



Universidad Autónoma del Estado de México

Maestría en Ciencias Químicas
Química en alimentos

EFFECTO DEL SALADO DIRECTO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS, TEXTURALES Y ACEPTACIÓN DE UN QUESO DE PASTA DURA.

TESIS

Que presenta: L. en G. Marian Salgado Maya

Asesor Académico: Dr. Octavio Dublán García

Asesor Adjunto: Dra. Beneranda Murúa Pagola

Asesor Adjunto: Dr. Daniel Díaz Bandera



Contenido

Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. Antecedentes.....	8
1.1. La leche.....	8
1.1.1. La leche en México.....	11
1.2. El Queso.....	13
1.2.1. Historia del queso.....	13
1.2.2. Clasificación de los quesos.....	15
1.2.3. El mercado del queso en México.....	17
1.2.4. Proceso de elaboración.....	18
2. Justificación.....	31
3. Hipótesis.....	33
4. Objetivos.....	34
4.1. Objetivo general.....	34
4.2. Objetivos específicos.....	34
5. Metodología.....	35
5.1. Etapa 1 Estandarización de las técnicas de análisis para la leche el queso duro.....	35
5.1.1. Obtención de materia prima.....	35
5.1.2. Parámetros de elaboración del queso.....	35
5.2. Etapa 2 Evaluación de la cantidad de sal para la adición directa en pasta y de tiempo de inmersión en salmuera.....	37
5.3. Etapa 3 Evaluación de las características fisicoquímicas, texturales y microbiológicas durante la maduración.....	38
5.4. Métodos analíticos.....	38
5.4.1. Pruebas en leche.....	38
5.4.2. Pruebas en Queso.....	39
5.4.3. Análisis microbiológicos.....	44



5.4.4. Análisis sensorial.....	44
5.4.5. Análisis estadístico	44
6. Resultados.....	45
6.1. Etapa 1. Estandarización de las técnicas de análisis para la leche el queso duro ...	45
6.3. Etapa 3. Evaluación de las características fisicoquímicas, texturales y microbiológicas durante la maduración.....	48
7. Discusión	55
8. Conclusiones	58
9. Referencias.....	59
10. Anexos	64
10.1. Ficha de cata	64
10.2. Artículo	65



Índice de tablas

Tabla 1. Composición de la leche cruda	9
Tabla 2. Composición de la leche de las principales razas bovinas en México.....	12
Tabla 3. Producción de leche de bovino (2005-2014)	12
Tabla 4. Elaboración de queso 2009-2014.....	17
Tabla 5. Características notables de bacterias empleadas como cultivos lácticos para quesos	19
Tabla 6. Investigaciones de salado en queso	28
Tabla 7. Determinación de cloruros etapa 2	46
Tabla 8. Determinación de color etapa 2	46
Tabla 9. Prueba de corte etapa 2	47
Tabla 10. Comparación de resultados etapa 2	47
Tabla 11. Análisis fisicoquímicos.....	48
Tabla 12. Prueba de corte.....	51
Tabla 13. Determinación de color.....	51
Tabla 14. Análisis sensorial	52
Tabla 15. Análisis microbiológicos	54



Índice de gráficas

Gráfica 1 Composición SD-0.....	49
Gráfica 2 Composición SD-6.....	49
Gráfica 3 Composición SS-0	49
Gráfica 4 Composición SS-6	49
Gráfica 5 Aceptación color SS.....	52
Gráfica 6 Aceptación Aroma SS.....	52
Gráfica 7 Aceptación retrogusto SS.....	52
Gráfica 8 Aceptación sabor SS	52
Gráfica 9 Aceptación textura SS.....	52
Gráfica 10 Aceptación color SD.....	53
Gráfica 11 Aceptación sabor SD.....	53
Gráfica 12 Aceptación aroma SD	53
Gráfica 13 Aceptación retrogusto SD.....	53
Gráfica 14 Aceptación textura SD	53



Resumen

En México la fabricación de lácteos es la tercera más importante dentro de la industria alimentaria, teniendo un especial énfasis en la elaboración de quesos, aunque su consumo en el país es en su mayoría de quesos frescos, hay un pequeño sector de la población interesada en los madurados que generalmente son importados, pero con el paulatino desarrollo de una cultura del queso, la producción artesanal de los mismos ha comenzado a florecer a nivel nacional.

Generalmente el tipo de salado utilizado por los productores de quesos madurados es la inmersión en salmuera que puede llegar a generar algunos inconvenientes en tanto a los cuidados y el mantenimiento que se le debe dar a ésta, así como los riesgos de contaminación si no es manejada apropiadamente; por otro lado el desecho ocasiona problemas al descargar una gran cantidad de cloruros al ambiente. Por lo anterior el objetivo de la presente investigación es hacer una evaluación del efecto que tienen dos tipos de salado (directo en la cuajada y el realizado por inmersión en salmuera) sobre las características texturales y fisicoquímicas de un queso de pasta dura con el fin de analizar si el método directo es el más adecuado para su uso como alternativa tanto en el ámbito artesanal como el industrial.

Quesos elaborados con ambos métodos de salado fueron analizados para características fisicoquímicas (grasa, humedad, cenizas, acidez titulable, pH, contenido de proteína y cloruros), texturales (fuerza necesaria para la primer mordida), y aceptación (color, aroma, textura, sabor y retrogusto), no encontrando diferencias significativas excepto por un contenido de proteínas más alto y grasa más baja en el salado directo, sin embargo, la degradación de proteínas mostrada en la electroforesis junto con la textura, probaron que ninguno de estos parámetros afectó las características finales del queso, logrando un producto con un perfil similar, haciendo así aceptable usar el método del salado directo en vez de salado por salmuera.



Abstract

Dairy production is the third most important within the food industry in Mexico, having a special emphasis in cheesemaking, even when the most consumed are fresh cheeses, there is a small population sector interested in ripened ones which are generally imported, nevertheless the slowly cheese culture development has led to its blossoming artisanal and industrial manufacture.

Brining is the most used salting method by ripened cheese producers, nevertheless this could cause some inconvenients, from the needed cares of brine to maintain its quality to contamination risks not only on cheese but in the environment when it is not properly discarded as it generates a great amount of chlorides discharged to the ground. For all of the above the objective of this study was to make an evaluation of the effect of two types of salting to determine if the direct method is most suitable for its use as an alternative both in the artisanal and industrial fields.

Cheeses made with both methods were analyzed for physicochemical (fat content, moisture, ashes, titratable acidity, pH, protein content and chlorides) textural characteristics (strength needed for the first bite) and acceptance (color, aroma, texture, flavor and aftertaste), finding no significant difference excepting for higher protein and lower fat content on direct salting but protein degradation showed on electrophoresis along with texture, proved that none of them affected the final characteristics of cheese, accomplishing a product with a similar profile, making acceptable to salt cheese with a direct method over brining.

1. Antecedentes

1.1. La leche

De acuerdo a la definición dada por el CODEX STAN 206-1999, la leche (figura 1) es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenidos mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinados al consumo en forma de leche líquida o la elaboración ulterior. En adición a lo marcado anteriormente, la NOM-243-SSA1-2010 indica que no debe contener calostro, es decir, la secreción de la glándula mamaria obtenida en el periodo comprendido de 5 días antes a 5 días después del parto, que difiere de la leche principalmente por su alto contenido de inmunoglobulinas (anticuerpos), células somáticas, cloruros y la presencia de eritrocitos, y cuyo color va del amarillo al rosado (NOM-155-SCFI-2012).

Los principales componentes de la leche son agua, lípidos, proteínas, carbohidratos, sales minerales y microcomponentes que pueden ser orgánicos como vitaminas y aminoácidos entre otros, o inorgánicos como cobre, hierro, manganeso, etc. También hay una gran diversidad de microorganismos contenidos en la leche como bacterias (principalmente bacterias ácido lácticas) y células somáticas (Villegas de Gante, 2004).

Para efectos tecnológicos, Villegas de Gante (1993), nos define la leche como un sistema fluido en el cual coexisten tres subsistemas en equilibrio dinámico, los cuales son, una emulsión aceite-agua que contiene lípidos y elementos liposolubles, los glóbulos están rodeados de fosfolípidos y una membrana proteica, una suspensión coloidal proteica comprendida de micelas de caseínas asociadas con fosfatos y citratos de calcio y magnesio (Guetouache *et al.*, 2014) y una solución verdadera, en la tabla 1 se muestran sus componentes y el estado físico en que se encuentran.



Figura 1 La leche

Fuente: <https://www.euroinnova.co/UFI178-Recepcion-Y-Almacenamiento-De-La-Leche-Y-Otras-Materias-Primas-Online>



Tabla 1. Composición de la leche cruda

	Composición promedio	Composición promedio	Estado físico de los componentes de la leche
	(%)	g/L	
Agua	87.1	---	Agua libre (disolvente) + agua ligada (3.7 %)
Lactosa	4.6	46	Disolución
Lípidos	4.0	40	Emulsión de glóbulos grasos (3 a 5 micras)
- Materia grasa			
- Lecitina (fosfolípidos)			
- Parte insaponificable (esteroles, carotenos, tocoferoles)			
Proteínas	3.3	33	Suspensión micelar de fosfocaseinato de calcio (0.08 a 0.12 micras) Disolución coloidal Solución verdadera
- Caseína	2.6	26	
- Prótidos solubles (globulinas, albuminas)			
- sustancias nitrogenadas no proteicas			
Sales minerales	0.7	---	Disolución o estado coloidal (P y Ca) (Sales de K, Ca, Na, Mg, etc.)
- del ácido cítrico			
- del ácido fosfórico (P ₂ O ₅)			
- del ácido clorhídrico (NaCl)			
Componentes diversos (vitaminas, enzimas, gases disueltos)		---	---
Extracto seco total	12.8	---	---
Extracto seco desgrasado	8.9	--	---
***Contenido de vitaminas			Emulsión de glóbulos grasos (A Y D)
- Vitamina A		0.2-2 mg/L	
- Vitamina B1		0.4 mg/L	
- Vitamina B2		1.7 mg/L	
- Vitamina C		5 mg/L	
- Vitamina D		0.002 mg/L	

Fuente: Santiago 2007; Walstra *et al.*, 2006



Chamorro y Losada (2002), describen algunos aspectos de los principales de estos componentes encontrados en la leche así como su relación e influencia en la estabilidad de la misma y la elaboración del queso.

- **Agua:** Es el componente mayoritario de la leche, particularmente, el agua libre tiene gran importancia, influyendo en sus procesos fisicoquímicos y microbiológicos así como en la fase de maduración de los quesos.
- **Glúcidos:** Principalmente encontramos la lactosa, que al tener la propiedad de ser fermentada por algunos microorganismos presentes en la leche y bajo acción de sus enzimas, sufre fermentaciones láctica, propiónica, alcohólica y butírica generando componentes que le dan al queso su gusto y aroma característicos.
- **Lípidos:** La materia grasa en la leche se encuentra presente en glóbulos constituidos por pequeñas gotas de grasa, particularmente triglicéridos de bajo punto de fusión por lo que son líquidos a temperatura ambiente y que están rodeados por una membrana lipoproteica, cargada negativamente, que estabiliza la emulsión al impedir que éstos glóbulos se agrupen y protegiéndolos de enzimas lipolíticas así como de oxidaciones. Esta grasa, durante la maduración del queso sufre transformaciones, influyendo en características físicas y organolépticas que definen al queso como su textura, aroma y gusto, también contribuye al aumento del rendimiento quesero y mejora la consistencia así como la distribución de la caseína en el queso.
- **Sustancias nitrogenadas:** Por un lado están las proteínas (95 % del nitrógeno total) y las no proteicas (5 % del nitrógeno total), las proteínas se encuentran en dos fases, la fase micelar inestable formada por las micelas de caseína en suspensión y la fase soluble estable, constituida por diversos polímeros proteicos hidrófilos que son las proteínas solubles o del suero.

Las caseínas son fosfoproteínas que se presentan como conglomerados coloidales dentro de la leche, la principal función de las micelas es fluidificar a las caseínas y solubilizar el fosfato cálcico. Se reconocen 4 tipos α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseína, las primeras tres precipitan en presencia de calcio por disminución de su carga eléctrica negativa y su hidrofilia, sin embargo, la κ -caseína no solo es soluble en calcio, sino que también interactúa y estabiliza a las otras caseínas insolubles formando un estado coloidal estable en la leche.



Las caseínas pueden precipitar por acidificación, hasta el pH isoelectrico (4.6) o por acción de enzimas proteolíticas; por otro lado las proteínas que presentan una estructura secundaria tales como la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, inmunoglobulinas y albumina sérica permanecen solubles en el lactosuero por su gran hidrofilia (Zimmermann, 2010).

- **Sales y minerales:** Las sales contenidas en la leche, se encuentran mayormente disueltas y otras en estado coloidal, la mayoría son de tipo mineral (fosfatos, cloruros, bicarbonatos) aunque también hay de origen orgánico (citratos y lactatos) a pesar de su porcentaje bajo (0.7 %) ejercen gran influencia en las características de la leche, pues su distribución e interacción con las proteínas de la leche son importantes para la estabilidad de los productos lácteos, por ejemplo la coagulación de la leche exige la presencia de sales cálcicas.
- **Ácidos orgánicos:** El ácido principal contenido en la leche es el cítrico que permite que la leche tenga mucho calcio disuelto como citrato cálcico al formar quelatos con el calcio, además de esto, es utilizado por ciertos microorganismos, siendo precursor de diacetilo, lo que en algunos quesos le da su aroma característico.
- **Enzimas:** La concentración de estas varía de acuerdo a la especie y el período de lactación, sin embargo, aunque estén en pequeñas cantidades, pueden influir en la estabilidad de los productos lácteos, éstas le dan a la leche propiedades de un sistema reversible de óxido-reducción, lo que es esencial para la fermentación láctica, imprescindible en la maduración del queso. Las proteasas y lipasas son las más importantes por sus efectos en proteínas y lípidos de los quesos tanto en textura como sabor y aroma.

1.1.1. La leche en México

La composición de la leche puede variar en especial en cuanto a contenido graso y proteico dependiendo de la fuente de la que provenga, las principales son la cabra, oveja y vaca, siendo la última la más explotada en nuestro país, no obstante, aún dentro de una misma especie pueden encontrarse diferencias importantes al tratarse con diferentes razas, en la tabla 2 figura la composición de la leche de las principales razas de ganado bovino en el país, que son las siguientes:



Tabla 2. Composición de la leche de las principales razas bovinas en México

Composición (%)	Holstein	Parda suiza	Jersey
Grasa	3.55	4.01	5.37
Proteína	3.25	3.61	3.92
Lactosa	4.42	5.04	4.93
Sólidos totales	12.04	13.41	14.91
Cenizas	0.74	0.73	0.71

Fuente: Law y Tamime, (2010);Alba, (1964)

El uso de estos diferentes tipos de ganado, se encuentra influenciado por cómo están repartidos a través del país y las características de los animales que el CONARGEN (2013) describe de la siguiente manera:

- **Holstein:** Es la raza lechera principalmente utilizada en México, fue traída de Holanda y se encuentra difundida por todo el territorio pero especialmente en la altiplanicie central y del norte.
- **Parda suiza:** Se encuentra en todos los estados de la República, es la más importante en el ramo lechero después de la Holstein, además su explotación es de doble propósito y la leche se puede destinar a producción de queso de calidad por su alto contenido de grasa.
- **Jersey:** Se encuentra distribuida en todo el país, aunque en núcleos reducidos principalmente en los estados de: Aguascalientes, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz.

