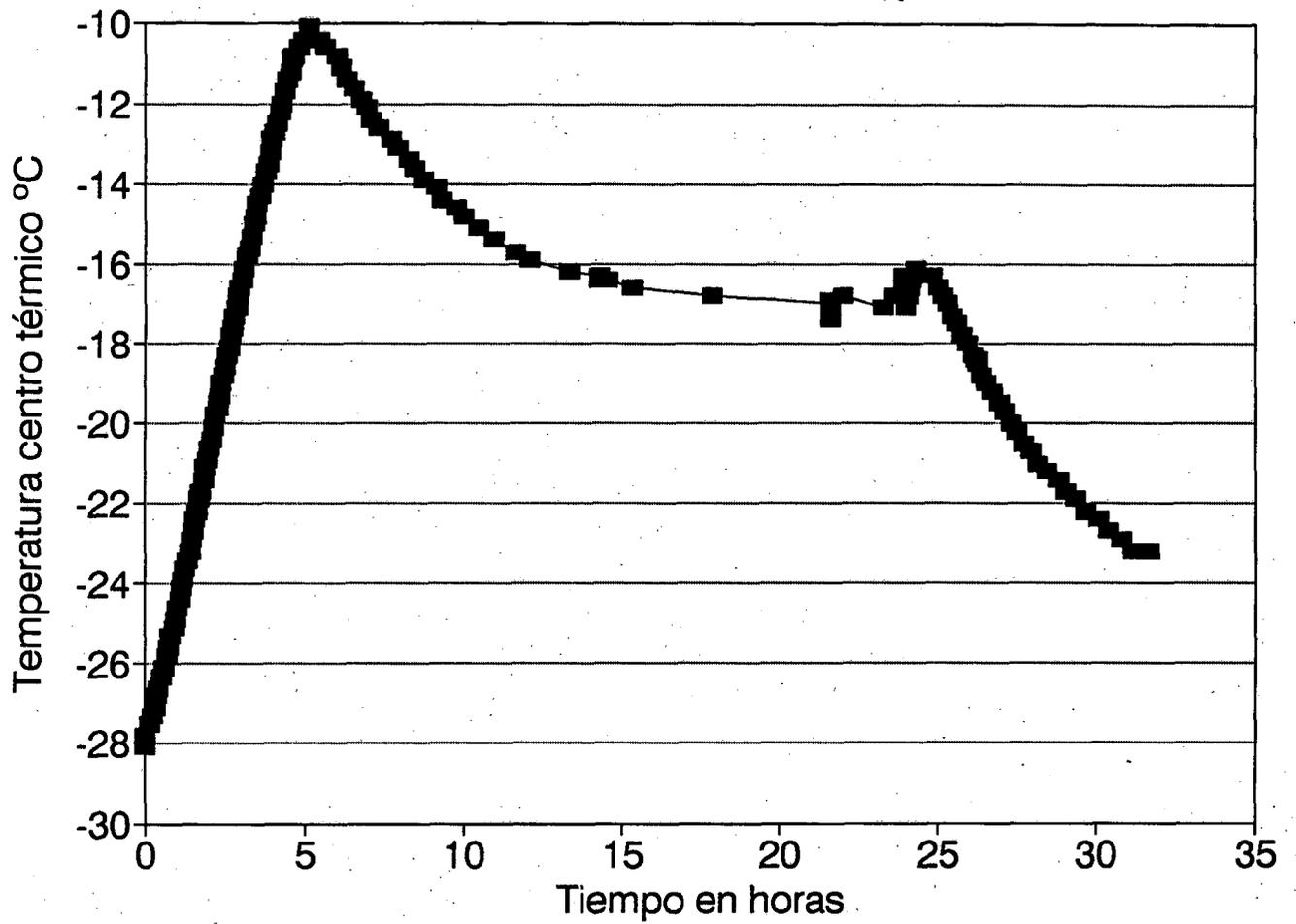


Tabla 2. Composición global (%) de las cuajadas en función del sistema de envasado (E), la velocidad de congelación (V) y el tiempo de conservación en congelación (T). Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

			est		cenizas		grasa		proteína		
Control			54,63	(1,30)	2,67	(0,16)	28,2	(1,7)	23,23	(0,70)	
E	V	T									
pe	L	1	54,19	(0,14)	2,63	(0,09)	27,8	(1,5)	23,47	(0,23)	
pe	L	2	<u>52,64</u>	(0,27)	<u>2,45</u>	(0,11)	26,8	(0,2)	<u>21,75</u>	(0,53)	
pe	M	1	54,06	(0,13)	2,68	(0,08)	26,3	(0,6)	23,21	(0,33)	
pe	M	2	53,12	(0,27)	<u>2,45</u>	(0,05)	26,9	(0,4)	<u>21,93</u>	(0,60)	
pe	H	1	54,28	(0,47)	2,70	(0,08)	<u>26,1</u>	(0,9)	23,55	(0,81)	
pe	H	2	53,78	(0,21)	2,47	(0,10)	27,9	(0,4)	22,21	(0,21)	
vac	L	1									
vac	L	2									
vac	M	1	54,51	(1,25)	2,59	(0,04)	26,3	(1,0)	23,45	(0,35)	
vac	M	2	55,75	(0,44)	2,55	(0,08)	28,4	(0,5)	22,88	(0,20)	
vac	H	1	53,93	(1,11)	2,56	(0,05)	26,3	(0,9)	22,27	(0,02)	
vac	H	2	55,02	(0,59)	2,51	(0,03)	28,9	(0,9)	22,52	(0,24)	
gas	L	1	54,32	(0,26)	2,77	(0,02)	<u>26,2</u>	(0,7)	22,77	(0,36)	
gas	L	2	53,81	(0,20)	2,74	(0,03)	26,6	(0,2)	<u>21,87</u>	(0,11)	
gas	M	1	55,02	(0,37)	2,82	(0,04)	27,2	(0,4)	22,79	(0,33)	
gas	M	2	53,96	(0,17)	2,70	(0,03)	26,7	(0,4)	22,61	(0,36)	
gas	H	1	53,99	(0,15)	2,77	(0,03)	26,8	(0,0)	<u>22,12</u>	(0,66)	
gas	H	2	53,91	(0,20)	2,76	(0,03)	27,6	(0,8)	22,56	(0,23)	

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$).

Tabla 3. Índices representativos de la composición global de las cuajadas en función del sistema de envasado (E), velocidad de congelación (V) y tiempo de mantenimiento (T). Medias^a y desviaciones estándar (std).

			a/esm	std	g/est	std
E	V	T				
0	0	0	1,72	0,07	0,52	0,02
pe	L	1	1,74	0,10	0,51	0,03
pe	L	2	1,83	0,03	0,51	0,00
pe	M	1	1,66	0,03	0,49	0,01
pe	M	2	1,79	0,03	0,51	0,01
pe	H	1	1,62	0,01	<u>0,48</u>	0,01
pe	H	2	1,79	0,03	0,52	0,01
vac	L	1				
vac	L	2				
vac	M	1	1,62	0,11	0,48	0,02
vac	M	2	1,62	0,03	0,51	0,01
vac	H	1	1,67	0,07	0,49	0,01
vac	H	2	1,72	0,04	0,53	0,01
gas	L	1	1,63	0,03	<u>0,48</u>	0,01
gas	L	2	1,70	0,02	0,49	0,00
gas	M	1	1,62	0,03	0,49	0,01
gas	M	2	1,69	0,01	0,49	0,01
gas	H	1	1,69	0,01	0,50	0,00

^aSubrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$)

Tabla 4. Fracciones nitrogenadas de las cuajadas en función del sistema de envasado (E), velocidad de congelación (V) el tiempo de conservación en congelación (T). Medias^a y desviaciones estándar (std). ^a Subrayadas las que difieren significativamente del control.

		nt	std	nnc	std	nTCA	std	nFT	std
0		3,640	0,110	0,257	0,056	0,105	0,015	0,042	0,013
pe	L	3,679	0,036	0,263	0,013	<u>0,129</u>	0,001	<u>0,071</u>	0,000
pe	L	<u>3,410</u>	0,083	0,261	0,007	<u>0,132</u>	0,004	0,046	0,013
pe	M	3,638	0,051	0,270	0,008	<u>0,126</u>	0,004	<u>0,073</u>	0,004
pe	M	<u>3,438</u>	0,094	0,261	0,016	0,122	0,001	0,053	0,000
pe	H	3,692	0,127	0,255	0,007	0,119	0,003	<u>0,074</u>	0,001
pe	H	3,482	0,033	0,264	0,009	<u>0,125</u>	0,000	0,057	0,003
vac	L								
vac	L								
vac	M	3,675	0,054	0,223	0,007	<u>0,126</u>	0,004	<u>0,064</u>	0,002
vac	M	3,586	0,032	0,239	0,005	<u>0,131</u>	0,012	0,040	0,009
vac	H	3,490	0,003	0,218	0,001	<u>0,125</u>	0,002	<u>0,061</u>	0,006
vac	H	3,530	0,038	0,232	0,012	<u>0,138</u>	0,003	0,053	0,005
gas	L	3,569	0,057	0,223	0,000	<u>0,141</u>	0,003	<u>0,082</u>	0,006
gas	L	3,428	0,017	0,234	0,005	0,141	0,005	0,063	0,009
gas	M	3,572	0,052	0,212	0,010	<u>0,140</u>	0,004	<u>0,075</u>	0,001
gas	M	3,544	0,056	0,223	0,005	<u>0,133</u>	0,000	0,058	0,005
gas	H	<u>3,468</u>	0,103	0,214	0,002	<u>0,131</u>	0,005	<u>0,079</u>	0,006
gas	H	3,535	0,036	0,220	0,007	<u>0,129</u>	0,006	0,055	0,003

Tabla 5. Índices de las fracciones nitrogenadas de las cuajadas en función del envase (E), velocidad de congelación (V) y tiempo de mantenimiento en congelación. Medias^a y desviaciones estándar (std).

			nnc/nt	std	nTCA/nt	std	nFT/nt	std
E	V	T						
0	0	0	7,02	1,36	2,87	0,32	1,15	0,34
pe	L	1	7,16	0,37	<u>3,50</u>	0,04	<u>1,92</u>	0,02
pe	L	2	7,65	0,26	<u>3,88</u>	0,14	1,35	0,36
pe	M	1	7,42	0,27	<u>3,46</u>	0,14	<u>2,01</u>	0,07
pe	M	2	7,61	0,61	<u>3,57</u>	0,12	1,54	0,05
pe	H	1	6,93	0,39	<u>3,23</u>	0,17	<u>1,99</u>	0,05
pe	H	2	7,59	0,34	<u>3,60</u>	0,03	1,63	0,09
vac	L	1						
vac	L	2						
vac	M	1	6,07	0,27	<u>3,43</u>	0,16	<u>1,73</u>	0,02
vac	M	2	6,66	0,18	<u>3,66</u>	0,35	1,12	0,25
vac	H	1	6,25	0,03	<u>3,58</u>	0,06	<u>1,74</u>	0,17
vac	H	2	6,56	0,42	<u>3,92</u>	0,12	1,49	0,12
gas	L	1	6,26	0,09	<u>3,96</u>	0,13	<u>2,30</u>	0,18
gas	L	2	6,82	0,17	<u>4,10</u>	0,14	<u>1,83</u>	0,25
gas	M	1	5,92	0,22	<u>3,93</u>	0,05	<u>2,10</u>	0,02
gas	M	2	6,30	0,25	<u>3,75</u>	0,05	1,63	0,13
gas	H	1	6,19	0,18	<u>3,78</u>	0,04	<u>2,29</u>	0,17
gas	H	2	6,22	0,25	<u>3,66</u>	0,15	1,55	0,25

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$)

Tabla 8. Composición global (%) de los quesos en función de los tratamientos aplicados a las cuajadas, envasado (E), velocidad de congelación (V) y tiempo de conservación en congelación. Medias^a y desviaciones estándar (std).

		est	std	cenizas	std	grasa	std	prot	std	clorurs	std	
E	V	T										
0	0	0	64.55	1.49	4.83	0.36	32.5	1.4	24.90	1.55	2.10	0.26
pe	L	1	63.08	0.74	5.42	0.59	31.3	0.6	24.93	0.17	2.20	0.05
pe	L	2	59.39	1.00	5.04	0.01	30.3	0.2	25.26	0.17	2.34	0.04
pe	M	1	62.09	0.25	4.73	0.11	30.8	0.8	24.83	0.07	2.19	0.02
pe	M	2	57.67	0.54	4.73	0.03	30.3	0.2	24.77	0.59	2.25	0.14
pe	H	1	62.82	0.18	4.92	0.13	30.4	0.4	24.94	0.09	2.27	0.09
pe	H	2	58.83	1.24	4.81	0.24	30.3	0.2	24.57	0.27	2.24	0.17
vac	L	1										
vac	L	2										
vac	M	1	64.77	0.21	4.65	0.07	31.3	0.2	24.92	0.65	1.93	0.02
vac	M	2	62.93	0.77	4.81	0.06	30.9	0.8	24.60	0.48	2.12	0.03
vac	H	1	63.24	0.97	4.88	0.14	30.8	0.2	24.80	1.77	2.18	0.21
vac	H	2										
gas	L	1	63.49	0.43	4.89	0.08	31.2	0.2	26.92	0.50	2.18	0.15
gas	L	2	62.56	1.05	5.04	0.03	30.3	0.0	26.68	0.31	2.33	0.09
gas	M	1	64.66	0.34	4.91	0.02	32.5	1.1	27.43	0.02	2.11	0.02
gas	M	2	61.92	0.07	4.94	0.04	31.0	0.2	26.74	0.25	2.31	0.05
gas	H	1										
gas	H	2										

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control.

