

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**UNITAT DE TECNOLOGIA DELS ALIMENTS**

**APLICACION DE LA ALTA PRESION**  
**HIDROSTATICA EN *MATÓ***  
**(QUESO FRESCO DE LECHE DE CABRA)**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR  
AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA Y  
TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

MARTA CAPELLAS PUIG

Bellaterra, 1998

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSION.**



## 1. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.

### 1.1 *Escherichia coli*.

En la Tabla IV.1.1 se detallan los recuentos correspondientes a las muestras de las experiencias en que se inoculó *E. coli* a la leche destinada a la elaboración del *Mató*. Entre la leche pasteurizada (LP) y el queso control (QC) puede observarse un aumento de 1,4 unidades logarítmicas en los recuentos de bacterias aerobias mesófilas (BAM) y en ninguno de los dos casos se detectaron enterobacterias, por lo tanto, tenemos un indicador de la buena higiene lograda durante la elaboración del queso. Asimismo, se garantiza que las colonias halladas en VRBA en las muestras de leche inoculada (LI) y los quesos elaborados a partir de ésta (QLI y QLIP) procedían de la población inicial del inóculo de *E. coli*. Por esta razón no se realizaron identificaciones confirmatorias de las colonias crecidas en VRBA. Además, no se observaron diferencias entre los recuentos en PCA y VRBA de las muestras de LI y QLI y el aumento de ambos recuentos en QLI respecto a LI fue el mismo.

**Tabla IV.1.1** Media (Log UFC/ml o g), desviación estándar e intervalo (UFC/ml o g) de los recuentos de la leche y quesos utilizados en las experiencias con *E. coli*.

	BAM (PCA)			<i>E. coli</i> (VRBA)		
	Media	d.s.	Min-Max	Media	d.s.	Min-Max
LP	3,27	0,78	4,6 10 <sup>1</sup> - 1,0 10 <sup>4</sup>	n.d.	-	-
QC	4,70	1,27	3,9 10 <sup>2</sup> - 5,9 10 <sup>5</sup>	n.d.	-	0-1 <sup>(a)</sup>
QCP*	2,59	0,58	2,0 10 <sup>1</sup> - 1,2 10 <sup>3</sup>	n.d.	-	0-1 <sup>(a)</sup>
LI	6,00	0,39	3,0 10 <sup>5</sup> - 3,3 10 <sup>6</sup>	6,14	0,35	4,1 10 <sup>5</sup> - 3,3 10 <sup>6</sup>
QLI	8,48	0,21	1,3 10 <sup>8</sup> - 5,4 10 <sup>8</sup>	8,46	0,17	1,4 10 <sup>8</sup> - 3,9 10 <sup>8</sup>
QLIP*	2,53	0,52	0 - 1,9 10 <sup>3</sup>	- <sup>(b)</sup>	-	0 - 7,6 10 <sup>2</sup>

LP: leche sin inocular; QC: queso control, elaborado con leche sin inocular; QCP: queso control presurizado; LI: leche inoculada; QLI: queso elaborado con leche inoculada; QLIP: queso elaborado con leche inoculada y presurizado; n.d.: recuentos no detectables. <sup>(a)</sup> recuentos no detectables, 1 UFC en alguna de las placas; <sup>(b)</sup> recuentos no detectables en el 98% de las muestras.\* Quesos presurizados en los tratamientos a 10 y 25° C.

Cuando se comparan los resultados de la leche inoculada con los del queso a que dió lugar se observa un aumento de más de 2 unidades logarítmicas en los recuentos

de BAM y en los del medio VRBA. Spahr y Url (1994) indican que el incremento de 1 unidad logarítmica en los primeros estadios de la elaboración de queso se explica mejor por un fenómeno físico de concentración, como resultado de la sinéresis de la cuajada, que por el crecimiento bacteriano. También señalan que los estudios sobre el comportamiento de cepas patógenas de *E. coli* durante la elaboración de queso madurado demuestran que los recuentos pueden sufrir un marcado incremento, de hasta tres órdenes de magnitud.

Por otro lado, Johnson y col. (1990) destacan que la mayoría de estudios que demuestran el crecimiento de distintas especies patógenas durante el proceso de elaboración de queso utilizan inóculos que han crecido en medios favorables antes de su adición a la leche pasteurizada. Estos autores sostienen que las circunstancias favorables mencionadas difieren de las condiciones habituales de fabricación, donde los microorganismos que han sobrevivido a la pasteurización no están probablemente en el mismo estado óptimo. Según esta teoría, el aumento de 2,4 unidades logarítmicas que se produjo en el queso QLI respecto a la leche inoculada puede considerarse el resultado de la concentración física anteriormente mencionada y del crecimiento del inóculo durante la elaboración.

En la Tabla IV.1.2 se muestran los recuentos en VRBA correspondientes a cada tratamiento. En dos de los tratamientos realizados a 2°C (400 MPa/5 min, 450 MPa/15 min) apareció una colonia en una placa de la primera dilución. En el resto de los tratamientos no se detectó ninguna colonia. A 10°C no se detectaron colonias en ningún tratamiento, excepto a 450 MPa/10 min, donde se observaron 2 y 5 colonias en dos placas de la primera dilución. A 25°C se detectó crecimiento en los tratamientos de 400 MPa/ 5min y 400 MPa/10 min. Según estos resultados, la letalidad que se consiguió con los tratamientos utilizados se encuentra entre 7,6 y 8,7 unidades logarítmicas, excepto en un caso, en que fue de 6,7. Como se ha mencionado anteriormente, en los tratamientos a 25°C se detectaron recuentos de microorganismos. La reducción de la inactivación de *E. coli* a temperatura ambiente ha sido descrita por otros autores que han trabajado con soluciones nutritivas, tampones o soluciones salinas fisiológicas. Takahashi (1992) consigue la completa inactivación de *E. coli* en tampón fosfato con un tratamiento a 200 MPa/-20°C/20 min, mientras que el mismo tratamiento a 20°C produce una ligera

inactivación. Smelt y Rijke (1992) detectan una menor inactivación a 20°C tratando a 300 MPa/15 min que con el mismo tratamiento a 5, 10 o 40°C. Ludwig y col., (1992) señalan que la inactivación de *E. coli* a 200 MPa durante 15 min presenta un mínimo a 20°C, mientras que a temperaturas inferiores el efecto de la presión es mayor, si bien el máximo se consigue a partir de los 40°C. Sin embargo, Gervilla y col. (1997) han estudiado la inactivación en leche de oveja de la misma cepa de *E. coli* que se utilizó en este trabajo y sus resultados muestran que se consigue una mayor inactivación a 25° C que a 10° y 2° C, temperaturas en las que son necesarios tratamientos de 450 MPa/15 min y 500 MPa/15 min respectivamente para alcanzar la misma inactivación que a 450 MPa/25° C/5 min. Carlez y col. (1994), con el tratamiento de 450 MPa/20°C/20 min, han conseguido reducir los recuentos de coliformes en carne picada de ternera desde 5,9 Log UFC/g hasta el límite de detección. En el mismo producto se ha estudiado otra enterobacteria, *Citrobacter freundii*, consiguiendo su completa destrucción a 300 MPa/20°C/20 min, siendo la población inicial de 7 Log UFC/g (Carlez y col., 1993). Los autores de este trabajo también observan que trabajando a temperaturas superiores (50° o 35° C) o inferiores (4° C) a la ambiente mejoran el efecto destructor de la alta presión. Otros estudios sobre la inactivación de *E. coli* bajo presión ponen de manifiesto la existencia de cepas mutantes, que sobreviven a tratamientos superiores a los 600 MPa/20°C/15 min (Patterson y Linton, 1997) y 700 MPa/20° C/15 min (García-Graells y col., 1997).

Se calculó la reducción decimal de los recuentos de BAM en algunos tratamientos (Tabla IV.1.3). Las esporas son resistentes a los tratamientos de alta presión aplicados en esta experiencia (Butz y Ludwig, 1986; Hoover, 1993; Porretta y col., 1995) y ésta es una de las causas por las que no se ha conseguido la total inactivación de BAM. Otros grupos de microorganismos que pueden hallarse en el queso son los del género *Micrococcus*, y bacterias ácido-lácticas, que pueden haber contaminado el queso durante la elaboración. Los recuentos de estos microorganismos pueden verse reducidos por algunos de los tratamientos aplicados pero probablemente no se consiguió su inactivación total, pues como se ha señalado anteriormente, las células vegetativas de cocos gram positivos se hallan entre las bacterias más resistentes a la alta presión.

Tabla IV.1.2 Recuentos y letalidades (Log UFC/g) de *E. coli* en queso *Mató* según el tratamiento efectuado.

MPa	400			450			500			
	min	5	10	15	5	10	15	5	10	15
2°C										
QLI	7,65	7,65	7,98	7,98	8,46	8,72	7,65	8,46	8,72	
QLIP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L	≥6,65	≥6,65	≥6,9	≥6,98	≥7,46	≥7,72	≥6,65	≥7,46	≥7,72	
10°C										
QLI	8,65	8,74	8,65	8,22	8,74	8,70	8,70	8,45	8,22	
QLIP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L	≥7,65	≥7,74	≥7,6	≥7,22	≥7,74	≥7,70	≥7,70	≥7,45	≥7,22	
25°C										
QLI	8,45	8,45	8,11	8,45	8,64	8,11	8,64	8,64	8,64	
QLIP	1,71	0,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L	6,74	7,68	≥7,1	≥7,45	≥7,64	≥7,11	≥7,64	≥7,64	≥7,64	

QLI: queso elaborado con leche inoculada; QLIP: queso elaborado con leche inoculada presurizado; L : letalidad = Log UFC/g QLI- Log UFC/g QLIP. n.d.: no se detectó crecimiento. El límite de detección es de 1 Log UFC/g.

Tabla IV.1.3 Recuentos y letalidades (Log UFC/g) de BAM en queso *Mató* según el tratamiento efectuado.

MPa	400			450			500			
	min	5	10	15	5	10	15	5	10	15
2°C										
QLIP	2,63	2,58	2,39	2,40	2,79	3,06	2,53	2,79	2,90	
10°C										
QC	-	2,60	-	3,13	2,60	-	-	5,77	3,13	
QCP	-	2,32	2,20	1,30	2,48	2,46	2,30	3,27	1,30	
QLIP	2,14	2,50	-	1,40	2,46	2,35	2,29	3,17	1,52	
L <sub>a</sub>	-	0,28	-	1,83	0,12	-	-	2,50	1,83	
L <sub>b</sub>	-	0,10	-	1,73	0,14	-	-	2,60	1,61	
25°C										
QC	5,77	5,77	4,24	5,77	5,70	4,24	5,70	5,70	5,70	
QCP	3,10	3,04	2,88	3,04	2,79	2,69	2,68	2,71	2,66	
QLIP	3,22	3,20	2,46	3,16	2,77	2,14	2,81	2,78	2,73	
L <sub>a</sub>	2,67	2,73	1,36	2,73	2,91	1,55	3,02	2,99	3,04	
L <sub>b</sub>	2,55	2,57	1,78	2,61	2,93	2,10	2,89	2,92	2,97	

QC: queso control elaborado con leche sin inocular; QCP: queso control presurizado; QLIP: queso elaborado con leche inoculada y presurizado; L<sub>a</sub>: letalidad<sub>a</sub> = Log UFC/g QC - Log UFC/g QCP; L<sub>b</sub>: letalidad<sub>b</sub> = Log UFC/g QC - Log UFC/g QLIP.

Los recuentos finales de BAM del queso deben contemplarse en valores absolutos puesto que no se ha realizado ninguna identificación ni distribución de frecuencias de los grupos microbianos inicialmente presentes en el queso, además, puede esperarse una elevada variabilidad tanto en la cantidad como en el tipo de microbiota presente en el queso debido a las fuentes de variación en la producción y manipulación de la leche.

La Figura 1 muestra la evolución durante 60 días de las BAM y *E. coli* que sobrevivieron a los tratamientos a 2°C, 10°C y 25°C respectivamente. En la mayoría de los casos se observó el mantenimiento de la población inicial. En cuanto a las BAM, en tres de los tratamientos más suaves se observó aumento de la población, que se atribuyó al crecimiento de células vegetativas que no habían sido inactivadas por el tratamiento de alta presión y que podían crecer en condiciones de refrigeración.

Podemos comparar nuestros resultados con los de trabajos que estudian la evolución de las poblaciones de quesos similares al *Mató* durante la conservación en refrigeración: Sendra y col. (1994) han estudiado la evolución de los microorganismos del queso fresco de cabra (pH 6,45) envasado en atmósferas modificadas: los recuentos de BAM se mantienen constantes durante la primera semana en refrigeración al vacío, pero a los 14 días aumentan 1,5 unidades logarítmicas y la microbiota láctica también aumenta durante la conservación. Por otro lado, Coppola y col. (1995) han observado un aumento de 1,4 unidades logarítmicas de los recuentos de microorganismos viables después de la conservación en refrigeración durante 10 días de queso *Mozzarella*.

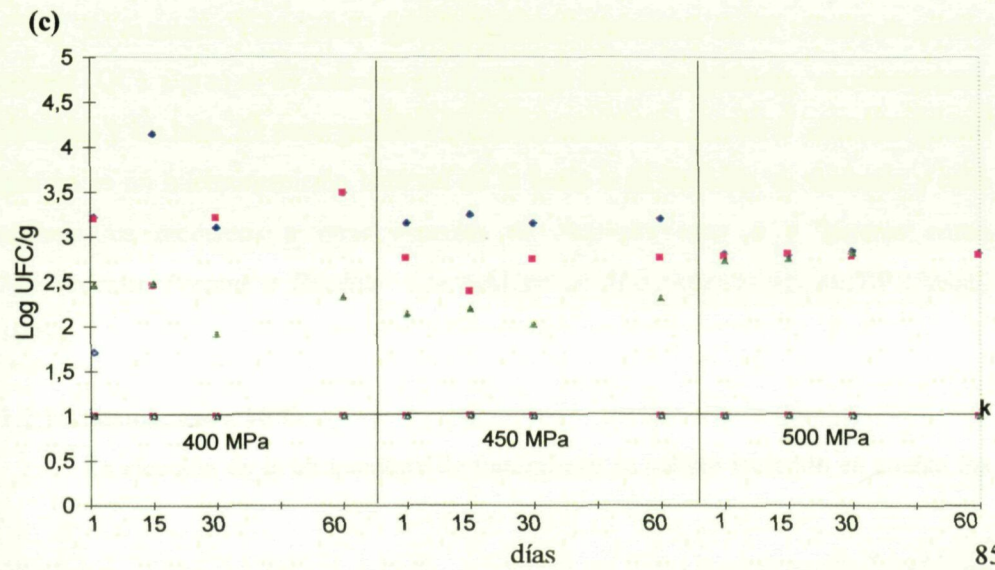
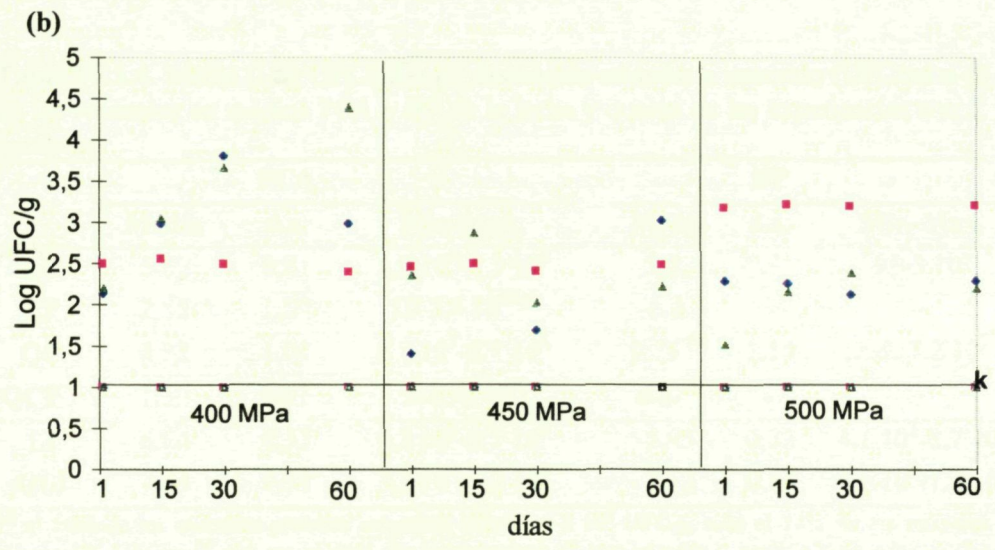
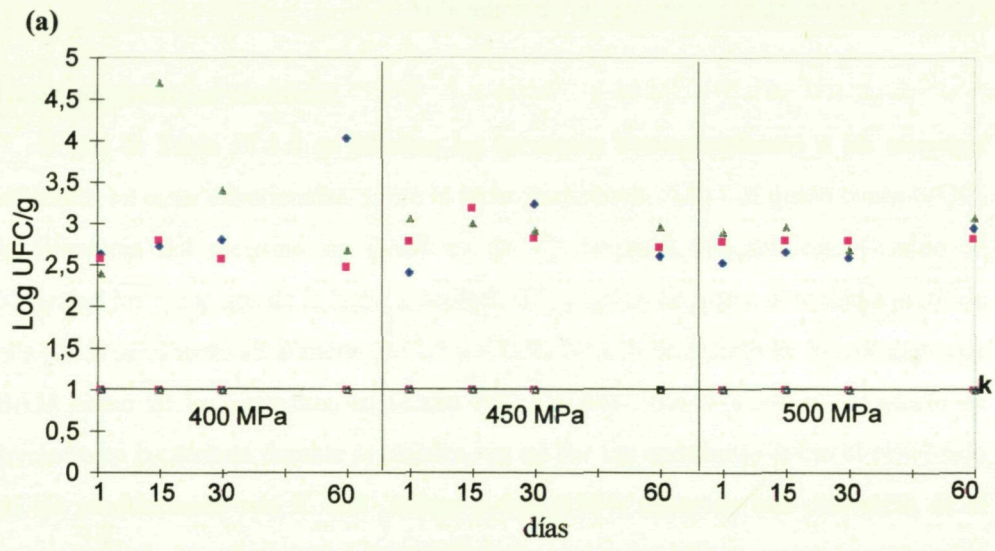
Por lo que respecta a la evolución de las población de mesófilos aerobios en otros alimentos que han sido sometidos a alta presión, Carlez y col. (1994) aplicando presiones de 400-450 MPa, causan una reducción entre 3 y 5 unidades logarítmicas de los niveles iniciales en carne de ternera e inducen un retraso de 6-13 días en el crecimiento de los supervivientes cuando la carne se encuentra refrigerada a 3°C y envasada con aire o al vacío. Sostienen que la recuperación que se produce en los recuentos es debida a la reparación de parte de los microorganismos que han sido dañados por la alta presión y que deben considerarse dos niveles de presión: uno que causa estrés o daño subletal y retrasa el crecimiento, y otro nivel que induce la inactivación completa. Patterson y Linton (1997), en su trabajo con cepas resistentes de *E. coli*, también observan la presencia de células dañadas subletalmente a presiones inferiores a las requeridas para la inactivación completa. Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados, pues en las muestras sometidas a tratamientos más agresivos no se observó crecimiento durante la conservación. En este caso, los recuentos de supervivientes corresponderían a esporas y células vegetativas que sobrevivieron al tratamiento pero no pudieron desarrollarse en refrigeración y en condiciones de vacío.