Dentro de la industria alimentaria en México, la láctea es la tercera más importante, la producción lechera, de acuerdo a SAGARPA y SIAP (2015), entre 2005 y 2014 se incrementó en promedio 1.35 % como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Producción de leche de bovino (2005-2014)

Año	Producción	Crecimiento anual %
2005	9,868,302	...
2006	10,088,550	2.2
2007	10,345,982	2.6
2008	10,589,481	2.4
2009	10,549,037	-0.4
2010	10,676,692	1.2
2011	10,724,288	0.4
2012	10,880,870	1.5
2013	10,965,629	0.8
2014	11,129,918	1.5
promedio		1.35

Fuente: SAGARPA, SIAP (2015)



1.2. El Queso

En la industria de alimentos, la de los lácteos es una de las principales, específicamente los quesos, son uno de los productos de mayor consumo habitual, los cuales están definidos de acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994 como un producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, además se puede considerar un alimento casi completo que contiene más o menos todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del cuerpo humano.

1.2.1. Historia del queso

Se han encontrado diferentes evidencias que muestran la domesticación de animales de ganado en el neolítico, cuando el hombre dejó de ser nómada y se volvió sedentario, lo que hizo posible la obtención de leche para consumo y más tarde al persistir en su conservación, y gracias al descubrimiento probablemente accidental de su coagulación, se pudo lograr la elaboración de queso que evolucionó con el paso del tiempo y los aportes de distintas civilizaciones.

El origen de dicho producto se sitúa en la zona comprendida entre los ríos Tigris y Éufrates, a partir de leches de cabra y oveja (Gómez, 2012), se piensa que en un principio fue el resultado de las condiciones climáticas que acidificaban la leche hasta que ésta se coagulaba por la precipitación de las caseínas al alcanzar su punto isoeléctrico (Villegas de Gante, 1993), en la Revista Geográfica Universal (1983), se habla de la leyenda árabe de un hombre que cruzó el desierto y descubrió que la leche que transportaba en un odre hecho a base de un estómago de rumiante había cuajado mejor y más rápido que en los recipientes convencionales, aunque entonces no se sabía, esto se debió a las enzimas coagulantes renina o pepsina encontrados en dicho recipiente.

La alfarería también comprende una parte importante en la historia del queso, pues se han encontrado vasijas perforadas de civilizaciones de Egipto, Mesopotamia (6000 a. C.) así como Europeas (2800 a. C.) que eran usadas para escurrir la cuajada (Gómez, 2012; Nantet *et al.*, 1994), obteniendo así un producto con menos humedad y mayor duración.



En el Museo Nacional de Bagdad se encuentra el Friso de la Quesería (2500-3000 a. C.) donde están plasmadas algunas etapas como el ordeño luego del cual se ve la filtración, después un trabajo con las manos y al final la separación de la cuajada. Esta elaboración del queso que comenzó en pueblos del mediterráneo oriental pasó a Europa donde las técnicas se modificaron y refinaron (Castañeda *et al.*, 2010); algunos logros en la fabricación del queso como el secado de la cuajada, el moldeado, salado y prensado, son procesos que fueron favorecido tanto la conservación como variedad y atractivo del producto lo que permitió su comercialización por los vikingos, comerciantes medievales, bizantinos, venecianos y holandeses (Villegas, 1993).

Hay indicios en la literatura clásica de que los griegos y romanos conocían el arte de fabricar queso, precisamente de la palabra griega “formos” (designa un pequeño cesto en el que la cuajada se escurría y tomaba su forma) proviene del francés fromage, el catalán formatge y el italiano formaggio, por otro lado queso (español), cheese (inglés), queijo (portugués) y käse (alemán) provienen de “caseus” contracción de carere seurum (carece de suero) palabra que designaba al queso en la antigua Roma (Gómez, 2012; Villegas, 1993).

Cuando el dominio de Roma se extendió, los quesos de cabra y oveja constituían parte de la dieta diaria y aunque eran principalmente blandos, también existían productos duraderos salados y madurados. El surgimiento del comercio y el aumento de las rutas de comunicación, otorgaron una ventaja a los quesos que llegaban bien después de un viaje, principalmente los quesos duros de las regiones montañosas (Nantet *et al.*, 1994).

Con el paso del tiempo, los monasterios comenzaron a adoptar una política de reglas estrictas relativas a la higiene de sus vinos y quesos, más tarde, las pasturas de las montañas altas se pusieron bajo el control de la comunidad así como la elaboración de quesos de gran tamaño, donde además, las condiciones climáticas permitieron que los sótanos estuvieran permanentemente frescos y húmedos, favoreciendo la producción de quesos prensados de maduración lenta (Nantet *et al.*, 1994).

En la actualidad el fundamento para la elaboración del queso es el mismo, aunque las técnicas se han perfeccionado a lo largo de los siglos y algunos ejemplos de los principales elementos de su modernización son, el empleo de leche pasteurizada, gracias a los aportes de



Louis Pasteur sobre eliminación de microorganismos patógenos y deteriorantes de la leche, el uso de la descremadora para estandarizar la leche, la utilización de frío para conservar la leche o el queso así como controlar la maduración del mismo y la adición de cultivos lácticos específicos para orientar fermentaciones deseadas en quesos de leche pasteurizada (Villegas, 1993).

Todos estos progresos aunados a las bases científicas han permitido un desarrollo industrializado del producto, sin embargo, en países de limitado avance tecnológico lechero coexisten métodos modernos de fabricación de queso y métodos rústicos artesanales.

1.2.2. Clasificación de los quesos

La NOM -121-SSA1-1994 divide al queso en tres grandes grupos que son los frescos, los madurados que a su vez se subdividen en prensados de pasta dura, prensados y de maduración con mohos, finalmente los procesados, no obstante, hay una amplia gama de clasificaciones basadas en distintos criterios como tipo de corteza, proceso de elaboración, el tipo de maduración o la textura que tienen.

Una de las clasificaciones más conocidas es por su textura y en esta se encuentran (Carr, 1983):

- **Quesos muy blandos:** Se pueden cortar y comer con una cuchara, la mayoría de los quesos frescos se encuentran en esta clasificación
- **Quesos semiblandos:** Más firmes pero aún con un elevado grado de humedad, son quebradizos y se desmenuzan fácilmente como el queso azul.
- **Quesos semiduros:** Son consistentes y fácilmente cortables en rebanadas
- **Quesos duros:** Son densos y a veces granuloso dependiendo de su nivel de maduración y humedad, se pueden cortar en rebanadas o rallar.

Al respecto Battistotti *et al.* (1985), dice que la consistencia se define en base a la resistencia al corte y la humedad. La pasta blanda es la de los quesos más mórvidos, con un contenido acuoso del 45 – 50 %; la semidura, de quesos con el 40 – 50 % de agua y la dura es de menos del 40 %.



Los quesos duros además de tener un bajo contenido de humedad, generalmente son de pasta cocida, firme, compacta, presentan un color amarillo pálido y suelen utilizarse para consumo directo, en trozos o para rallar (Battro, 2010; Battistotti *et al.*, 1985). Estas características particulares las logran luego de un periodo de maduración, la NOM-121-SSA1-1994 establece que un queso madurado es aquel sometido a un proceso, mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos, lo que les permite prolongar su vida de anaquel.

Jack y Paterson (1992) explica algunos factores que tienen influencia sobre la textura del queso, al respecto dice que los tres principales constituyentes del queso son la caseína, grasa y agua, elementos que contribuyen a la estructura y por tanto a la textura del producto final. Las caseínas son las que forman un entramado, estructura en la cual los glóbulos de grasa quedan atrapados mientras que el agua se enlaza a las proteínas y a su vez llena los espacios libres, el resultado es una matriz viscoelástica que varía su textura, todo esto, determinado en mayor medida por la composición de la leche utilizada durante la elaboración.

También agrega que la red proteica del queso principalmente está formada por la caseína α_{s1} cuyas cadenas helicoidales forman celdas que al atrapar los glóbulos de grasa, resulta en una matriz flexible cuyas dimensiones están principalmente determinadas por las dimensiones de los mismos glóbulos de grasa en la leche. Por otro lado, la proporción de grasa/proteína es muy importante ya que los incrementos del contenido de grasa y agua debilitan la estructura de proteína, mientras que su disminución resulta en un endurecimiento del queso, teniendo que aquellos con alto contenido de grasa son suaves.

Los diferentes componentes contenidos en el queso cumplen una función o tienen un comportamiento distinto, por ejemplo la firmeza está altamente relacionada al contenido de caseínas, mientras que la cantidad de grasa dentro de la matriz proteica regula la cantidad de deformación posible. En la cuajada el agua sirve para lubricar el movimiento de caseínas en relación a la grasa, incrementos en la humedad reducen la resistencia e incrementan la capacidad de recuperación a una deformación. El contenido de agua es un factor primario que influencia el



mecanismo de fractura durante la masticación. El contenido de sal que se puede cristalizar en la matriz también influenciará la textura (Jack y Paterson, 1992).

Además el rol de la acidez en la textura es importante puesto que una baja acidez debilita los enlaces entre las moléculas en la red proteica a través de repulsión de cargas, ya que las cargas negativas en las moléculas de caseína incrementan con el pH. Las interacciones hidrofóbicas influyen en la estabilización de la estructura de la matriz, pero estas se debilitan por la adsorción de agua por parte de las proteínas para solvatar las cargas iónicas. Las caseínas precipitadas pueden disolverse si el agua presente es suficiente, pero los iones de calcio se enlazan estrechamente a la proteína limitando su solubilidad. La tendencia de los agregados de proteína a adsorber agua limita la cantidad de agua intersticial presente en quesos con pH alto, lo cual puede pensarse como emulsiones concentradas de proteína, mientras que los quesos de pH bajo son masas porosas de caseínas encerrando partículas de grasa (Jack y Paterson, 1992).

1.2.3. El mercado del queso en México

La producción de derivados lácteos tales como el queso, de 2009 a 2014 aumentó en promedio 9.48 %, en la tabla 4 se pueden observar los valores de producción en toneladas.

El consumo per cápita anual de queso, se reporta en 2.83 kg en comparación con España que registra 8.02 kg y Francia que alcanza los 20 kg., la preferencia de consumo en México tiende a los quesos frescos, demanda que en su mayoría se satisface con la producción nacional, sin embargo, el elevado número de importaciones que en 2009 se registraron con un valor de 261,850,505 USD y para 2011 se reportaron 362,465,144 USD (Hervás, 2012), indica el crecimiento que se está dando también en la cultura del queso y el interés de otro tipo de productos más *gourmet* como lo son los quesos madurados.

Tabla 4. Elaboración de queso 2009-2014

Año	Producción (Toneladas)	Incremento (%)
2009	220,876	
2010	275,293	24.64
2011	275,411	0.04
2012	292,551	6.22
2013	315,555	7.86
2014	342,870	8.66
promedio		9.48

Fuente: SAGARPA, SIAP (2015)



Además de que ya se tiene como antecedente este crecimiento en la elaboración de queso, de acuerdo a las proyecciones para el sector agropecuario en México de 2009-2018 (SAGARPA, 2009), el consumo de queso se incrementará, pasando de 253 mil toneladas a 273 mil toneladas, por otra parte para el mismo período se estima que la producción incremente de 175 mil a 179 mil toneladas.

1.2.4. Proceso de elaboración

Estas operaciones pueden variar de acuerdo al tipo de queso que se pretende obtener y las características específicas que se deseen en el producto final pero a grandes rasgos son los siguientes pasos:

Recepción de la leche cruda, que es filtrada para la eliminación de impurezas, luego de la cual se somete a un tratamiento térmico que de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010 puede ser pasteurización lenta a 63 °C durante 30 min o rápida a 72 °C por 15 seg con el motivo de estandarizar la calidad microbiológica, destruyendo agentes patógenos y reduciendo enzimas no deseadas (Chamorro y Losada, 2002).

Después la leche se enfría hasta la temperatura de inoculación del cultivo láctico, que sustituye en parte a los microorganismos que se perdieron por la pasteurización y a su vez acidifican la leche y le dan las características específicas a la cuajada para el tipo de queso que se elaborará, por otro lado más tarde si el queso se madura, estos mismos microorganismos le producirán transformaciones (Chamorro y Losada, 2002).

Un cultivo láctico se define como una cepa o conjunto de cepas de microorganismos que se propaga o cultiva para inocularse en la leche, y así orientar una fermentación deseada que imparta propiedades sensoriales atractivas en un producto lácteo. Las principales funciones de un cultivo láctico son por un lado, abatir el pH al transformar la lactosa contenida en el medio en ácido láctico, lo cual promueve la coagulación de la leche y la sinéresis en la cuajada quesera y por otro, contribuir con características sensoriales en los productos liberando enzimas o metabolitos que participan en su maduración.

En la tabla 5 se muestran las principales bacterias lácticas utilizadas para la elaboración de quesos y algunas de sus características más importantes.

Tabla 5. Características notables de bacterias empleadas como cultivos lácticos para quesos

	<i>Lactococcus</i>				<i>Lactobacillus</i>			<i>Leuconostoc</i>	
	<i>Lcl</i>	<i>Lcd</i>	<i>Lcc</i>	<i>Sst</i>	<i>Lbdb</i>	<i>Lbh</i>	<i>Lbdll</i>	<i>Ll</i>	<i>Lmc</i>
Tipo de fermentación	homofermentativos							heterofermentativos	
Azúcares fermentables									
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Sacarosa	±	±	-	+	-	-	+	+	-
Grado de acidificación aproximadamente (°D)	80	40 a 80	80	60	180	200	180	<250	20
Clasificación por temperatura de crecimiento	Mesó-filo	Mesó-filo	Mesó-filo	Termó-filo	Termó-filo	Termó-filo	Termó-filo	Mesófilo	Mesófilo
Crecimiento a:									
15°C	+	+	+	-	-	-	-	+	+
39°C	+	+	-	+	+	+	+	+	-
45°C	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Temperatura óptima de crecimiento (°C)	30	30	30	45	45	45	45	30	30
Fermentación de citrato	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Función como cultivo	Acidez	Aroma	Acidez	Acidez	Acidez	Acidez	Acidez	Aroma	Aroma

Fuente: Villegas 2004. *Lcl*: *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *Lcd*: *Lactococcus lactis* spp *lactis* biovariedad *diacetylactis*, *Lbdb*: *Lactobacillus delbrückii* spp *Lactis*, *Lbh*: *Lactobacillus helveticus*, *Lcc*: *Lactococcus lactis* spp *cremoris*, *Lbdll*: *Lactobacillus delbrückii* spp *lactis*, *Sst*: *Streptococcus salivarius* spp *thermophiles*, *Ll*: *Leuconostoc lactis*; *Lmc*: *Leuconostoc mesenteroides* spp *cremoris*.

La diversidad de estos cultivos lácticos es amplia y de acuerdo a las características de cada uno, se pueden obtener resultados distintos de acuerdo a las propiedades deseadas en el producto final, así como el tipo de procedimiento que se llevará a cabo para su elaboración, puesto que las condiciones ideales para cada microorganismo son distintas y se pueden hacer diversas mezclas propiciando relaciones de simbiosis o de oposición logrando obtener una gran variedad de productos y por lo tanto de quesos diferentes.

Luego de la premaduración, a la leche se le debe adicionar cloruro de calcio (CaCl_2) que restituya el calcio precipitado durante la pasteurización para que esté disponible y actúe junto con las caseínas en la correcta formación del gel e incremente el rendimiento quesero. Alais (1988) indica que se requiere de 0.1 a 0.2 g/L de leche, siendo el punto intermedio entre la adición de los cultivos iniciadores y la coagulación, donde se da el cambio del estado de físico de la leche



de líquido a la formación de un gel que poseerá diferentes características en base a la forma en que se obtuvo.