Tabla 9. Índices de composición global de los quesos en función de los tratamientos aplicados a las cuajadas de que proceden: condiciones de envasado (E), velocidad de congelación (V) y tiempo de conservación en congelación (T). Medias^a y desviaciones estándar.

			a/esm	std	g/est	std	cl/acu	std
E	V	T						
0	0	0	1,11	0,07	0,50	0,01	5,92	0,68
pe	L	1	1,16	0,03	0,50	0,00	5,96	0,24
pe	L	2	1,40	0,07	0,51	0,00	5,77	0,06
pe	M	1	1,21	0,05	0,50	0,01	5,78	0,09
pe	M	2	1,55	0,05	0,53	0,01	5,32	0,34
pe	H	1	1,15	0,02	0,48	0,01	6,11	0,22
pe	H	2	1,45	0,12	0,52	0,02	5,45	0,58
vac	L	1						
vac	L	2						
vac	M	1	1,05	0,02	0,48	0,00	5,47	0,09
vac	M	2	1,16	0,02	0,49	0,01	5,73	0,21
vac	H	1	1,14	0,06	0,49	0,01	5,95	0,72
vac	H	2						
gas	L	1	1,13	0,02	0,49	0,00	5,97	0,49
gas	L	2	1,16	0,07	0,48	0,01	6,22	0,10
gas	M	1	1,10	0,05	0,50	0,02	5,98	0,02
gas	M	2	1,23	0,01	0,50	0,00	6,07	0,12
gas	H	1						
gas	H	2						

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$)

Tabla 11. Índices de las fracciones nitrogenadas del queso en función de los tratamientos aplicados a las cuajadas de que proceden: condiciones de envasado (E), velocidad de congelación (V) y tiempo de conservación en congelación (T). Medias^a y desviaciones estándar (std).

			nnc/nt	std	nTCA/nt	std	nFT/nt	std
E	V	T						
0	0	0	15,03	2,87	9,75	1,38	2,60	0,32
pe	L	1	<u>20,74</u>	0,23	<u>17,48</u>	0,19	<u>12,81</u>	0,50
pe	L	2	15,66	0,55	<u>12,43</u>	0,65	<u>9,56</u>	1,49
pe	M	1	<u>21,27</u>	0,42	<u>17,34</u>	0,08	<u>12,05</u>	0,36
pe	M	2	17,55	0,12	<u>13,77</u>	0,20	<u>8,14</u>	0,56
pe	H	1	<u>20,51</u>	0,11	<u>16,69</u>	0,09	<u>11,68</u>	0,32
pe	H	2	16,92	0,54	<u>13,06</u>	0,31	<u>7,61</u>	0,57
vac	L	1						
vac	L	2						
vac	M	1	<u>21,44</u>	1,43	<u>15,89</u>	1,12	<u>7,99</u>	0,67
vac	M	2	<u>24,95</u>	3,38	<u>14,39</u>	0,78	<u>8,18</u>	0,59
vac	H	1	<u>23,00</u>	1,84	<u>16,41</u>	0,55	<u>8,74</u>	0,60
vac	H	2						
gas	L	1	16,39	0,41	<u>14,99</u>	0,70	<u>9,41</u>	0,71
gas	L	2	14,55	0,37	<u>11,82</u>	0,54	<u>9,00</u>	1,13
gas	M	1	16,06	0,25	<u>15,42</u>	1,61	<u>9,98</u>	0,29
gas	M	2	14,75	0,33	<u>12,78</u>	0,18	<u>10,53</u>	0,69
gas	H	1						
gas	H	2						

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$)

Tabla 15. Recuentos microbianos (log UFC/g) de las cuajadas en función del sistema de envasado (E) y de la velocidad de congelación (V). Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

		Mesófilos	Hongos	Sicrótrofos
Control		9,40 (0,07)	1,85 (0,40)	8,50 (0,12)
E	V			
G	L	<u>9,05</u> (0,04)	n.d.	8,50 (0,07)
G	M	<u>8,71</u> (0,20)	n.d.	8,52 (0,15)
P	L	<u>8,29</u> (0,07)	n.d.	<u>7,83</u> (0,05)
P	M	<u>8,01</u> (0,02)	1,43 (0,08)	<u>7,89</u> (0,24)
G.S. ^b				

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$). Con igual superíndice las que no difieren entre ellas.

^b Grado de significación obtenido en el análisis de la varianza de 1 factor
n.d.: recuentos no detectados

Tabla 16. Recuentos microbianos (log UFC/g) de los quesos en función del sistema de envasado (E) y de la velocidad de congelación (V) de las cuajadas de que proceden. Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

		Mesófilos	Hongos	Sicrótrofos
Control		8,01 (0,53)	1,46 (0,46)	6,56 (0,10)
E	V			
gas	L	7,63 (0,29)	1,60 (0,15)	6,40 (0,08)
gas	M	7,90 (0,17)	1,54 (0,06)	6,30 (0,08)
pe	L	8,46 (0,15)	1,00 (0,00)	8,29 (0,04)
pe	M	<u>7,11</u> (0,12)	1,10 (0,14)	8,04 (0,17)
G.S. ^b				

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$).

^b Grado de significación obtenido en el análisis de la varianza de 1 factor.

Tabla 17. Parámetros texturales de las cuajadas en función de las condiciones de envasado (E) y la velocidad de congelación (V). Medias^a y desviaciones estándar (std).

		elasticid.	std	cohesiv.	std	mastic.	std	gomos.	std	adhesiv.	std	dureza	std
E	V												
0	0	0,7953	0,033	0,4917	0,090	1,5396	0,452	1,9262	0,522	-0,03857	0,034	3876,4	553,1
	L	0,7769	0,022	0,4065	0,029	0,8488	0,103	1,0880	0,134	-0,03814	0,027	2651,0	244,1
	M	0,7816	0,024	0,4302	0,040	1,4884	0,231	1,8825	0,294	-0,01302	0,005	4319,0	329,4
gas	L	0,7536	0,018	0,4608	0,037	1,0922	0,176	1,4420	0,231	-0,03237	0,038	3090,1	311,7
gas	M	0,7743	0,018	0,4834	0,056	1,5056	0,381	1,9339	0,491	-0,04707	0,028	3906,2	648,4
pe	L	0,7619	0,029	0,4417	0,033	0,8200	0,095	1,0903	0,111	-0,05238	0,017	2451,4	182,1
pe	M	0,7994	0,026	0,5345	0,077	1,4358	0,185	1,7874	0,252	-0,07108	0,043	3323,9	216,6

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control

Tabla 18. Resistencia al corte de las cuajadas en función de las condiciones de envasado y la velocidad de congelación. Medias^a y desviaciones estándar.

		f max	std	f mit	std	área	std	grad	std
E	V								
0	0	214,5	26,8	181,5	15,8	681,6	68,9	-8,4	11,7
	L	221,5	27,9	189,0	22,2	703,2	76,5	-11,8	5,8
	M	<u>266,3</u>	26,6	<u>220,3</u>	11,4	<u>843,2</u>	37,9	-16,0	9,7
gas	L	214,4	31,5	178,2	20,9	637,9	56,7	-17,8	11,6
gas	M	225,5	30,7	191,8	21,4	686,6	67,6	-12,8	11,9
pe	L	<u>191,2</u>	19,1	136,6	15,1	456,3	51,4	-5,6	3,4
pe	M	207,4	15,3	185,3	7,0	623,1	34,3	-13,1	4,8

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control

f max: fuerza máxima de corte (g)

f mit: fuerza media de corte (g)

área: área descrita bajo el gráfico de fuerza (g)

grad: gradiente de la fuerza aplicada

Tabla 19. Parámetros texturales de los quesos en función de los tratamientos aplicados a las cuajadas de que proceden: condiciones de envasado (E) y velocidad de congelación (V). Medias^a y desviaciones estándar.

		elastic.	std	cohesiv.	std	mastic.	std	gomos.	std	adhes.	std	dureza	std
E	V												
0	0	0,5158	0,074	0,1641	0,027	0,4534	0,131	0,8778	0,221	-0,085	0,069	5606,8	1580,6
gas	L	0,4672	0,082	0,1719	0,026	0,6675	0,200	1,4148	0,289	-0,144	0,102	7357,5	1220,1
gas	M	0,5922	0,083	0,1811	0,023	0,7286	0,159	1,6993	0,221	-0,126	0,035	7708,5	758,6
pe	L	0,5544	0,068	0,1671	0,028	0,6194	0,134	1,1220	0,242	-0,069	0,035	7221,7	812,1
pe	L	0,5913	0,052	0,1813	0,017	0,6913	0,086	1,1781	0,171	-0,069	0,052	7179,0	846,9

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$)

Tabla 20. Parámetros de resistencia al corte de los quesos en función de los tratamientos aplicados a las cuajadas de que proceden: condiciones de envasado (E) y velocidad de congelación (V). Medias^a y desviaciones estándar (std).

		f max	std	f mit.	std	area	std	grad	std
E	V								
	0	339,3	177,3	297,8	150,7	1189,4	585,9	-8,7	12,4
	gas	361,3	71,0	311,0	60,6	1305,8	255,0	-6,2	6,0
	gas	500,7	126,3	421,8	93,0	1707,4	407,7	-10,8	8,5
	pe	408,2	40,0	363,5	43,0	1446,7	127,2	-22,8	16,9
	pe	381,5	44,3	337,7	48,3	1320,7	204,7	-21,2	13,4

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control

f max: fuerza máxima de corte (g)

f mit: fuerza media de corte (g)

área: área bajo el gráfico de corte (g)

grad: gradiente de la fuerza aplicada para cortar

Tabla 21. Parámetros de color de las cuajadas en función de las condiciones de envase (E) y la velocidad de congelación (V). Medias^a y desviaciones estándar (std).

	L	std	a	std	b	std	Wi	std	Hue	std	chroma	std	ΔE	std
E	V													
	0	94,5	0,2	-1,4	0,1	11,6	0,4	26,7	2,4	-1,4	0,005	11,7	0,4	
	L	94,3	0,4	<u>-1,6</u>	0,1	11,4	0,4	27,0	2,0	-1,4	0,008	11,5	0,3	0,6 0,2
	M	94,8	0,4	-1,4	0,1	10,8	0,7	<u>32,7</u>	3,8	-1,4	0,008	10,9	0,7	0,9 0,5
gas	L	<u>93,5</u>	0,2	-1,4	0,1	11,7	0,5	24,9	2,9	<u>-1,5</u>	0,001	11,7	0,5	1,2 0,3
gas	M	93,8	0,4	-1,4	0,1	11,4	0,3	26,6	1,7	-1,5	0,002	11,5	0,3	0,9 0,3
pe	L	<u>92,7</u>	0,1	-1,3	0,1	12,1	0,8	23,7	3,1	<u>-1,5</u>	0,002	12,1	0,4	2,0 0,2
pe	M	<u>93,0</u>	1,0	-1,2	0,0	12,3	0,5	26,1	2,1	-1,5	0,003	12,3	0,6	1,9 0,9

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$)

Tabla 22. Parámetros de color del queso en función de los tratamientos aplicados a las cuajadas de que proceden: condiciones de envasado (E) y velocidad de congelación (V). Medias^a y desviaciones estándar (std).