En cuanto a *E. coli*, a partir de los quince días en refrigeración no se observó supervivencia en ningún caso, ni siquiera en los quesos que presentaban crecimiento el día siguiente al tratamiento. Carlez y col. (1994) han estudiado la evolución en refrigeración de los recuentos de coliformes totales supervivientes al tratamiento de 300 MPa/20°C/20 min en carne de ternera y observan que cuando los coliformes no son completamente inactivados se recupera su nivel inicial después de 13 días de conservación en refrigeración y al vacío, pero los recuentos no aumentan en presencia de aire en el envase Sims y col (1989) han estudiado la evolución de *E. coli* inoculado en leche para elaborar queso *cottage* con distintos ingredientes y con un pH cercano a 5. En algunas formulaciones los recuentos iniciales se mantienen constantes durante 12 días a 7°C, mientras que en otros casos los recuentos disminuyen aproximadamente una unidad logarítmica. Arispe y Westhoff (1984) no detectan crecimiento de coliformes ni coliformes fecales presentes en queso fresco venezolano (pH 6,4-6,6; NaCl 1,5-3,5%) después de conservarlo durante 8 días en refrigeración (3°C).

En nuestro caso, podemos afirmar que las células de *E. coli* que sobrevivieron al tratamiento de alta presión quedaron dañadas y las condiciones de refrigeración y vacío no permitieron su reparación, puesto que 15 días después ya no se detectaron supervivientes. Esta afirmación queda corroborada porque no se detectó crecimiento en VRBA en ninguna de las muestras de queso incubadas a 37° C/18 h para confirmar la inactivación total de *E. coli*. Las incubaciones se realizaron 1 día después del tratamiento en quesos presurizados a 500 MPa/10° C/10 min y 450 MPa/25° C/5 min y uno y 15 días después en quesos tratados a 400 MPa/25° C/5 min y 450 MPa/25° C/5 min.

Página siguiente: **Figura IV.1.1.** Evolución de BAM (◆: 5 min; ■: 10 min; ▲: 15 min) y *Escherichia coli* (◇: 5 min; □: 10 min; △: 15 min) supervivientes a los tratamientos de alta presión (a) 2° C, (b) 10° C, (c) 25° C. k indica el límite de detección de la técnica utilizada.





### 1.2 *Staphylococcus carnosus*.

En la Tabla IV.1.4 se detallan los recuentos correspondientes a las muestras utilizadas en estas experiencias. Entre la leche pasteurizada (LP) y el queso control (QC) la diferencia del recuento de BAM es de 1,7 unidades logarítmicas. Cuando se comparan los recuentos de la leche inoculada (LI) con los del queso obtenido a partir de ella (QLI) se observa un aumento de 1,5 unidades logarítmicas tanto en los recuentos de BAM como en los recuentos en medio BP. Así pues, con *S. carnosus* el efecto de crecimiento bacteriano durante la elaboración no fue tan manifiesto como el observado en las producciones con *E. coli*. Arispe y col. (1994) observan una diferencia de al menos un ciclo logarítmico (1-1,9) entre la leche y el queso blanco venezolano obtenido y lo atribuyen al efecto de concentración en la cuajada.

**Tabla IV.1.4** Media (Log UFC/ml o g), desviación estándar e intervalo (UFC/ml o g) de los recuentos en medios PCA y BP de la leche y quesos de las experiencias con *S. carnosus*.

	PCA			BP		
	Media	d.s.	Min-Max.	Media	d.s.	Min-Max.
LC	5,62	0,81	1,9 10 <sup>4</sup> -4,3 10 <sup>6</sup>	3,55	0,71	99-5 10 <sup>4</sup>
LP	2,55	1,09	19-3,6 10 <sup>4</sup> ( <sup>a</sup> )	n.d.	-	-
QC	4,32	1,04	6,7 10 <sup>2</sup> -8,8 10 <sup>5</sup>	0,75 ( <sup>b</sup> )	1,14	n.d.-7,2 10 <sup>2</sup>
QCP( <sup>c</sup> )	1,50	0,61	5-1,75 10 <sup>2</sup>	n.d.( <sup>d</sup> )	-	-
LI	6,04	0,37	5,2 10 <sup>5</sup> -8,7 10 <sup>6</sup>	5,95	0,33	4,1 10 <sup>5</sup> -8,7 10 <sup>6</sup>
QLI	7,54	0,34	5,3 10 <sup>6</sup> -1,2 10 <sup>8</sup>	7,52	0,33	4,6 10 <sup>6</sup> -1,2 10 <sup>8</sup>

(<sup>a</sup>) el 50% de las muestras presenta recuentos inferiores a 10<sup>2</sup> UFC/g; solo el 14% de las muestras supera 10<sup>4</sup> UFC/g; (<sup>b</sup>) n.d. en el 66% de las muestras; (<sup>c</sup>) tratamientos y análisis realizados en las experiencias a 10°C; (<sup>d</sup>) recuentos iniciales máximos en BP: 1,03 10<sup>2</sup>.

En la misma Tabla puede apreciarse cierto crecimiento en BP a partir de quesos control (QC). Como se ha indicado en el apartado III, se contaron las colonias negras, redondas y sin halo. Es poco probable que estas colonias fueran de *S. carnosus* puesto que no es un microorganismo habitual de la leche o de las salas de quesería y cabe atribuir los recuentos a otras especies de *Staphylococcus* o a géneros como *Micrococcus*, *Proteus* o *Bacillus* que también se desarrollan en medio BP (Anon., 1995).

#### 1.2.1 Tratamientos a 10°C.

La elección de la temperatura de tratamiento se realizó teniendo en cuenta los

resultados de las experiencias con *E. coli*: como ya se ha visto, la temperatura de 25°C fue la menos adecuada para inactivar este microorganismo. Por otro lado, tratar a 25°C supone someter la muestra a un aumento de temperatura entre la fase de elaboración y la de almacenamiento. En cambio el tratamiento a 10°C fue efectivo en la destrucción de *E. coli* y supone una implantación rápida de la cadena del frío, lo que contribuye a controlar el desarrollo de microorganismos en el queso. El tratamiento a 2° C no se consideró debido al mayor coste energético y de tiempo que supone. Las letalidades alcanzadas al aplicar los tratamientos a 10°C se exponen en la Tabla IV.1.5. La inactivación aumentó a medida que aumentaron la presión y el tiempo de tratamiento.

**Tabla IV.1.5** Letalidad (Log UFC/g inicial - Log UFC/g final) conseguida en los tratamientos a 10° C de *Mató* fabricado con leche inoculada con *Staphylococcus carnosus*.

	5 min	10 min	15 min	30 min
<i>S. carnosus</i>				
400 MPa	0,48	0,35	0,53	-
450 MPa	0,86	0,96	1,65	-
500 MPa	0,94	0,92	1,84	2,17
<b>BAM</b>				
400 MPa	0,36	0,54	0,41	-
450 MPa	0,82	0,92	0,52	-
500 MPa	0,50	0,88	1,87	2,03

Algunos de los tratamientos de esta experiencia se realizaron inmediatamente después de la elaboración del queso y se repitieron al día siguiente, con el fin de valorar si el tiempo transcurrido desde la elaboración estaba relacionado con la letalidad conseguida por el tratamiento. Los resultados de la Tabla IV.1.6 indican que, en general, no existieron diferencias y en las excepciones, en la mayoría de los casos la letalidad conseguida fue mayor a las 18 h que a las 0 h.

**Tabla IV.1.6** Efecto del tiempo transcurrido entre la elaboración y la aplicación de la alta presión a 10°C sobre la letalidad (Log UFC/g inicial - Log UFC/g final) conseguida en *Mató* fabricado con leche inoculada con *Staphylococcus carnosus*.

	0 h				18 h			
	BAM		<i>S. carnosus</i>		BAM		<i>S. carnosus</i>	
	Media	d.s.	Media	d.s.	Media	d.s.	Media	d.s.
400/5	0,32	0,01	0,27	0,003	0,36	0,15	0,48	0,19
450/5	0,64	0,02	0,58	0,04	0,82 <sup>a</sup>	0,05	0,86 <sup>a</sup>	0,08
450/10	0,29	0,35	0,14	0,96	0,92	0,1	0,96 <sup>a</sup>	0,06
500/15	1,81	0,05	1,58	0,22	1,87	0,12	1,84	0,32
500/30	2,59	0,01	2,12	0,26	2,03 <sup>a</sup>	0,07	2,17	0,1

\*Recuentos iniciales de BAM: 6,73 Log UFC/g a las 0 h y 7,88 Log UFC/g a las 18 h; de *S. carnosus*: 6,67 Log UFC/g a las 0 h y 7,92 Log UFC/g a las 18 h.<sup>a</sup>Las letalidades difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) de las obtenidas con los tratamientos efectuados a las 0 horas de la elaboración.

### 1.2.2 Tratamientos a 25 y 50°C.

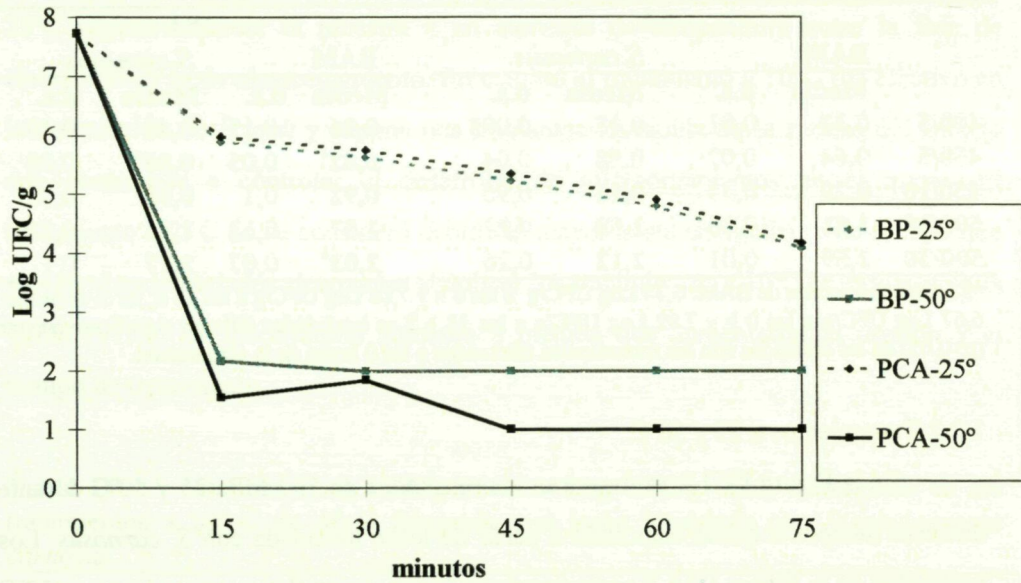
En la Figura IV.1.2 se muestran los resultados de 500 MPa/25 y 50°C durante distintos tiempos a queso elaborado a partir de leche inoculada con *S. carnosus*. Los resultados de la Figura IV.1.3 corresponden a la repetición de los tratamientos a 50°C reflejados en la Figura IV.1.2 pero con un nivel de detección de *S. carnosus* <3 UFC/g gracias a la utilización de la técnica de NMP. Paralelamente se sembraron placas con medio BP, no apareciendo ninguna colonia ni siquiera en las correspondientes a la dilución -1.

Después de la presurización se incubó una muestra de cada tratamiento a 37°C/18 h para permitir la recuperación de las células dañadas subletalmente y se realizaron los análisis microbiológicos. Todas las muestras presentaron recuentos elevados en PCA. En medio BP también se observó el crecimiento de colonias, pero únicamente las placas correspondientes a las muestras tratadas durante 30 min presentaron colonias típicas, que al realizarse la tinción de gram resultaron ser cocos gram positivos. Las colonias atípicas correspondían a bacilos gram positivos.

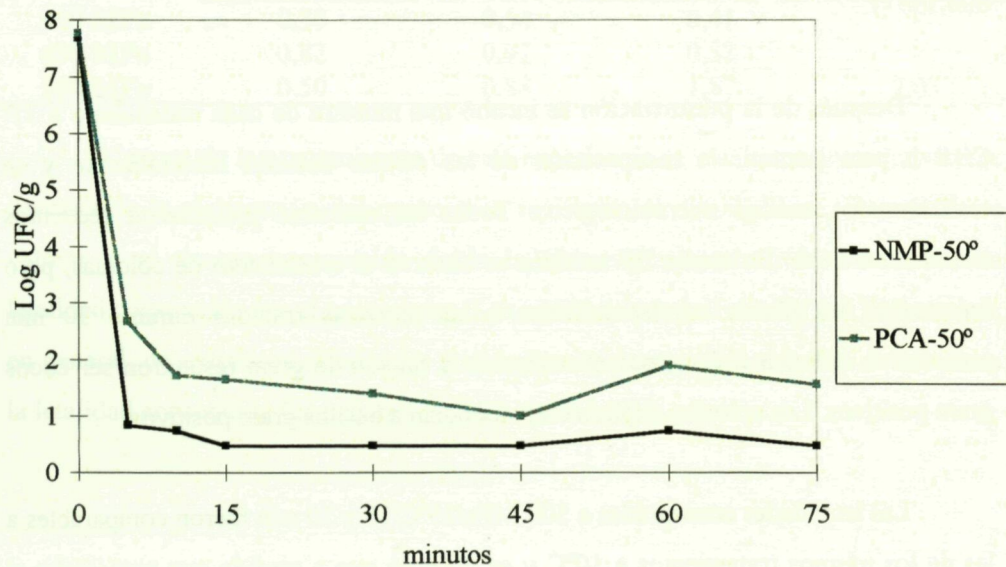
Las letalidades conseguidas a 500 MPa/25°C/15 y 30 min fueron comparables a las de los mismos tratamientos a 10°C y se observó que a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento aumentaba ligeramente la inactivación. En el caso que *S. carnosus* sirviera para estimar el comportamiento de *Staphylococcus aureus*, estos tratamientos pueden resultar insuficientes para garantizar el cumplimiento de los criterios microbiológicos aplicables al queso fresco (Tabla I.6), puesto que en algunos



**Figura IV.1.2** Recuentos (Log UFC/g) en PCA (k=1) y BP (k=2) en muestras tratadas a 500 MPa, 25° C y 50° C.



**Figura IV.1.3** Recuentos (Log UFC/g) en PCA (k=1) y con la técnica de NMP para *S. carnosus* (k<0,48) en muestras tratadas a 500 MPa/50° C.



casos las poblaciones de este microorganismo son muy elevadas (Tabla I.5). Por otro lado, en quesos elaborados correctamente y que cumplieran los criterios especificados, servirían para reducir al mínimo el riesgo de producción de toxinas.