Cuajar la leche implica desestabilizar las micelas caseínicas en constituyentes de la fase coloidal proteica dispersa, modificándolas para que interaccionen y formen una superestructura matricial, reticular, que por oclusión retiene agua y glóbulos de grasa, algo de lactosa, sales minerales, microflora y células somáticas (Villegas de Gante, 2004). La leche pierde su estado líquido y se transforma en gel por cualquiera de los siguientes procedimientos:

a) Por acidificación o precipitación ácida: Se basa en la gelificación de las caseínas de la leche o en su precipitación, lo que forma un coágulo debido a la acidificación de la fase sérica, producida por ácido láctico generado por fermentación o por adición de un ácido orgánico de grado alimentario (Villegas de Gante, 2004).

b) Por coagulación enzimática: consiste en añadir a la leche una enzima que tiene la capacidad de coagular el complejo de caseína. El coágulo es compacto, flexible, elástico, impermeable y contráctil. Estas características tienen una gran influencia en el desuerado y endurecimiento de la cuajada porque le permiten soportar las intervenciones mecánicas durante el proceso de fabricación (Amiot, 1991). El fenómeno de la coagulación enzimática de la leche puede dividirse en dos etapas básicas de acuerdo con Villegas de Gante (2004):

- **Fase enzimática o primaria:** donde la κ -caseína se hidroliza por acción de la renina del cuajo en el enlace (105 – 106) fenilalanina- metionina, lo que origina dos péptidos con propiedades marcadamente diferentes:
 - El macropéptido o caseinomacropéptido, es una molécula hidrofílica y soluble que se desprende de la micela caseínica y se difunde en el suero.
 - La para- κ -caseína, es una molécula fuertemente hidrofóbica, que tras la hidrólisis permanece “atada” a la micela.
- **Fase no enzimática o secundaria.** La hidrólisis progresiva de la κ -caseína durante la fase primaria altera las propiedades de las micelas, de tal manera que estas se tornan susceptibles a su agregación. La escisión del macropéptido a partir de la κ -caseína, reduce considerablemente la carga eléctrica superficial lo que disminuye así mismo el efecto estérico y permite el acercamiento o interacción de



las micelas caseínicas modificadas. Por lo que se agregan y forman una estructura de red tridimensional, que constituye la matriz de la cuajada quesera.

c) Por coagulación mixta: combinación de los dos procedimientos anteriores, acción conjunta del cuajo y la acidificación láctica. Se obtiene una cuajada mixta por la acción del cuajo sobre una leche más o menos ácida y por acidificación de un gel obtenido enzimáticamente (Amiot, 1991).

Una vez obtenida la cuajada se debe retirar parte del suero lo cual se puede llevar a cabo por medio de distintas acciones mecánicas que van a variar de acuerdo al tipo de queso. Generalmente se comienza cortando el coágulo en pequeñas partes cuyo tamaño depende del resultado deseado, también se puede llevar a cabo una agitación y elevación de temperatura en los granos de cuajada (Chamorro y Losada, 2002). Adicionalmente se puede llevar a cabo un trabajo de agitación en el que se puede o no subir la temperatura para promover una salida de suero más rápida, de 47 – 48 °C para quesos de pasta semicocida y de 54 – 56 °C para quesos cocidos que generalmente son los de maduración prolongada (Battistotti *et al.*, 1985), la sinéresis continúa incluso en las siguientes etapas de elaboración como lo son el moldeado, prensado, salado y maduración.

La cuajada ya drenada se coloca en el molde y de acuerdo al tipo de queso puede auto prensarse por la presión que ejerce sobre sí misma o ponerle peso adicional para obtener un queso más compacto y firme. El salado algunas veces se lleva a cabo antes del moldeado agregando sal directamente a la cuajada ya desuerada, otra manera es con el queso ya formado, frotando la superficie con sal o por una inmersión en salmuera que generalmente es utilizada por los fabricantes de queso madurado, algunos incluso son lavados con sal periódicamente. Esta operación además de potencializar el sabor, acelera el proceso de secado, promueve la formación de corteza y aumenta su vida útil disminuyendo la proliferación de microorganismos (Nantet *et al.*, 1994).

Finalmente si el queso se va a madurar, durante esta etapa se dan una serie de procesos microbianos, que producen importantes cambios químicos en la composición y estructura del queso y en consecuencia en su flavor y su textura (Walstra, 2001), y para lograrla hay ciertos



parámetros que se deben tomar en cuenta como la temperatura de la cámara, la cual debe encontrarse alrededor de los 12 °C con una humedad cercana al 90 % (Nantet *et al.*, 1994). Esto no aplica a todos los quesos pues algunos requieren de condiciones más particulares.

De acuerdo a Eck (1990) la maduración es la etapa final durante la cual los quesos atraviesan varias transformaciones bioquímicas y fisicoquímicas debido a una serie de reacciones sobre los componentes contenidos en la cuajada logrando que una pasta dura y compacta cambie su estructura y su aspecto acentuando su sabor y aroma pues la leche, luego del cuajado y el desuerado se convierte en un sustrato que se compone principalmente de caseínas, grasa y algunos componentes solubles, los cambios generados gracias a la maduración, se ven influenciados por el tamaño y forma del queso que adicionalmente contiene microorganismos y enzimas provenientes de diversas fuentes, gracias a todo esto durante el proceso de afinación ocurre una digestión enzimática en la que los componentes originales se transforman modificando las características generales del producto (Jack y Paterson, 1992).

Para llevarse a cabo este procedimiento, se hace bajo ciertas condiciones como control de humedad y temperatura de almacenamiento, las cuales de acuerdo a McGee (2004) ayudarán a determinar el contenido de humedad en el queso y por tanto el crecimiento de los microorganismos y la actividad enzimática que hacen posibles las características particulares del producto final tales como la textura y el desarrollo de sabores y aromas, a su vez la pérdida de humedad que se da con una maduración prolongada también tiene repercusiones en la textura, ya que con el paso del tiempo, la evaporación del agua comienza a incrementar el extracto seco sobre el peso total del queso (Gómez, 2012).

Eck (1990) nos explica que la modificación en mayor o menor medida de los componentes se da por medio de una degradación de los mismos así como la influencia que pueden tener sobre el desarrollo microbiano o la actividad enzimática actuando como sustratos, las degradaciones pueden ser de distintos tipos y pueden ser simultáneas o sucesivas donde un mismo componente puede generar diferentes productos y el compuesto puede tener diversos orígenes haciendo posible la formación de un gran número de compuestos distintos a través de las diversas combinaciones posibles.



Por otro lado la complejidad en el proceso puede estar dada por la variedad de microflora hallada en el producto, ya que las diferentes combinaciones pueden dar como resultado asociaciones determinadas que pueden ser de simbiosis o de oposición, la flora microbiana evoluciona, algunas especies pueden desarrollarse y otras desaparecer por lo que a lo largo del afinado se observa la acción metabólica de diversos microorganismos lo que implica un gran número de sistemas enzimáticos (Villegas de Gante, 2004). Por ejemplo, Tunick (2014) expone que las bacterias ácido lácticas del cultivo mueren durante la maduración del queso, abriéndose y expulsando su contenido celular que incluye enzimas responsables de la formación de sabor y textura, a su vez al desaparecer algunos microorganismos otros comienzan a dominar, tal es el caso de los lactobacilos agregados una vez que los lactococos terminan su ciclo y la lactosa remanente es metabolizada por los microorganismos sobrevivientes.

Respecto a las enzimas Eck (1990), explica que las involucradas en la elaboración del queso, provienen de fuentes variadas como las originarias de la leche, algunas remanentes del cuajo utilizado así como las producidas por los microorganismos encontrados en el queso que provienen tanto de la leche como de los fermentos empleados para la acidificación de la leche, de la salmuera, la atmósfera o el material de quesería.

También menciona que se han aislado e identificado más de 20 enzimas nativas de la leche; a pesar de la gran variedad que contiene y que existe intervención de todas, las principales son:

- **Lipasa:** una lipoproteína que en estado nativo se encuentra asociada a la micela de caseína y cuya migración al suero es favorecida por la acción de la sal, su acción depende de la cantidad retenida en la cuajada y el estado de la membrana de los glóbulos grasos.
- **Proteasas:** se ha establecido la presencia de dos enzimas proteolíticas que están asociadas a las micelas de caseína, por un lado está la plasmina que es una proteasa alcalina y es el principal componente del sistema proteolítico nativo. También está la proteasa ácida cuya acción es preferentemente sobre la caseína α_{s1} . La actividad de estas enzimas en la leche es apreciable y un tratamiento a 72 °C durante 15 seg la aumenta entre un 30 – 40 %.



En general todos los cambios bioquímicos ocurridos en la maduración están agrupados en primarios, que incluyen el metabolismo residual de la lactosa en ácido láctico, la lipólisis y proteólisis, luego de esta fase primaria, están los eventos bioquímicos secundarios que constan del metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos que son importantes para el desarrollo de compuestos volátiles de sabor McSweeney (2004).

Gómez (2012) describe en pocas palabras los dos procesos más importantes ocurridos durante la maduración del queso, la proteólisis que es una degradación de proteínas provocada tanto por los fermentos como por la acción del cuajo y que tiene influencia en la textura y aromas del producto final, además de generar un ablandamiento de la pasta pudiéndose obtener un producto unttable y cremoso, sin embargo, de acuerdo a las características iniciales del queso y su proceso de elaboración podría obtenerse un resultado opuesto. Por otro lado está la lipólisis es decir la degradación de la grasa que es fundamental para el desarrollo de aromas y es ocasionada por las lipasas de la leche o los fermentos lácticos. No obstante, estos fenómenos tienen una gran complejidad que implica una serie de cambios bioquímicos.

En los quesos madurados es característico encontrar una gran variedad de aromas y sabores que son mucho más intensos que aquellos percibidos en quesos frescos, McGee (2004) explica que esta complejidad se desarrolla debido a que las enzimas de la leche y el cuajo así como los microorganismos que descomponen la proteína y grasa concentradas en un amplio rango de compuestos de sabor, más concretamente, las largas cadenas proteicas de las caseínas se rompen formando péptidos algunos de los cuales aún no tienen sabor, otros amargos, usualmente estos se descomponen por enzimas microbianas resultando en los 20 aminoácidos, varios de los cuales tienen sabores. Estos aminoácidos se convierten en aminos, algunas de las cuales evocan al pescado (trimetilamina), carne echada a perder (putrescina), compuestos de azufre, aunque estos aromas no suenan como aromas deseables, ligeras notas de este tipo de compuestos juntos, crean la complejidad y riqueza de sabores en el queso.

En muchas variedades de quesos, la hidrolisis inicial de las caseínas es causada por el coagulante y en menor grado por la plasmina, que resulta en la formación de péptidos largos (insolubles en agua) y medianos (solubles en agua), que se degradan por enzimas (Delgado *et al*, 2015), provenientes de las distintas fuentes antes mencionadas.



La descomposición de proteínas tiene un rol importante, no solo en el desarrollo de aroma y sabor sino en las propiedades deseadas de textura de un queso, la proporción, grado y patrón de proteólisis durante la maduración del queso así como la cantidad y naturaleza de degradación de los productos puede variar de acuerdo a las enzimas involucradas, tipo de queso y condiciones ambientales (Sánchez *et al*, 2001), siendo determinante para las propiedades del producto final.

La textura del queso atraviesa una transformación durante las primeras 2 semanas de maduración, cuando la caseína α_{s1} es hidrolizada por las proteasas presentes en el cuajo para producir péptidos, lo que resulta en un debilitamiento de la red proteica, los cambios subsecuentes son relativamente lentos y dependen de la proporción de la proteólisis afectado por el cuajo agregado y por la plasmina (Jack y Paterson, 1992).

La concentración de sal en humedad también afecta, según Sánchez *et al.* (2001) el cloruro de sodio (NaCl) tiene influencia en la maduración principalmente a través de su efecto en la actividad de agua, pero también actúa sobre el crecimiento bacteriano y actividad enzimática, sinéresis y propiedades físicas de las proteínas que a su vez influyen en la textura, solubilidad proteica y probablemente la conformación de las proteínas.

Todos los cambios tempranos en la maduración referentes a la textura del queso se reflejan en una disminución de la fuerza requerida para la fractura, la firmeza se relaciona con el contenido de caseínas α_{s1} intactas, conforme los productos de descomposición de las proteínas tienden a disolverse, reduciendo la integridad estructural de la matriz. Además mientras cada enlace peptídico se rompe, los dos nuevos grupos iónicos generados reducen la cantidad de agua libre en la matriz al incrementar la solvatación de las cadenas proteicas. Por tanto los quesos endurecen con la edad, ganando resistencia a la deformación. La matriz proteica también se hace menos cohesiva y el queso se derrite con mayor facilidad. La heterogeneidad en la textura resulta por el secado de la corteza (Jack y Paterson, 1992).

Por otro lado, está la grasa que como McGee (2004) explica, se descompone en ácidos grasos algunos de los cuales tienen un efecto picante en la lengua y un intensificado aroma a oveja o cabra. Entre más variedad de enzimas de maduración, la colección de fragmentos de grasa y proteína es más compleja resultando en un sabor más rico.



1.2.4.1. *El salado en el queso*

El salado es una de las formas más antiguas para la preservación de los alimentos, junto con la fermentación y la deshidratación fue uno de los métodos clásicos de conservación. La sal fue tan importante en tiempos medievales que se llegó a usar como medio de pago (Fox *et al.*, 2004).

De acuerdo a Guinee (2004) los propósitos del salado en el queso son múltiples, van desde tener un correcto desuerado de la cuajada, contribuir al sabor, la conservación del producto a través de la regulación de la actividad acuosa que controla la microflora durante la curación y la formación de corteza. Los métodos más utilizados para el salado de un queso de acuerdo García *et al.* (2004) son:

1. **En seco:** Frotando con sal la superficie del queso ya moldeado distribuyéndola por ambas caras y alrededor de la manera más uniforme posible.
2. **Directo:** La sal se agrega a la cuajada que ha sido desuerada y luego se introduce en los moldes para formar el queso.
3. **Inmersión:** una vez formado el queso se sumerge en una disolución de NaCl en agua.

En los últimos años, otras tecnologías han sido aplicadas con la intención de perfeccionar algunos aspectos durante el salado del queso, por ejemplo las pulsaciones al vacío que intentan disminuir el tiempo requerido para la adición de sal por medio de una salmuera (González *et al.*, 2002; Messens *et al.*, 1999).

1.2.4.1.1. *El salado por salmuera*

Jonson y Paulus (2005), explican que en este tipo de salado los iones de sodio y cloro se mueven dentro del queso, esto debido a la diferencia de presión osmótica entre la salmuera y la humedad del queso, de esta forma se da un intercambio en el cual el agua se difunde afuera del queso y la sal entra a la matriz del mismo hasta alcanzar un equilibrio. Por otro lado al retirar el queso de una salmuera, su contenido de sal en la superficie y en el centro es significativamente diferente, ésta va disminuyendo conforme pasa el tiempo y se unifica, esto puede tardar meses o en ocasiones no llegar a ocurrir (Battro, 2010). Respecto a esa diferencia de sal al centro del queso, Triviño (2010) puntualiza que se obtiene un producto con un pH bajo pues los



microorganismos iniciadores continúan la fermentación láctica lo cual afecta el curso de maduración.

Para utilizar este tipo de salado, se deben tomar en cuenta diferentes características con las que debe contar la salmuera, Battro (2010), contempla una disolución saturada de 0.320 kg / L. También recomienda que el queso esté a una temperatura similar a la de la salmuera para evitar que el choque térmico ocasione problemas en el queso tales como rajaduras.