	L	std	a	std	b	std	Wi	std	Hue	std	chroma	std	ΔE	std
E	V													
0	0	92,3	0,7	-1,0	0,1	15,6	1,8	3,4	6,8	6,8	15,6	1,8		
gas	L	<u>82,3</u>	0,4	-1,0	0,5	14,9	0,7	<u>-6,8</u>	3,8	3,8	14,9	0,7	10,0	0,2
gas	M	<u>80,9</u>	0,9	-1,5	0,0	14,3	0,5	<u>-4,4</u>	3,2	3,2	14,4	0,5	11,4	0,8
pe	L	<u>82,8</u>	0,6	-1,8	0,1	14,4	0,7	<u>-5,7</u>	0,7	0,7	14,5	0,7	9,6	0,4
pe	M	<u>83,8</u>	0,4	-1,8	0,1	15,3	0,6	<u>-7,6</u>	0,2	0,2	15,3	0,6	8,4	0,3

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control

Tabla 23. Atributos de la evaluación organoléptica descriptiva del queso en función de los tratamientos aplicados a la cuajada de que proceden. Medias^a y desviaciones estándar.

E	V		aspecto	std	color	std	aroma	std		
control			2,9	0,6	1,1	0,6	2,3	1,2		
pe	L		2,2	0,9	1,7	0,8	2,1	1,0		
pe	M		2,6	0,8	<u>2,4</u>	0,8	1,9	0,9		
gas	L		3,1	0,6	<u>2,6</u>	0,7	1,8	0,8		
gas	M		3,1	0,6	<u>2,7</u>	0,8	1,8	0,8		
			f morder	std	granul.	std	plasti.	std	cremos	std
control			2,0	0,8	2,6	0,7	1,4	1,0	1,8	1,0
pe	L		2,1	0,9	4,0	0,5	1,3	0,5	1,0	0,6
pe	M		2,7	0,9	3,2	1,1	1,2	0,6	1,1	0,5
gas	L		1,2	0,3	1,8	0,5	1,6	1,1	1,9	1,0
gas	M		1,6	0,6	1,9	0,7	1,7	1,0	2,1	0,8
			sabor	std	rancidez	std	salado	std	general	std
control			2,3	0,8	1,6	0,9	2,2	1,1	3,9	0,9
pe	L		2,2	0,9	1,2	0,7	2,2	0,6	3,9	0,8
pe	M		2,3	0,8	1,7	0,9	2,1	1,1	3,8	0,8
gas	L		2,9	0,8	1,2	1,1	1,6	0,9	4,0	1,0
gas	M		2,9	0,8	1,0	0,6	1,5	0,8	4,3	1,2

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control

Tabla 24. Composición global (%) e índices representativos de las cuajadas en función del número de oscilaciones térmicas experimentadas durante 4 meses de conservación en congelación. Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

	est	grasa	proteína	g/est	a/esm
Control	47,87 (0,39)	27,6 (0,3)	17,95 (0,21)	0,58 (0,01)	2,57 (0,07)
0 oscil.	48,80 (0,21)	<u>26,3</u> (0,3)	17,68 (0,21)	<u>0,54</u> (0,00)	<u>2,28</u> (0,02)
1 oscil.	<u>49,72</u> (0,24)	26,7 (0,7)	17,77 (0,13)	<u>0,53</u> (0,01)	<u>2,16</u> (0,06)
2 oscil.	48,82 (0,99)	<u>25,0</u> (0,6)	17,59 (0,27)	<u>0,51</u> (0,02)	<u>2,17</u> (0,17)
3 oscil.	<u>49,59</u> (0,82)	<u>25,5</u> (1,3)	17,56 (0,23)	<u>0,51</u> (0,02)	<u>2,04</u> (0,09)
G.S. ^b	0,0001	0,0001	0,0604	0,0001	0,0001

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$).

^b Grado de significación obtenido en el análisis de la varianza de 1 factor.

Tabla 25. Composición global (%) e índices representativos de los quesos en función del número de oscilaciones térmicas experimentadas por las cuajadas de que proceden. Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

	est	grasa	proteína	g/est	a/esm
Control	61,17 (0,31)	33,6 (1,0)	21,20 (0,64)	0,55 (0,02)	1,43 (0,05)
0 oscil.	<u>63,23</u> (0,39)	34,4 (0,4)	21,60 (0,61)	0,55 (0,01)	<u>1,29</u> (0,03)
1 oscil.	<u>62,31</u> (0,88)	<u>35,0</u> (0,0)	21,21 (0,59)	0,56 (0,00)	<u>1,34</u> (0,04)
2 oscil.	61,77 (0,90)	33,5 (0,7)	21,50 (0,35)	0,55 (0,01)	1,40 (0,04)
3 oscil.	61,96 (0,65)	33,0 (0,0)	21,50 (1,17)	0,53 (0,01)	<u>1,33</u> (0,06)
G.S. ^b	0,0001	0,0001	0,8886	0,0053	0,0010

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$).

^b Grado de significación obtenido en el análisis de la varianza de 1 factor.

Tabla 26. Fracciones nitrogenadas (%) e índices representativos de las cuajadas en función del número de oscilaciones térmicas experimentadas durante 4 meses de conservación en congelación. Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

	nt	nnc	nTCA	nFT	nnc/nt	nTCA/nt	nFT/nt
Control	2,81 (0,03)	0,179 (0,009)	0,087 (0,007)	0,047 (0,002)	6,35 (0,39)	3,10 (0,23)	1,65 (0,06)
0 oscil.	2,77 (0,03)	0,197 (0,008)	0,069 (0,008)	0,036 (0,005)	7,13 (0,27)	2,48 (0,30)	1,30 (0,19)
1 oscil.	2,79 (0,02)	0,182 (0,011)	0,070 (0,005)	0,040 (0,001)	6,53 (0,41)	2,50 (0,20)	1,45 (0,04)
2 oscil.	2,76 (0,04)	0,199 (0,007)	0,068 (0,006)	0,041 (0,005)	7,23 (0,27)	2,46 (0,25)	1,50 (0,15)
3 oscil.	2,75 (0,04)	0,194 (0,005)	0,066 (0,004)	0,042 (0,003)	7,04 (0,27)	2,40 (0,16)	1,53 (0,12)
G.S. ^b	0,0614	0,0028	0,0008	0,0109	0,0018	0,0032	0,0122

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$).

^b Grado de significación obtenido en el análisis de la varianza de 1 factor.

Tabla 27. Fracciones nitrogenadas (%) e índices representativos de los quesos en función del número de oscilaciones térmicas experimentadas por las cuajadas de que proceden. Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

	nt	nnc	nTCA	nFT	nnc/nt	nTCA/nt	nFT/nt
Control	3,32 (0,10)	0,710 (0,012)	0,505 (0,004)	0,107 (0,006)	21,40 (0,71)	15,22 (0,50)	3,23 (0,12)
0 oscil.	3,39 (0,10)	<u>0,765</u> (0,023)	<u>0,566</u> (0,019)	<u>0,206</u> (0,008)	22,63 (0,89)	<u>16,74</u> (0,68)	<u>6,09</u> (0,32)
1 oscil.	3,32 (0,09)	<u>0,767</u> (0,012)	<u>0,575</u> (0,012)	<u>0,212</u> (0,007)	23,09 (0,83)	<u>17,32</u> (0,77)	<u>6,39</u> (0,27)
2 oscil.	3,37 (0,05)	<u>0,757</u> (0,022)	<u>0,393</u> (0,278)	<u>0,216</u> (0,007)	22,49 (0,95)	<u>17,70</u> (0,22)	<u>6,40</u> (0,31)
3 oscil.	3,37 (0,18)	<u>0,749</u> (0,015)		<u>0,203</u> (0,005)	22,33 (1,51)		<u>6,06</u> (0,40)
G.S. ^b	0,8886	0,0014	0,0001	0,0001	0,2772	0,0005	0,0001

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$).

^b Grado de significación obtenido en el análisis de la varianza de 1 factor.

Tabla 28.1. Composición en ácidos grasos totales de cuajadas y quesos de ellas obtenidos, en función de las fluctuaciones sufridas por las cuajadas. Medias^a y desviaciones estándar (std). r² de las rectas de calibración de cada ácido graso.

	C4:0	std	C6:0	std	C8:0	std	C10:0	std	C12:0	std	C14:0	std
cuajada												
control	3,74	0,09	3,28	0,07	3,09	0,08	8,69	0,40	5,04	0,45	11,76	0,41
0 oscil.	3,26	0,11	2,91	0,02	2,80	0,10	7,68	0,60	4,45	0,10	11,37	0,10
1 oscil.	3,72	0,19	3,24	0,11	2,95	0,08	7,72	1,13	4,60	0,04	11,68	0,05
2 oscil.	3,36	0,10	3,01	0,08	2,83	0,09	7,87	0,23	4,33	0,32	10,78	0,61
3 oscil.	3,79	0,03	3,27	0,00	3,13	0,09	9,28	0,38	4,78	0,12	11,46	0,11
queso												
control	3,95	0,14	3,46	0,19	3,26	0,12	8,02	0,34	5,16	0,31	12,96	0,00
0 oscil.	3,58	0,09	3,21	0,03	2,89	0,07	7,08	0,91	4,48	0,03	11,63	0,21
1 oscil.	3,49	0,28	3,08	0,24	2,78	0,20	8,14	0,60	4,48	0,37	<u>10,98</u>	0,55
2 oscil.	3,87	0,46	3,36	0,35	3,08	0,27	9,09	0,65	4,87	0,22	11,65	0,21
3 oscil.	3,52	0,12	3,01	0,18	2,79	0,07	8,14	0,26	4,53	0,16	11,53	0,39
r ²		0,9825		0,9699		0,9759		0,8622		0,9692		0,9640

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control

Tabla 28.1. Composición en ácidos grasos totales de cuajadas y quesos de ellas obtenidos, en función de las fluctuaciones sufridas por las cuajadas. Medias^a y desviaciones estándar (std). r² de las rectas de calibración de cada ácido graso.

	C15:0	std	C16:0	std	C18:0	std	C18:1	std	C18:2	std
cuajada										
control	1,56	0,05	28,50	0,67	7,88	0,13	17,61	0,21	1,75	0,12
0 oscil.	1,37	0,04	27,53	0,72	7,65	0,23	18,00	0,14	2,04	0,11
1 oscil.	1,39	0,01	27,03	0,89	7,60	0,22	18,19	0,48	1,89	0,16
2 oscil.	1,33	0,06	26,72	0,86	7,01	0,64	17,67	0,30	2,40	0,27
3 oscil.	1,42	0,04	26,22	1,28	6,99	0,10	18,39	0,49	2,34	0,44
queso										
control	1,53	0,05	27,93	0,81	6,88	0,31	17,34	0,47	1,97	0,00
0 oscil.	1,42	0,05	28,05	0,71	6,90	0,21	18,03	0,79	2,27	0,11
1 oscil.	1,30	0,04	25,79	1,03	7,15	0,59	17,96	1,26	2,48	0,18
2 oscil.	1,38	0,04	25,41	0,83	6,43	0,26	16,39	0,26	2,26	0,10
3 oscil.	1,38	0,05	26,18	0,43	6,90	0,20	17,04	0,12	2,26	0,07
r ²		0,9784		0,8636		0,9716		0,9634		0,9618

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control

Tabla 34. Recuentos microbianos (log UFC/g) de las cuajadas en función del número de oscilaciones sufridas durante la conservación en congelación. Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

	Mesófilos	Hongos	Sicrótrofos
Control	9,7 (0,1)	0,6 (0,6)	
0 oscil.	<u>8,7</u> (0,2)	0,5 (0,7)	5,8 (0,1)
1 oscil.	9,3 (0,1)	0,4 (0,6)	6,1 (0,0)
2 oscil.	<u>8,9</u> (0,3)	0,0 (0,0)	5,9 (0,1)
3 oscil.	<u>8,7</u> (0,3)	0,0 (0,0)	5,7 (0,1)
G.S. ^b	0,0001	0,1978	0,0006

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$).