El aumento de la temperatura a 50°C permitió la inactivación de *S. carnosus* hasta el nivel de detección con letalidades muy elevadas y no fueron necesarios tiempos superiores a 15 min para conseguir este efecto. Sin embargo, este proceso presentó un inconveniente: como se ha descrito en el apartado III, las muestras se llevaban a la temperatura de tratamiento antes de introducirse en el cilindro para ser presurizadas y en este caso implicaba el mantenimiento del queso en un baño de agua hasta alcanzar los 50°C. Este pretratamiento suponía *per se* un aumento del desuerado del queso. Si a esto le sumamos el efecto de la alta presión se obtenía un producto cuyas características de textura lo hacían inaceptable. Por esta razón se ensayaron dos tratamientos en los que el cilindro se encontraba a 50° C pero la muestra se introducía sin precalentar. Los resultados se exponen en la Tabla IV.1.7 y corresponden a dos producciones distintas.

La reducción de la población de *S. carnosus* conseguida en la producción A se acercó al nivel de detección (0,48), mientras que en la producción B la reducción fue solamente de 4 unidades logarítmicas. Como se ha señalado en la introducción, el efecto de la alta presión sobre las células vegetativas depende de varios factores, como el estado fisiológico, el tipo de cepa utilizada, el medio de presurización, etc. La única variación que existió entre estas producciones fue la fecha de realización de la experiencia, pues transcurrieron cinco meses entre ambas.

**Tabla IV.1.7** Recuentos (Log UFC/g) en los tratamientos de presurización a 500 MPa con cilindro a 50° C y queso a 15° C.

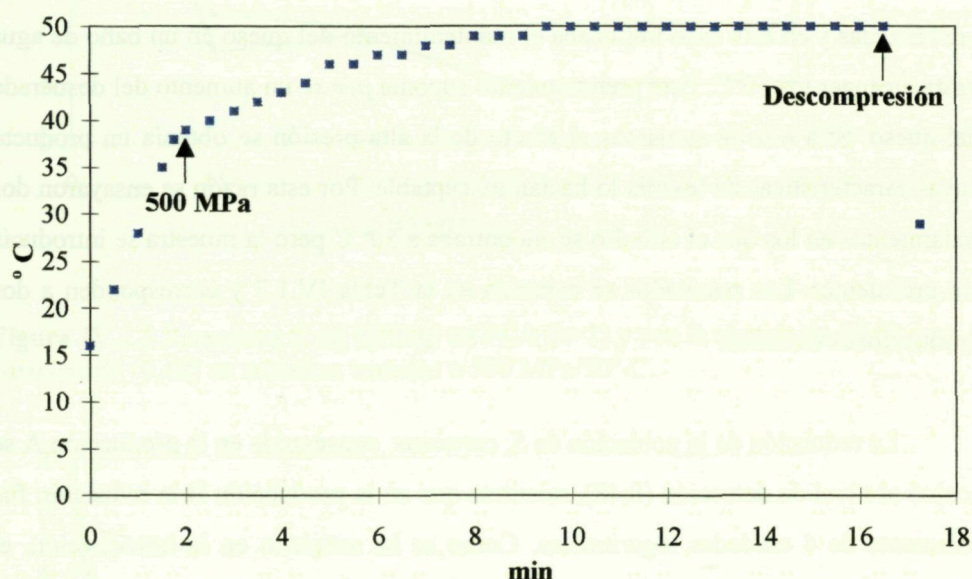
		BAM	<i>S. carnosus</i>
Prod. A	Inicial	7,81	7,78
	10 min	3,66	1,14
	15 min	3,69	1,04
Prod. B	Inicial	7,46	7,32
	10 min	3,5	3,38
	15 min	3,28	3,22

Paralelamente se siguió la evolución de la temperatura del centro del queso



durante los 15 min del tratamiento (Figura IV.1.4). El queso partió de una temperatura inicial de 16°C, durante la compresión subió a 39°C y tardó 7,5 min en llegar a 50°C. La textura de los quesos introducidos a temperatura ambiente estando el cilindro a 50°C mejoró sensiblemente respecto a la de los quesos que fueron precalentados, sin embargo, la reducción de las poblaciones estudiadas fue considerablemente menor que cuando se precalentaba la muestra.

**Figura IV.1.4** Evolución de la temperatura en el centro de un queso durante el tratamiento de 500 MPa/15 min, hallándose el cilindro y el agua de su interior a 50°C.



### 1.2.3 Tratamientos con nisina.

En la bibliografía, la mayoría de las aplicaciones queseras de la nisina hacen referencia a su adición en la elaboración de queso procesado. Cuando se trata de queso madurado, los estudios consultados no utilizan nisina directamente sino que, junto con los cultivos iniciadores inoculan en la leche cepas productoras. En nuestro caso, se añadió nisina a la leche destinada a elaborar el *Mató*.

Al no disponer de ninguna referencia acerca de la dosis necesaria a añadir en la leche para conseguir la deseada en el queso final, se realizó una experiencia preliminar para determinar dicha dosis inicial de la leche. Los resultados de esta experiencia indicaron que para conseguir 12,5 mg de nisina/kg de queso (contenido máximo

máximo autorizado según la Directiva 95/27/CE DOCE 18/3/95 en quesos fundidos y madurados) es necesario añadir a la leche 1,56 mg/l, es decir, 62,5 mg de Nisaplin®/l de leche (1g de Nisaplin contiene 25 mg ó  $1 \times 10^6$  UI de nisina). Se comprobó lo correcto de esta estimación en una producción añadiendo la mencionada dosis de Nisaplin® en la leche, con lo que se obtuvieron 13,4 mg nisina/kg de queso. Sin embargo, en las producciones posteriores para estudiar el efecto combinado de la nisina y la alta presión sobre BAM y *S. carnosus*, con leche inoculada o no, se observó que, repitiendo esa dosificación en la leche, el contenido de nisina en el queso era inferior al de la primera experiencia y muy variable entre experiencias. Para proporcionar una visión global de todas las pruebas con nisina, se exponen los datos de las concentraciones en leche y queso (Tabla IV.1.8).

**Tabla IV.1.8** Concentraciones de nisina añadida a la leche (mg/l) de distintas producciones y concentraciones finales en el queso (mg/kg).

Experiencia	Leche	Queso
<i>S. carnosus</i> , • 500 MPa/5, 15 y 30 min	1,56	13,4
<i>S. carnosus</i> , • 500 MPa/5 min	1	3,68
Sin inocular:		
• Queso no tratado	1,56	9,16
• 400 MPa/5 min	1,56	10,15
• 500 MPa/5 min	1,56	8,46
• 500 MPa/2 y 3 ciclos de 5 min	1,56	8,32
Sin inocular:		
• Queso no tratado	1,56	7,12
• 500 MPa/5 min	1,56	6,94
• 500 MPa/30 min	1,56	7,12

Al determinar la actividad de nisina en los quesos control y tratados, no se observaron diferencias significativas entre quesos de una misma producción, por lo que podemos afirmar que la alta presión no afectó a su actividad después del tratamiento.

En los quesos que contenían 13,4 ppm de nisina y elaborados a partir de leche inoculada con *S. carnosus*, los recuentos de éstos quedaron reducidos hasta el nivel de detección un día después de la elaboración (Tabla IV.1.9). En la especie más

estudiada del género, *S. aureus*, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de nisina se encuentra entre 0,1-3,2 ppm de nisina (Ray, 1987), atribuyéndose la amplia variabilidad a las diferencias de resistencia que existen entre las cepas y también a las variaciones en el estado fisiológico. No disponemos de datos acerca de la CMI para *S. carnosus*, aunque la concentración empleada es mucho mayor que la máxima citada.

Se observó una reducción importante de la población de BAM, que correspondía a la inactivación de *S. carnosus*. Los recuentos del QLI+N fueron superiores a los del QC, tanto en esta producción como en la realizada con 3,68 ppm de nisina (Tabla IV.1.10). Si, como observamos, la nisina redujo los *S. carnosus* hasta el nivel de detección, los recuentos hubieran debido quedar al menos igualados, puesto que el aumento en BAM del QLI respecto al QC es debido exclusivamente al inóculo de *S. carnosus*. Una posible explicación de este comportamiento podría ser que la nisina causara un efecto subletal en parte de las células de la población de *S. carnosus*, de manera que no pudieran crecer en medio selectivo pero sí lo hicieran cuando se incubaban en medio general para el recuento de BAM.

**Tabla IV.1.9** Efecto combinado de nisina (13,4 mg/kg de queso) y alta presión (500 MPa) sobre la población de BAM y *S. carnosus* (Log UFC/g) del *Mató* al día siguiente del tratamiento a 10 y 25°C y su evolución en conservación a 4 ó 25°C.

	1 día a 4°C				30 días a 4°C			
	BAM		<i>S. carnosus</i>		BAM		<i>S. carnosus</i>	
QC	3,64		<0,48		-		-	
QLI	8,22		8,13		8,99		5,94	
QLI+N	4,13		<0,48		>6		<0,48	
Conservación	1 día a 4°C				15 días a 25°C			
Tratamiento	25°C				10°C			
°C	25°C		10°C		25°C		10°C	
Tiempo	BAM	<i>S.c.</i>	BAM	<i>S.c.</i>	BAM	<i>S.c.</i>	BAM	<i>S.c.</i>
5 min	1,74	<0,48	1,65	<0,48	5,46	<0,48	>6	<0,48
15 min	1,17	<0,48	1,89	<0,48	1,74	<0,48	1,7	<0,48
30 min	1,40	<0,48	1,93	<0,48	1,3	<0,48	3,57	<0,48

*S.c.*=*S. carnosus*

Después de 30 días en refrigeración, la población de *S. carnosus* siguió manteniéndose por debajo del nivel de detección en los QLI + N y en los QLI disminuyó 2 unidades logarítmicas. Una disminución similar se observó también en

las experiencias realizadas con tratamientos cíclicos, tanto en los QLI como en los quesos presurizados. Los datos hallados en la bibliografía acerca de la evolución en refrigeración de microorganismos de este mismo género hacen referencia a *S. aureus*. Sims y col. (1989) han observado la disminución de 1 Log UFC/g de la población de *S. aureus* en queso *Cottage* conservado a 10°C durante 14 días y Arispe y col. (1984) no han observado aumento en la población después de mantener queso fresco venezolano a 3°C durante 8 días. Como en el caso anterior, Núñez y col. (1986) tampoco han detectado variaciones en la población de queso de Burgos conservado durante una semana a 4°C. En cambio, Otero y col. (1988) han hallado un aumento entre 1 y 1,5 Log UFC/g en la población de *S. aureus* de queso de Burgos durante el mismo tiempo de conservación. La disminución significativa de la población de *S. aureus* durante la maduración y el almacenamiento de quesos madurados ha sido descrita (Mor-Mur y col., 1994 y Spahr y Uhl, 1994), pero en los quesos frescos mencionados y en el *Mató* no se presentan las mismas condiciones. En nuestro caso, la disminución de la población de *S. carnosus* del queso se explica porque la cepa utilizada no es capaz de metabolizar la lactosa.

La población de BAM de los QLI + N aumentó significativamente después de un mes en refrigeración. El efecto de la alta presión sobre ellos solamente puede valorarse en la población de BAM: la reducción fue significativamente superior en los tratamientos a 25°C (15 y 30 min) que en los realizados a 10°C. Los recuentos finales logrados con el tratamiento combinado de nisina y alta presión en los QLI + N fueron inferiores a los alcanzados con el tratamiento de alta presión en experiencias comparables en quesos inoculados con *E. coli* (Tabla IV.1.2). Se explica porque la nisina tiene efecto sobre las esporas y, como se ha señalado anteriormente, las esporas son una parte importante de la microbiota superviviente al tratamiento de alta presión en el queso. Roberts y Hoover (1996) han estudiado la inactivación de esporas de *Bacillus coagulans*, sensibles a la acción de la nisina, combinando ésta y alta presión y señalan un efecto aditivo de los dos tratamientos a 25°C. El efecto de la nisina cuando se combina con la presión no sólo se manifiesta sobre las células habitualmente sensibles, sino también sobre bacterias gram negativas y gram positivas resistentes, puesto que el estrés causado por la alta presión debido a los cambios de permeabilidad que se producen en la membrana, las sensibiliza a la acción de la nisina

(Kalchayanad, 1992; Hauben y col., 1996).

Después de 15 días en conservación a temperatura ambiente no hubo crecimiento de *S. carnosus*. Los niveles de BAM aumentaron en los tratamientos de 5 min a las dos temperaturas utilizadas y en el de 30 min/10° C, mientras que en el resto de tratamientos se mantuvieron.

La producción con una dosis de nisina de 3,68 ppm se realizó con el objetivo de no inactivar la totalidad de la población de *S. carnosus* para poder observar el efecto de la alta presión. El efecto de la nisina *per se* siguió siendo muy marcado sobre la población de *S. carnosus*, tanto en la leche como en el queso, y no se observó efecto aditivo de reducción debido a la alta presión. La presencia de una fracción de microbiota que no era inactivada por la nisina puede explicarse por dos razones o por la combinación de ambas: según Richard (1996), las bacterias en fase estacionaria son menos sensibles a la nisina que en fase logarítmica de crecimiento. Por otro lado, al utilizar una dosis baja quizá no se alcanzó la concentración mínima inhibitoria para este microorganismo.

Como se ha mencionado, la población de *S. carnosus* resistente a la nisina también lo ha sido al tratamiento de presurización. Earnshaw y col. (1995) han descrito la aparición de “colas” de supervivientes en las Figuras que representan las cinéticas de inactivación por alta presión de *S. carnosus*. Plantean posibles teorías para explicar este hecho: a) la persistencia de supervivientes es un hecho normal, asociado a mecanismos de resistencia; b) independientemente de éstos, es el resultado de la heterogeneidad de la población, que se halla en distintas edades celulares o estadios fisiológicos; c) es resultado de variaciones genéticas; d) es consecuencia de distintas disponibilidades de agua y e) puede atribuirse incluso al error experimental.

Zottola y col. (1994) han estudiado el efecto de la nisina sobre una población de *S. aureus* de  $10^3$  UFC/g inoculada en queso fundido elaborado a partir de queso *Cheddar* que contenía la bacteriocina, observando una rápida reducción de los niveles del microorganismo, de manera que después de 5 días de conservación a 23°C ya no se detectan supervivientes.

**Tabla IV.1.10** Efecto combinado de nisina (3,68 mg/Kg de queso) y alta presión sobre la población de BAM y *S. carnosus* (Log UFC/g) de *Mató* al día siguiente del tratamiento a 25°C.

	BAM	<i>S. carnosus</i>
LC	4,58	3,71*
LP	1,47	n.d.
LI	5,82	5,9
LI + N	3,30	<2
QC	3,96	n.d.
QC + N	2,63	n.d.
QLI	7,29	7,69
QLI + N	4,54	1,21
QLI + N + 500 MPa/5 min	1,70	1,14

\* aparición de colonias típicas en BP que probablemente no corresponden a *S. carnosus*

#### 1.2.4 Tratamientos en ciclos.

Se realizaron dos experiencias a 10°C aplicando ciclos de 5 min a 500 MPa. En la segunda se aplicaron además dos tratamientos continuos para compararlos con los cíclicos y seguir su evolución durante 15 y 30 días en refrigeración. Los resultados se muestran en la Tabla IV.1.11.

**Tabla IV.1.11** Letalidad (Log UFC/g inicial - Log UFC/g final) conseguida en los tratamientos a 500 MPa/10° C/ *n* ciclos de 5 min o continuos.

<i>n</i>	Producción A <sup>(1)</sup>		Producción B <sup>(2)</sup>	
	BAM	<i>S. carnosus</i>	BAM	<i>S. carnosus</i>
1	0,71	1,21	0,03	0,09
2	1,51	2,02	0,88	0,71
3	1,93	2,66	1,87	1,51
4	3,05	3,47	2,67	2,39
5	3,23	3,56	3,90	3,49
6	-	-	4,25	3,70
15 min	-	-	<u>1,38</u>	1,37
30 min	-	-	<u>2,28</u>	<u>2,30</u>

<sup>(1)</sup>Recuentos iniciales. BAM: 7,41; *S. carnosus*: 7,37. <sup>(2)</sup>Recuentos iniciales. BAM: 7,43; *S. carnosus*: 7,37. Subrayadas las medias significativamente distintas de las de los tratamientos cíclicos comparables.