El contenido de calcio también afecta en el sistema, debido a que se mantiene en movimiento migrando adentro y afuera del queso tratando de equilibrar la concentración por lo cual lo ideal es controlar que el nivel de calcio del queso y el de la salmuera coincida, así que al preparar ésta última, se debe añadir CaCl_2 (Jonson y Paulus, 2005). La salmuera permite un salado más uniforme, pero tiene las desventajas de requerir más trabajo, mejor organización del tiempo y por consecuencia mayores costos además de que requiere un control complejo (GanAfrica, 2012).

En un estudio llevado a cabo por la Universidad de Winsconsin-Madison sobre la influencia del procedimiento de salado en la composición del queso tipo Muenster se concluyó que las diferencias entre un queso con un método de salado y otro no eran significativas por lo que se podía elaborar el queso con cualquiera de los salados probados, en éste se apelaba a la importancia de disminuir las descargas de cloruros al ambiente provocadas por el subsecuente desecho de la salmuera utilizada (Ponce de León *et al.*, 2000).

Además del problema de las descargas de cloruros podemos también notar la dificultad que puede conllevar el mantener una salmuera con los parámetros adecuados para el salado del queso, pues al manejarse por medio de presiones osmóticas, al mismo tiempo que la sal penetra la matriz del queso, el suero junto con algunas proteínas, grasas y bacterias pasa a la salmuera cambiando el pH, la concentración de sal (que tiene que ser frecuentemente ajustada), y en especial la calidad microbiológica; por ejemplo *Listeria monocytogenes* es un microorganismo capaz de sobrevivir en la salmuera aun con altas concentraciones de NaCl que a su vez puede desarrollarse en la superficie del queso que ha sido retirado de la misma (Jonson y Paulus, 2005).



El método principal para el tratamiento de la salmuera es el filtrado por membranas que retira lo que dejó el queso tras su paso por la salmuera pero dejando el sodio, calcio e hidrógeno en ella, la gran desventaja es el alto costo de estas tecnologías. Otra opción es descremar la salmuera fría, pasteurizar y finalmente filtrarla a través de una tela, esto supone además de contar con el equipo necesario, mayor cantidad de trabajo lo cual lo convierte en una técnica poco práctica (Jonson y Paulus, 2005).

En un artículo de la Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay se hizo un estudio para determinar si el salado por impregnación en vacío afectaba la maduración del queso comparado con la inmersión en salmuera, no se encontraron diferencias significativas en la proteólisis y la evolución de bacterias y aunque los análisis mostraron una diferencia de NaCl en la cáscara y en el agua de los quesos por impregnación al vacío, la evaluación sensorial no reveló una diferencia significativa (Crosa *et al.*, 2009). En la tabla 6 se presentan algunos trabajos de investigación concernientes al salado en queso.

Tabla 6. Investigaciones de salado en queso

Autores	Artículo	Resultados
Fucà <i>et al.</i> , 2012	<i>Effect of brine composition and brining temperature on cheese physical properties in Ragusano cheese.</i>	Concentración de salmuera (NaCl y Ca ²⁺) Cambios estructurales (microscopía) Peso y volumen: ↓NaCl = expulsión de suero ∴ menor volumen y peso. ↓Ca ²⁺ = interacciones proteicas apretadas (expulsión de suero ∴ menor peso.
Ying and McMahon, 2014	<i>Effects of sodium chloride salting and substitution with potassium chloride on whey expulsion of cheddar cheese</i>	Reducción de 1/3 de NaCl, disminuye sinéresis un 80% 2/3 NaCl + 1/3 KCl = sinéresis que 3/3 NaCl
González <i>et al.</i> , 2002	<i>Development of salt profiles on Manchego type cheese during brining. Influence of vacuum pressure</i>	Usando vacío se aumenta la cinética de salado debido a la promoción de transporte hidrodinámico junto con la difusión en la fase líquida del queso.
Messens <i>et al.</i> , 1999	<i>Transport of sodium chloride and water in Gouda cheese as affected by high-pressure brining</i>	Usando vacío en salado de Gouda no se reduce el tiempo de salado ni el tiempo de equilibrio de sal durante su maduración
Paulson <i>et al.</i> , 1998	<i>Influence of Sodium Chloride on Appearance, Functionality, and Protein Arrangements in Nonfat Mozzarella Cheese</i>	Queso s/salar = agregados grandes de proteínas con bolsas de suero libre dentro de la matriz proteica Salado: Estructura más homogénea y proteínas más hidratadas = mejor fundido Mejor formulación: 1.0 % de NaCl antes de estirar con H ₂ O contenido final = 0.4 %



1.1.1.1.1. El salado directo y el suero salado

Al llevar a cabo el proceso de salado directo a través del cual la sal es agregada al cuajo aun sin moldear y mezclado uniformemente en toda la pasta, la sal se dispersa en los granos de cuajada y se disuelve en la humedad superficial, luego de lo cual se difunde al interior de las partículas de la cuajada. Esto lleva a un encogimiento que incrementa la sinéresis del suero, la mayor parte de este se expulsa durante el prensado (Gilbert, 1979; Sutherland, 1974), entre 60 y 80 % es recolectado en esta etapa y se conoce como suero salado, aproximadamente 7 a 9 kg de suero salado es producido por 100 kg de cuajada salada (Sutherland, 1974).

La cantidad de suero de leche producido en el mundo aumenta cada día por lo que se han buscado formas de aprovechamiento tales como la elaboración de distintos productos a base del mismo, extractos proteicos utilizados como complementos alimenticios etc., teniendo en el mercado una gran variedad de ellos, sin embargo, al suero salado no se le puede dar el mismo uso que el dulce debido a su alta salinidad y su alta demanda química y biológica de oxígeno (Sanderson *et al.*, 1996; Zayed and Winter, 1995)

En el pasado la mayoría de las instalaciones de fabricación lo desechaban en tierras, incrementando el nivel de cloruros en el suelo elevando así el riesgo de daños a las cosechas (Rao y Wendorff, 2003; Parmentier, 2000), por otro lado el contenido de cloruros del agua para consumo no debe exceder 250 mg / L, la preocupación por la toxicidad por cloruros ha hecho que la actividad regulatoria para controlar los niveles de descargas de cloruros en el agua, estas disposiciones dificultan a las queserías el disponer del suero salado (Nair *et al.*, 2004).

Debido a lo mencionado anteriormente, es que se han propuesto diversas soluciones desde procesos como el de Gregory (1988) para la utilización de este suero en el que usó membranas de nanofiltración logrando remover 90 % de la sal contenida y 80 % de sólidos del suero que podrían ser incorporados en el suero dulce. Sanderson *et al.* (1996) llegó un poco más lejos pues además concentró el permeado que contenía la sal por evaporación y lo usó para salar otros quesos. Más investigaciones han demostrado que el suero salado puede ser utilizado para producir ácido láctico utilizando cultivos inmovilizados (Zayed y Winter, 1995; Zayed y Zahran, 1991) o producir levadura de proteína (Zall y El-Samragy, 1988).



Distintas aplicaciones de este tipo de suero se han intentado, por ejemplo como ingrediente en quesos procesados en los cuales un máximo de 7.6 % de la fórmula de un alimento a base de queso procesado podría ser reemplazado por suero salado (Kapoor y Metzger, 2004). No obstante, estudios más recientes de Janevski *et al.* (2012) han logrado maximizarlo logrando hasta un 13 % de este reemplazo y mejorando las características de fundido del queso.

El total de suero salado producido por la elaboración del queso cheddar fue aproximadamente 127 millones kg, y de acuerdo a un estudio realizado por Kapoor y Metzger (2004) aproximadamente 55 % del producido en estados unidos podría ser aprovechado en la elaboración de un queso procesado, además existe la posibilidad de usarse en productos de queso procesado así como imitaciones de queso, también se concluyó que el uso de suero salado como ingrediente en quesos procesados es una alternativa atractiva que podría significar una reducción de costos generados por la disposición de este subproducto.

También Nair *et al.*, en el 2004 realizó un estudio para evaluar los efectos de diferentes tecnologías de elaboración quesera tales como homogeneización de la grasa, ultrafiltración y condensación de la leche por vacío en la retención de sal en el queso cheddar logrando incrementarla gracias a la homogeneización y en menor medida a la condensación, de esta manera podrían disminuirse también las descargas de cloruros al tener menor pérdida de los mismos en el suero.



2. Justificación

El salado es una etapa de gran importancia para la elaboración de queso ya que tiene diversas funciones en su proceso como potenciar su sabor, influir en la textura y contenido de humedad, la técnica utilizada para llevarlo a cabo depende de las características deseadas en el producto final.

La inmersión en salmuera es por tradición el método más utilizado para la producción de quesos madurados pero también porque requiere un menor esfuerzo al tener la posibilidad de salar todo el queso simultáneamente y en un paso lo que aparentemente lo convierte en la técnica más práctica para llevarlo a cabo, sin embargo, conlleva una serie de cuidados meticulosos para mantener las características necesarias para un correcto salado además del riesgo que puede implicar el que se contamine de algún microorganismo patógeno como *Lysteria monocytogenes*.

Los tratamientos para la salmuera pueden ser caros o poco prácticos y en ocasiones los productores de queso no toman en cuenta los efectos que un mal uso de salmuera pueden traer, por otro lado al desechar la salmuera también se ve afectado el medio ambiente por la cantidad de descargas de cloruros generadas.

Aunque el salado directo en el queso genera suero salado que no puede utilizarse para la obtención del mismo tipo de subproductos que el suero dulce, algunas investigaciones han logrado su desalinización pudiéndose reintegrar los compuestos recuperados al suero dulce posteriormente aprovechado o logrando agregar directamente el suero salado en la elaboración quesos procesados, lo que ayudaría a disminuir aún más las descargas de cloruros explotando parte de ese residuo.

Dado que un salado directo en pasta requiere menos espacio para realizarse, que no necesita de algún tipo de cuidado especial a diferencia de las condiciones requeridas por la salmuera y que las descargas de cloruros son menores en el salado directo, es necesario llevar a cabo un estudio que nos indique si las características texturales y fisicoquímicas de un queso salado por adición directa en pasta pueden ser similares a las de uno que fue sometido a tratamiento de salmuera y evitar los problemas generados por el procesamiento del queso de



pasta dura en esta etapa. Teniendo una base científica del método de salado, se puede extrapolar a la aplicación tanto a nivel industrial como artesanal.



3. Hipótesis

Si se utiliza el salado directo en la cuajada de un queso de pasta dura, entonces se obtienen características fisicoquímicas y texturales similares a las del queso salado mediante proceso tradicional (salmuera).



4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del salado directo sobre las características fisicoquímicas, texturales y aceptación de un queso de pasta dura.

4.2. Objetivos específicos

- Establecer los parámetros de elaboración del queso de pasta dura.
- Evaluar el efecto del salado directo sobre las características fisicoquímicas y texturales del queso de pasta dura durante su maduración comparándolo con un proceso de salado tradicional (salmuera).
- Evaluar la calidad microbiológica de cada uno de los quesos de pasta dura obtenidos como parámetro de control.
- Evaluar el efecto del salado directo sobre la aceptación por parte del consumidor del queso de pasta dura.



5. Metodología

El presente trabajo se llevó a cabo en 3 etapas las cuales se presentan a continuación:

5.1. Etapa 1 Estandarización de las técnicas de análisis para la leche el queso duro

En esta etapa se determinaron las técnicas más apropiadas para llevar a cabo los análisis, en el caso de la leche se utilizaron los métodos estándar marcados por la norma mientras que para el queso se hizo una búsqueda de los diferentes métodos disponibles para determinar sus características, entre las cuales se encuentran la determinación de proteínas, grasa, humedad, cenizas, acidez titulable, cloruros, pH, electroforesis, pruebas de textura y análisis sensorial. Se probaron algunos de los métodos lo cuales debieron ser ajustados debido a las características particulares de muestra al ser un queso madurado, determinando los parámetros para poder obtener los resultados requeridos.

Por otro lado se estableció la formulación del queso y los parámetros específicos del procedimiento a seguir para su obtención que se presentan a continuación:

5.1.1. Obtención de materia prima

Para la elaboración del queso se utilizó un mezcla de leches de vaca de las razas Holstein y Parda Suiza obtenida de la Posta de la Universidad Autónoma del Estado de México, se le tomaron muestras para llevar a cabo un análisis por medio de pruebas básicas como la toma de temperatura, la densidad por medio de lactodensímetro, determinación de grasa butírica por el método Gerber, obtención de pH con potenciómetro y acidez titulable, todos de acuerdo a la NOM-155-SCFI-2012 para el aseguramiento de la calidad higiénica de la materia prima.

5.1.2. Parámetros de elaboración del queso

Una vez recolectada la materia prima se procedió a su estandarización a 4.2 % de grasa butírica y pasteurización por el método HTST calentando la leche hasta una temperatura de 72 °C durante 15 seg a fin de destruir microorganismos patógenos que puedan estar presentes, evitando así alterar las características fisicoquímicas y de calidad, posteriormente se procedió al



rápido enfriamiento por medio de baño maría invertido para evitar la exposición a temperaturas que provocan crecimiento de microorganismos y alcanzar las condiciones óptimas para la adición de cultivos lácticos (38 °C).

Se llevó a cabo la inoculación controlada de 2 unidades de cultivo láctico liofilizado Lyofast MOT 096 FE (SACCO, Italia) que consta de los siguientes microorganismos: *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus*; los cuales llevaron a cabo la fermentación láctica y acidificaron la leche que se dejó reposar 50 min; transcurridos los primeros 30 min de la fermentación se adicionó el CaCl₂ en una concentración del 0.02 % respecto a la leche, éste fue previamente diluido 10 veces su volumen en agua a fin de distribuir homogéneamente y así recuperar el calcio perdido durante la pasteurización; al finalizar éste tiempo se tomó medición de pH y de acidez titulable como control de la pre-fermentación llevada a cabo en la leche, para su posterior coagulación bajo las condiciones ideales.

A Continuación se adicionó cuajo animal en la proporción marcada en las indicaciones del fabricante (1:10000) y diluido 10 veces su volumen en agua para una homogénea distribución, se dejó a una temperatura constante de 35 °C por un periodo de 55 min permitiendo la coagulación, luego de lo cual se llevó a cabo el corte de la cuajada utilizando liras horizontal y vertical de acero inoxidable para obtener pequeños cubos de aproximadamente 3 mm a fin de tener una mayor exposición de la superficie y promover la sinéresis. Posteriormente se realizó el trabajo de grano en tina de acero inoxidable agitando la cuajada y utilizando una rampa de temperatura hasta llegar a 39 °C incrementando aproximadamente 1 °C cada 5 min a fin de obtener una consistencia de adhesión que permitiera la formación del queso y a su vez continuar con el proceso de sinéresis.

Ya alcanzada la temperatura deseada la cuajada se dividió en dos partes y se pre-prensó durante 5 min con un peso de 266.66 g / L de leche para promover la adhesión de la cuajada formando bloques, en seguida una de las cuajadas se saló utilizando sal refinada en el porcentaje obtenido por las pruebas preliminares, distribuyéndola lo más homogéneamente posible.



Ambas cuajadas se introdujeron en moldes perforados de polietileno en porciones con un peso de 450 g para poder dar forma, se procedió al prensado por medio de una prensa mecánica durante un periodo de 18 hr para lograr la compactación de la cuajada, una pasta uniforme y el desuerado de la misma.

Transcurrido el tiempo de prensado los quesos cuya cuajada no fue previamente salada se sumergieron en una salmuera al 23 % con una temperatura de 12 °C durante el periodo de tiempo arrojado por las pruebas preliminares.

Finalmente se llevó a cabo la maduración en una cámara con condiciones controladas de HR a 80 % y temperatura de 12 °C durante 90 d.