^b Grado de significación obtenido en el análisis de la varianza de 1 factor

Tabla 35. Recuentos microbianos (log UFC/g) de los quesos en función del número de oscilaciones sufridas por las cuajadas de que proceden durante la conservación en congelación. Medias^a y desviaciones estándar entre paréntesis.

	Mesófilos	Hongos	Sicrótrofos
Control	7,2 (0,3)	1,0 (0,7)	5,7 (0,1)
0 oscil.	7,1 (0,5)	<u>0,0</u> (0,0)	6,0 (0,5)
1 oscil.	7,2 (0,2)	<u>0,0</u> (0,0)	6,3 (0,7)
2 oscil.	7,3 (0,1)	<u>0,0</u> (0,0)	<u>6,7</u> (0,5)
3 oscil.	7,5 (0,2)	<u>0,0</u> (0,0)	6,3 (0,2)
G.S. ^b	0,2774	0,0001	0,0333

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control ($p < 0.05$).

^b Grado de significación obtenido en el análisis de la varianza de 1 factor

Tabla 36. Parámetros texturales del queso en función de las oscilaciones de temperatura sufridas por las cuajadas de que proceden. Medias^a y desviaciones estándar.

	elastic.	std	cohes.	std	mastic.	std	gomos.	std	adhes.	std	dureza	std
control	0,4313	0,042	0,1302	0,015	0,2358	0,045	0,5444	0,073	-0,1779	0,075	4,2023	0,525
0 oscil.	<u>0,5033</u>	0,051	<u>0,1614</u>	0,017	<u>0,4608</u>	0,093	<u>0,9103</u>	0,125	-0,1823	0,069	<u>5,6308</u>	0,385
1 oscil.	<u>0,5121</u>	0,065	0,1500	0,009	<u>0,4533</u>	0,059	<u>0,8951</u>	0,141	-0,2568	0,091	<u>5,9523</u>	0,703
2 oscil.	0,4444	0,037	<u>0,1593</u>	0,013	<u>0,4089</u>	0,059	<u>0,9175</u>	0,076	-0,1866	0,119	<u>5,7806</u>	0,413
3 oscil.	0,4401	0,032	<u>0,1640</u>	0,025	<u>0,4239</u>	0,091	<u>0,9665</u>	0,196	-0,2395	0,054	<u>5,8539</u>	0,618

^a Subrayadas la que difieren significativamente del control ($p < 0,05$)

Tabla 37: Parámetros de la resistencia al corte de quesos en función de las oscilaciones de temperatura sufridas por las cuajadas de que proceden. Media^a y desviaciones estándar (std).

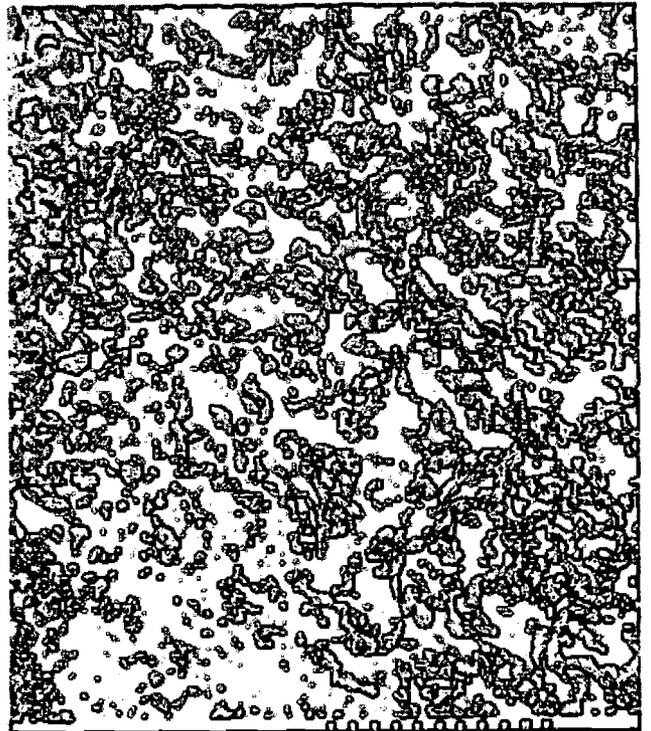
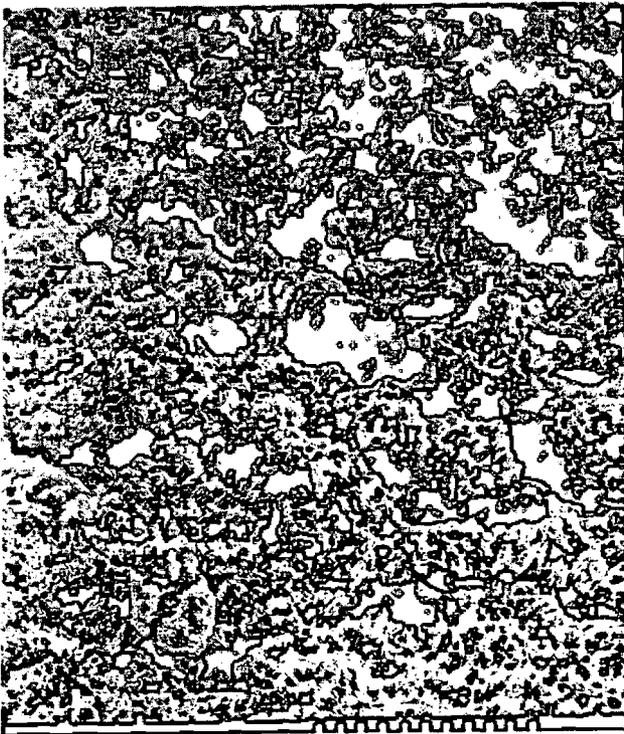
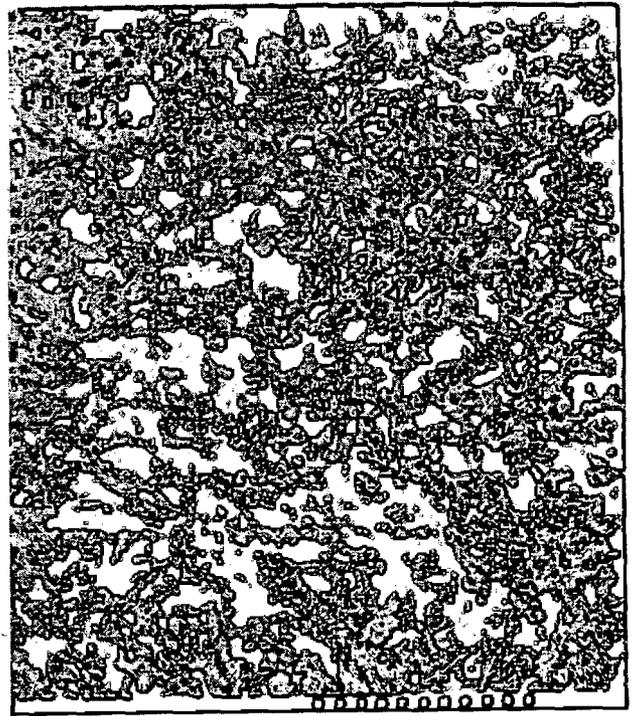
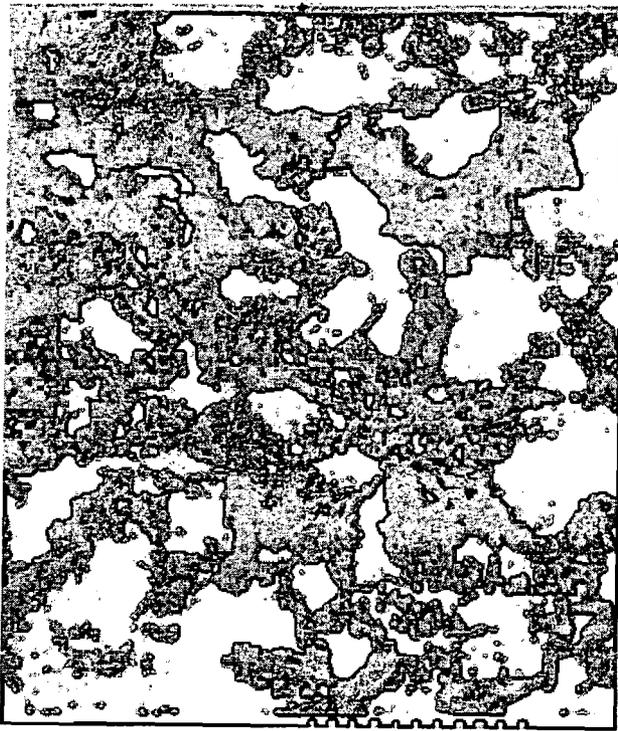
	f max	std	f mit	std	area	std	grad	std
control	304,2	50,7	267,8	44,0	1110,0	196,1	-2,6	11,8
0 oscil.	342,0	30,7	293,6	16,2	1239,0	59,4	-8,5	10,0
1 oscil.	323,1	29,9	294,8	20,3	1191,7	105,0	-6,6	5,7
2 oscil.	311,5	16,7	278,3	13,7	1128,4	150,3	-4,0	10,0
3 oscil.	<u>357,1</u>	35,0	<u>322,1</u>	27,0	<u>1317,4</u>	153,4	-8,1	4,7

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control

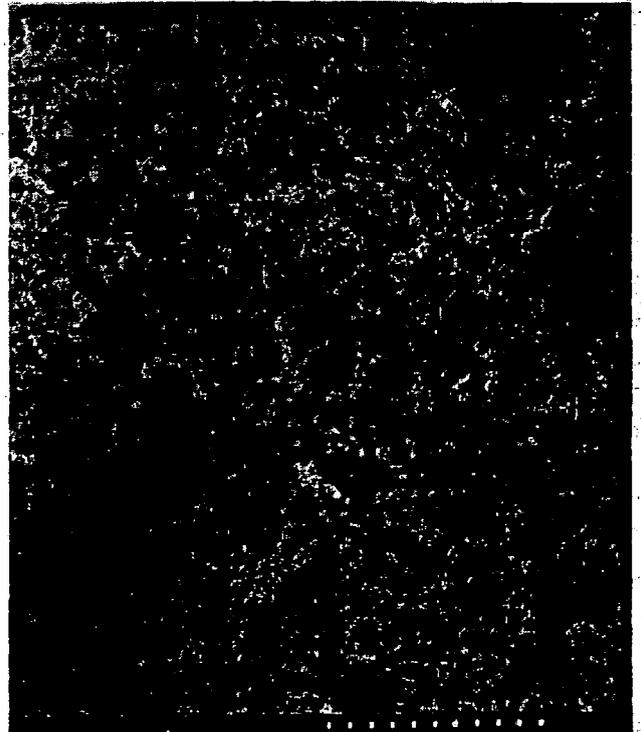
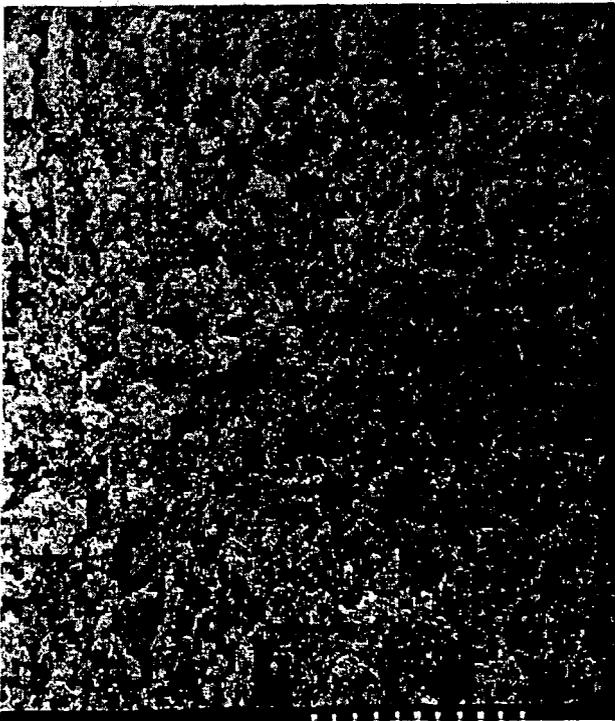
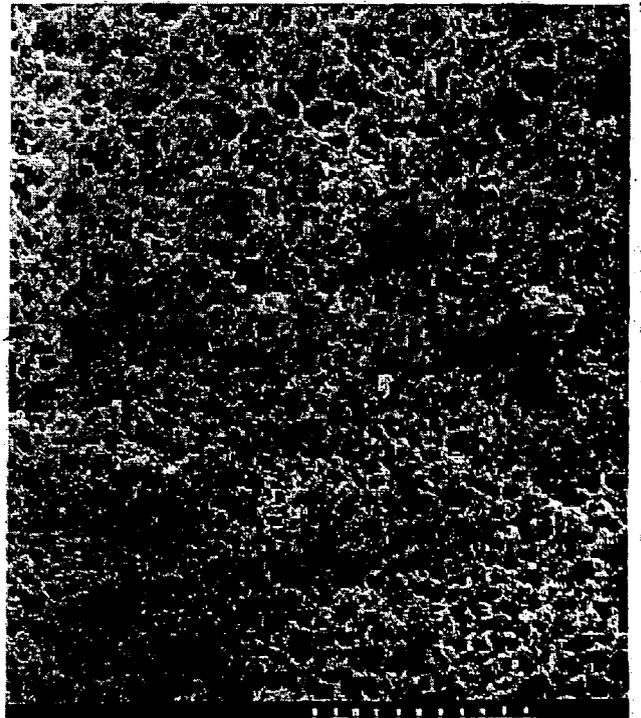
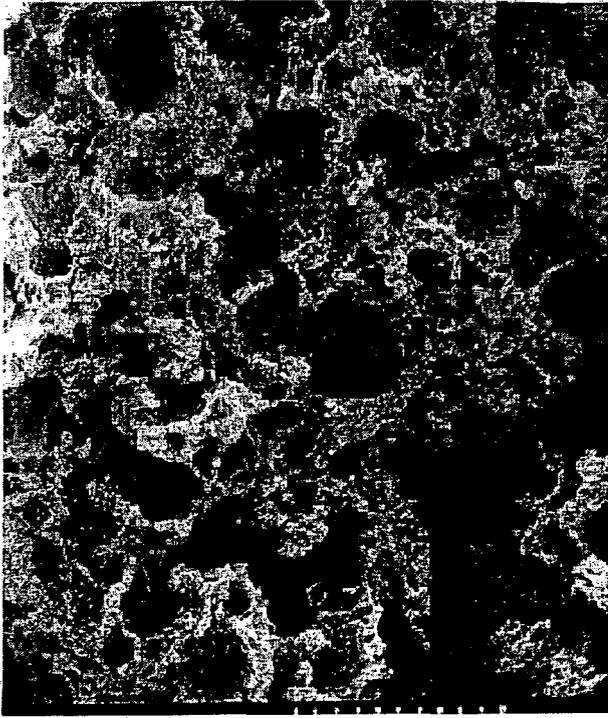
Tabla 38. Parámetros de color del queso en función de las oscilaciones de temperatura sufridas por las cuajadas de que proceden. Media^a y desviaciones estándar (std).