Existen diferencias significativas entre la mayoría de las letalidades conseguidas en las dos producciones, efecto que ya se ha observó al comparar los dos tratamientos realizados con el cilindro a 50°C y la muestra a temperatura ambiente. Como en las experiencias a 50°C, la única variación entre las dos producciones fue la fecha de elaboración, pues se realizaron con un mes y medio de diferencia. En el resto

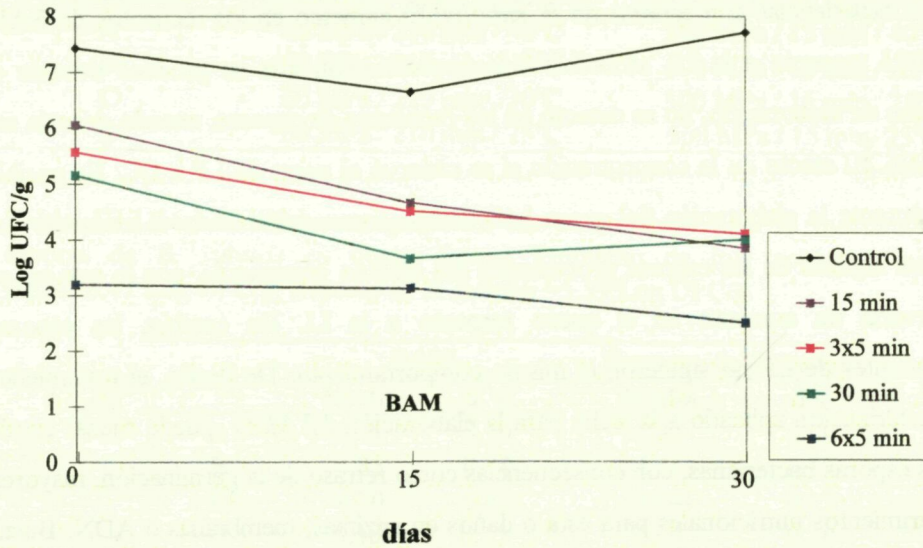
de experiencias con microorganismos, el tiempo transcurrido entre producciones que se comparan no era superior a dos semanas, y no se observaron variaciones tan acusadas. Los cambios en la población microbiana propia de la leche o de la sala de quesería a lo largo del tiempo, pueden explicar las variaciones en la inactivación de la población de BAM, pero no las de los microorganismos inoculados.

Cuando se comparan los tratamientos cíclicos y continuos de la producción B se observa que el cíclico de 15 min no aportó una letalidad significativamente superior sobre la población de *S. carnosus* que la proporcionada por el tratamiento continuo, mientras que sí fue superior la reducción de la población de BAM. El tratamiento cíclico de 30 min consiguió reducciones significativamente superiores a las del continuo sobre las dos poblaciones estudiadas. De manera similar, Ponce y col. (1997) han observado una mayor letalidad de *Salmonella enteritidis* inoculada en huevo líquido cuando el tratamiento de alta presión se efectúa en varios ciclos de 5 min que cuando, con la misma duración, se aplica de manera continua. Así mismo, Yuste y col. (en revisión) han hallado resultados ligeramente mejores en la inactivación de las bacterias mesófilas y sicrotomas de carne de pollo recuperada mecánicamente aplicando tratamientos cíclicos.

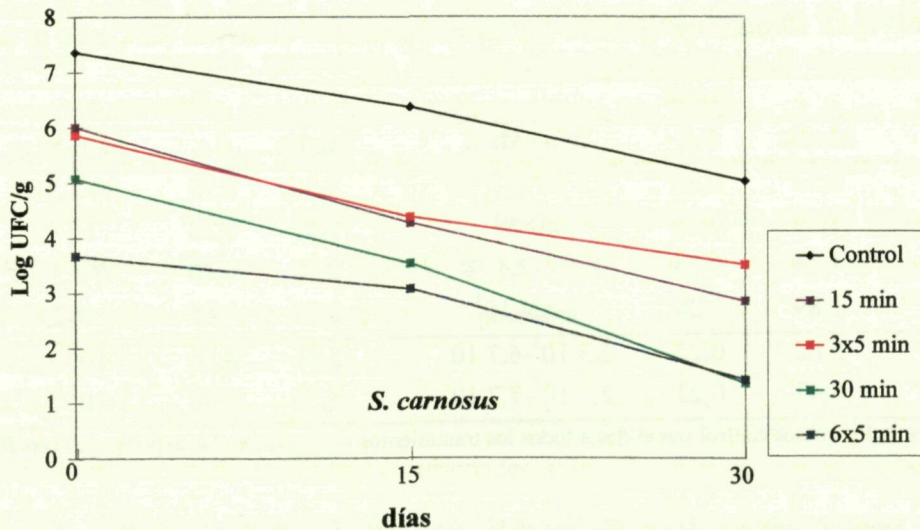
La evolución de las poblaciones de BAM y *S. carnosus* supervivientes a los tratamientos de 500 MPa/10° C durante 15 y 30 min aplicados de manera continua y en ciclos se muestra en las Figuras IV.1.5 y IV.1.6 respectivamente y en la Tabla IV.1.11. La población de BAM disminuyó significativamente durante los 30 días de conservación en refrigeración, debido a que se trataba mayoritariamente de *S. carnosus* que disminuyen aún en mayor grado. Como ya se ha visto, la disminución de los recuentos de *S. carnosus* en refrigeración ocurrió también en aquellos quesos inoculados que no habían sido presurizados debido a que estos microorganismos no son capaces de metabolizar el principal carbohidrato de queso.



**Figura IV.1.5** Evolución de los recuentos de BAM de quesos elaborados con leche inoculada con *S. carnosus* sometidos a 500 MPa/10°C y conservados a 4°C.



**Figura IV.1.6** Evolución de los recuentos de *S. carnosus* de quesos elaborados con leche inoculada con *S. carnosus* sometidos a 500 MPa/10°C y conservados a 4°C .





### 1.3 *Bacillus subtilis*.

En la Tabla IV.1.12 se presentan los recuentos de la leche y quesos utilizados en las experiencias con esporas de *B. subtilis*. El aumento en los recuentos de BAM del QLI respecto a la LI, atribuible a la concentración que se produce durante el proceso de elaboración, no se detectó en los recuentos de esporas, cuando debería ser paralelo. El efecto de la concentración sí se observó al pasar de LP a QC. Es posible que durante la elaboración del queso y el tiempo transcurrido hasta el momento del análisis algunas de las esporas procedentes del inóculo germinaran, por lo que no se observaría un aumento en el queso respecto a la LI. En cambio, las esporas procedentes de LP no siguieron el mismo comportamiento. De hecho, el tratamiento de pasteurización aplicado a la leche para la elaboración del *Mató* puede causar estrés en las esporas bacterianas, con consecuencias como retraso de la germinación, mayores requerimientos nutricionales para ésta o daños en enzimas, membranas o ADN. Busta y col. (1981) indican que 75-90°C retrasan la germinación de *B. cereus*, y 90°C alteran la cadena de ADN de *B. subtilis* y aumentan sus requerimientos nutricionales en aminoácidos.

**Tabla IV.1.12** Media (Log UFC/ml o g), desviación estándar e intervalo (UFC/ml o g) de los recuentos de *B. subtilis* de leche y queso.

	BAM			Esporas		
	Media	d.s.	Min-Max.	Media	d.s.	Min-Max.
LC	6,52	0,33	1,3 10 <sup>6</sup> -7,7 10 <sup>6</sup>	2,56	0,95	20-1,310 <sup>4</sup>
LP	1,63	0,28	20-89	1,60	0,28	16-78
QC	4,56	0,78	2 10 <sup>3</sup> -2,4 10 <sup>5</sup>	2,23	0,40	30-5,1 10 <sup>2</sup>
QCP <sup>(1)</sup>	1,89	1,28	0-6,4 10 <sup>3</sup>	0,59	0,65	0-23
LI	5,62	0,22	2,3 10 <sup>5</sup> -6,7 10 <sup>5</sup>	5,31	0,14	1,5 10 <sup>5</sup> -3,2 10 <sup>5</sup>
QLI	6,47	0,23	2,5 10 <sup>5</sup> -7,7 10 <sup>6</sup>	5,59	0,12	2,5 10 <sup>5</sup> -6,6 10 <sup>5</sup>

<sup>(1)</sup>Media de los quesos control sometidos a todos los tratamientos realizados en las experiencias con *B. subtilis*.

Los tratamientos de presión aplicados estuvieron basados en las experiencias de Sojka y Ludwig (1994). Las combinaciones utilizadas son las de la Tabla IV.1.13 y las letalidad alcanzada la de la Tabla IV.1.14.

**Tabla IV.1.13** Tratamientos aplicados en queso *Mató* para conseguir la germinación de las esporas de *B. subtilis* y su posterior inactivación.

Tratamiento	Tratamiento de germinación	Tratamiento de inactivación
A	60 MPa / 210 min / 40°C	500 MPa / 15 min / 40°C
B	60 MPa / 210 min / 40°C	500 MPa / 15 min / 25°C
C	60 MPa / 210 min / 30°C	500 MPa / 15 min / 25°C
D	60 MPa / 210 min / 25°C	500 MPa / 15 min / 25°C

**Tabla IV.1.14** Letalidad conseguida en los tratamientos para la inactivación de esporas de *B. subtilis* en queso fresco. Promedio de los recuentos iniciales: BAM=6,47 Log UFC/g; Esporas de *B. subtilis* =5,59 Log UFC/g.

	BAM		Esporas de <i>B. subtilis</i>	
	Media	d. s.	Media	d.s.
A	6,11	0,10	4,90	0,09
B	4,33	0,78	4,51	0,52
C	4,00	0,13	3,04	0,17
D	3,40	0,15	2,69	0,19

De la Tabla IV.1.14 deducimos que, a mayor temperatura durante la primera etapa de tratamiento, mayor número de esporas germinadas, y, por lo tanto, se consiguió una mayor inactivación al aplicar el segundo tratamiento, lo que concuerda con el estudio de Sojka y Ludwig (1994). Asimismo, el aumento de temperatura durante el segundo tratamiento también aumentó la reducción de las BAM, coincidiendo con en nuestras experiencias anteriores. Sin embargo, el efecto negativo del tratamiento a 40°C sobre las características organolépticas del queso fue muy acentuado, por lo que se ensayaron las mismas combinaciones de presión y tiempo a temperaturas inferiores, que al tener menos efecto sobre la pérdida de agua, no incidieron tanto sobre la calidad final del producto.

Los únicos recuentos de esporas hallados en la bibliografía en un queso de características similares al *Mató* corresponden a *Bacillus* spp. en *Mozzarella* (Marino y col., 1995) y se encuentran entre  $1 \times 10^2$  y  $2,4 \times 10^3$  UFC/g. Los recuentos de los quesos control elaborados en este trabajo no superaron 2,5 Log UFC/g, por lo que el efecto del tratamiento de germinación e inactivación a 25°C sería suficiente para inactivar totalmente la población de esporas de un *Mató* elaborado en condiciones higiénicas y reduciría los recuentos del queso *Mozzarella* citado hasta prácticamente el límite de detección.

#### 1.4 Experiencias en quesos con nisina y no inoculados.

Para estimar el posible prolongación de la vida útil del *Mató* y como síntesis de las experiencias con microorganismos consideramos adecuado conocer el efecto de la alta presión por sí sola y combinada con nisina sobre la población de BAM propia del queso y su evolución en refrigeración. En la Tabla IV.1.15 se muestran los resultados de la experiencia realizada combinando nisina y alta presión aplicada en tratamientos cíclicos y continuos sobre la población de BAM del queso. Como ocurrió con la población de BAM de los quesos inoculados con *S. carnosus*, los recuentos finales conseguidos con la combinación de nisina y alta presión en los quesos sin inocular fueron inferiores a los alcanzados con el tratamiento de alta presión en experiencias comparables (Tabla IV.1.3 de *E. coli*), debido al efecto de la nisina sobre la población de esporas, que no se inactivaron con los tratamientos únicamente de alta presión. Como puede observarse, aunque se aumentara el número de ciclos, siempre existía una fracción de microorganismos supervivientes, resistentes a la combinación de los dos tratamientos.

**Tabla IV.1.15** Media (Log UFC/ml o g), desviación estándar e intervalo (UFC/g) de BAM del *Mató* con 8 mg/kg de nisina (N) sometido a distintos tratamientos de alta presión a 25°C.

	Media	d.s.	Min-Max.
LC	4,95	0,43	$3,5 \cdot 10^4 - 2,27 \cdot 10^5$
LP	1,74	0,32	$27 - 1,05 \cdot 10^2$
LP+N*	1,02	0,05	9-12
QC	3,42	0,57	$6 \cdot 10^2 - 1,1 \cdot 10^4$
QC+N	2,57	0,11	$2,7 \cdot 10^2 - 5,8 \cdot 10^2$
400 MPa/5 min/N	2,35	0,7	$43 - 1,1 \cdot 10^3$
500 MPa/5 min/N	1,82	0,49	$28 - 2,4 \cdot 10^2$
500 MPa/5 min x 2/N	1,48	0,14	23 -43
500 MPa/5 min x 3/N	1,60	0,52	21-93

(\*)1,56 mg/l

Una vez evaluados los tratamientos que tenían menor efecto sobre las características sensoriales del queso, se realizó una experiencia con una dosis de nisina de 7,1 ppm. En la Tabla IV.1.16 se exponen los recuentos de BAM y esporas al día siguiente del tratamiento y en las Figuras IV.1.7 y IV.1.8 su evolución en refrigeración durante 4 meses. Los recuentos de BAM de los quesos sometidos a tratamientos combinados fueron inferiores a los de los quesos en los que sólo se

utilizó nisina o alta presión. Fueron debidos: por una parte, a una mayor inactivación de la población de esporas, debida a su vez únicamente al efecto de la nisina, puesto que cuando se añadía nisina al queso control la disminución de esporas era comparable a la de los tratamientos combinados; por otra parte, el tratamiento combinado también causó una mayor letalidad sobre una fracción de la población de BAM. Como ya se ha comentado, la alta presión provoca que células inicialmente resistentes a la nisina se sensibilicen a ella y de este hecho se deriva el efecto aditivo de los dos tratamientos.

A efectos de vida útil, en esta experiencia se consideró que el queso está alterado cuando se alcanzan 6 Log UFC/g. La nisina utilizada sin combinar con alta presión retrasó la alteración del queso control, pero a los 40 días aproximadamente ya se alcanzaban las 6 unidades logarítmicas. El tratamiento de alta presión por sí solo era más efectivo que la nisina pues conseguía retrasar el crecimiento hasta el nivel de alteración a los 70 días aproximadamente con el tratamiento de 5 min y hasta los 90 con el de 30 min.

Si comparamos la evolución de la población de BAM de los quesos de esta experiencia respecto a la de la experiencia con *Escherichia coli*, se observa que en el primer caso, los recuentos de BAM de los quesos tratados a 500 MPa/25°C/5 y 30 min aumentaron a lo largo de la conservación, mientras que en los quesos inoculados con *E. coli* (Figura IV.1.1), la población de BAM se mantuvo sin evolucionar durante los dos meses de conservación. Una vez más, hallamos resultados distintos después de aplicar tratamientos comparables. Las diferencias entre poblaciones iniciales de microorganismos de la leche y el queso y en suma, la variabilidad a la que está sujeta la producción de queso, ya sea controlada, artesanal o industrial explicarían las diferencias entre distintas experiencias.

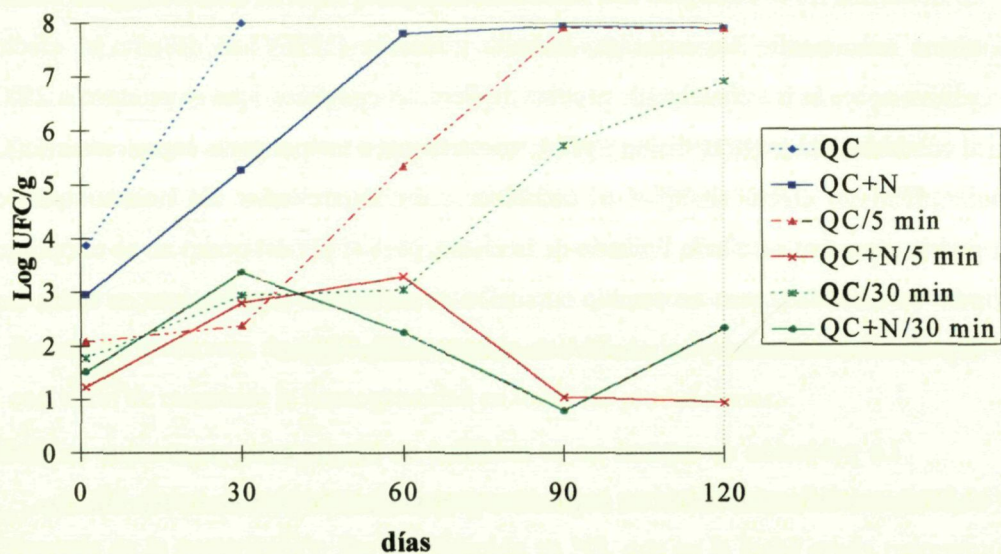
El tratamiento combinado de nisina y alta presión es el que más alargó la vida del queso. El aumento de los recuentos que se produjo a los 30 y 60 días en los tratamientos de 5 y 30 min no tiene una explicación clara, puesto que después se observó su disminución.

**Tabla IV.1.16** Media (Log UFC/ml o g), desviación estándar e intervalo (UFC/ml o g) de BAM y esporas del *Mató* con 7,1 mg/kg de nisina (N) sometido a distintos tratamientos de alta presión a 25°C.