5.2. Etapa 2 Evaluación de la cantidad de sal para la adición directa en pasta y de tiempo de inmersión en salmuera.

Utilizando el procedimiento previamente descrito se elaboraron quesos en un formato de 45 g, los moldes eran de medidas escaladas 1:10 de los moldes que se utilizaron para luego hacer los quesos de formato 450 g, en ésta etapa se utilizaron las dos variables de salado en diferentes niveles, en el salado directo (SD) la cuajada se dividió en 5 partes utilizando diferentes concentraciones de sal que fueron adicionadas en cada una (1.0 %, 1.5 %, 2.0 %, 2.5 % y 3.0 %), mezcladas para homogeneizar el contenido de sal y proceder al moldeado inmediatamente. Por otro lado los quesos que se utilizaron para salado por salmuera (SS) se sumergieron por diferentes periodos de tiempo (10, 20, 30, 40, 50 y 60 min), se escurrieron y pusieron a madurar en cámaras a 12 °C con una humedad relativa de 80 % durante 9 d. Todos los quesos con los diferentes tratamientos se elaboraron por triplicado.

Transcurrido el tiempo indicado se hicieron distintas pruebas en cada uno de los quesos, primero se tomaron mediciones de color por medio de un espectrofotómetro, obteniendo los parámetros de color L*, a* y b* de acuerdo al modelo CIELAB, luego se llevó a cabo una medición de textura por medio de pruebas de corte y de penetración seguida de una medición de cloruros por el método Mohr para poder determinar la concentración adecuada de sal para los quesos por SD comparándolas con las de los quesos sumergidos en salmuera (SS) para también determinar el tiempo necesario de inmersión, los cuales se eligieron de acuerdo a los resultados



arrojados en el análisis estadístico que revelara que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en los parámetros previamente mencionados.

5.3. Etapa 3 Evaluación de las características fisicoquímicas, texturales y microbiológicas durante la maduración.

Una vez obtenidos los parámetros de salado del queso se llevó a cabo la corrida experimental elaborando quesos de 450 g bajo el procedimiento ya establecido y los tratamientos de salado que se comprobó en la etapa anterior que eran los más adecuados para la elaboración y éstos se maduraron por un periodo de 90 d (proyección de los 9 d utilizados en la etapa 2 para un queso a una escala 1:10) en las cámaras con las condiciones previamente mencionadas y de los cuales se hizo una toma de muestra en los d 15, 30, 45, 60, 75 y 90 para hacer un seguimiento de los diferentes parámetros del producto a lo largo de su maduración y observar así la evolución para cada tratamiento, lo anterior se consiguió por medio de pruebas que constaron de análisis fisicoquímicos, microbiológicos y de textura así como un test de evaluación sensorial de escala hedónica, los métodos utilizados se describen a continuación.

5.4. Métodos analíticos

5.4.1. Pruebas en leche

Fueron llevadas a cabo de acuerdo a la NOM-155-SCFI-2012

5.4.1.1. Determinación de densidad

Se tomó una muestra de 250 mL de leche que se colocó en una probeta, se introdujo un lactodensímetro y se giró para tomar nota de la lectura de densidad y temperatura, la medida, al no ser tomada a 15 °C, se hizo el ajuste tomando en cuenta que cada grado centígrado varía el peso específico en 0.0002, sumándose esta corrección en el caso donde la temperatura fue mayor y restándose, si cuando fue menor.

5.4.1.2. Determinación de grasa

La determinación de grasa en leche se hizo por el método de Gerber utilizando un butirómetro en el cual se introdujeron 10 mL de ácido sulfúrico al 90.5 %, se adicionaron 11 mL



de leche cuidadosamente sin que tocara el cuello del butirómetro ni se mezclara con el ácido apoyando la punta de la pipeta lateralmente y lo más bajo posible en el borde del butirómetro formando una capa encima del ácido, se añadió 1 mL de alcohol isoamílico, se tapó y se procedió a agitar el butirómetro hasta que los líquidos quedaron bien mezclados, utilizando un guante aislante para evitar quemaduras. Los butirómetros fueron centrifugados y se procedió a la lectura ayudándose de la llave para ajustar la línea divisora de la grasa en la primera línea de graduación, la medición se representó en porcentaje.

5.4.1.3. Determinación de acidez titulable

Se tomó una muestra de 9 mL de leche y se colocó en un matraz Erlenmeyer, se adicionaron 4 gotas de fenolftaleína al 2 % como indicador y se tituló con una bureta con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N hasta el viraje a color rosa tenue, el porcentaje de ácido láctico se expresó utilizando la fórmula:

$$V \text{ de NaOH} \times 0.009 = \text{partes de ácido láctico en 10 mL}$$

5.4.1.4. Determinación de pH

Se tomó una muestra de 25 mL de leche en un vaso de precipitados y se usó un potenciómetro Conductronic pH10 (Puebla, México) que se calibró utilizando disoluciones buffer de 4.0, 7.0 y 10.0, se introdujo en la muestra y se tomó la medición.

5.4.2. Pruebas en Queso

5.4.2.1. Determinación de proteínas

Se llevó a cabo por el método Kjeldahl descrito por Lynch *et al.*(2002), para el cual se tomó una muestra de 2 g de queso finamente picado, se llevó a cabo la digestión en una unidad Büchi K-424 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) por medio de la adición de 20 mL de ácido sulfúrico al 98 % y 2 pastillas catalizadoras durante un aproximado de 5 hr hasta que la muestra se volvió de un color azul/verde transparente sin puntos negros, se dejó enfriar totalmente el equipo, luego de lo cual se agregaron 50 mL de agua destilada y se disolvió la muestra a la que se le agregó NaOH al 32 % hasta que el equipo de destilación Büchi K-350 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) indicó 150, se recibió el destilado en un matraz



que contenía 60 mL de ácido bórico al 2 % y 3 gotas del indicador Mortimer, se tituló con una disolución de ácido clorhídrico 0.1 N hasta el viraje a color naranja brillante y se realizaron los cálculos con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \left(\frac{(\text{HCl gastado en muestra} - \text{HCl gastado en blanco}) \times \text{molaridad (0.014)} \times \text{Normalidad}}{\text{Peso de la muestra}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times \text{factor (6.38)}$$

5.4.2.2. Determinación de grasa

Para determinar la grasa en el queso se utilizó el método Gerber, (ISO 3433:2008), se pesaron 3 g de queso finamente picado en la copa perforada del tapón, ésta fue después insertada en el butirómetro para queso y se agregaron 15 mL de ácido sulfúrico al 63 %, se tapó el butirómetro, se colocó en baño María por 30 min a 65 °C, agitando constantemente. Posteriormente se añadió 1 mL de alcohol isoamílico y ácido sulfúrico suficiente para llegar a la marca de 35 % del butirómetro que se volvió a tapar, se agitó y se puso 5 min más en baño María a la misma temperatura. Se centrifugó a 1100 rpm por 5 min y se procedió a tomar la lectura. En los casos en los que no fue posible, se colocó en baño María por 5 min más. El resultado se expresó en porcentaje.

5.4.2.3. Determinación de Humedad

Se utilizó el método del AOAC 926.08:1990 de secado en una estufa Novatech E-180-ED-ESP (Tlaquepaque, México) que se precalentó a 102 °C. Se pesaron 5 g de muestra del queso finamente picado, se colocó en una charola de aluminio y se secó por cuatro hr. Se dejó enfriar la muestra en un desecador y se pesó para hacer el cálculo por diferencia de peso y en porcentaje de humedad.

5.4.2.4. Determinación de cenizas

Para ésta técnica se utilizaron las muestras previamente secadas en la prueba de humedad (AOAC 935.42:1990), la muestra se carbonizó lentamente evitando desprendimiento de humos, se colocó la charola de aluminio con la muestra dentro de la mufla (62700, Barnstead Thermolyne, Dubuque, Iowa) para calcinar a 550 °C revisando cada 2 hr hasta verificar que las



cenizas estuvieran blancas o ligeramente grisáceas. Se colocaron en un desecador, se registró el peso de charola de aluminio con cenizas y se obtuvo el resultado conforme a la fórmula:

$$\% \text{ cenizas totales} = (C-A) \times 100 / B$$

$$g \text{ cenizas} / 100 g \text{ muestra} = (C-A) \times 100 / B$$

Donde:

C= peso de la charola con cenizas

A = peso de charola

B = peso de la muestra

5.4.2.5. Determinación de pH

El pH se determinó utilizando un electrodo de inserción modelo HI 99161 (Hanna Instruments Romania) que se calibró usando disoluciones buffer de 4.0 y 7.0, se introdujo en el centro de la muestra y se tomó la medición.

5.4.2.6. Determinación acidez titulable

Se llevó a cabo de acuerdo al método del AOAC 920.24:2000 para el cual 10 g de queso finamente picado se colocaron en un matraz de 150 mL al cual posteriormente se le adicionaron 100 mL de agua desionizada a 40 °C, se dejó reposar hasta que la temperatura disminuyera y se filtró el líquido que posteriormente se separó distintos matraces conteniendo 25 mL cada uno, posteriormente se les agregó 1 mL de fenolftaleína al 2 % como indicador. Con ayuda de una bureta, utilizando NaOH 0.1 N, se tituló hasta el viraje a rosa tenue.

5.4.2.7. Determinación de cloruros

Se llevó a cabo por el método Mohr, modificando el método de referencia para contenido de NaCl en mantequillas (Fil 12A 1969). Se pesaron 0.15 g de muestra molida en mortero que se colocó en un matraz Erlenmeyer y se le adicionaron 75 mL de agua destilada hirviendo, dejando reposar 15 min agitando de vez en cuando a fin de solubilizar el NaCl presente en la muestra, cuando se llegó a una temperatura de 50 a 55 °C se tituló con nitrato de plata al 0.1 N en



presencia de cromato de potasio (K_2CrO_4) al 5 % como indicador hasta la aparición de un color naranja. Se realizó un ensayo en blanco para continuar con la expresión de resultados a partir de la siguiente fórmula:

$$\%NaCl = \left(\frac{(0.0585)(N AgNO_3)(V_1 - V_2)}{m} \right) \times 100$$

Donde:

N = Normalidad de la disolución de nitrato de plata.

V1 = cm^3 gastados de nitrato de plata en la titulación.

V0 = cm^3 gastados de nitrato de plata en el ensayo en blanco.

m = Masa en gramos de la muestra empleada.

0.0585 = miliequivalente del NaCl.

5.4.2.8. Electroforesis SDS-PAGE

La muestra del extracto proteico fue obtenido disolviendo en tubos Eppendorf 0.1 g de muestra en 100 μL de urea 8 M y 800 μL de buffer de muestra, posteriormente se mantuvo en ebullición por 10 min. El extracto proteico se sometió a una electroforesis SDS-PAGE usando una modificación del método reportado por García-Carreño *et al.* (1993). El gel de separación estuvo compuesto por 16 % de acrilamida/bis (2.67 % C, 30 % T) en buffer Tris/HCl 1.5 M pH 8.8 y el gel de concentración se compuso de 5 % de acrilamida/bis (2.67 % C, 30 % T) en buffer Tris/HCl 0.5 M, pH 6.8, ambos geles contuvieron 10 % de SDS. 10 μL de muestra y 5 μL de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Kaleidoscope, Bio Rad USA) fueron inyectados en los geles que se corrieron en un mini-Protean tetra cell, 4 gel system (Biorad Laboratories, Richmond, CA) a 200 V por cerca de 45 min a 4 °C luego de lo cual se tiñeron entre 30 - 40 min con 0.5 % de azul de Coomassie R250 disuelto en 15 % de ácido acético y 40 % de metanol y posteriormente se destiñeron en una disolución de 15 % de ácido acético y 40 % de metanol.



5.4.2.9. Pruebas de textura

Para todas las pruebas de textura se utilizó un TA-XT2i Texture Analyzer con un software Texture Expert versión 1.22

En el caso de la medición de la dureza del queso de 45 g se utilizó Texturómetro TATX con una sonda TA-54, la muestra se sometió a dos penetraciones con una profundidad de 0.5 cm, a una velocidad de cabezal de 1 mm/s y con un tiempo de espera de cinco seg entre cada una de ellas (Stable micro systems, 2010).

Con ayuda de la sonda TA-44 (Craft knife) se obtuvo el perfil de fuerza necesaria para la primer mordida que se dé al queso, sometiendo las muestras a un corte, la penetración de la navaja fue de 0.8 cm, a una velocidad de cabezal de 1 mm / s usando la celda de carga del analizador de textura de 25 kg (Stable micro systems, 2010).

En el caso de la segunda etapa, la muestra constó de la mitad de cada queso de 45 g cortado como se muestra en la figura 2

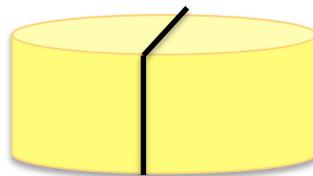


Figura 2 Corte transversal del queso

Para la tercera etapa se cortaron prismas cuadrangulares de 1.5 cm de ancho por 3 cm de largo (figura 3) del cual una de sus caras era corteza y del lado opuesto centro del queso, se obtuvieron datos a partir del corte de ambos.

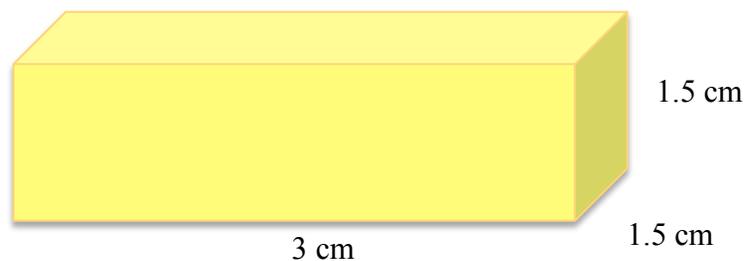


Figura 3 Prisma cuadrangular de queso para prueba de corte



5.4.2.10. Determinación del color

El color en los quesos se determinó usando un colorímetro (Konica Minolta CM-508c) de acuerdo al modelo CIELAB. Se obtuvieron los valores de L^* , a^* y b^* , como estimadores de la luminosidad (L^*) en una escala de 0 a 100, indicadores de rojo-verde (a^*) e indicadores de color amarillo-azul (b^*). Posteriormente se determinaron los valores de blancura, índice de color, cromaticidad y saturación (Park, 2000).

5.4.3. Análisis microbiológicos

Se llevaron a cabo de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010, se determinaron

- Hongos y levaduras
- Coliformes totales
- Mesófilos aerobios

5.4.4. Análisis sensorial

Al final de la maduración del queso (90 d) se llevó a cabo una prueba de aceptación con un panel no entrenado, a cada juez se le presentó una muestra de ambos tratamientos junto con una ficha de cata que se puede observar en el anexo 1 y se le pidió evaluar al queso en los siguientes atributos: color, olor, textura en boca, flavor y retrogusto, todo mediante una escala hedónica de 5 puntos (1 = me desagrada mucho; 2 = me desagrada; 3 = me es indiferente; 4 = me gusta; 5 = me gusta mucho).

5.4.5. Análisis estadístico

Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y se utilizó el programa de IBM SPSS Statistics Versión 4 (2006, SPSS Ibérica 165 S.L.U. Madrid, Spain), con el que se hizo un análisis de varianza (ANOVA) y diferencia de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia de ($p < 0.05$). Para la evaluación sensorial también se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) pero se utilizó una prueba Student-Newman-Keuls (SNK).

6. Resultados

6.1. Etapa 1. Estandarización de las técnicas de análisis para la leche el queso duro

Se lograron estandarizar las técnicas de análisis necesarias para el queso madurado a partir de las reportadas en queso fresco las cuales se modificaron a fin de adaptarse a las características del producto.