	L	std	a	std	b	std	wi	std	hue	std	chroma	std	ΔE	std
control	92,3	0,67	-1,0	0,12	15,6	1,79	3,4	6,84	-1,50	0,003	15,62	1,79		
0 oscil.	<u>81,8</u>	0,98	<u>-2,2</u>	0,09	15,3	0,40	<u>-9,1</u>	2,96	<u>-1,43</u>	0,001	15,41	0,46	10,2	0,8
1 oscil.	<u>82,0</u>	0,92	<u>-2,2</u>	0,04	15,2	0,14	-8,8	0,84	<u>-1,43</u>	0,003	15,35	0,14	10,1	0,9
2 oscil.	<u>82,8</u>	0,59	<u>-2,0</u>	0,03	14,6	0,49	<u>-5,1</u>	2,42	<u>-1,43</u>	0,006	14,72	0,49	9,6	0,7
3 oscil.	<u>82,3</u>	1,62	<u>-2,1</u>	0,10	15,1	0,48	<u>-7,9</u>	3,38	<u>-1,43</u>	0,002	15,20	0,49	9,9	1,4

^a Subrayadas las que difieren significativamente del control



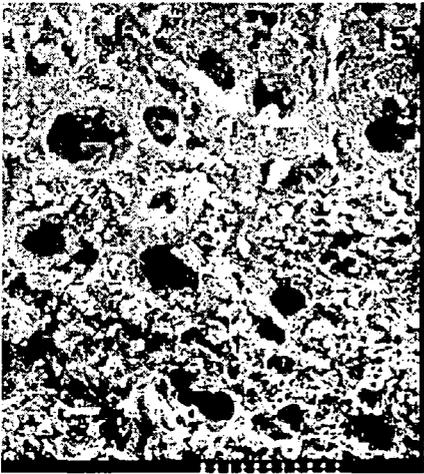
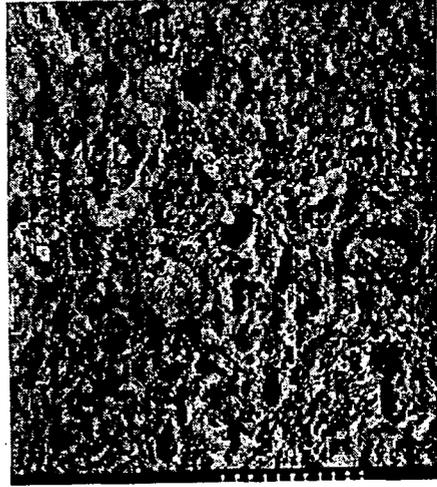
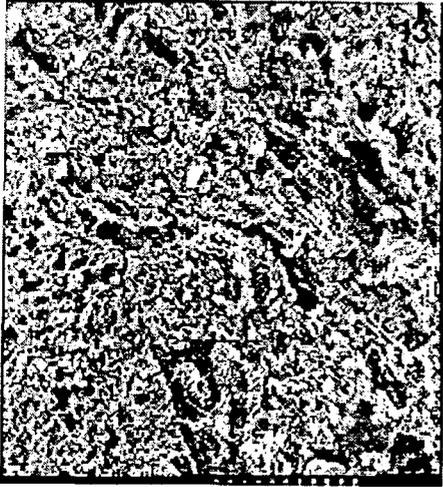
Fotografías: (1) cuajada control $12\mu\text{m}$, (2) cuajada control $60\mu\text{m}$, (3) cuajada congelada a velocidad lenta $60\mu\text{m}$ y (4) cuajada congelada a velocidad media $60\mu\text{m}$.



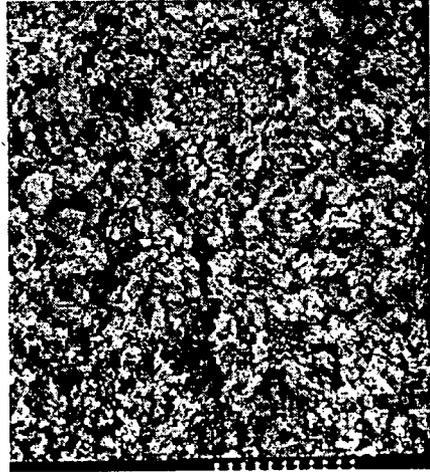
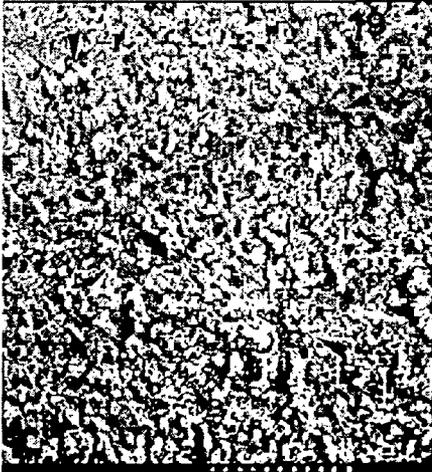
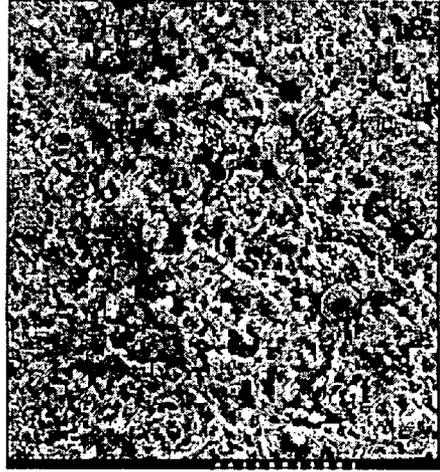
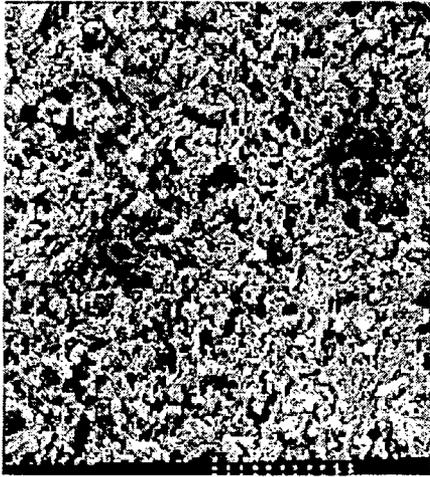
Fotografías: (5) queso control $12\mu\text{m}$, (6) queso control $60\mu\text{m}$, (7) queso procedente de cuajada congelada a velocidad lenta $60\mu\text{m}$ y (8) queso procedente de cuajada congelada a velocidad media $60\mu\text{m}$.



Fotografías 9 a 12: inclusiones cristalinas observadas en cuajadas (9 y 12) y queso (10 y 11).



Fotografías: (13) cuajada congelada $100\mu\text{m}$, (14) cuajada congelada sometida a 1 oscilación $60\mu\text{m}$, (15) cuajada congelada sometida a 2 oscilaciones $60\mu\text{m}$ y (16) cuajada congelada sometida a 3 oscilaciones $60\mu\text{m}$.



Fotografías: quesos procedentes de cuajadas (17) sin oscilaciones $60\mu\text{m}$, (18) sometidas a 1 oscilación $60\mu\text{m}$, (19) sometidas a 2 oscilaciones $100\mu\text{m}$ (las flechas indican la zona ocupada por cristales de hielo) y (20) sometida a 3 oscilaciones $100\mu\text{m}$.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Una vez realizado el estudio estadístico de los resultados obtenidos y la valoración de las diferencias entre lotes control y congelados, concluimos que la mayor parte de las modificaciones observadas están dentro de las características normales del tipo de queso estudiado, como una variabilidad normal de mercado. Incluso aquellos parámetros para los que se obtuvieron grandes desviaciones (proteolisis, dureza y color) no se vieron reflejados en una depreciación de la calidad por parte de los catadores. Por todo ello consideramos que la congelación de cuajadas es un método válido de aplicación industrial para desestacionalizar la oferta de queso madurado de leche de oveja.

La velocidad de congelación es un factor determinante del mantenimiento de la calidad del queso; existe un intervalo de velocidades en que los cambios son mínimos (velocidades **lenta** y **media** (1,5-5,4 cm/h en nuestro estudio), en cambio, una velocidad excesiva provoca rupturas macroscópicas con deterioro del producto.

Las cuajadas congeladas a velocidad **lenta** presentaron mayores alteraciones microestructurales y texturales que la **media**, sin embargo la maduración revertió las alteraciones debidas a la velocidad aplicada en el proceso de congelación.

El envase utilizado puede afectar al aspecto externo de la cuajada y queso, como observamos en el envasado al **vacío**. Envasar en **polietileno** o en envase barrera y al **vacío** o en atmósfera de **CO₂** no afecta a la composición global, fracciones nitrogenadas, integridad de la fracción grasa, textura, microestructura, color y características sensoriales.

El efecto del envase fue significativo para la supervivencia de la flora microbiana de las cuajadas, de forma que en cuajadas congeladas en ausencia de oxígeno (**CO₂**) la reducción de la flora fue inferior a la observada al envasar con aire (**polietileno**). Estos cambios no se vieron reflejados en el queso puesto que tras la maduración se obtuvieron recuentos iguales en todos los quesos, al igual que ocurriera con textura y microestructura la maduración niveló las variaciones.

La conservación en congelación por un periodo de tiempo inferior a 10 meses ofrece buenos resultados.

Los quesos procedentes de cuajadas congeladas presentaron valores de a_w significativamente inferiores a los quesos de elaboración clásica.