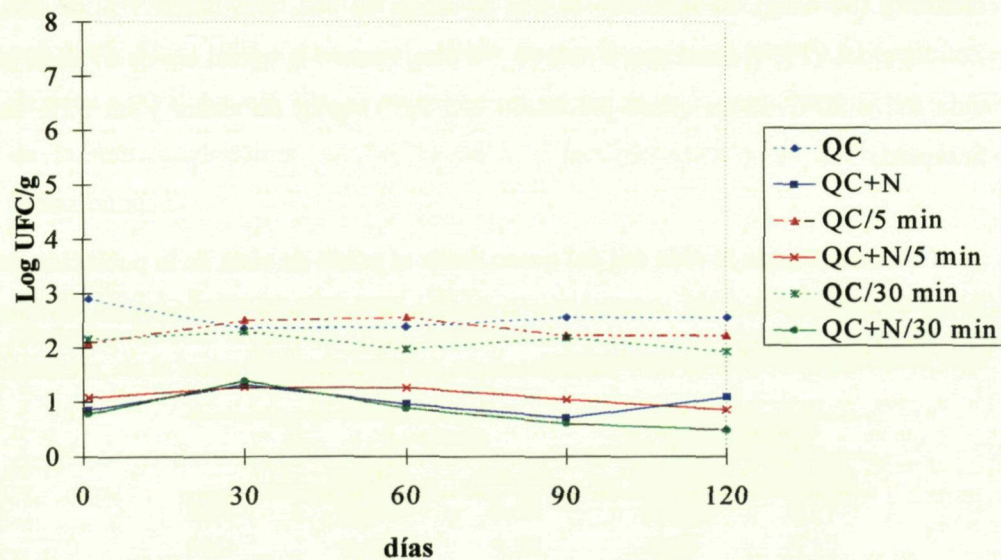
	BAM			Esporas		
	Media	d.s.	Min-Max.	Media	d.s.	Min-Max.
LP	1,54	0,03	33-36	1,48	0,105	28-33
LP+N*	0,91	0,18	6-11	0	0	0
QC	3,86	0,13	5,5 10 <sup>3</sup> -9,6 10 <sup>3</sup>	1,43	1,6	4,8 10 <sup>2</sup> -1 10 <sup>3</sup>
QC+N	2,85	0,37	3 10 <sup>2</sup> -1,4 10 <sup>3</sup>	0,85	0	7
500 MPa/5 min/N	1,22	0,11	1,4 10 <sup>1</sup> -2 10 <sup>1</sup>	0,90	0,60	3-21
500 MPa/5 min	1,97	0	9,3 10 <sup>1</sup>	2,07	0,15	93-1,5 10 <sup>2</sup>
500 MPa/30 min/N	1,48	0,22	2 10 <sup>1</sup> -4,3 10 <sup>1</sup>	0,72	0,34	3-9
500 MPa/30 min	1,75	0,17	4,3 10 <sup>1</sup> -7,5 10 <sup>1</sup>	2,01	0,53	43-2,4 10 <sup>2</sup>

(\*) 1,56 mg/l

**Figura IV.1.7** Recuentos de la población de BAM del queso *Mató* con nisina (N=7,1 mg/kg) tratado a 500 MPa/10°C durante la conservación a 4° C.



**Figura IV.1.8** Recuentos de la población de esporas del queso *Mató* con nisina (N=7,1 mg/kg) tratado a 500 MPa/10°C durante la conservación a 4° C.



La nisina tuvo un efecto claro sobre la concentración de esporas del queso independientemente del tratamiento de alta presión. Aplicando los dos tratamientos en combinación no se consiguió una reducción de esporas superior a la conseguida con la nisina únicamente. Sin embargo, Roberts y Hoover (1996) han descrito el efecto aditivo sobre la inactivación de esporas de *Bacillus coagulans* que se produce a 25°C al combinar alta presión, nisina y pH 4, mientras que a temperaturas superiores a 45°C describen un efecto sinérgico al combinar estos tratamientos. En nuestro trabajo podría esperarse un efecto limitado de la nisina, pues el pH del queso no es el óptimo para su actividad, pero en cambio su acción se manifestó rápidamente en todas las experiencias realizadas y se mantuvo durante la conservación.

La población de esporas no se modificó en ningún caso, puesto que en estas condiciones de conservación no se produce germinación de las formas esporuladas.

En un trabajo anónimo, citado por Delves-Broughton (1990), se estudia la conservación a 7°C de un postre lácteo con chocolate al que se añaden 1,25 mg de nisina/kg (50 UI/g). El resultado es que se alarga su vida útil, desde 7 a 20 días. Zottola y col. (1994) aumentan a más de 90 días, cuando la inicial era de 67 días, la vida útil a 22°C de un queso procesado con 9,67 mg/kg de nisina y un 52% de humedad.

Considerando la vida útil del queso desde el punto de vista de la población de BAM vemos que con los tratamientos aplicados se mejoraba notablemente, lo que abre muchas posibilidades comerciales.

## 2. ASPECTOS FISICO-QUIMICOS.

### 2.1 Composición de la leche y los quesos.

En la Tabla IV.2.1 se muestra el contenido en extracto seco total, materia grasa, nitrógeno total y nitrógeno soluble a pH 4,6 de la leche cruda y pasteurizada utilizadas en la elaboración del *Mató*. Los valores de MG de la leche cruda son comparables a los valores mínimos presentados en la Tabla IV.2.2, que recoge los valores de composición reflejados en otros estudios. En nuestro caso, pueden explicarse por la alimentación de mantenimiento que estuvieron recibiendo las cabras durante la primavera de 1997. El contenido en MG de la leche se estandarizó al 4% con el fin de mantener la homogeneidad en todas las producciones.

El único componente que presentó una variación significativa ( $p < 0,05$ ) después de la pasteurización fue el contenido en NS, que en la leche cruda representó un 27,44% del NT y en la pasteurizada un 14,35%. Esta disminución se debe a que el tratamiento térmico provoca desnaturalización de las proteínas séricas e interacción de la  $\beta$ -lactoglobulina con la  $\kappa$ -caseína mediante puentes disulfuro (Lucey y col., 1993; Sing, 1993 y Law y col., 1994). Según Banks y col. (1993), al tratar leche de vaca a 90°C durante 30 s se desnaturaliza un 99,7% de la seroalbúmina, un 97,4% de la inmunoglobulina, un 50,2% de la  $\beta$ -lactoglobulina y un 2,4% de la  $\alpha$ -lactoalbúmina.

**Tabla IV.2.1.** Extracto seco total (EST), materia grasa (MG), nitrógeno total (NT), nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS), expresados en tanto por ciento en peso en base húmeda, de la leche utilizada para las producciones P1 a P6.

	L. cruda		L. pasteurizada*	
	media	des.est.	media	des.est.
<b>EST</b>	<b>13,24</b>	0,34	<b>13,05</b>	0,57
<b>MG</b>	<b>4,41</b>	0,29	<b>4,05</b>	0,12
<b>NT</b>	<b>0,557</b>	0,033	<b>0,537</b>	0,036
<b>NS</b>	<b>0,153</b>	0,014	<b>0,077</b>	0,011

\* 90 ± 2°C, 2 min.

Montilla y col. (1995) han estudiado la desnaturalización inducida por calor en proteínas séricas de leche de cabra y vaca y destacan una desnaturalización



significativamente más alta en leche de cabra que de vaca. En leche de cabra, con un tratamiento a 80°C durante 5 min se desnaturaliza más del 60% de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y más del 95% de la  $\beta$ -lactoglobulina. También se ha descrito la incorporación de proteínas séricas a la membrana del glóbulo graso como consecuencia del tratamiento térmico (Corredig y Dalgleish, 1996).

**Tabla IV.2.2.** Composición (% en base húmeda) de leche de cabra según datos bibliográficos (razas: M=Murciana; G=Granadina; M-G: Murciana-Granadina).

	M <sup>1</sup>	G <sup>1</sup>	M-G <sup>2</sup>	M-G <sup>3</sup>	M-G <sup>4</sup>	M-G <sup>5</sup>
EST	15,67	13,23	12,53-12,02	13,57	-	-
MG	6,57	4,53	4-4,6	4,9	4,25-6,30	5,38
NT	0,565	0,544	0,512-0,501	0,579	0,54-0,65	0,54
NS	0,127	0,119	0,113-0,083	0,166	-	-

<sup>1</sup>Martín-Hernández y col.(1988a); <sup>2</sup>Martín-Hernández y col. (1988b); <sup>3</sup>Carretero (1991); <sup>4</sup>Luna y col. (1995); <sup>5</sup>Analla y col.(1996).

En la Tabla IV.2.3 se detalla la composición de los quesos no tratados elaborados en las producciones P1 a P6. Podemos comparar estos datos con los de otros quesos frescos, incluyendo algún queso de oveja, presentados en la Tabla I.4. Los datos acerca de la composición de otros quesos *Mató* son insuficientes pues sólo disponemos de una referencia (Canut y Navarro, 1980) que a su vez corresponde al análisis de una sola muestra de queso. El EST del *Mató* elaborado en el presente estudio fue el más bajo de todos los quesos frescos, exceptuando el del queso de Burgos, que presenta valores comprendidos entre el 15 y el 46%. Por un lado, esto es debido a la incorporación de proteínas séricas desnaturalizadas a la cuajada, lo que aumentó la capacidad de retención de agua y, por tanto, la humedad del queso (Imafidon y Farkye, 1993; Banks y col., 1993, 1994; Jameson y Lelievre, 1996) y por otro lado, debe tenerse en cuenta que el prensado al que fue sometido el queso en este trabajo es muy suave. La incorporación de proteínas séricas a la cuajada también debería traducirse en un aumento de la cantidad de proteína del queso aunque la relación NT/EST (5,6%) del *Mató* de este trabajo fue comparable a las del resto de los quesos referenciados (entre 4,1 y 6,4%). Los valores del porcentaje de NS respecto al NT (NS/NT) fueron inferiores a todos los de los quesos de la Tabla I.4, incluidos los valores del *Mató* referenciados por Canut y Navarro (1980), que son extrañamente elevados y no estamos en condiciones de justificar. La diferencia entre nuestros

valores de NS/NT y los de otros quesos frescos se explica por la menor cantidad de NS presente en la leche utilizada en la elaboración del *Mató*.

**Tabla IV.2.3** Composición (% en base húmeda) y pH de los quesos control elaborados en las producciones P1 a P6.

%	Media	Desv. est.	Coef. var.	Max.	Min.
EST	32,960	0,936	2,840	35,467	31,668
CEN	1,491	0,070	4,675	1,640	1,385
MG	16,396	0,579	3,529	17,50	15,50
NT	1,847	0,038	2,036	1,897	1,787
NS	0,091	0,007	7,152	0,099	0,075
NNP	0,058	0,004	7,274	0,065	0,051
NS/NT*	4,949	0,408	8,243	5,392	3,995
NNP/NT*	3,117	0,248	7,946	3,630	2,745
PH	6,61	0,062	0,934	6,68	6,5

\*% respecto al contenido en NT

## 2.2 Efecto de la alta presión sobre la composición del *Mató*.

Los quesos tratados por alta presión liberaron una mayor cantidad de suero que los quesos no tratados. Macroscópicamente también se observó que el suero contenía partículas en suspensión en mayor cantidad y de mayor tamaño que las del suero de los quesos controles. Estas observaciones nos llevaron a cuantificar el desuerado (apartado IV.2.3) y a analizar la composición del suero que quedaba retenido en el envase; por este motivo, se exponen por separado los resultados obtenidos para el queso y para el suero liberado.

Existen diferencias significativas entre producciones a las que se efectuó un mismo tratamiento, por lo que señalamos las diferencias existentes dentro de una misma producción. Estas diferencias no sólo se han detectado a nivel de composición, sino que los resultados de las pruebas preliminares de textura y microestructura ya nos indicaron la existencia de una gran variabilidad, no sólo entre quesos de distintas producciones, sino también dentro de una misma producción. Cabe señalar que al llevar el proceso de fabricación y tratamiento a escala industrial es muy probable que estas diferencias persistan. Según Lawrence y col. (1984), que analizaron la composición de un elevado número de muestras de queso *Cheddar* procedente de fabricación industrial, los intervalos de composición son relativamente grandes y no

es posible obtener una fabricación de queso completamente uniforme. Aún así, se decidió elaborar el queso con una mayor intensidad de prensado ( $0,4 \text{ kg/cm}^2$ ) con el fin de disminuir la variabilidad entre y dentro de las producciones destinadas a evaluar los efectos de la alta presión sobre las características físico-químicas y sensoriales del queso.

A la hora de evaluar los resultados de composición se han tomado como válidas las diferencias o tendencias que se repitieron a lo largo de todas las producciones, pues aunque el análisis estadístico detectó diferencias significativas debidas al tratamiento de alta presión, en muchos casos las diferencias entre las muestras presurizadas y las control fueron superadas por las diferencias entre los quesos control de las seis producciones. Esta visión global se refleja en la Tabla IV.2.4.

**Tabla IV.2.4.** Comportamiento respecto al control de los parámetros de composición analizados en las muestras procedentes de queso presurizado y el suero liberado.

QUESO	NT	NS	NNP	CEN	MG	EST
P1			↓			
P2		↓	↓	↑		
P3	↓	↑	↓			
P4	↓		↓	↓		
P5						
P6			↓	↓		
<b>SUERO</b>						
P1	↑	↓		↑		↑
P2	↑	↓		↑		↑
P3	↑	↓		↑		↑
P4	↑	↓		↑		↑
P5	↑	↓				↑
P6	↑					↑

↑: mayor en queso presurizado que en control; ↓: menor en queso presurizado que en control.

En las Tablas IV.2.5, IV.2.6 y IV.2.7 se detallan los valores de los componentes analizados en el queso. Como consecuencia de la presurización, el componente que se mostró más constante fue el NNP, puesto que su contenido disminuyó en todas las producciones, excepto en la P5, producción que en ningún

caso presentó diferencias significativas entre quesos control y tratados. La disminución del contenido en NNP no se tradujo en una disminución del contenido en NT. Los componentes EST y MG no cambiaron en ninguno de los tratamientos efectuados en las seis producciones, y el resto de componentes mostró distintos comportamientos dependiendo de la producción.

La composición del suero liberado, detallada en las Tablas IV.2.8, IV.2.9 y IV.2.10, nos aportó más información. Se observa un comportamiento más homogéneo de la mayoría de los componentes en todas las producciones. Los valores de EST y NT fueron significativamente mayores en el suero de los quesos tratados que en el de los controles. Este aumento se explica por el paso de sustancias nitrogenadas del queso al suero, aunque en el queso no se observó disminución alguna del contenido en NT ni de EST. Además, el aumento en la cantidad de NT que se observó en el suero fue muy reducido si se lo compara con los valores de NT del queso. Esto tampoco representó un cambio suficiente como para que se detectara en los valores de EST del queso. Por otro lado, como ya hemos mencionado, el queso presurizado perdió más suero que el control de modo que se compensa la pérdida de materia seca con la pérdida de humedad.

El NS del suero de los quesos tratados fue significativamente inferior al del suero del queso control. El NNP no sufrió variaciones. El componente CEN aumentó respecto al control en el suero de los quesos tratados a 10 y 25°C en tratamiento continuo.

En las Tablas IV.2.11 y IV.2.12 se expresan las fracciones nitrogenadas del queso y el suero en porcentaje respecto a la cantidad de NT. Los valores de NNP/NT de los quesos presurizados disminuyeron respecto a los de los quesos control. En el suero de los quesos presurizados, la disminución del índice NS/NT se debe a la disminución del NS y al aumento del NT. La disminución del índice NNP/NT se explica exclusivamente por el aumento del NT.

Messens y col. (1997) han estudiado el efecto del salado por alta presión en cuajadas de *Gouda*, a 300 MPa/50 min. El efecto del tratamiento sobre la composición se traduce en un mayor contenido en agua en los quesos presurizados,

sobretudo después de 14 días de maduración. La composición de los quesos en base seca es similar en controles y presurizados; la fase acuosa de los quesos presurizados presenta un contenido en EST y NT mayor que la de los quesos controles. El aumento en el contenido en NT se debe tanto al aumento en nitrógeno proteico como en nitrógeno no proteico. Los autores del trabajo, a partir de los resultados obtenidos por SDS-PAGE y FPLC sugieren que el mayor contenido en NT del suero puede ser resultado de una disrupción de la red de paracaseína causada por el tratamiento de alta presión, que comporta una mayor cantidad de proteínas y péptidos en el suero. Han observado también que los niveles de calcio y fósforo de la fase acuosa no se ven influidos por el tratamiento de alta presión, es decir, la disrupción de la red de paracaseína no va acompañada de un aumento de los niveles de fosfato cálcico en la fase acuosa.

La disrupción de la red de paracaseína causada por la alta presión explicaría también en nuestro caso el aumento del contenido en NT del suero de los quesos tratados. Pero en nuestro caso se observó además una disminución del contenido en NS del suero y, al contrario que Messens y col. (1997), no se observaron cambios claros en el contenido en NNP del suero, aunque se apreció una disminución del NNP del queso. La mayor presión utilizada en nuestro trabajo pudo causar la agregación de proteínas séricas y péptidos que no se hallaban formando parte de la red proteica, junto con los que se hubieran separado de la red de paracaseína, lo que explicaría el aumento del número y el tamaño de las partículas macroscópicas presentes en el suero presurizado, y también la disminución de NS del suero y del NNP del queso.