6.2. Etapa 2. Evaluación de la cantidad de sal para la adición directa en pasta y tiempo de inmersión en salmuera.

Para esta etapa se elaboraron en total 33 quesos de pasta dura utilizando 45g de cuajada (Figura 4) que para el caso de SD se saló directamente utilizando los diferentes porcentajes de sal (SD1 = 1.0 %; SD2 = 1.5 %; SD3 = 2.0 %; SD4 = 2.5 %; SD5 = 3.0 %) mientras que para SS las piezas ya formadas se sumergieron en la salmuera utilizando 6 variaciones de tiempo (SS1 = 10 min; SS2 = 20 min; SS3 = 30 min; SS4 = 40 min; SS5 = 50 min; SS6 = 60 min) obteniendo 3 piezas por cada tratamiento.



Figura 4 Queso de 45 g fresco y madurado.

El análisis de cloruros se llevó a cabo por triplicado en cada muestra con lo que se consiguieron en total de 9 resultados por cada tipo y nivel de salado, en la tabla 7 se muestran los resultados del análisis estadístico, se observó que conforme se incrementaba la cantidad de sal agregada en SD y el tiempo para SS, la cantidad de cloruros en el producto final también fue mayor, al comparar los dos tratamientos se encontró que SD1 tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) con todas las muestras de SS, y mediante la técnica de Tukey se observó para el resto



las muestras que no presentaron diferencias significativas entre ellas fueron: SD2 con SS1; SD3 con SS1, SS2 y SS3; SD4 con SS3, SS4 y SS5; por último SD5 con SS4, SS5 y SS6.

Tabla 7. Determinación de cloruros etapa 2

Muestra	Cloruros	Muestra	Cloruros
SD1	1.71 ^a ± 0.20	SS1	2.53 ^{bc} ± 0.20
SD2	2.10 ^{ab} ± 0.44	SS2	3.00 ^{cd} ± 0.39
SD3	3.09 ^{cd} ± 0.36	SS3	3.24 ^{de} ± 0.18
SD4	3.72 ^{ef} ± 0.20	SS4	3.96 ^{fg} ± 0.27
SD5	4.07 ^{gh} ± 0.62	SS5	4.16 ^{gh} ± 0.50
---	---	SS6	4.37 ^{gh} ± 0.14

SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera. SD1 = 1.0 %; SD2 = 1.5 %; SD3 = 2.0 %; SD4 = 2.5 %; SD5 = 3.0 %, SS1 = 10 min; SS2 = 20 min; SS3 = 30 min; SS4 = 40 min; SS5 = 50 min; SS6 = 60 min. Medias con las mismas letras de superíndice no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Medias de las nueve repeticiones ± desviación estándar

Para la determinación de color se hizo una medición por cada queso, es decir se obtuvieron 3 resultados por cada tratamiento, los resultados del análisis estadístico se presentan en la tabla 8 donde se puede observar que hubo diferencia significativa ($p < 0.05$), y mediante la técnica de Tukey se observó que tanto la muestra SD1 como en la SD2 mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los parámetros de L* y b* con todas las muestras de SS para el resto se pueden observar varias relaciones entre los diferentes niveles y tipos de salado.

Tabla 8. Determinación de color etapa 2

Muestra	L*	a*	b*	Muestra	L*	a*	b*
SD1	58.82 ^a ± 1.28	-8.22 ^{cd} ± 0.35	25.43 ^a ± 1.23	SS1	64.82 ^b ± 0.23	-8.07 ^{cd} ± 0.20	29.33 ^b ± 0.10
SD2	58.59 ^a ± 0.50	-7.65 ^d ± 0.51	25.87 ^a ± 0.53	SS2	67.04 ^{bc} ± 0.07	-8.17 ^{cd} ± 0.35	29.59 ^{bc} ± 0.41
SD3	64.75 ^b ± 2.39	-7.74 ^d ± 0.63	32.20 ^{bcd} ± 2.23	SS3	68.94 ^{cd} ± 1.12	-8.61 ^{abcd} ± 0.16	32.38 ^{bcd} ± 1.35
SD4	66.93 ^{bc} ± 1.11	-7.79 ^d ± 0.73	32.68 ^{bcd} ± 1.39	SS4	69.99 ^{cd} ± 0.61	-8.98 ^{abc} ± 0.03	35.04 ^{de} ± 0.62
SD5	65.33 ^b ± 1.16	-8.32 ^{bcd} ± 0.27	32.94 ^{cde} ± 1.56	SS5	71.00 ^d ± 0.79	-9.41 ^{ab} ± 0.05	35.17 ^{de} ± 0.33
---	---	---	---	SS6	71.23 ^d ± 0.40	-9.52 ^a ± 0.24	36.17 ^e ± 0.37

SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera. SD1 = 1.0 %; SD2 = 1.5 %; SD3 = 2.0 %; SD4 = 2.5 %; SD5 = 3.0 %, SS1 = 10 min; SS2 = 20 min; SS3 = 30 min; SS4 = 40 min; SS5 = 50 min; SS6 = 60 min. Medias con las mismas letras de superíndice no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Medias de las tres repeticiones ± desviación estándar.

En las pruebas de textura, se obtuvo el perfil de fuerza necesario para la primera mordida en el queso usando una prueba de corte con la navaja craft knife, se obtuvieron 3 resultados cuyas medias se plasman en la tabla 9 y van del 9.09 N en SD1 al 11.03 N en SD5 sin haber diferencia significativa entre ellos ni al compararlos con los SS del SS1 al SS5 donde los valores fueron 9.49 N y 11.12 N respectivamente, no obstante, SS6 tuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) con todos siendo su valor 16.40 N.

Por otro lado se determinó la dureza del queso por medio de una prueba de punción, los resultados de SD1 (11.19 N) a SD4 (13.43 N) no se observó diferencia significativa, y son

comparables con los de SS1 (13.95 N) a SS4 (16.72 N); SD5 (18.11 N) no tuvo diferencias únicamente con SS5 (18.99 N) y SS6 (21.15 N), por lo que se pueden hacer un gran número de relaciones entre SD y SS.

Tabla 9. Prueba de corte etapa 2

Muestra	Corte	Punción	Muestra	Corte	Punción
SD1	9.09a ± 0.13	11.19a ± 0.79	SS1	9.49ab ± 0.29	13.95ab ± 2.36
SD2	9.25a ± 2.11	13.18ab ± 2.27	SS2	9.25a ± 1.92	15.54bc ± 2.24
SD3	10.62ab ± 0.53	14.40ab ± 1.65	SS3	11.12ab ± 1.51	15.90bc ± 1.97
SD4	10.54ab ± 1.13	13.43ab ± 0.79	SS4	10.92ab ± 1.30	16.72bc ± 0.85
SD5	11.03ab ± 1.63	18.11cd ± 1.03	SS5	11.12ab ± 0.73	18.99cd ± 2.80
---	---	---	SS6	16.40c ± 1.57	21.15de ± 1.31

SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera. SD1 = 1.0 %; SD2 = 1.5 %; SD3 = 2.0 %; SD4 = 2.5 %; SD5 = 3.0 %, SS1 = 10 min; SS2 = 20 min; SS3 = 30 min; SS4 = 40 min; SS5 = 50 min; SS6 = 60 min. Medias con las mismas letras de superíndice no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Medias de las tres repeticiones ± desviación estándar

En la tabla 10 se encuentran las comparaciones entre SD y SS que no mostraron diferencias significativas para los parámetros analizados, con estos datos se descartó SD1 ya que se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) con todas las muestras de SS en cloruros, L* y b*, al igual que SD2 que mostro diferencias ($p < 0.05$) para todos los SS en L* y b*, SD3 es comparable en todos los parámetros con SS1 y SS2 mientras que SD4 no tiene diferencias significativas con SS3, para SD5 no se encontró un tratamiento equiparable en todas las características con SS en cuanto a los resultados reportados.

Tabla 10. Comparación de resultados etapa 2

Muestra	Cloruros	L*	a*	b*	Corte	Punción
SD1	---	---	SS: 1, 2, 3, 4	---	SS: 1, 2, 3, 4, 5	SS: 1
SD2	SS: 1	---	SS: 1, 2, 3	---	SS: 1, 2, 3, 4, 5	SS: 1, 2, 3, 4
SD3	SS: 1, 2, 3	SS: 1, 2	SS: 1, 2, 3	SS: 1, 2, 3, 4, 5	SS: 1, 2, 3, 4, 5	SS: 1, 2, 3, 4
SD4	SS: 3, 4, 5	SS: 1, 2, 3, 4	SS: 1, 2, 3	SS: 1, 2, 3, 4, 5	SS: 1, 2, 3, 4, 5	SS: 1, 2, 3, 4
SD5	SS: 4, 5, 6	SS: 1, 2	SS: 1, 2, 3, 4, 5	SS: 2, 3, 4, 5, 6	SS: 1, 2, 3, 4, 5	SS: 2, 3, 4, 5, 6

SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera. SD1 = 1.0 %; SD2 = 1.5 %; SD3 = 2.0 %; SD4 = 2.5 %; SD5 = 3.0 %, SS1 = 10 min; SS2 = 20 min; SS3 = 30 min; SS4 = 40 min; SS5 = 50 min; SS6 = 60 min

De acuerdo a lo dicho anteriormente solamente se encontró la posibilidad de utilizar tres combinaciones de SD con SS, sin embargo, la decisión para la estandarización del procedimiento se basó en los resultados de cloruros que más se aproximaran, al ser el parámetro clave del estudio, siendo las combinaciones posibles SD3 (3.09 %) con SS1 (2.62 %) en el cual hay una diferencia de 0.47 % y con SS2 (3.00 %) es de tan solo 0.9 % mientras que el par SD4 (3.72 %) con SS3 (3.19 %) tiene una diferencia mayor con 0.53 %, con lo cual se concluyó que adicionar 2 % de NaCl en la elaboración del queso por salado directo (SD3) es equiparable con la



inmersión en salmuera al 23 % con una temperatura de 12 °C durante 20 min (SS2), no obstante, este tiempo se multiplicó por 10 para la elaboración del queso de 450 g ya que al ser un modelo a escala 1:10 el tiempo se vio determinado por las dimensiones del mismo, proyectándose en una inmersión durante 200 min.

6.3. Etapa 3. Evaluación de las características fisicoquímicas, texturales y microbiológicas durante la maduración.

La composición de los quesos se encuentra en la tabla 11, al principio del proceso la humedad entre los diferentes tratamientos mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), pero conforme el periodo de maduración avanzó se vio disminuida llegando a un resultado similar. No se encontraron diferencias significativas para cenizas, acidez titulable y cloruros para ambos tratamientos en los mismos periodos de muestreo.

El contenido de grasa y proteína fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre SS y SD, la grasa fue ligeramente menor (2.5 %) en SD al contrario de la proteína donde se observó una mayor cantidad (2.04 %).

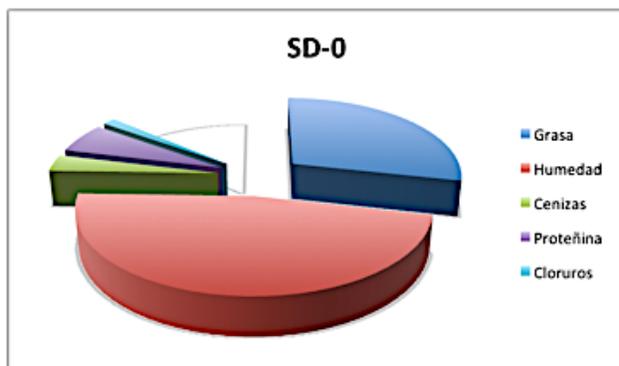
Tabla 11. Análisis fisicoquímicos

Muestra	Grasa	Humedad	Cenizas	Acidez titulable	pH	Proteína	NaCl
SD0	28.50 ^a ± 0.55	47.00 ⁱ ± 0.89	3.31 ^a ± 0.28	1.96 ^a ± 0.19	4.69 ^g ± 0.19	6.03 ^a ± 0.12	1.40 ^a ± 0.00
SS0	32.00 ^b ± 1.10	41.66 ^h ± 0.82	3.40 ^a ± 0.46	2.12 ^{abcd} ± 0.25	4.58 ^{cdef} ± 0.25	6.41 ^a ± 0.17	1.40 ^a ± 0.00
SD1	34.50 ^c ± 0.55	35.16 ^g ± 1.72	---	1.99 ^{ab} ± 0.02	4.49 ^{ab} ± 0.02	---	1.88 ^b ± 0.12
SS1	37.50 ^{de} ± 0.55	33.66 ^g ± 0.52	---	2.40 ^{abcd} ± 0.08	4.41 ^a ± 0.08	---	1.96 ^{bc} ± 0.24
SD2	36.50 ^d ± 0.55	30.00 ^f ± 1.10	4.76 ^{bc} ± 0.12	2.12 ^{abcd} ± 0.39	4.47 ^{ab} ± 0.39	---	2.28 ^{bcd} ± 0.15
SS2	40.00 ^{gh} ± 1.10	29.33 ^{ef} ± 1.51	4.35 ^b ± 0.05	2.56 ^d ± 0.06	4.49 ^{abc} ± 0.06	---	2.16 ^{bcd} ± 0.20
SD3	38.50 ^{ef} ± 1.64	27.00 ^{de} ± 0.63	---	2.42 ^{bcd} ± 0.13	4.53 ^{bcd} ± 0.13	---	2.38 ^{cde} ± 0.16
SS3	41.00 ^{gh} ± 1.10	26.00 ^{cd} ± 0.89	---	2.41 ^{bcd} ± 0.14	4.52 ^{bcd} ± 0.14	---	2.35 ^{cde} ± 0.23
SD4	39.50 ^{fg} ± 0.55	24.00 ^{bc} ± 0.63	5.23 ^d ± 0.14	2.09 ^{abc} ± 0.23	4.63 ^{efg} ± 0.23	---	2.53 ^{de} ± 0.21
SS4	43.00 ^{jl} ± 1.10	23.16 ^{ab} ± 0.41	4.85 ^{cd} ± 0.05	2.02 ^{abc} ± 0.44	4.54 ^{bcd} ± 0.44	---	2.35 ^{cde} ± 0.29
SD5	41.50 ^{hi} ± 0.55	22.33 ^{ab} ± 0.52	---	2.47 ^{cd} ± 0.31	4.65 ^{fg} ± 0.31	---	2.60 ^e ± 0.20
SS5	44.00 ^k ± 1.10	21.66 ^{ab} ± 0.82	---	2.38 ^{abcd} ± 0.02	4.61 ^{defg} ± 0.02	---	2.51 ^{de} ± 0.28
SD6	41.50 ^{hi} ± 0.55	21.83 ^{ab} ± 3.54	5.23 ^d ± 0.37	2.35 ^{abcd} ± 0.05	4.67 ^{fg} ± 0.05	31.36 ^c ± 1.00	2.61 ^e ± 0.21
SS6	44.00 ^k ± 1.10	20.83 ^a ± 1.47	5.03 ^{cd} ± 0.08	2.28 ^{abcd} ± 0.23	4.61 ^{defg} ± 0.23	29.32 ^b ± 0.87	2.58 ^{de} ± 0.34

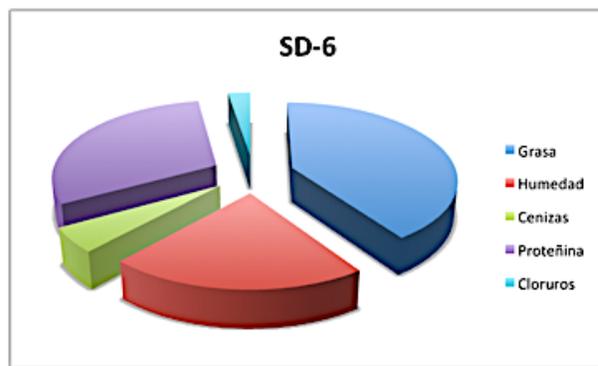
SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera. Número de muestra: 0= 0d, 1= 15d, 2= 30d, 3= 45d, 4= 60, 5= 75d y 6= 90d. Medias con las mismas letras de superíndice dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Medias de las seis repeticiones ± desviación estándar.