El proceso de congelación provocó un aumento de los índices de proteolisis que en ningún caso fue detectado en el análisis sensorial del queso.

La composición y características de la fracción lipídica no se vieron modificadas por ninguno de los tratamientos de congelación aplicados.

Las mediciones objetivas de la textura demostraron aumento de la dureza, masticabilidad y gomosidad del queso obtenido de cuajadas congeladas, sin embargo estos cambios no fueron detectados por los catadores.

Los quesos elaborados con cuajadas congeladas presentaron un descenso de la luminosidad (L), aunque sí fue apreciado por los catadores como mayor intensidad de color no redujo la aceptabilidad de los mismos.

Unas condiciones adecuadas para la congelación de cuajadas de queso duro de leche de oveja son,

- la utilización de un sistema de congelación que permita congelar a una velocidad situada en el intervalo entre 1,5-5,4 cm/h,
- el envasado en bolsa de polietileno, adecuado para la manipulación y conservación de estas cuajadas, sin necesidad de utilizar sistemas ni materiales de envasado más complejos y económicamente costosos,
- descongelar las cuajadas dentro de un período de mantenimiento inferior a 10 meses para su maduración.

Si durante el almacenamiento en congelación las cuajadas se someten a oscilaciones de temperatura de $13 \pm 1^\circ\text{C}$, un máximo de 3 veces, no se aprecian modificaciones de la calidad del queso. No varían significativamente respecto al queso procedente de cuajadas congeladas

correctamente almacenadas: composición global, índices de proteólisis, fracción lipídica, pH, a_w , recuentos microbianos, textura, color y características sensoriales. La microestructura de las cuajadas se vió gravemente modificada por las fluctuaciones de temperatura aunque tras la maduración las diferencias fueron imperceptibles.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Addeo F., L. Chianese, R. Sacchi, S. Spagna Musso, P. Ferranti y A. Malorni (1994). Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120g. trichloacetic acid/l. *Journal of Dairy Research*, 61, 365-374.

Alichanidis E., A. Polychroniadou, N. Tzanetakis y A. Vafopoulou (1977). Teleme cheese from deep-frozen curd. *Journal of Dairy Science*, 64(5), 732-739.

Alonso L. y M.C. Martín-Hernández (1987). Lipolisis en quesos. *Alimentación, equipos y tecnología*, 6, 269-274.

Alonso L., M. Juárez, M. Ramos y P.J. Martín-Alvarez (1987). Effects of changes during ripening and frozen storage on the physicochemical and sensory characteristics of Cabrales cheeses. *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 525-534.

Alonso L., M. Ramos, P.J. Martín-Alvarez y M. Juárez (1987). Application of stepwise discriminant analysis to parameters for characterizing frozen Cabrales cheeses. *Journal of Dairy Science*, 70, 905-908.

Andersen P.E. (1989). Utilización de lipasas en la maduración acelerada del queso. III Jornadas de aplicaciones industriales de los enzimas, 1-13.

Anquez M. (1974). Le froid en fromagerie. *Le Lait*, 537, 422-431.

Anónimo (1972). Recommendations for the processing and handling of frozen foods. 2nd Edition, pp. 14-16. I.I.R. París. (de Brennan 1980)

Antifakis E., C. Kehagias, E. Kotouza y G. Kalatzopoulos (1980). Frozen stability of sheeps milk under various conditions. *Milchwissenschaft*, 35(2), 80-82.

Ardö Y. y H.E. Pettersson (1988). Accelerated ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. *Journal of Dairy Research*...

Aston J.W. y L.K. Creamer (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.

Banks J.M., E.Y. Brechany y W.W. Christie (1989). The production of low fat Cheddar-type cheese. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42(1), 6-9.

Bevilaqua A.E. y N.E. Zaritzky (1980). *Journal of Food Technology UK*, 15, 589-597. (citado por Jul, 1984).

Blanc B., M. Rüegg, A. Baer, M. Casey y A. Lukesch (1980). Etudes comparatives du fromage de Gruyère avec et sans fermentation secondaire. *Schweiz. Milchw. Forschung.*, 9, 29-34.

Botsoglou N.A., D.J. Fletouris, G.E. Papageorgiou, V.N. Vassilopoulos, A.J. Mantis y A.G. Trakatellis (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1931-1937.

Bottazzi V., B. Battistotti y F. Bianchi (1982). The microscopic crystalline inclusions in Grana cheese and their X-ray microanalysis. *Milchwissenschaft*, 37(10), 577-580.

Bourne M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, July, 62-66.

Bousquet-Ricard M., G. Quayle, T. Pham y J. Cheftel (1980). Etude comparative critique de trois méthodes de mesure de l'activité de l'eau des aliments a humidité intermédiaire. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 13, 169-176.

Bouton Y. y R. Grappin (1994). Measurement of proteolysis in cheese: relationship between phosphotungstic acid-soluble N fraction by Kjeldahl and 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid reactive groups in water-soluble N. *Journal of Dairy Research*, 61, 437-440.

Brennan J.G., J.R. Butters, N.D. Cowell y A.E.V. Lilly (1980). Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. 2nd. Edition, Applied Science Publishers Ltd.. Edición española: Ed. Acribia, Zaragoza, 1980.

Brennan J.G. y M.C. Bourne (1994). Effect of lubrication on the compression behaviour of cheese and frankfurters. *Journal of texture studies*, 25, 139-150.

Bringe N.A. y J.E. Kinsella (1990). Acidic coagulation of casein micelles: mechanisms inferred from spectrophotometric studies. *Journal of Dairy Research*, 57, 365-375.

Brooker B.E., D.G. Hobbs y A. Turvey (1975). Observations on the microscopic crystalline inclusions in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 42, 341-348.

Brulé G. y J. Lenoir (1987). La coagulation du lait. En: *Le fromage*. Ed: A. Eck. París: Technique et Documentation, 1-15.

Buxadé C. (1993). El subsector ovino en la CEE. *Mundo ganadero*, 6, 28-32.

Buyanov O.N., L.A. Ostroumov e I.V. Buyanova (1994). Low-temperature storage of hard rennet cheese. *Kholodil'naya-Technika*, 4, 22-23, 39.

Cabezas L. y A. García Ruiz (1994). Comparación de dos sistemas de electroforesis vertical para el estudio de la proteólisis de los quesos. *Alimentación, equipos y tecnología*, diciembre, 73-76.

Carretero C., M. Mor-Mur, R. Pla y B. Guamis (1992). SDS-PAGE study of pH 4.6 soluble proteins during ripening of goat milk cheese. *Milchwissenschaft*, 47(5), 292-295.

Carretero C., A. Trujillo, M. Mor-Mur, R. Pla y B. Guamis (1994). Electrophoretic study of casein breakdown during ripening of goat's milk cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1546-1550.

Casado P. (1987). Métodos de análisis de la leche y productos lácteos. Ed. Industrias Lácteas Españolas (ILE), Madrid.

Casla D., J. Fontecha, R. Gómez y C. Peláez (1995). The effects of freezing and frozen storage of ewe's milk cheese on the viability and proteolytic activity of lactococci used as a starter. *Z Lebensm. Unters. Forsch*, 200, 59-63.

Cervantes M.A., D.B. Lund y N.F. Olson (1983). Effects of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese texture. *Journal of Dairy Science*, 66, 204-213.

Chapman H.R. y M.E. Sharpe (1987). Microbiología del queso. En: Microbiología lactológica. Vol.II: Microbiología de los productos lácteos. Robinson R.K. Ed. Acribia, Zaragoza, 11-...

Chianese L., R. Mauriello, L. Moio, N. Intorcia y F. Addeo (1992). Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. *Journal of Dairy Research*, 9, 39-47.

Choisy C. (1987). Les levains lactiques et les bactéries lactiques. En: *Le fromage*. Ed: A. Eck. París: Technique et Documentation, 108-119.

Choisy C., M. Desmazeaud, J.C. Gripon, G. Lamberet, J. Lenoir y C. Tourneur (1987). Les phénomènes microbiologiques et enzymatiques et la biochimie de l'affinage. En: *Le fromage*. Ed: A. Eck. París: Technique et Documentation, 62-89.

Choisy C., M. Gueguen, J. Lenoir, J.L. Schmidt y C. Tourneur (1987). Les phénomènes microbiens. En: *Le fromage*. Ed: A. Eck. París: Technique et Documentation, 259-282.

Christensen T.M., A.M. Bech y H. Werner (1991). Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. *Bulletin of IDF*, 261, 4-9.

Conochie J. y B.J. Sutherland (1965). The nature and cause of semanimness in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 32(1), 35-48.

Dalles T., Kalatzopoulos y C. Kehagias (1984). Freezing preservation of soft cheeses with and without mold form goat's and sheep's milk. Thermal processing and quality of foods. Edited by Zeuthen P., Cheftel J.C., Eriksson C., Jul M., Leniger H., Enko P., Varela G. and Vos G., 740-745.

Decio P. (1989). Realizzazione di un impianto di caseificazione per pecorino con latte congelato di pecora. *Industrie alimentari*, XXVIII, luglio-agosto, 724-728.

Delacroix-Buchet A. y P. Trossat (1991). Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. I. Influence de l'activité de l'eau. *Le Lait*, 71, 299-311.

Desmazeaud M.J. y J.C. Gripon (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32(12), 731-734.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1992). Directiva 92/1/CEE relativa al control de las temperaturas en los medios de transporte y los locales de depósito y almacenamiento de alimentos ultracongelados destinados al consumo humano. L 34/28.

Diefes H.A., S.S.H. Rizvi y J.A. Bartsch (1993). Rheological behavior of frozen and thawed low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 58(4), 764-769.

Dybing S.T., J.A. Wiengand, S.A. Brundvig, E.A. Huang y R.C. Chandan (1988). Effect of processing variables on the formation of *calcium lactate* crystals on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 71, 1701-1710.

Emaldi G.C. (1987). Goat milk cheeses. *Mondo-del-Latte*, 41(5), 274-277.

Esteban M.A., M. Alcalá, A. Marcos y J. Fernández-Salguero (1990). Comparison of methods for determination of high water activities. Application to dairy products and juices. *Food Chemistry*, 35, 153-158.

Fellows P. (1988). Freezing. En: Food processing technology. Ellis Horwood Series in Food Science. VCH Publishers, 375-400.

Fennema O.R. (1973). Low temperature preservation of foods and living matter. Editores: Fennema, O.R., W.D. Powrie y E.H. Marth. Ed: Dekker, New York.

Fernández-García E., M. Ramos, C. Polo, M. Juárez y A. Olano (1988). Enzyme accelerated ripening of Spanish Gouda cheese. Food Chemistry, 28, 63-80.

Fernández-García E., R. López-Fandiño, A. Olano y M. Ramos (1990). Comparative study of the proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease preparation during early stages of ripening of cheeses made from cow and ewe milk. Milchwissenschaft, 45(7), 428-431.

Fernández-García E., A. Olano, D. Cabezudo, P.J. Martín-Alvarez y M. Ramos (1993). Accelerated ripening of Manchego type cheese by added commercial enzyme preparation from *Aspergillus oryzae*. Enzyme Microbiology Technology, 15, June, 519-524.

Fernández-García E., R. López-Fandiño y L. Alonso (1994). Effect of a food-grade enzyme preparation from *Aspergillus oryzae* on free fatty acid release in Manchego-type cheese from ovine and bovine milk. Z. Lebensmittel Unters Forschung, 199, 262-264.

Fernández-García E., R. López-Fandiño, L. Alonso y M. Ramos (1994). The use of lipolytic and proteolytic enzymes in the manufacture of Manchego type cheese from ovine and bovine milk. Journal of Dairy Science, 77, 2139-2149.

Fett H.M. (1973). Water activity determination in foods in the range 0.80 to 0.99. Journal of food science, 38, 1097-1098.

Fialaire A. y E. Postaire (1994). Hydrolysis of peptide binding by phosphotungstic acid. Journal of AOAC International, 77(5), 1-3.

Filchakova N.N. (1986). Improvements in cooling treatment and storage of dairy products. Kholodil'naya-Tekhnika, 3, 6-9.

Filchakova N.N, R.I. Pankova, Z.A. Mishenina y G.P. Ovcharova (1983). Changes on protein properties in cheese during freezing. En "Refrigeration in the service of man". XVth International Congress of Refrigeration, Vol.3, 529-533.