El NS del queso no experimentó variaciones debido a que ya se encontraba formando parte de agregados  $\beta$ -lg- $\kappa$ -cas y  $\beta$ -lg- $\beta$ -lg que habían quedado incorporados en la red de paracaseína.

**Tabla IV.2.5** Composición (en % en base húmeda) de los quesos de las producciones P1 y P2. Los quesos fueron tratados a 500 MPa/10°C. Los valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de los controles están subrayados.

queso P1		EST	CEN	NT	NS	NNP	MG
<b>control</b>	media	<b>33,686</b>	<b>1,567</b>	<b>1,880</b>	<b>0,084</b>	<b>0,062</b>	<b>16,000</b>
	desv.est.	0,906	0,020	0,019	0,008	0,003	0,000
	coef.var.	2,690	1,275	1,037	9,081	4,138	0,000
<b>5 min</b>	media	<b>32,750</b>	<b>1,523</b>	<b>1,826</b>	<b>0,090</b>	<u><b>0,052</b></u>	<b>16,750</b>
	desv.est.	1,639	0,051	0,080	0,001	0,004	0,354
	coef.var.	5,003	3,378	4,368	0,684	7,162	2,111
<b>15 min</b>	media	<b>32,301</b>	<b>1,479</b>	<b>1,741</b>	<b>0,092</b>	<u><b>0,053</b></u>	<b>16,750</b>
	desv.est.	0,565	0,041	0,041	0,013	0,001	0,354
	coef.var.	1,749	2,752	2,343	13,926	1,838	2,111
<b>30 min</b>	media	<b>33,834</b>	<b>1,495</b>	<b>1,941</b>	<b>0,094</b>	<u><b>0,054</b></u>	<b>17,000</b>
	desv.est.	0,609	0,010	0,105	0,000	0,002	0,707
	coef.var.	1,800	0,652	5,424	0,239	4,043	4,159

queso P2		EST	CEN	NT	NS	NNP	MG
<b>control</b>	media	<b>32,444</b>	<b>1,435</b>	<b>1,824</b>	<b>0,097</b>	<b>0,056</b>	<b>17,250</b>
	desv.est.	0,878	0,038	0,030	0,001	0,003	0,354
	coef.var.	2,707	2,641	1,658	0,895	5,731	2,050
<b>5 min</b>	media	<b>34,283</b>	<u><b>1,550</b></u>	<u><b>1,965</b></u>	<u><b>0,087</b></u>	<b>0,051</b>	<b>17,250</b>
	desv.est.	1,029	0,056	0,048	0,003	0,001	0,354
	coef.var.	3,002	3,597	2,449	3,408	1,689	2,050
<b>15 min</b>	media	<b>33,220</b>	<u><b>1,612</b></u>	<u><b>1,964</b></u>	<u><b>0,089</b></u>	<b>0,051</b>	<b>17,000</b>
	desv.est.	0,180	0,064	0,077	0,001	0,002	0,000
	coef.var.	0,542	3,946	3,945	1,515	4,771	0,000
<b>30 min</b>	media	<b>32,826</b>	<u><b>1,733</b></u>	<b>1,840</b>	<u><b>0,087</b></u>	<u><b>0,049</b></u>	<b>16,000</b>
	desv.est.	0,751	0,030	0,008	0,004	0,001	0,000
	coef.var.	2,287	1,749	0,443	4,857	1,434	0,000

**Tabla IV.2.6** Composición (en % en base húmeda) de los quesos de las producciones P3 y P4. Los quesos fueron tratados a 500 MPa/25°C. Los valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de los controles están subrayados.

queso P3		EST	CEN	NT	NS	NNP	MG
control	media	<b>32,258</b>	<b>1,445</b>	<b>1,840</b>	<b>0,098</b>	<b>0,058</b>	<b>16,000</b>
	desv.est.	0,412	0,060	0,015	0,001	0,002	0,000
	coef.var.	1,276	4,122	0,797	0,803	4,023	0,000
5 min	media	<b>32,243</b>	<b>1,554</b>	<b>1,824</b>	<b>0,093</b>	<u><b>0,052</b></u>	<b>16,500</b>
	desv.est.	0,728	0,287	0,023	0,003	0,003	0,707
	coef.var.	2,257	18,495	1,279	3,460	6,541	4,285
15 min	media	<b>33,404</b>	<b>1,538</b>	<b>1,821</b>	<b>0,099</b>	<u><b>0,050</b></u>	<b>16,750</b>
	desv.est.	1,147	0,103	0,027	0,004	0,000	0,354
	coef.var.	3,432	6,690	1,498	4,283	0,417	2,111
30 min	media	<b>33,195</b>	<b>1,430</b>	<u><b>1,707</b></u>	<u><b>0,133</b></u>	<u><b>0,049</b></u>	<b>15,500</b>
	desv.est.	1,066	0,040	0,028	0,001	0,003	0,000
	coef.var.	3,213	2,830	1,632	0,908	5,321	0,000

queso P4		EST	CEN	NT	NS	NNP	MG
control	media	<b>32,979</b>	<b>1,452</b>	<b>1,877</b>	<b>0,083</b>	<b>0,057</b>	<b>16,625</b>
	desv.est.	0,594	0,013	0,009	0,000	0,003	0,177
	coef.var.	1,801	0,892	0,461	0,138	4,690	1,063
5 min	media	<b>32,866</b>	<b>1,454</b>	<b>1,818</b>	<b>0,083</b>	<b>0,053</b>	<b>15,875</b>
	desv.est.	0,865	0,018	0,081	0,001	0,004	0,530
	coef.var.	2,633	1,235	4,444	1,737	8,319	3,341
15 min	media	<b>32,042</b>	<u><b>1,425</b></u>	<b>1,852</b>	<b>0,082</b>	<u><b>0,047</b></u>	<b>16,000</b>
	desv.est.	0,646	0,006	0,035	0,002	0,002	0,707
	coef.var.	2,016	0,411	1,892	2,911	3,532	4,419
30 min	media	<b>31,291</b>	<u><b>1,393</b></u>	<u><b>1,719</b></u>	<b>0,084</b>	<u><b>0,046</b></u>	<b>15,750</b>
	desv.est.	1,083	0,005	0,022	0,001	0,001	0,354
	coef.var.	3,463	0,324	1,283	1,785	1,114	2,245

**Tabla IV.2.7** Composición en (% en base húmeda) de los quesos de las producciones P5 y P6. Los quesos fueron tratados a 500 MPa/25°C. Los valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de los controles están subrayados.

queso P5		EST	CEN	NT	NS	NNP	MG
<b>control</b>	media	<b>33,673</b>	<b>1,571</b>	<b>1,870</b>	<b>0,093</b>	<b>0,052</b>	<b>15,750</b>
	desv.est.	1,554	0,070	0,025	0,000	0,000	0,354
	coef.var.	4,613	4,426	1,355	0,481	0,548	2,245
<b>5 min</b>	media	<b>33,654</b>	<b>1,577</b>	<b>1,919</b>	<b>0,095</b>	<b>0,047</b>	<b>16,250</b>
	desv.est.	0,637	0,055	0,028	0,001	0,005	0,354
	coef.var.	1,893	3,499	1,455	1,521	11,113	2,176
<b>3x5 min</b>	media	<b>33,519</b>	<b>1,551</b>	<b>1,889</b>	<b>0,094</b>	<b>0,051</b>	<b>16,250</b>
	desv.est.	0,910	0,038	0,086	0,002	0,001	0,354
	coef.var.	2,713	2,482	4,577	1,678	2,325	2,176
<b>6x5 min</b>	media	<b>33,646</b>	<b>1,563</b>	<b>1,952</b>	<b>0,093</b>	<b>0,051</b>	<b>16,000</b>
	desv.est.	0,476	0,020	0,088	0,001	0,002	0,000
	coef.var.	1,414	1,259	4,490	1,035	4,172	0,000

queso P6		EST	CEN	NT	NS	NNP	MG
<b>control</b>	media	<b>32,722</b>	<b>1,478</b>	<b>1,789</b>	<b>0,092</b>	<b>0,061</b>	<b>16,750</b>
	desv.est.	0,377	0,048	0,003	0,001	0,004	0,354
	coef.var.	1,152	3,216	0,159	0,831	6,692	2,111
<b>5 min</b>	media	<u><b>31,958</b></u>	<u><b>1,391</b></u>	<b>1,805</b>	<b>0,090</b>	<u><b>0,052</b></u>	<b>16,000</b>
	desv.est.	0,276	0,029	0,215	0,004	0,001	0,707
	coef.var.	0,865	2,049	11,890	4,053	0,967	4,419
<b>3x5 min</b>	media	<b>32,865</b>	<u><b>1,376</b></u>	<b>1,735</b>	<b>0,087</b>	<u><b>0,040</b></u>	<b>16,250</b>
	desv.est.	0,076	0,041	0,136	0,000	0,002	0,354
	coef.var.	0,233	2,991	7,837	0,500	4,794	2,176
<b>6x5 min</b>	media	<b>32,950</b>	<u><b>1,377</b></u>	<b>1,952</b>	<b>0,084</b>	<u><b>0,037</b></u>	-
	desv.est.	0,317	0,015	0,115	0,003	0,003	-
	coef.var.	0,961	1,075	5,896	3,586	7,605	-



**Tabla IV.2.8** Composición en (% en base húmeda) del suero de los quesos de las producciones P1 y P2. Los quesos fueron tratados a 500 MPa/10°C. Los valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de los controles están subrayados.

suero P1		EST	CEN	NT	NS	NNP
<b>control</b>	media	<b>6,928</b>	<b>0,579</b>	<b>0,222</b>	<b>0,143</b>	<b>0,074</b>
	desv.est.	0,024	0,015	0,005	0,003	0,003
	coef.var.	0,349	2,631	2,211	1,773	3,376
<b>5 min</b>	media	<u>7,427</u>	<u>0,649</u>	<u>0,296</u>	<u>0,133</u>	<b>0,073</b>
	desv.est.	0,032	0,013	0,002	0,002	0,001
	coef.var.	0,433	1,987	0,704	1,388	1,296
<b>15 min</b>	media	<u>7,586</u>	<u>0,630</u>	<u>0,313</u>	<u>0,137</u>	<b>0,074</b>
	desv.est.	0,064	0,013	0,002	0,001	0,001
	coef.var.	0,839	2,081	0,505	0,762	1,575
<b>30 min</b>	media	<u>7,778</u>	<u>0,718</u>	<u>0,326</u>	<b>0,139</b>	<b>0,076</b>
	desv.est.	0,030	0,030	0,009	0,001	0,005
	coef.var.	0,384	4,245	2,649	0,753	6,820

suero P2		EST	CEN	NT	NS	NNP
<b>control</b>	media	<b>6,971</b>	<b>0,621</b>	<b>0,257</b>	<b>0,121</b>	<b>0,057</b>
	desv.est.	0,137	0,010	0,008	0,000	0,003
	coef.var.	1,970	1,552	3,119	0,377	4,446
<b>5 min</b>	media	<u>6,624</u>	<b>0,613</b>	<u>0,307</u>	<u>0,111</u>	<b>0,042</b>
	desv.est.	0,023	0,022	0,001	0,000	0,000
	coef.var.	0,347	3,671	0,396	0,172	0,716
<b>15 min</b>	media	<b>7,213</b>	<u>0,664</u>	<u>0,319</u>	<u>0,108</u>	<b>0,052</b>
	desv.est.	0,193	0,018	0,002	0,001	0,002
	coef.var.	2,671	2,771	0,675	1,119	3,182
<b>30 min</b>	media	<u>7,417</u>	<u>0,712</u>	<u>0,343</u>	<u>0,107</u>	<u>0,064</u>
	desv.est.	0,154	0,010	0,011	0,000	0,002
	coef.var.	2,072	1,370	3,296	0,005	3,009

**Tabla IV.2.9** Composición (en % en base húmeda) del suero de los quesos de las producciones P3 y P4. Los quesos fueron tratados a 500 MPa/25° C. Los valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de los controles están subrayados.

<b>suero P3</b>		<b>EST</b>	<b>CEN</b>	<b>NT</b>	<b>NS</b>	<b>NNP</b>
<b>control</b>	media	<b>7,438</b>	<b>0,560</b>	<b>0,243</b>	<b>0,144</b>	<b>0,067</b>
	desv.est.	0,078	0,040	0,004	0,002	0,001
	coef.var.	1,044	7,221	1,620	1,153	1,515
<b>5 min</b>	media	<b><u>8,491</u></b>	<b><u>0,653</u></b>	<b><u>0,310</u></b>	<b><u>0,126</u></b>	<b><u>0,063</u></b>
	desv.est.	0,614	0,014	0,021	0,010	0,000
	coef.var.	7,229	2,100	6,706	7,669	0,650
<b>15 min</b>	media	<b>8,148</b>	<b>0,631</b>	<b><u>0,330</u></b>	<b><u>0,134</u></b>	<b><u>0,063</u></b>
	desv.est.	0,054	0,033	0,010	0,002	0,000
	coef.var.	0,657	5,200	3,145	1,752	0,480
<b>30 min</b>	media	<b><u>8,353</u></b>	<b>0,579</b>	<b>0,355</b>	<b>0,142</b>	<b><u>0,069</u></b>
	desv.est.	0,122	0,038	0,007	0,001	0,000
	coef.var.	1,458	6,577	2,074	0,500	0,716

<b>suero P4</b>		<b>EST</b>	<b>CEN</b>	<b>NT</b>	<b>NS</b>	<b>NNP</b>
<b>control</b>	media	<b>7,053</b>	<b>0,559</b>	<b>0,189</b>	<b>0,116</b>	<b>0,064</b>
	desv.est.	0,016	0,031	0,001	0,001	0,003
	coef.var.	0,227	5,513	0,575	1,268	4,449
<b>5 min</b>	media	<b><u>7,377</u></b>	<b><u>0,609</u></b>	<b><u>0,236</u></b>	<b><u>0,111</u></b>	<b>0,065</b>
	desv.est.	0,046	0,017	0,004	0,001	0,003
	coef.var.	0,622	2,861	1,803	0,811	4,861
<b>15 min</b>	media	<b><u>7,692</u></b>	<b><u>0,601</u></b>	<b><u>0,279</u></b>	<b><u>0,112</u></b>	<b>0,066</b>
	desv.est.	0,027	0,005	0,005	0,001	0,002
	coef.var.	0,353	0,867	1,837	1,270	2,988
<b>30 min</b>	media	<b><u>7,885</u></b>	<b>0,591</b>	<b><u>0,317</u></b>	<b>0,114</b>	<b>0,063</b>
	desv.est.	0,050	0,006	0,003	0,002	0,001
	coef.var.	0,638	0,993	0,799	1,375	2,360

**Tabla IV.2.10** Composición (en % en base húmeda) del suero de los quesos de las producciones P5 y P6. Los quesos fueron tratados a 500 MPa/25° C. Los valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de los controles están subrayados.

suero P5		EST	CEN	NT	NS	NNP
<b>control</b>	media	<b>6,893</b>	<b>0,505</b>	<b>0,235</b>	<b>0,136</b>	<b>0,069</b>
	desv.est.	0,117	0,052	0,009	0,001	0,002
	coef.var.	1,693	10,210	3,658	1,020	3,145
<b>5 min</b>	media	<u><b>7,434</b></u>	<b>0,568</b>	<u><b>0,293</b></u>	<u><b>0,130</b></u>	<b>0,067</b>
	desv.est.	0,222	0,035	0,003	0,002	0,004
	coef.var.	2,983	6,089	0,919	1,156	5,656
<b>3x5 min</b>	media	<u><b>7,542</b></u>	<b>0,574</b>	<u><b>0,303</b></u>	<u><b>0,130</b></u>	<b>0,065</b>
	desv.est.	0,066	0,034	0,003	0,002	0,003
	coef.var.	0,869	5,911	1,102	1,519	4,195
<b>6x5 min</b>	media	<u><b>8,100</b></u>	<b>0,603</b>	<u><b>0,375</b></u>	<b>0,133</b>	<b>0,067</b>
	desv.est.	0,253	0,053	0,015	0,002	0,002
	coef.var.	3,123	8,872	4,022	1,733	3,551

suero P6		EST	CEN	NT	NS	NNP
<b>control</b>	media	<b>6,917</b>	<b>0,578</b>	<b>0,184</b>	<b>0,123</b>	<b>0,069</b>
	desv.est.	0,298	0,052	0,001	0,004	0,002
	coef.var.	4,303	8,952	0,504	3,251	2,544
<b>5 min</b>	media	<u><b>7,575</b></u>	<b>0,567</b>	<u><b>0,318</b></u>	<u><b>0,140</b></u>	<b>0,074</b>
	desv.est.	0,095	0,007	0,011	0,001	0,004
	coef.var.	1,258	1,198	3,358	0,747	5,494
<b>3x5 min</b>	media	<u><b>7,735</b></u>	<b>0,595</b>	<u><b>0,318</b></u>	<b>0,122</b>	<u><b>0,090</b></u>
	desv.est.	0,040	0,025	0,003	0,001	0,001
	coef.var.	0,516	4,251	0,899	0,732	1,090
<b>6x5 min</b>	media	<u><b>7,461</b></u>	<b>0,631</b>	<u><b>0,285</b></u>	<b>0,121</b>	<b>0,070</b>
	desv.est.	0,141	0,023	0,009	0,003	0,004
	coef.var.	1,885	3,682	3,134	2,137	6,340

Tabla IV.2.11 Índices de fracciones nitrogenadas (% respecto al contenido en NT) de los quesos de las producciones P1 a P6. Subrayadas las medias que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) de los controles.