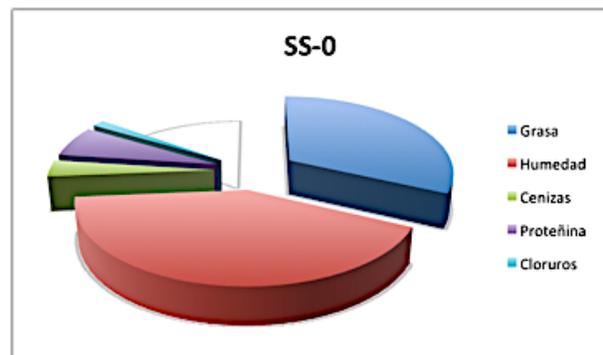
Las gráficas 1 y 2 muestran la proporción de los componentes encontrados en el queso elaborado utilizando SD para el principio y final de la maduración, mientras que en las gráficas 3 y 4 se presenta la misma información para el caso de SS.



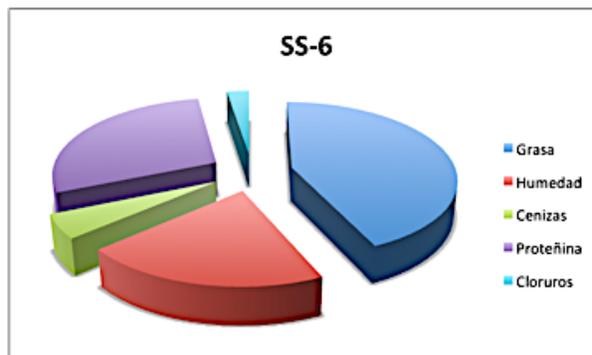
Gráfica 1 Composición SD-0



Gráfica 2 Composición SD-6



Gráfica 3 Composición SS-0



Gráfica 4 Composición SS-6

Para ambos tratamientos, las gráficas anteriores evidencian claramente la drástica disminución de humedad así como la concentración del resto de los componentes de los diferentes quesos.

No se encontró diferencia significativa en los dos patrones de proteólisis como se observa en las figuras 5- 10 para cada tiempo, demostrando que la evolución del queso fue similar para ambos tratamientos conforme transcurrió el tiempo de maduración, sin embargo, se puede observar que el patrón si cambió a lo largo del tiempo haciendo evidente la presencia de fracciones proteicas de menor peso molecular para ambos tratamientos.

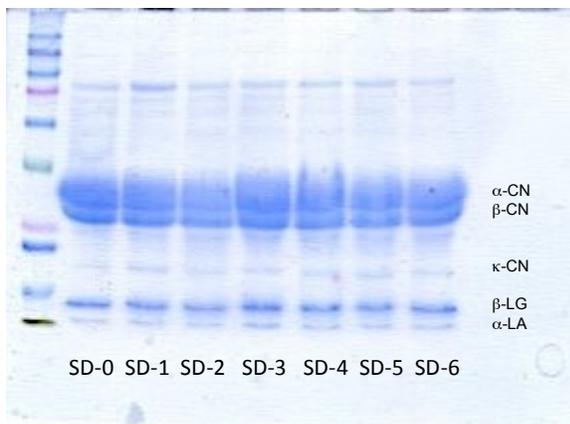


Figura5 Electroforesis SD 0 - 6 (lote 1)

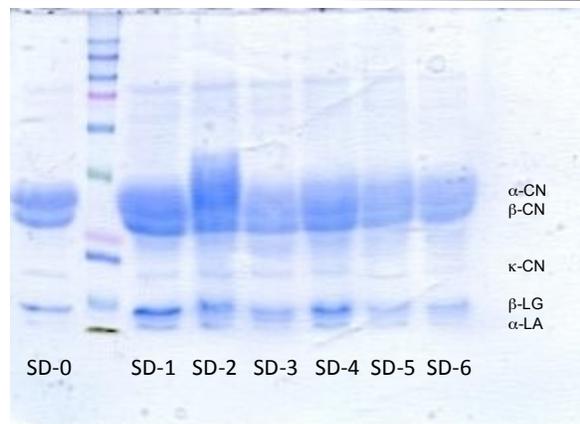


Figura6 Electroforesis SD 0 - 6 (lote 2)

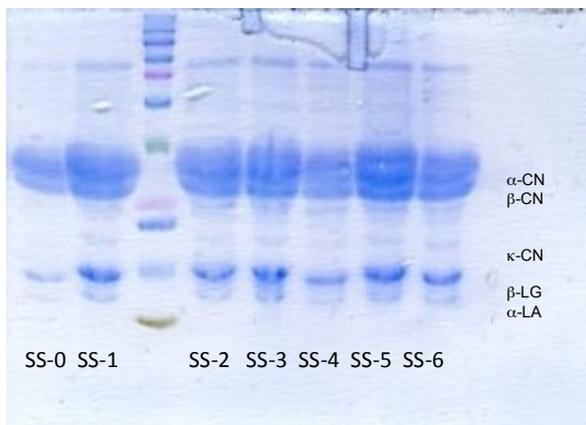


Figura7 Electroforesis SS 0 - 6 (lote 1)

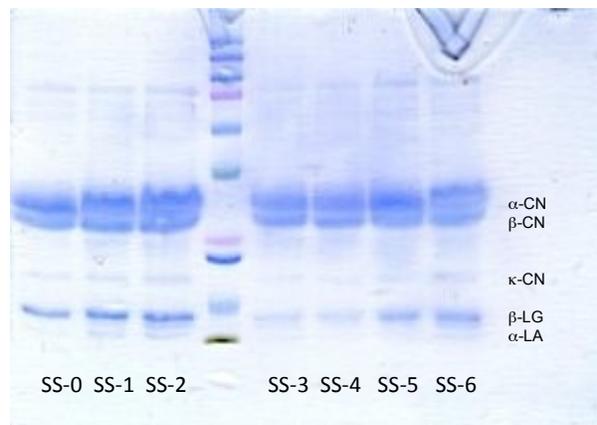


Figura8 Electroforesis SS 0 - 6 (lote 2)

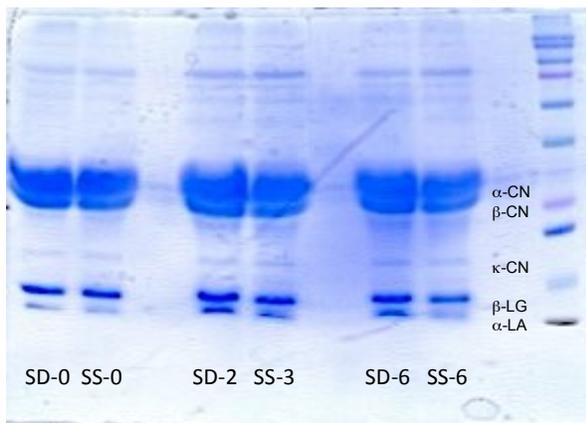


Figura9 Electroforesis comparación SD/SS 0 - 3 - 6

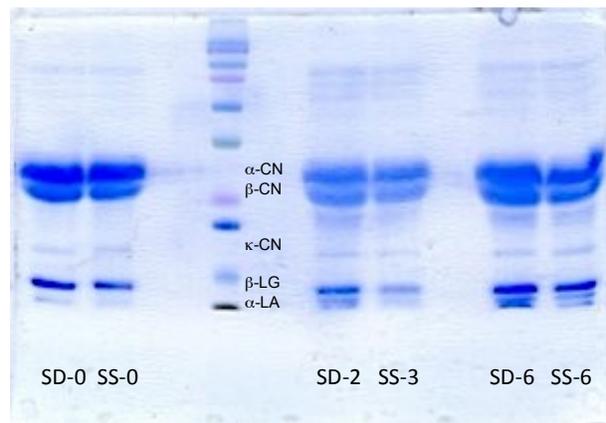


Figura10 Electroforesis comparación SD/SS 0 - 3 - 6

Todas las medidas obtenidas en la prueba de corte del queso se encuentran en la tabla 12, para el centro no hubo diferencia significativa entre los dos tratamientos de la misma edad y para la corteza se observó el mismo comportamiento exceptuando las muestras SD5 y SS5 (75 d) donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) pero al final de la maduración esta diferencia dejó de mostrarse.



Tabla 12. Prueba de corte

Muestra	Fuerza corteza	Fuerza centro
SD0	1.26 ^a ± 0.14	1.18 ^a ± 0.15
SS0	1.41 ^a ± 0.09	1.29 ^a ± 0.08
SD1	1.83 ^{ab} ± 0.48	1.88 ^{ab} ± 0.19
SS1	2.29 ^{ab} ± 0.56	2.26 ^{abc} ± 0.41
SD2	3.48 ^{cd} ± 0.53	3.42 ^{abcd} ± 0.82
SS2	3.75 ^{cd} ± 0.20	3.88 ^{bcd} ± 0.34
SD3	5.36 ^{cd} ± 0.52	4.46 ^{cde} ± 1.10
SS3	5.01 ^{cd} ± 0.95	4.86 ^{de} ± 0.44
SD4	6.14 ^{de} ± 2.38	7.21 ^f ± 1.75
SS4	6.75 ^{de} ± 0.27	6.47 ^{ef} ± 0.20
SD5	10.05 ^g ± 1.73	10.39 ^g ± 2.88
SS5	7.75 ^{ef} ± 1.08	8.57 ^{fg} ± 0.72
SD6	10.90 ^g ± 0.74	10.15 ^g ± 1.82
SS6	9.56 ^{fg} ± 0.78	10.01 ^g ± 1.20

SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera. Número de muestra: 0= 0d, 1= 15d, 2= 30d, 3= 45d, 4= 60, 5= 75d y 6= 90d. Medias con las mismas letras de superíndice dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (p<0.05). Medias de las seis repeticiones ± desviación estándar.

Los valores de color se presentan en la tabla 13, para la corteza los valores del modelo CIELAB (L*, a* y b*) para SD y SS al mismo periodo de muestreo no fueron estadísticamente diferentes excepto para b* en las muestras SD4 y SS4, donde se observó una diferencia significativa (p<0.05), sin embargo, esta cesó en el siguiente par de muestras y hasta el final de la maduración. Las mediciones de color en el centro no revelaron diferencias significativas para cada juego de muestras.

Tabla 13. Determinación de color

Muestra	Corteza			Centro		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
SD0	86.56 ^c ± 1.00	2.39 ^a ± 0.33	19.52 ^a ± 1.76	87.61 ^g ± 1.83	2.13 ^{abc} ± 0.20	18.35 ^a ± 0.42
SS0	85.05 ^c ± 1.48	2.27 ^a ± 0.16	22.95 ^{ab} ± 1.09	87.80 ^g ± 1.09	2.25 ^{bcd} ± 0.25	19.93 ^{ab} ± 1.06
SD1	66.94 ^{ab} ± 2.93	4.58 ^d ± 0.33	25.15 ^{bc} ± 0.60	86.00 ^{fg} ± 0.89	2.61 ^{cde} ± 0.25	21.45 ^{ab} ± 1.29
SS1	69.21 ^b ± 3.45	4.38 ^d ± 0.47	27.17 ^c ± 1.41	86.31 ^{fg} ± 0.25	2.87 ^{cde} ± 0.52	23.68 ^{bc} ± 0.58
SD2	65.50 ^{ab} ± 10.85	4.34 ^d ± 0.40	21.93 ^{ab} ± 2.06	82.85 ^{ef} ± 1.29	2.79 ^{cde} ± 0.30	22.71 ^{bc} ± 2.04
SS2	65.88 ^{ab} ± 3.29	4.01 ^{cd} ± 0.44	24.83 ^{bc} ± 2.72	82.03 ^{ef} ± 1.43	3.19 ^e ± 0.28	25.66 ^c ± 1.32
SD3	64.08 ^{ab} ± 2.94	3.90 ^{bcd} ± 0.23	22.22 ^{ab} ± 1.02	78.79 ^{de} ± 1.48	2.97 ^{de} ± 0.16	23.34 ^{bc} ± 2.24
SS3	63.46 ^{ab} ± 2.68	2.89 ^{ab} ± 0.51	24.79 ^{bc} ± 1.20	78.73 ^{de} ± 0.94	2.74 ^{cde} ± 0.33	25.71 ^c ± 2.08
SD4	64.07 ^{ab} ± 6.29	3.04 ^{abc} ± 0.37	20.08 ^a ± 2.26	76.80 ^d ± 6.21	2.48 ^{bcd} ± 0.16	22.14 ^{abc} ± 2.93
SS4	61.68 ^{ab} ± 2.81	2.93 ^{abc} ± 1.20	25.26 ^{bc} ± 0.75	74.64 ^{cd} ± 1.37	2.51 ^{cde} ± 0.55	25.68 ^c ± 1.89
SD5	59.51 ^a ± 2.05	2.65 ^a ± 0.56	21.42 ^{ab} ± 2.26	67.15 ^{ab} ± 2.01	2.29 ^{bcd} ± 0.50	23.73 ^{bc} ± 2.21
SS5	61.37 ^{ab} ± 2.75	2.69 ^a ± 0.82	24.46 ^{bc} ± 2.14	71.15 ^{bc} ± 1.26	2.58 ^{cde} ± 0.44	26.11 ^c ± 2.34
SD6	58.83 ^a ± 2.05	2.12 ^a ± 0.53	21.56 ^{ab} ± 3.74	65.63 ^a ± 0.08	1.36 ^a ± 0.74	20.64 ^{ab} ± 2.59
SS6	61.23 ^{ab} ± 1.79	2.28 ^a ± 0.32	22.73 ^{ab} ± 3.01	68.66 ^{ab} ± 2.35	1.70 ^{ab} ± 0.39	23.26 ^{bc} ± 2.79

SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera. Número de muestra: 0= 0d, 1= 15d, 2= 30d, 3= 45d, 4= 60, 5= 75d y 6= 90d. Medias con las mismas letras de superíndice dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (p<0.05). Medias de las seis repeticiones ± desviación estándar.

La tabla 14 muestra los resultados para la evaluación sensorial, todos los parámetros obtuvieron una calificación entre 4 = me gusta y 5 = me gusta mucho, asimismo, no se encontró diferencia significativa entre los dos tratamientos para ninguno de los parámetros evaluados.

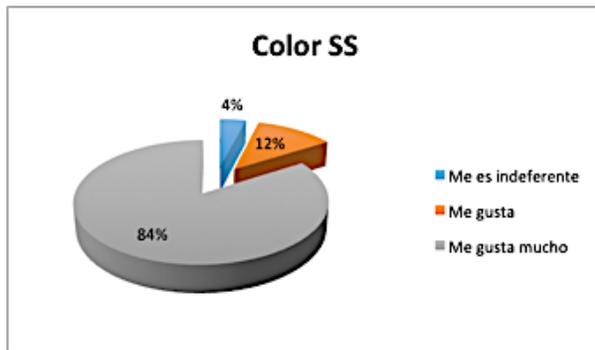


Tabla 14. Análisis sensorial

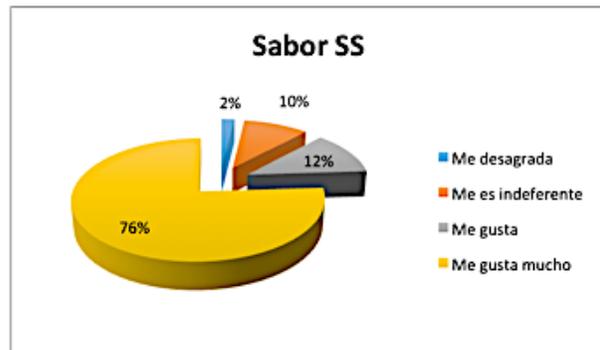
Atributo	SD6	SS6
Color	4,66 ^a	4,80 ^a
Aroma	4,42 ^a	4,40 ^a
Textura	4,24 ^a	4,36 ^a
Flavor	4,42 ^a	4,62 ^a
Retrogusto	4,20 ^a	4,46 ^a

SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera. Número de muestra: 0= 0d, 1= 15d, 2= 30d, 3= 45d, 4= 60, 5= 75d y 6= 90d. Medias con las mismas letras de superíndice dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Medias de las seis repeticiones \pm desviación estándar.