Fontecha J., C. Peláez, M. Juárez (1994). Biochemical characteristics of a semi-hard ewe's-milk cheese. Z Lebensm Unters Forsch, 198, 24-28.

Fontecha J., C. Peláez, M. Juárez y C. Martín-Hernández (1994). Effect of freezing and frozen storage on the physicochemical, organoleptic and microbiological characteristics of a semi-hard ewes' milk cheese. Journal of dairy research, 61, 133-142.

Fox, P.F. (1988). Acceleration of cheese ripening. Food Biotechnology, 2, 133-185.

Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. Journal of Dairy Science, 72, 1379-1400.

Fox P.F., J.A. Lucey y T.M. Cogan (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 29(4), 237-253.

- Fox P.F. y J. Law (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology*, 5(3), 239-262.
- Frey J.P., E.H. Marth, M.E. Johnson y N.F. Olson (1986). Heat- and freeze-shocking cause changes in peptidase and protease activity of *Lactobacillus helveticus*. *Milchwissenschaft*, 41(11), 681-685.
- Fritsch R.J., F. Martens y H.D. Belitz (1992). Monitoring Ceddar cheese ripening by chemical indices of proteolysis. *Z Lemensm Unters Forsch*, 194, 330-336.
- Fuente M.A. y M. Juárez (1993). Revisión: determinación de ácidos grasos libres en productos lácteos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33(3), 247-269.
- Fuster, C. (1970). Differential characteristics of casein of fresh and frozen milk. *Rev. Frío*, 15(1), 37. (En *Dairy Science Abstracts* 1970,33:1110)
- García A. y L. Cabezas (1995). Estudio de las diferencias entre la elaboración artesanal e industrial de quesos manchegos acogidos a la Denominación de Origen. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, julio/agosto, 43-48.
- Ghosh B.C. y S. Singh (1991). Effect of storage temperatures on sensory, chemical and rheological characteristics of mozzarella cheese. *Journal of food science and technology*, 28(5), 288-292.
- Ghosh B.C. y S. Singh (1992). Storage studies of mozzarella cheese part-I - Sensory and rheological characteristics. *Indian J. Dairy Sci.*, 45(4), 199-202.
- Ghosh B.C. y S. Singh (1992). Storage studies of mozzarella cheese part-II - Chemical changes. *Indian J. Dairy Sci.*, 45(4), 203-208.
- Gilliand S.E. (1985). Role of starter culture bacteria in food preservation. En: *Bacterial starter cultures for foods*. Ed: Gilliland S.E. Boca raton, CRC Pres, Inc....
- Grantham C. (1995). Analysis of edible oils and fats. *Research & Analysis*, March, 32-34.
- Grappin R. (1992). Bases and experiences of expressing the protein content of milk-France. *Journal of dairy science*, 75(11), 3221-3227.
- Grappin R., T.C. Rank y N.F. Olson (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science*, 68, 531-540.
- Green M.L. (1984). Milk coagulation and the development of cheese texture. En: *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Ed: Davies F.L. y B.A. Law. Barking: Elsevier Applied Publishers, 1-34.
- Green M.L. (1987). Effect of manipulation of milk composition and curd forming conditions on the formation, structure and properties of milk curd. *Journal of Dairy Research*, 54, 303-313.
- Grippon J.C. (1987). Mould-ripened cheeses. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.2. Ed: Fox P.F. Barking: Elsevier Applied Publishers, Londres, 121-149.
- Guamis B., T. Huerta y E. Garay (1987). SDS-PAGE study of milk proteolysis by selected psychrotrophs from raw milk. *Milchwissenschaft*, 42(2), 89-91.

Guamis B., T. Huerta y E. Garay (1987). Heat-inactivation of bacterial proteases in milk before UHT-treatment. *Milchwissenschaft*, 42(10), 651-653.

Guinee T.P. y P.F. Fox (1987). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology. I. General aspects*. Ed: Fox P.F. Barking: Elsevier Applied Science Publishers, 30...

Ha J.K. y R.C. Lindsay (1993). Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *Journal of Dairy Science*, 76, 677-690.

Hardy J. (1987). L'activité de l'eau et le salage des fromages. En: *Le fromage*. Ed: A. Eck. París: Technique et Documentation, 37-58.

Harrison P. y M. Croucher (1993). Packaging of frozen foods. En: *Frozen food technology*. Ed. C.P. Mallet. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, 59-92.

Hemme D., C. Bouillanne, F. Métro y M.J. Desmazeaud (1982). Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sciences des aliments*, 2, 113-123.

Hori T., M. Kako y H. Hayashi (1982). Relationship between static electrical conductivity and unfrozen water content in food products. *Journal of food science*, 47, 1254-1256.

Hori T. (1982). Effects of freezing and thawing green curds before processing on the rheological properties of cream cheese. *Journal of food science*, 47, 1811-1817.

Hunter R.S. (1942). Photoelectric tristimulus colorimetry with three filters. *Nat'l Bur. Std. Circ.* 429.

Ibáñez F.C., Y. Barcina y M.I. Torres (1994). Compuestos nitrogenados en el queso. Métodos analíticos para su evaluación. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, diciembre, 67-70.

Ikens W.G., H.S. Kwak, G.S. Zink and I.J. Jeon (1988). Comparison of methods for quantitation of free fatty acids in cheese. *Journal of food science*, 53(6), 1915-1916.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1982). *Microorganismos de los alimentos. Vol.I. Técnicas de análisis microbiológico*. Ed. Acribia, Zaragoza.

International Dairy Federation (1987). *Sensory evaluation of dairy products*. 99A:1987.

Irvine D.M. (1989). Sheep's milk dairy products. *North American Dairy Sheep Symposium*, Univ. of Minnesota, July, 135-177.

Jack F.R. y A. Paterson (1992). Texture of hard cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, July (3), 160-164.

Jarmul I., A. Rejs, K. Wisniewska y L. Jedrychowski (1985). Stabilisation du fromage de Camembert par congélation. *Le lait*, 65, 213-220.

Jarmul I., A. Rejs, K. Wisniewska y L. Jedrychowski (1986). Preservation of Camembert cheeses by freezing. *Przemysl-Spozywczy*, 40(1), 18-20.

Jul M. (1984). The quality of frozen foods. Academic Press, London.

Kaláb M. (1993). Practical aspects of electron microscopy in dairy research. *Food Structure*, 12, 95-114.

Kamaly K.M. y E.H. Marth (1989). Enzyme activities of Lactic Streptococci and their role in maturation of cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 72(8), 1945-1966.

Kaminarides S.E. y E.M. Anifantakis (1989). Evolution of the microflora of Kopanisti cheese during ripening - Study of the yeast flora. *Lait*, 69, 537-546.

Kasprzak K., W.L. Wendorff y C.M. Chen (1994). Freezing qualities of Cheddar-type cheeses containing varied percentages of fat, moisture and salt. *Journal of dairy science*, 77(7), 1771-1782.

Khalid N.M. y E.H. Marth (1990). Lactobacilli, their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 73, 2669-2684.

Kiely L.J., P.S. Kindstedt, G.M. Hendricks, J.E. Levis, J.J. Yun y D.M. Barbano (1992). Effect of draw pH on the development of curd structure during the manufacture of Mozzarella cheese. *Food Structure*, 11, 217-224.

Kim Ha J. y R.C. Lindsay (1993). Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *Journal of dairy science*, 76, 677-690.

King R.L. (1962). Oxidation of Milk Fat Globule Membrane Material I. Thiobarbituric Acid Reaction as a Measure of Oxidized Flavor in Milk and Model Systems. *Journal of Dairy Science*, 45(10), 1165-1171.

Kinsella J.E. y D.H. Hwang (1976). Biosynthesis of flavours by *Penicillium roqueforti*. *Biotechnology and Bioengineering*, XVIII, 927-938.

Kishida E., S. Tokumaru, Y. Ishitani, M. Yamamoto, M. Oribe, H. Iguchi y S. Kojo (1993). Comparison of the formation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1598-1600.

Koschak M.C. (1981). Protein stability of frozen milk as influenced by storage temperature and ultrafiltration. *Journal of Food Science*, 46(4), 1211-1217.

Kosikowski y T. Iwasaki (1974-1975) Changes in Cheddar cheese by commercial enzyme preparations. *Journal of Dairy Science*, ..., 963-970.

Laan H., E.J. Smidh, P.S.T. Tan y W.N. Konings (1989). Enzymes involved in the degradation and utilization of casein in *Lactococcus lactis*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43, 327-345.

Lagoni H. y K.H. Peters (1966). Die grefierlagerung von milch und rahm hinsichtlich der stabilitä der michkolloide. 17th. International Dairy Congress, C:219. (citado por Alichanidis y col., 1981).

Lawrence R.C., H.A. Heap y J. Gilles (1984). A controlled approach to cheese technology. *Journal of Dairy Science*, 67, 1632-1645.

Lawrence R.C., L.K. Creamer y J. Gilles (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70, 1748-1760.

Le Jaouen J.C. y M. Mouillot (1985). Fromages a partir de lait de chèvre. Les techniques de report. En: *Laits et produits laitiers. Vache, brebis, chèvre. Vol.2. Les produits laitiers.* Ed. F.M. Luquet, Technique et Documentation (Lavoisier), 331-336.

Lenoir J. y N. Schneid (1987). L'aptitude de lait à la coagulation par la présure. En: *Le fromage.* Ed: A. Eck. Paris: Technique et Documentation, 139-148.

Le Toquin A. (1983). Le point bibliographique sur la conservation du lait de chèvre à l'état de caillé congelé. *Revue des ENIL*, 79, 19-20.

Lin J.C.C. y I.J. Jeon (1987). Effects of commercial food grade enzymes on free fatty acid profiles in granular Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 52(1), 78-83.

Lin C.W., C.H. Hsieh y H.P. Su (1994). Breaking stress and syneresis of rennin curds from reconstituted skim milk frozen concentrate. *Journal of food science*, 59(5), 952-955.

Lomascolo A., E. Dubreucq, V. Perrier y P. Galzy (1994). Observations concerning the composition of fatty acids in dairy products. *Milchwissenschaft*, 49(10), 559-561.

Löndahl G. (1992). Análisis de los costes energéticos y ahorro de energía - Alimentos congelados. *Alimentación, equipos y tecnología*, noviembre, 46-50.

Löndahl G. y A. Lindborg (1993). Calidad de los alimentos congelados y ahorro de energía en el almacenamiento a granel. *Alimentación, equipos y tecnología*, noviembre, 39-45.

Lonergan D.A., O. Fennema y C. Amundson (1981). Stability of proteins in ultrafiltered, low lactose milk concentrate during frozen storage. *Journal of Food Science*, 46(5), 1603-1611.

López-Fandiño R., P.J. Martín-Alvarez, E. Pueyo y M. Ramos (1994). Proteolysis assessment of several cheese varieties using different methods. *Milchwissenschaft*, 49(6), 315-318.

Lorentzen G. y S. Roestvik (1959). Some experiments regarding freezing of meat. *Norges Tekniske Hogskole-Trykk, Trondheim.* (citado por Jul, 1984).

Luck H. (1977). Preservation of cheese and perishable dairy products by freezing. *S. Afr. J. Dairy Technol.*, 9(4), 127-132.

Marcos A., M. Alcalá, F. León, J. Fernández-Salguero y M.A. Esteban (1981). Water activity and chemical composition of cheese. *Journal of Dairy Science*, 64, 622-626.

Marcos A., J. Fernández-Salguero, M.A. Esteban y M. Alcalá (1985). Technical note: water activity measurement near to 1.00. *Journal of Food Technology*, 20, 523-526.

Marcos A., J. Fernández-Salguero, M.A. Esteban, F. León, M. Alcalá y F.H. Beltrán de Heredia (1985). Quesos españoles. Tablas de composición, valor nutritivo y estabilidad. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.

Martín-Hernández C., M. Juárez y M. Ramos (1988). Influencia del proceso de congelación sobre las características de un queso semiduro elaborado con mezcla de leche de cabra y vaca. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.*, 28(1), 45-55.

Martín-Hernández C., M. Juárez, M. Ramos y P. Martín-Alvarez (1990). Effects of freezing and frozen storage on the physicochemical and sensory characteristics of four types of goat's cheese. *Z Lebensm Unters Forsch*, 190, 325-330.