P1	NS/NT	NNP/NT	P2	NS/NT	NNP/NT
Control	<b>4,462</b>	<b>3,290</b>	media	<b>5,338</b>	<b>3,080</b>
	0,405	0,136	des.est.	0,048	0,177
	9,081	4,138	coef.var	0,895	5,731
5 min	<b>4,955</b>	<b>2,826</b>	media	<b>4,433</b>	<b>2,600</b>
	0,034	0,202	des.est.	0,151	0,044
	0,684	7,162	coef.var	3,408	1,689
15 min	<b>5,263</b>	<b>3,058</b>	media	<b>4,538</b>	<b>2,603</b>
	0,733	0,056	des.est.	0,069	0,124
	13,926	1,838	coef.var	1,515	4,771
30 min	<b>4,823</b>	<b>2,787</b>	media	<b>4,714</b>	<b>2,670</b>
	0,012	0,113	des.est.	0,229	0,038
	0,239	4,043	coef.var	4,857	1,434
P3			P4		
Control	<b>5,313</b>	<b>3,156</b>	media	<b>4,439</b>	<b>3,011</b>
	0,043	0,127	des.est.	0,006	0,141
	0,803	4,023	coef.var	0,138	4,690
5 min	<b>5,073</b>	<b>2,859</b>	media	<b>4,548</b>	<b>2,935</b>
	0,176	0,187	des.est.	0,079	0,244
	3,460	6,541	coef.var	1,737	8,319
15 min	<b>5,437</b>	<b>2,746</b>	media	<b>4,439</b>	<b>2,544</b>
	0,233	0,011	des.est.	0,129	0,090
	4,283	0,417	coef.var	2,911	3,532
30 min	<b>7,771</b>	<b>2,897</b>	media	<b>4,881</b>	<b>2,703</b>
	0,071	0,154	des.est.	0,087	0,030
	0,908	5,321	coef.var	1,785	1,114
P5			P6		
Control	<b>4,974</b>	<b>2,760</b>	media	<b>5,165</b>	<b>3,408</b>
	0,024	0,015	des.est.	0,043	0,228
	0,481	0,548	coef.var	0,831	6,692
5 min	<b>4,935</b>	<b>2,456</b>	media	<b>4,963</b>	<b>2,875</b>
	0,075	0,273	des.est.	0,201	0,028
	1,521	11,113	coef.var	4,053	0,967
3x5 min	<b>4,988</b>	<b>2,705</b>	media	<b>5,017</b>	<b>2,304</b>
	0,084	0,063	des.est.	0,025	0,110
	1,678	2,325	coef.var	0,500	4,794
6x5 min	<b>4,758</b>	<b>2,603</b>	media	<b>4,285</b>	<b>1,920</b>
	0,049	0,109	des.est.	0,154	0,146
	1,035	4,172	coef.var	3,586	7,605

Tabla IV.2.12 Índices de fracciones nitrogenadas (% respecto al contenido en NT) del suero de los quesos de las producciones P1 a P6. Subrayadas las medias que difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) de los controles.

P1	NS/NT	NNP/NT	P2	NS/NT	NNP/NT
Control	<b>64,570</b>	<b>33,590</b>	media	<b>47,020</b>	<b>22,157</b>
	1,145	1,134	des.est.	0,177	0,985
	1,773	3,376	coef.var	0,377	4,446
5 min	<b>45,087</b>	<b>24,780</b>	media	<b>36,036</b>	<b>13,773</b>
	0,626	0,321	des.est.	0,062	0,099
	1,388	1,296	coef.var	0,172	0,716
15 min	<b>43,920</b>	<b>23,727</b>	media	<b>33,713</b>	<b>16,249</b>
	0,335	0,374	des.est.	0,377	0,517
	0,762	1,575	coef.var	1,119	3,182
30 min	<b>42,480</b>	<b>23,181</b>	media	<b>31,075</b>	<b>18,737</b>
	0,320	1,581	des.est.	0,002	0,564
	0,753	6,820	coef.var	0,005	3,009
P3			P4		
Control	<b>59,431</b>	<b>27,636</b>	media	<b>61,071</b>	<b>33,743</b>
	0,685	0,419	des.est.	0,775	1,501
	1,153	1,515	coef.var	1,268	4,449
5 min	<b>40,660</b>	<b>20,184</b>	media	<b>46,950</b>	<b>27,668</b>
	3,118	0,131	des.est.	0,381	1,345
	7,669	0,650	coef.var	0,811	4,861
15 min	<b>40,710</b>	<b>19,032</b>	media	<b>40,014</b>	<b>23,650</b>
	0,713	0,091	des.est.	0,508	0,707
	1,752	0,480	coef.var	1,270	2,988
30 min	<b>40,046</b>	<b>19,522</b>	media	<b>36,078</b>	<b>19,773</b>
	0,200	0,140	des.est.	0,496	0,467
	0,500	0,716	coef.var	1,375	2,360
P5			P6		
Control	<b>57,931</b>	<b>29,133</b>	media	<b>67,292</b>	<b>37,860</b>
	0,591	0,916	des.est.	2,187	0,963
	1,020	3,145	coef.var	3,251	2,544
5 min	<b>44,494</b>	<b>23,003</b>	media	<b>44,034</b>	<b>23,151</b>
	0,514	1,301	des.est.	0,329	1,272
	1,156	5,656	coef.var	0,747	5,494
3x5 min	<b>42,813</b>	<b>21,558</b>	media	<b>38,298</b>	<b>28,287</b>
	0,650	0,904	des.est.	0,280	0,308
	1,519	4,195	coef.var	0,732	1,090
6x5 min	<b>35,493</b>	<b>17,771</b>	media	<b>42,473</b>	<b>24,649</b>
	0,615	0,631	des.est.	0,908	1,563
	1,733	3,551	coef.var	2,137	6,340

### 2.3. Efecto sobre el desuerado.

#### 2.3.1 Experiencias preliminares.

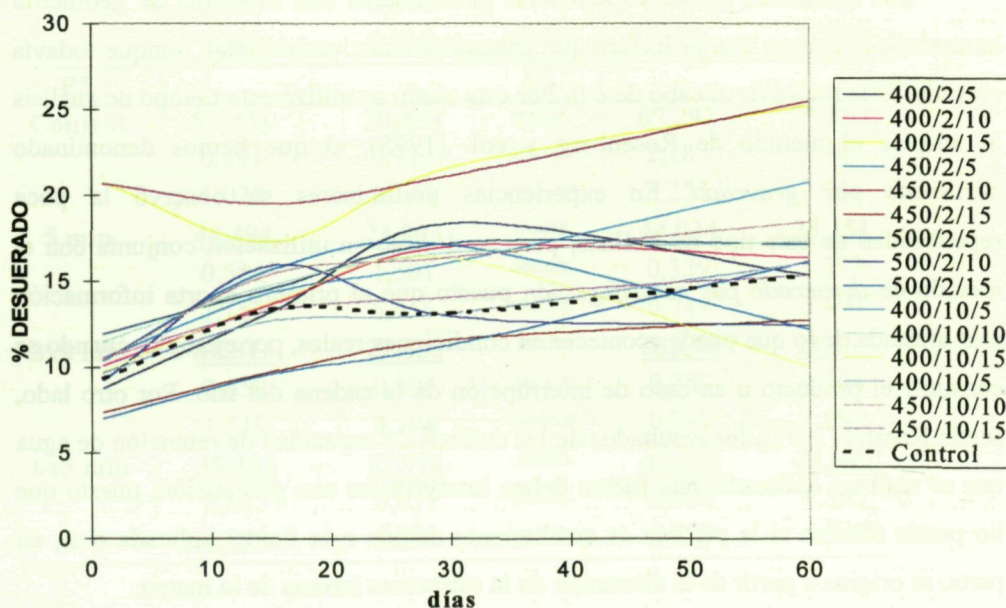
Como se ha mencionado anteriormente, la observación de una mayor cantidad de suero liberado por parte de los quesos presurizados nos llevó a cuantificar el desuerado. Los análisis que se describen a continuación se efectuaron en las muestras inoculadas con *Escherichia coli*, tratadas a 2 y 10°C y destinadas primordialmente al análisis microbiológico. Se cuantificó el suero que quedaba en el envase después del tratamiento y se siguió la evolución del desuerado durante un mes de conservación en refrigeración. Los resultados se muestran en la Tabla IV.2.13 y en la Figura IV.2.1, donde se ha representado el porcentaje de desuerado correspondiente a la media de los quesos controles y el de los tratados con las combinaciones de la Tabla IV.2.13. Aunque la mayoría de los quesos presurizados desueraron más que los controles, la evolución del desuerado durante la conservación en refrigeración fue similar en todos ellos. Las diferencias de desuerado entre los quesos presurizados eran más atribuibles a la gran variabilidad del método utilizado (influido sobretodo por la geometría y el peso de la muestra) que al efecto de los distintos tratamientos aplicados, ya que no se observó ningún comportamiento ligado al aumento de tiempo o presión de tratamiento. Este hecho nos llevó a plantearnos la utilización de otros métodos para valorar el efecto de la alta presión sobre el desuerado.

Los resultados de las experiencias preliminares con muestras de geometría controlada indicaron que la lectura que presenta menor variabilidad, aunque todavía elevada, es la realizada al cabo de 6 h. Por esta razón se utilizó este tiempo de análisis al adaptar el método de Rosenberg y col. (1995), al que hemos denominado *desuerado por gravedad*. En experiencias preliminares se observó la poca repetibilidad de este tipo de análisis, pero se decidió su utilización conjunta con el método de *desuerado por centrifugación* puesto que el primero aporta información más ajustada de lo que puede acontecer en condiciones reales, por ejemplo, cuando se consume el producto o en caso de interrupción de la cadena del frío. Por otro lado, según Kneifel (1991), los resultados de los análisis de capacidad de retención de agua que se realizan aplicando una fuerza deben interpretarse con precaución, puesto que no puede saberse si la pérdida es enteramente debida a la fuerza aplicada o si, en parte, se origina a partir de la alteración de la estructura interna de la matriz.

**Tabla IV.2.13** Evolución del desuerado (%DES) de los quesos control (n=8) y presurizados (n=3) conservados a 4°C.

	1 día	15 días	30 días	60 días
<b>Control</b>	9,33	13,38	16,21	16,83
<b>2°C</b>				
400 MPa/5 min	8,76	13,2	18,37	15,35
400 MPa/10 min	10,09	13,63	17,03	16,38
400 MPa/15 min	20,76	17,3	21,64	25,26
450 MPa/5 min	10,38	15,66	17,12	12,21
450 MPa/10 min	20,66	19,53	21,16	25,5
450 MPa/15 min	7,36	9,71	11,6	12,73
500 MPa/5 min	11,9	14,54	17,24	17,14
500 MPa/10 min	9,22	15,9	12,96	12,39
500 MPa/15 min	7	9,6	11,28	16,15
<b>10°C</b>				
400 MPa/5 min	10,5	14,32	16,09	20,77
400 MPa/10 min	11,46	14,75	16,65	17,29
400 MPa/15 min	9,72	13,75	16,33	10,01
450 MPa/5 min	9,66	12,67	13,12	16,06
450 MPa/10 min	10,41	15,38	16,38	18,45
450 MPa/15 min	10,52	13,27	14,07	15,35

**Figura IV.2.1** Evolución del desuerado a 4° C (%DES) de los quesos control (n=8) y los quesos presurizados (n=3).



Como contrapartida, el método de centrifugación, utilizado por Guo y Kindstedt (1995) para evaluar cambios en la capacidad de retención de agua en *Mozzarella*, y por Ramkumar y col. (1997) en cuajadas frescas de *Cheddar*, es más reproducible y aporta información valiosa sobre las diferencias entre quesos.

### 2.3.2 Análisis por centrifugación y gravedad.

Los resultados de estos análisis se presentan en las Tablas IV.2.14 y IV.2.15 respectivamente. En los análisis realizados por centrifugación se observó que los quesos tratados presentaban un desuerado mayor que los controles respectivos (salvo una excepción, el tratamiento a 500 MPa/10°C/15 min de la P1). Los resultados obtenidos por el método de gravedad revelaron un comportamiento similar pero presentaban una variabilidad mucho mayor, que en algunos casos impidió que se detectaran diferencias. El análisis del desuerado por el método de gravedad de la producción P3 se realizó a 30°C, debido a un problema en la regulación de la temperatura durante el análisis. Los quesos mostraron la misma tendencia que en los análisis a 25°C, aunque más exagerada.

Se calculado el  $\Delta\%DES$  de los quesos presurizados respecto al control con el fin de observar si existían diferencias entre tratamientos (Figura IV.2.2). Mediante el análisis por gravedad se detectó mayor liberación de suero en los quesos tratados a 25°C y en continuo que en los quesos tratados a 10 y 25°C en ciclos, cualquiera que hubiera sido el tiempo de presurización. En el análisis por centrifugación los quesos tratados a 25°C en continuo sólo desueraron más cuando el tiempo de tratamiento había sido de 30 min. La influencia de la duración del tratamiento en el suero liberado por centrifugación fue significativa a 10 y 25° C en tratamiento continuo, en que se observó que los quesos tratados durante 30 min desueraron más que los tratados durante 5 ó 15 min. En los tratamientos realizados a 25°C en ciclos no se detectaron diferencias debidas a la duración del tratamiento.



**Tabla IV.2.14** Porcentaje de desuerado referido al contenido de agua de la muestra. Análisis de las producciones P1 a P6 realizados por el **método de centrifugación**. Las medias subrayadas difieren significativamente de los controles ( $p < 0,05$ ).

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<b>CONTROL</b>						
media	57,280	55,117	56,969	53,395	57,903	57,047
desv.est.	0,475	0,766	1,160	0,895	1,095	1,658
coef.var.	0,830	1,389	2,036	1,676	1,892	2,906
<b>5 min</b>						
media	<u>60,408</u>	<u>62,085</u>	<u>62,582</u>	<u>58,770</u>	<u>62,979</u>	<u>60,205</u>
desv.est.	0,638	1,272	0,444	1,169	0,728	1,259
coef.var.	1,056	2,050	0,710	1,988	1,155	2,092
<b>15 min</b>						
media	58,596	<u>63,405</u>	<u>64,244</u>	<u>59,768</u>	<u>61,928</u>	<u>60,996</u>
desv.est.	0,220	1,450	0,945	1,754	1,792	1,384
coef.var.	0,376	2,287	1,471	2,935	2,894	2,268
<b>30 min</b>						
media	<u>65,389<sup>a,b</sup></u>	<u>64,610<sup>a</sup></u>	<u>65,923<sup>a</sup></u>	<u>61,481<sup>a</sup></u>	<u>66,647<sup>a,b</sup></u>	<u>60,072</u>
desv.est.	3,277	1,805	2,715	0,838	0,900	1,911
coef.var.	5,012	2,793	4,119	1,363	1,351	3,181

<sup>a</sup> distinto del tratamiento de 5 min; <sup>b</sup> distinto del tratamiento de 15 min.

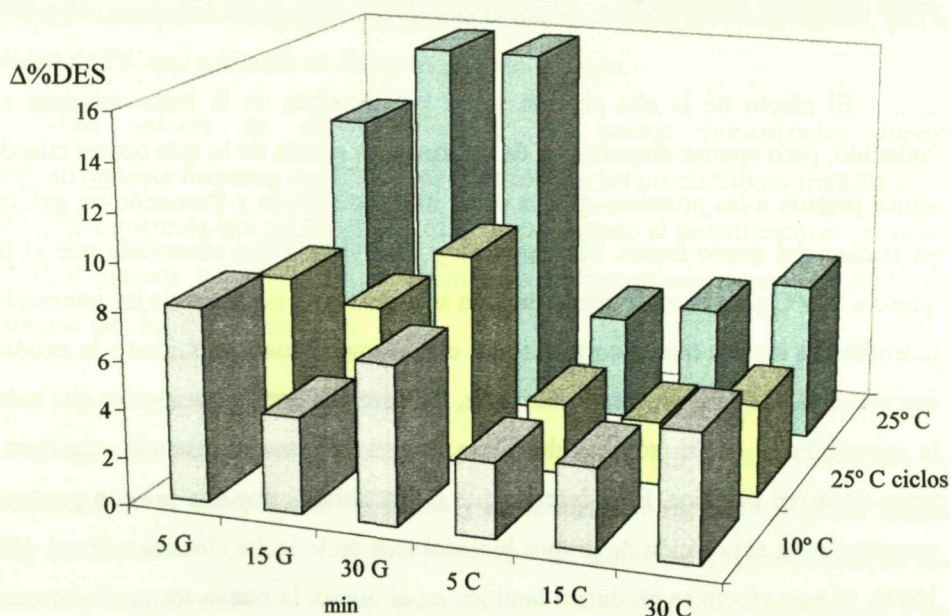
**Tabla IV.2.15** Porcentaje de desuerado referido al contenido de agua de la muestra. Análisis de las producciones P1 a P6 realizados por el **método de gravedad**. Las medias subrayadas difieren significativamente de los controles ( $p < 0,05$ ).

	P1	P2	P3*	P4	P5	P6
<b>CONTROL</b>						
media	17,028	11,709	22,372	11,432	13,511	11,483
desv.est.	2,084	1,636	5,825	1,342	1,844	2,469
coef.var.	12,238	13,975	26,039	11,735	13,646	21,502
<b>5 min</b>						
media	20,951	<u>32,363<sup>b,c</sup></u>	<u>43,324</u>	15,628	<u>20,616</u>	<u>25,338</u>
desv.est.	4,383	3,214	3,407	1,513	4,329	2,571
coef.var.	20,919	9,930	7,864	9,681	20,998	10,147
<b>15 min</b>						
media	<u>25,346</u>	15,028	<u>49,279</u>	<u>20,629</u>	<u>21,684</u>	<u>21,795</u>
desv.est.	2,094	4,400	13,259	2,749	2,333	1,415
coef.var.	8,262	29,280	26,907	13,325	10,761	6,494
<b>30 min</b>						
media	<u>31,615<sup>a</sup></u>	17,085	<u>45,630</u>	<u>23,084<sup>a,b</sup></u>	<u>27,544</u>	<u>23,737</u>
desv.est.	3,687	5,916	2,297	5,468	2,624	1,871
coef.var.	11,661	34,625	5,033	23,686	9,528	7,882

<sup>a</sup> distinto del tratamiento de 5 min; <sup>b</sup> distinto del tratamiento de 15 min; <sup>c</sup> distinto del tratamiento de 30 min;

\* este análisis se realizó a 30° C.

**Figura IV.2.2** Diferencia de desuerado ( $\Delta\%DES$ ) entre los quesos presurizados de las producciones P1 a P6 y sus respectivos controles según el tratamiento aplicado. G: desuerado analizado por gravedad; C: desuerado analizado por centrifugación.



Distintos autores han clasificado las formas en que podemos encontrar el agua en una estructura proteica. Según Harwalkar y Brown (1989) pueden considerarse tres clases de agua interaccionando con las proteínas: 1) agua libre, 2) agua adsorbida en multicapas, considerada como hidratación hidrodinámica y 3) agua ligada, considerada como agua estructural. Según Damodaran (1996), la contribución a la capacidad de retención del agua es mucho mayor por parte del agua atrapada físicamente que por parte del agua ligada y el agua de hidratación hidrodinámica, a pesar de haberse demostrado que la capacidad de retención del agua está correlacionada positivamente con la aptitud de las proteínas para ligarla.

Rosenberg y col. (1995) han estudiado el desuerado, la textura y la microestructura del queso *Cottage* en distintas condiciones de formulación y elaboración, observando que la cantidad de suero liberado es inversamente proporcional a la firmeza inicial de la cuajada y la relacionan también con su porosidad. Su estudio no es comparable con el presente trabajo, puesto que en nuestro caso, se realiza un tratamiento entre la elaboración del queso y la medida del desuerado. Como se verá en el siguiente apartado, los quesos que presentan mayor

firmeza en el análisis de textura son los presurizados, es decir, los que liberan más suero en el análisis y probablemente sea porque han perdieron mayor cantidad de suero durante el tratamiento.

El efecto de la alta presión sobre las proteínas de la leche empieza a ser conocido, pero apenas disponemos de información acerca de lo que ocurre cuando se aplica presión a las proteínas que ya están interaccionando y formando un gel, como en el caso del queso fresco. Marchesseau y Cuq (1995) han observado que al tratar queso a 140°C para obtener queso fundido se produce un aumento de las interacciones hidrofóbicas locales que se correlacionan con la mayor susceptibilidad a la exudación que presenta el queso procesado. Es decir, los cambios conformacionales que reducen la accesibilidad de las zonas hidrofílicas causan una menor retención de agua por parte de la red proteica. Está descrito que el tratamiento por alta presión provoca un aumento en la exposición de grupos hidrofóbicos en la leche (Johnston y col, 1992 y 1993). Si este efecto se produjera también en el queso, la nueva forma de interacción en la red proteica podría explicar el aumento de desuerado en los quesos presurizados.

Por otro lado, la disrupción de la red de paracaseína y la formación de agregados descrita en el apartado 2.2 de este capítulo también puede ser responsable de una menor capacidad de retención de agua en el queso, puesto que al interaccionar las proteínas entre sí lo hacen en menor grado con el agua.

### 2.4 Efecto sobre la textura.

Los resultados de los análisis de textura se presentan en las Tablas IV.2.16, IV.2.17 y IV.2.18. Como ocurrió con los resultados de composición, las diferencias debidas al tratamiento fueron del mismo orden que las existentes entre quesos control de distintas producciones. Por esta razón, aunque se detallan las diferencias entre quesos control y presurizados dentro de una misma producción, los resultados se comentan globalmente. Los valores del *esfuerzo en el momento de la fractura (esfuerzo)* y de la *deformación en el momento de la fractura (deformación<sub>f</sub>)* mostraron tendencias que se repitieron en casi todas las producciones. Los coeficientes de variación de estos dos parámetros fueron elevados (3-15%), pero habituales en este tipo de muestra (Molander y col., 1990; Delacroix-Bouchet, 1991).

-En general, los valores de *esfuerzo<sub>f</sub>* fueron iguales o más bajos en los quesos control que en los tratados, es decir, la fuerza por unidad de superficie necesaria para fracturar los controles fue igual o menor que la necesaria para los presurizados, con la salvedad de P6, que presentó un comportamiento opuesto.

-Los valores de *deformación<sub>f</sub>* de los quesos presurizados fueron significativamente menores que los de los controles en las producciones tratadas a 25°C (P3 a P6), mientras que no existieron diferencias cuando el tratamiento se realizó a 10°C. Los quesos no presurizados alcanzaron deformaciones mayores antes de fracturarse que los quesos tratados.

Según Delacroix-Bouchet y Trossat (1991) y Zoon (1991) la *deformación<sub>f</sub>* es un indicador de la cohesividad del queso y el *esfuerzo<sub>f</sub>* lo es de la firmeza. Según Kfoury (1989) el *esfuerzo<sub>f</sub>* puede utilizarse como un índice de fracturabilidad de los alimentos y la *deformación<sub>f</sub>* da un valor estimado de la fragilidad (*brittleness*) y su valor puede relacionarse frecuentemente con propiedades bien definidas sensorialmente como la impresión de falta de cohesión de la pasta (*shortness*), un parámetro cuya definición física es muy imprecisa. Hsieh y col. (1993) han estudiado las propiedades reológicas de queso *Mozzarella* adicionado de proteínas lácteas, huevo, soja y gelatina, observando que valores más altos de *esfuerzo<sub>f</sub>* pueden ser el resultado de una mayor pérdida de humedad del queso. Esta relación también existe en los quesos presurizados, que pierden más suero (en nuestro caso, también más materia seca) y presentan valores más elevados de *esfuerzo<sub>f</sub>* que los control.

Los valores del *Mmódulo*, que según la terminología propuesta por Zoon (1991) se corresponden con el término utilizado en el análisis sensorial *rigidez*, no siguieron ningún comportamiento regular, siendo difícil de explicar, probablemente debido a que en la mayoría de los casos los coeficientes de variación de estos resultados fueron superiores al 20%.

La medida del *trabajo* representa la cantidad de energía absorbida por el gel antes de la fractura (*toughness*) (Mohsenin, 1986). Los valores del *trabajo* realizado hasta el momento de fractura fueron superiores en los quesos presurizados de las

producciones P1 a P4. Por lo que respecta a los tratamientos cíclicos, no se observaron diferencias en la producción P5, mientras que los valores de *trabajo* de P6 mostraron un comportamiento en sentido contrario al del resto de las producciones, como también ocurrió con el *esfuerzos*.

Tabla IV.2.16 Parámetros de textura de las producciones P1 y P2, correspondientes a los tratamientos realizados a 10°C. Los tratamientos que difieren significativamente del control ( $p < 0,05$ ) están subrayados.

	P1				P2				
	Esfuerzo <sup>a</sup>	Deformación <sup>b</sup>	Módulo <sup>c</sup>	Trabajo <sup>d</sup>	Esfuerzo <sup>a</sup>	Deformación <sup>b</sup>	Módulo <sup>c</sup>	Trabajo <sup>d</sup>	
Control	7,437	0,485	19,133	33,97	m	5,857	0,513	14,105	23,81
	1,275	0,060	3,746	4,14	de	0,442	0,064	2,205	2,23
	17,137	12,349	19,58	12,19	cv	7,546	12,489	15,63	9,37
5 min	<u>9,359</u>	0,477	20,003	<u>45,15</u>	m	<u>8,156</u>	0,460	16,130	<u>32,56</u>
	1,212	0,044	3,795	3,60	de	0,766	0,037	3,018	3,70
	12,947	9,257	18,97	7,97	cv	9,397	8,115	18,71	11,35
15 min	7,762	0,480	<u>14,471</u>	<u>39,24</u>	m	<u>9,363</u>	0,504	14,158	<u>38,61</u>
	0,561	0,023	1,867	3,82	de	1,264	0,032	3,286	5,82
	7,232	4,779	12,91	9,74	cv	13,500	6,351	23,21	15,07
30 min	7,754	0,481	<u>14,365</u>	<u>39,91</u>	m	<u>9,100</u>	0,517	12,094	<u>38,75</u>
	0,876	0,058	3,570	3,37	de	1,458	0,027	2,832	6,76
	11,302	11,977	24,85	8,44	cv	16,018	5,184	23,42	17,45

<sup>a</sup> ( $\times 10^3$  N/m<sup>2</sup>); <sup>b</sup> (-); <sup>c</sup> ( $\times 10^3$  N/m<sup>2</sup>); <sup>d</sup> (J)

m: media; de: desviación estándar; cv: coeficiente de variación.

**Tabla IV.2.17** Parámetros de textura de las producciones P3 y P4, correspondientes a los tratamientos realizados a 25°C. Los tratamientos que difieren significativamente del control ( $p < 0,05$ ) están subrayados.

	P3				P4			
	Esfuerzo <sup>a</sup>	Deformación <sup>b</sup>	Módulo <sup>c</sup>	Trabajo <sup>d</sup>	Esfuerzo <sup>a</sup>	Deformación <sup>b</sup>	Módulo <sup>c</sup>	Trabajo <sup>d</sup>
Control	5,606	<u>0,623</u>	10,753	29,70	7,949	0,565	14,698	39,90
	0,783	0,021	1,384	4,63	0,710	0,051	2,324	4,33
	13,97	3,36	12,87	15,58	8,94	9,10	15,81	10,84
5 min	<u>7,844</u>	<u>0,530</u>	11,691	<u>41,45</u>	9,510	<u>0,498</u>	<u>18,618</u>	<u>49,34</u>
	0,633	0,052	3,220	3,68	1,450	0,041	4,034	7,55
	8,07	9,76	27,55	8,89	15,25	8,28	21,67	15,31
15 min	<u>7,832</u>	<u>0,507</u>	11,730	<u>38,67</u>	8,134	0,515	13,311	41,61
	0,830	0,032	2,636	2,81	1,151	0,040	2,279	3,88
	10,59	6,29	22,47	7,26	14,16	7,68	17,12	9,34
30 min	<u>7,889</u>	<u>0,519</u>	11,853	<u>42,45</u>	8,869	0,518	13,583	<u>49,36</u>
	1,016	0,020	2,983	3,72	1,245	0,039	2,931	5,62
	12,87	3,802	25,17	8,78	14,04	7,59	21,58	11,38

<sup>a</sup> ( $\times 10^3$  N/m<sup>2</sup>); <sup>b</sup> (-); <sup>c</sup> ( $\times 10^3$  N/m<sup>2</sup>); <sup>d</sup> (J)

m: media; de: desviación estándar; cv: coeficiente de variación

Tabla IV.2.18 Parámetros de textura de las producciones P5 y P6, correspondientes a los tratamientos en ciclos a 25°C. Los tratamientos que difieren significativamente del control ( $p < 0,05$ ) están subrayados.

	P5			P6					
	Esfuerzo <sup>a</sup>	Deformación <sup>b</sup>	Módulo <sup>c</sup>	Trabajo <sup>d</sup>	Esfuerzo <sup>a</sup>	Deformación <sup>b</sup>	Módulo <sup>c</sup>	Trabajo <sup>d</sup>	
Control	7,655	<u>0,542</u>	17,216	38,51	m	8,537	<u>0,586</u>	17,272	<u>44,50</u>
	0,882	0,044	2,888	3,65	de	1,269	0,054	2,705	2,40
	11,53	8,04	16,78	9,47	cv	14,86	9,20	15,66	5,40
5 min	<u>8,853</u>	<u>0,477</u>	<u>18,386</u>	<u>44,40</u>	m	<u>7,021</u>	<u>0,524</u>	<u>12,568</u>	<u>36,70</u>
	0,859	0,037	3,602	4,02	de	0,345	0,060	3,233	3,68
	9,70	7,81	19,69	9,06	cv	4,91	11,37	25,72	10,03
15 min	<u>8,286</u>	<u>0,480</u>	<u>13,604</u>	<u>39,67</u>	m	<u>6,486</u>	<u>0,481</u>	<u>11,873</u>	<u>34,11</u>
	1,467	0,029	3,684	5,36	de	0,903	0,063	2,755	5,60
	17,71	6,05	27,08	13,51	cv	13,92	13,16	23,20	16,43
30 min	<u>8,110</u>	<u>0,462</u>	<u>14,165</u>	<u>38,28</u>	m	<u>7,507</u>	<u>0,504</u>	<u>14,070</u>	<u>40,86</u>
	1,942	0,047	2,110	5,76	de	1,169	0,036	4,386	4,57
	23,95	10,14	14,90	15,04	cv	15,59	7,11	31,17	11,19

<sup>a</sup> ( $\times 10^3$  N/m<sup>2</sup>); <sup>b</sup> (-); <sup>c</sup> ( $\times 10^3$  N/m<sup>2</sup>); <sup>d</sup> (J)

m: media; de: desviación estándar; cv: coeficiente de variación



### 2.5 Efecto sobre el color.

El análisis estadístico señaló diferencias significativas entre los quesos control y los presurizados, pero como ocurrió con los valores de composición y textura, estas diferencias también existen entre quesos control de distintas producciones, por lo que la variabilidad entre producciones es tan responsable de diferencias de color en los quesos como pueda serlo el tratamiento de alta presión. Los resultados de las medidas instrumentales de color se muestran en las Tablas IV.2.19 y IV.2.20. El comportamiento de los parámetros medidos e índices calculados fue similar en las muestras de la superficie y del interior de los quesos, si bien en la superficie los cambios fueron más pronunciados (los valores  $\Delta E$  fueron superiores). Este hecho puede observarse sobretodo en los valores de  $W_i$  y  $b$ , que son los que presentaron cambios más manifiestos en todas las producciones.  $W_i$  disminuyó respecto al control en los quesos presurizados, en concordancia con el aumento de los valores de  $b$  (se aproximan al amarillo). *Chroma* tendió a disminuir en las muestras del interior de los quesos presurizados de algunas producciones, mientras que en las muestras de superficie aumentó claramente en todas las producciones.

Para valorar si las diferencias debidas al tratamiento superaron a las causadas por el factor producción, se compararon todos los quesos control con los quesos presurizados a distintos tiempos. En el interior de los quesos, los únicos parámetros de los quesos presurizados que presentaron diferencias respecto a los quesos control fueron  $b$  (aumentó en los tratamientos aplicados durante 5 y 30 min) y  $W_i$  (disminuyó en todos los niveles de duración de tratamiento). En la superficie,  $b$  y *chroma* de los quesos presurizados aumentaron significativamente respecto a los controles fuera cual fuese el tiempo de tratamiento. Al comparar todos los controles con todos los quesos presurizados se mantuvieron estas diferencias significativas.

No se han encontrado datos en la bibliografía acerca de los cambios de color causados por la alta presión en quesos. Los estudios que existen en leche son contradictorios, pues Johnston y col. (1992) observan que el valor de  $L$  disminuye en leches presurizadas, atribuyéndolo a la disgregación de la estructura micelar. Por otro lado, Adapa y col. (1996) no detectan cambios en los parámetros  $L$  y  $b$ , pero las leches presurizadas presentan valores de  $a$  inferiores a los de los controles. En cualquier

caso, no podemos establecer relación alguna con estos estudios, puesto que los componentes que tienen influencia en el color de la leche habían sido transformados durante la elaboración del queso.