Meryman H.T. (1966). The interpretation of freezing rates in biological materials. *Cryobiology*, 2(4), 165. (de Hori, 1982).

Micev N. y D. Lazarevska (1967). Analyses bactériologiques et chimiques sur fromage blanc de brebis avant et après stockage de 4 mois à -17°. *Le Lait*, 468, 561-562.

Minson E.I., O. Fennema y C. Amundson (1981). Accelerated test for evaluating protein stability in frozen skim milk. *Journal of Food Science*, 46(5), 1592-1596.

Mistry V.V. y D.L. Anderson (1993). Composition and Microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses. *Food Structure*, 12, 259-266.

Miyawaki O., T. Abe y T. Yano (1992). Freezing and ice structure formed in protein gels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(6), 953-957.

Montoro Angulo V. y P. Angulo Toledo (1991). Producción y transformación de leche de ovino en España. VII Jornadas técnicas sobre ganado ovino y caprino, 363-380.

Morris H.A., C. Holt, B.E. Brooker, J.M. Banks y W. Manson (1988). Inorganic constituents of cheese: analysis of juice from a one-month-old Cheddar cheese and the use of light and electron microscopy to characterize the crystalline phases. *Journal of Dairy Research*, 55, 255-268.

Nájera A.I., L.J.R. Barrón y Y. Barcina (1993). Revisión: composición de la fracción lipídica del queso de vaca, oveja y cabra, y la influencia sobre su calidad. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33(4), 345-363.

Nakajima H., S. Toyoda, K. Kitamura y K. Ahiko (1991). Accelerated ripening of Gouda cheese: direct inoculation of a lactose-negative mutant of *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* into cheese milk. *Milchwissenschaft*, 46(1), 8-10.

Nakanishi T. y T. Itoh (1965). Studies on the changes of the milk casein by various treatments. II. The effect of frozen storage on the milk casein. *Agric. Biol. Chem. (Dairy Science Abstracts)*, 28:294)

Needs E.C. (1992). Effects of long-term deep-freeze storage on the condition of the fat in raw sheep's milk. *Journal of Dairy Research*, 59, 49-55.

Núñez M., C. García-Aser, M.A. Rodríguez-Martin, M. Medina y P. Gaya (1986). The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. *Food Chemistry*, 21, 115-123.

Núñez M., M. Medina y P. Gaya (1989). Ewe's milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *Journal of Dairy Research*, 56, 303-321.

Oberg C.J., Merrill R.K., Brown R.J. y G.H. Richardson (1992). Effects of freezing, thawing and shredding on low moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of dairy science*, 75(5), 1161-1166.

Omar M.M., A.A. Abdel Baky, A.M. Rable y M.M. Ashour (1987). Free fatty acids and quality of Domiati cheese made from dried milks as affected by added lipase. *Food Chemistry*, 24, 197-201.

Oneca M., I. Pérez y M.A. Lluch (1994). "Caracterización microestructural del queso D.O. Roncal: estudio de la evolución de su microestructura a lo largo del proceso de elaboración y maduración". *Anales de Investigación del Máster en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos*, volumen IV, 271-288.

Ordoñez J.A. y M.J. Ortiz-Apodaca (1977). Lipolytic activity of micrococci isolated from cheese. *Milchwissenschaft*, 32(9), 531-533.

Ortiz de Apodaca M.J., M.D. Selgas y J.A. Ordoñez (1993). Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from cheese. *Food Research International*, 26, 319-325.

Pardo J.E., C.E. Serrano, V. Montoro, A. Carcerrada, R. Gallego, R. Arias y S. Altares (1995). Calidad de la leche utilizada en queserías artesanales inscritas en la Denominación de Origen Queso Manchego. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, julio/agosto, 29-32.

Peláez C. (1983). Congelación de cuajadas. *Alimentaria*, 144, julio-agosto, 19-22.

Persson P.O. y G. Löndahl (1993). Freezing technology. En: *Frozen food technology*. Ed. C.P. Mallet, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, 20-58.

Picón A., P. Gaya, M. Medina y M. Núñez (1995). The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 78, 1238-1247.

Portman A. (1970). La congélation et le stockage du fromage de chèvre. *Le Lait*, 493-494, 161-164.

Prieto B., J.M. Fresno, J. Carballo, A. Bernardo y R. Martín (1994). Biochemical characteristics of León raw cow milk cheese, a Spanish craft variety. *Sciences des Aliments*, 14, 203-215.

Pugnale B. (1992). Freezing: From everyday use to applied science. *European food and drink review*, spring, 13-15.

Quarne E.L., W.A. Larson y N.F. Olson (1968). Effect of acidulants and milk-clotting enzymes on yield, sensory quality an proteolysis of Pizza cheese made by direct acidification. \$\$\$\$

Quintanilla y col. (1992). Congelación de cuajadas - Congelación de quesos con nitrógeno líquido. *Ile*, julio-agosto, 64-65.

Raharjo S. y J.N. Sofos (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. *Meat Science*, 35, 145-169.

Ramanauskas R.I. (1984). Effect of storage at near-cryoscopic temperatures on cheese quality. *Molochnaya-Promyshlennost'*, 7, 13-16, 47.

Ramanauskas R.I. y B. Paserpskiene (1978). Determination of cryoscopic temperature in rennet cheeses. *Trudy, Litovskii Filial VNIIMSP*, 12, 113-116, 154.

Ramos M. y I. Martínez-Castro (1976). Etude de la protéolyse du fromage type Manchego au cours de l'affinage. *Le Lait*, 553-554, 164-176.

Ramos M., I. Cáceres, C. Polo, L. Alonso y M. Juárez (1987). Effect of freezing on soluble nitrogen fraction of Cabrales cheese. *Food chemistry* 24, 271-278.

Rank T.C., R. Grappin y F. Olson (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening: a review. *Journal of Dairy Science*, 68, 801-805.

Reid D.S. (1993). Basic physical phenomena in the freezing and thawing of plant and animal tissues. En: *Frozen food technology*. Ed. C.P. Mallet, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, 1-19.

Reiter B., Y. Sorokin, A. Pickering y A.J. Hall (1969). Hydrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *Journal of Dairy Research*, 36, 65-76.

Richards E. (1966). Cheese storage under atmospheric and deep freeze conditions. *Dairy industries*, november, 893-897.

Rohm H., J. Benedikt y D. Jaros (1994). Comparison of two precipitation methods for determination of phosphotungstic acid soluble nitrogen in cheese. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 27, 392-393.

Roissart de H.B. (1986). Bactéries lactiques. En: *Laits et produits laitiers. Vache-Brebis-Chèvre*. 3. Qualité énergie et tables de composition. Ed: Luquet F.M. París: Technique et Documentation. 343-414.

Rouco P.F., F.J. Calahorra (1994). Producción de leche. \$\$\$\$

Rouco P.F., F.J. Calahorra (1994). La industria quesera. \$\$\$\$

Salih, A.M., D.M. Smith, J.F. Price y L.E. Dawson (1987) Modified Extraction 2-Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Oxidation in Poultry. *Poultry Science*, 6, 1483-1488.

Scofield F. (1943). A method for determination of color differences. *Nat'l Paint, Varnish, Laquer Assoc. Sci. Sec. Circ.* 664.

Scott R. (1986). *Cheesemaking practice*. Barking: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.

Shaw M.B. (1986). Modern cheesemaking: soft cheeses. En: *Modern dairy technology*. Vol. 2: advances in milk products. Ed: Robinson R.K. Barking: Elsevier Applied Publishers, ...

Sinnhuber R.O., T.C. Yu y T.C. Yu (1958). Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric determination of oxidative rancidity. *Technical Paper*, 1134, Oregon Agricultural Experiment Station.

Sinnhuber R.O. y T.C. Yu (1977). The 2-thiobarbituric acid reaction, an objective measure of the oxidate deterioration occurring in fats and oils. *Technical Paper*, 4485, Oregon Agricultural Experiment Station.

Skeie S., J.A. Narvhus y R.K. Abrahamsen (1995). Addition of liposome-encapsulated enzymes SP446 and flavour-zyme to low fat (10% fat) Gouda-type cheese. *Milchwissenschaft*, 50(3),

134-\$\$\$.

Speck M.L. y B. Ray (1977). Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods: a review. *Journal of food protection*, 40(5), 333-336.

Stanley D.W. y D.B. Emmons (1977). Cheddar cheese made with bovine pepsin II. Texture-microstructure-composition relationships. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, 10(2), 78-84.

Steele J.L. y G. Ünlü (1992). Impact of lactic acid bacteria on cheese flavor development. *Food technology*, November, 128-135.

Strachan, P.W. (1983). *IFST Proc.*, 16(2), 65-74.

Swartling P. (1968). Effects of freezing on dairy product quality. *Dairy industries*, January, 30-36.

Tamime A.Y. (1986) Modern cheesemaking: hard cheeses. En: *Modern dairy technology*. Vol. 2: advances in milk products. Ed: Robinson R.K. Barking: Elsevier Applied Publishers, ...

Thomas M.A., G. Newell y G. Abad (1980). Effects of freezing on the objective and subjective properties of processed cheese. *J. Fd. Technol.*, 15, 599-605.

Tiersonnier B. (1970). Le froid en fromagerie de chèvre. *Le Lait*, 497, 415-419.

Tinguely P. y G. Perdonet (1985). Généralités. Préparations du lait. En: *Laits et produits laitiers. Vache-Brebis-Chèvre. 2. Les produits laitiers: transformations et technologies*. Ed: Luquet F.M. Paris: Technique et Documentation, 69-88.

Tomlins R. (1995). Cryogenic freezing and chilling of food. *Food technology international Europe*, 145-149.

Treacher, T.T. (1986). Dairy sheep in southern Europe. \$\$\$\$

Trépanier G., R.E. Simard y B.H. Lee (1991). Lactic acid bacteria relation to accelerated maturation of Cheddar cheese. *Journal of food science*, 56(5), 1238-1240.

Trépanier G., M. El Abboudi, B.H. Lee y R.E. Simard (1992). Accelerated maturation of Cheddar cheese: microbiology of cheeses supplemented with *Lactobacillus casei* subsp. *casei* L2A. *Journal of food science*, 57(2), 345-349.

Trépanier G., M. El Abboudi, B.H. Lee y R.E. Simard (1992). Accelerated maturation of Cheddar cheese: influence of added lactobacilli and commercial protease on composition and texture. *Journal of Food Science*, 57(4), 898-902.

Tulloch D. y M. Cheney (1984). Keeping quality of western australian frozen milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, June, 84-85.

Tunick M.H., K.L. Mackey, P.W. Smith y V.H. Holsinger (1991). Effects of composition and storage on the texture of Mozzarella cheese. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 45, 117-125.

Uceda R., A.M. Guillen, P. Gaya, M. Medina y M. Núñez (1994). Chemical and rheological characteristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw milk preserved by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft*, 49(9), 494-498.

Ulrich R. (1981). *Revue General du Froid*, 71(7/8),371-389. (citdo por Jul, 1984)

Valle J.L.E., I. Moreno, A.G.F.V. Dender y G. Souza (1992). Evolucao de microbiota do queijo prato conservado a temperaturas de subcongelamento. *Colet.ITAL*, Campinas, 22(1), 83-91.

Villaran M.C. y J.I. Lombr a (1995). Propiedades termof sicas características de alimentos en la congelación. *Alimentación, equipos y tecnología*, mayo, 61-68.

Visser S. (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, 76, 329-350.

Weber F. (1987). L'egouttage du coagulum. En: *Le fromage*. Ed: A. Eck. Paris: Technique et Documentation, 22-36.

Wolf R.L. (1987). Mise au point et évaluation d'une méthode d'extraction de la matière grasse de fromage de type emmental. *Etudes et Recherches*, 34(3), 123-132.

Wolf R.L. y R.J. Fabien (1989). Utilisation de l'isopropanol pour l'extraction de la matière grasse de produits laitiers et pour l'estérification subséquente des acides gras. *Le Lait*, 69, 33-46.

Young P. (1987). Deep frozen storage of ewe's milk. *Sheep Dairy News*, 4(3), 41.

Zhang Z.P. y T. Aoki (1995). Effect of modification of amino groups on crosslinking of casein by micellar calcium phosphate. *Journal of dairy science*, 78, 36-43.