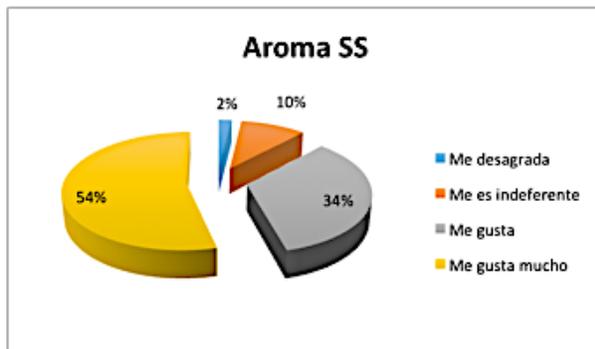
En las gráficas 5 - 14 se muestran las proporciones de las frecuencias de cada una de las calificaciones obtenidas para cada parámetro en la prueba de aceptación



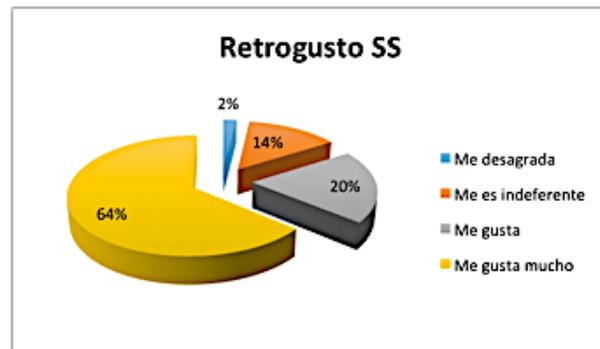
Gráfica 5 Aceptación color SS



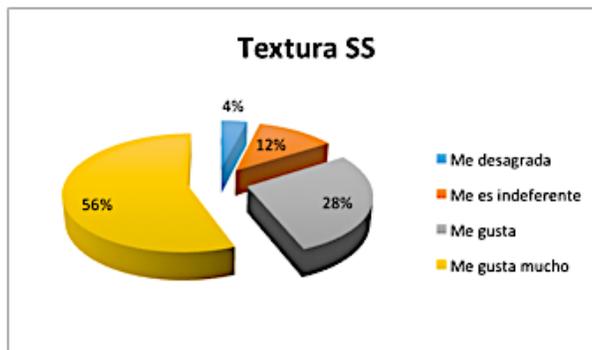
Gráfica 6 Aceptación Aroma SS



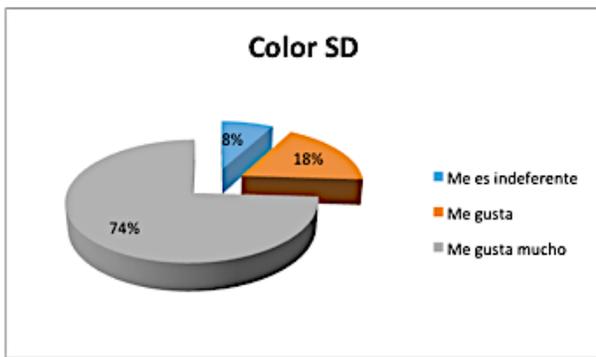
Gráfica 7 Aceptación retrogusto SS



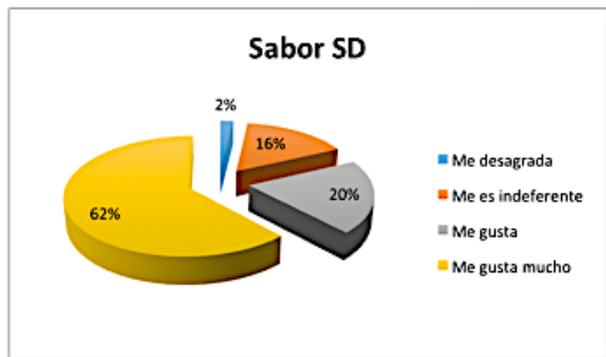
Gráfica 8 Aceptación sabor SS



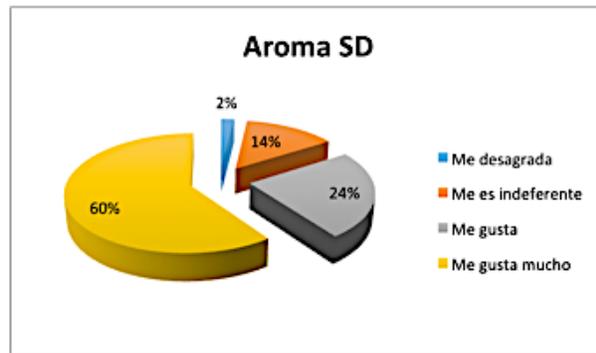
Gráfica 9 Aceptación textura SS



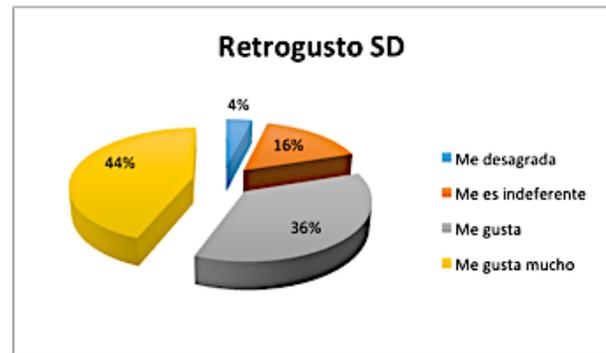
Gráfica 10 Aceptación color SD



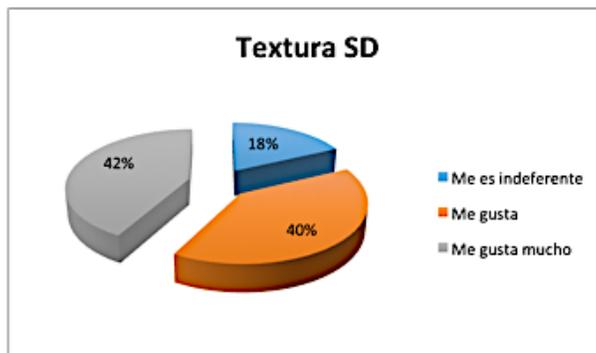
Gráfica 11 Aceptación sabor SD



Gráfica 12 Aceptación aroma SD



Gráfica 13 Aceptación retrogusto SD



Gráfica 14 Aceptación textura SD

En la tabla 15 se presentan los resultados de las pruebas microbiológicas donde podemos observar que se encontró un bajo recuento de coliformes, en SD que comenzaron en 8 UFC/g X 10⁻¹ para el tiempo 0 y se disminuyeron hasta tener 1 UFC X 10⁻¹ en el caso de SS tanto para el inicio como el final de la maduración no se encontraron coliformes; Los hongos y levaduras tuvieron un comportamiento diferente mostrando un menor contenido en SD que comenzó con 1 UFC X 10⁻¹ y para el tiempo 6 aumentó a 3 UFC X 10⁻¹, en cambio para SS se incrementó de 41 UFC X 10⁻² al principio hasta 72 UFC X 10⁻²; Finalmente los mesófilos aerobios proliferaron llegando a ser incontables en SD0 pero con el



tiempo disminuyeron hasta 135 UFC X10-6 mientras que en SS un comportamiento distinto se mostró ya que iniciaron en 50 UFC X10-6 y terminaron en 54 UFC X10-6.

Tabla 15. Análisis microbiológicos

Muestra	Coliformes	Hongos y Levaduras	Mesófilos Aerobios
SD0	8 V.E.UFC/g a 10 ⁻¹	1 V.E.UFC/g a 10 ⁻¹	Incontable a 10 ⁻⁶
SS0	---	41 UFC/g a 10 ⁻²	50 UFC/g a 10 ⁻⁶
SD6	1 V.E. UFC/g a 10 ⁻¹	3 V.E.UFC/g a 10 ⁻¹	135 UFC/g a 10 ⁻⁶
SS6	---	72 UFC/g a 10 ⁻²	54 UFC/g a 10 ⁻⁶

SD: Salado directo, SS: Salado por salmuera.



7. Discusión

Durante la primera etapa, la elaboración del queso de pasta dura fue estandarizada a fin de obtener quesos con características que no tuvieran grandes variaciones haciendo posible una fase experimental que arrojara resultados más precisos.

Los parámetros fisicoquímicos en los productos lácteos son de gran importancia puesto que la humedad, el pH, el contenido de grasa, proteína y sal entre otros, proveen elementos para la evolución del queso impactando en las características finales del producto tales como sus propiedades texturales y sensoriales.

La humedad (Tabla 11) indica la cantidad de agua presente en cada muestra, como se observa en el estudio, disminuye conforme pasa el tiempo, durante los 3 meses de maduración, la disminución total de humedad en el queso de 25.17 % para SS y 20.83 % para SD causa un incremento en otros componentes tales como cenizas (SD = 1.92 %; SS= 1.63 %), grasa (SD = 13 %; SS = 12 %), proteína (SD = 25.33 %; SS = 22.91 %) y cloruros (SD = 1.21 %; SS = 1.18 %), similar a lo reportado por Licitra *et al.* (2000). Fucà *et al.* (2012) también encontró una relación entre el alto contenido de sal y una mayor pérdida de humedad que resulta en mayor contenido de grasa y proteína. La mayor pérdida de humedad ocurrió durante el primer mes (SD = 17 %; SS = 12.33 %) pero al continuar la maduración se estabilizó y dejó de presentar diferencias significativas desde la muestra 4 a la 6 (90 – 60 d), el queso no mostró diferencias significativas entre SD y SS para cada periodo de maduración en los parámetros fisicoquímicos analizados.

El pH y la acidez titulable no mostraron diferencias significativas entre las muestras al principio y al final de la maduración como fue reportado por Crosa *et al.* (2011), sin embargo, los valores de ambos parámetros subieron y bajaron a lo largo de la maduración. Tarakci *et al.* (2004) explica este fenómeno como un incremento inicial en la acidez dado por la formación de hidrógeno junto con el ácido láctico generado por los cultivos bacterianos y la subsecuente disminución debida a la asimilación del ácido por los hongos y levaduras presentes en la maduración del queso.



La grasa presentó un contenido menor en SD y en el caso de la proteína, se observó un comportamiento opuesto teniendo una concentración más alta en SD, a pesar de esto más pruebas sugirieron que esta diferencia composicional no afectó la estructura final, textura, propiedades sensoriales y evolución del queso al no encontrar diferencias significativas entre las muestras en los análisis tanto de textura como sensoriales.

En la prueba de corte, se obtuvo el perfil de fuerza necesaria para la primer mordida del queso en la corteza y el centro del queso (tabla 12), estos valores parecen incrementar a medida que la humedad disminuye, creando una estructura más encogida y compacta, el desarrollo de la textura es bastante notable, del tiempo 1 al 6 se tuvo un incremento de 9.64 N en la corteza de SD y 8.15 en SS, en el caso del centro del queso el incremento para DS fue de 8.97 N y para SS de 8.72 N. En los resultados del centro se percibió una anomalía en la evolución del queso, el valor de SD5 es superior al de SD6 cuando se esperaría lo opuesto, referente a esto Šarić *et al* (2016) señala que los cambios texturales relacionado a la edad se expresan como dureza generada por la deshidratación y ablandamiento influenciado por la proteólisis.

Además la electroforesis SDS-PAGE que se observa en las figuras 5 a 11 revela un patrón similar en la proteólisis sin importar que se obtuvieran valores de proteína más bajos en SS, también se observaron proteínas de menor peso molecular que pusieron en evidencia la hidrólisis de proteína proceso llevado a cabo en parte por las enzimas presentes en el queso.

Para el color (valores en la tabla 13), los valores de L* en la corteza para ambas muestras se redujeron a través del tiempo lo cual significa que el producto se volvió más oscuro al transcurrir de los días, pero no se encontraron diferencias significativas entre cada par de muestras, para a* se observaron incrementos y decrementos, sin embargo, no hubo diferencias significativas al final de este estudio, un patrón similar se expuso para el parámetro b*, el descenso en L* coincide con la investigación de Gouda Egipcio desarrollada por El-Nimr *et al*. (2010). Respecto al centro del queso el mismo tipo de comportamiento perceptible en los tres parámetros, pero presentó valores más altos comparados con los de la corteza para L* y más bajos para a* y b* haciendo evidente que el interior del queso adquiere un color más claro en comparación con la corteza.



Los datos sensoriales en la tabla 14 también resaltan la aceptación entre los consumidores del producto final en los dos tipos de salado, a pesar de la ligera diferencia en grasa y proteína de las muestras, no se observó una influencia importante en las puntuaciones de los atributos analizados (color, olor, textura en boca, flavor y retrogusto) que obtuvieron calificaciones arriba de 4 (me gusta). En las gráficas 5 a 16 podemos observar las frecuencias de las calificaciones de la evaluación sensorial en los diferentes parámetros, para SS en color la calificación más alta fue 5 = me gusta mucho con una frecuencia de 84 % de los jueces mientras que en SD fue de 74 %; para aroma se obtuvo una mayor frecuencia en SD = 60 % y para SS 54 %; en textura SS fue más alto con 56% y SD obtuvo 42 % ; sabor SS = 76 %, SD =62 %; en retrogusto el porcentaje de SS fue 64 mostrando SD uno menor con 46 %; finalmente para decisión de compra en SS se logró una frecuencia mayor (64%) que en SD (46 %), sin embargo, altas frecuencias en bajas calificaciones no se presentaron para ninguna de las muestras, demostrando que en general los atributos evaluados para los diferentes tratamientos fueron bien aceptados.

Al haberse obtenido un número tan grande de Mesófilos aeróbios, se procedió a llevar a cabo una tinción Gram para verificar que los microorganismos presentes no fueran patógenos sino parte de la microflora que se desarrolla en la maduración del queso, se observó la tinción morada que indicó que se trataba de microorganismos Gram positivos

Por todo lo anterior el remplazo de SS por SD es posible y se pueden observar posibles ventajas, por ejemplo se pueden evitar los altos costos de mantenimiento de la salmuera así como las descargas contaminantes de cloruros al ambiente. Un estudio previo en queso tipo Muester reveló que el método de adición de sal no afectó su composición final y que al usar el salado directo en la cuajada del queso, se lograba una disminución significativa de descargas de cloruros (Ponce de León *et al.*, 2000). En vista de los resultados obtenidos en esta investigación y de las ventajas potenciales, el salado directo puede recomendarse como una alternativa a la inmersión en salmuera, evitando de esta forma, afectar los atributos fisicoquímicos y texturales así como la aceptabilidad del queso duro permitiendo aplicar este conocimiento tanto en el campo industrial como el artesanal.



8. Conclusiones

- Las muestras de ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas en las características texturales y de aceptación al final de la maduración.
- Para los parámetros fisicoquímicos, la grasa presentó un contenido menor y la proteína mayor en SD, no obstante, esta diferencia composicional no tuvo efectos en lo sensorial, textural y evolución de proteínas del queso, lo cual puede verse como una ventaja nutricional para los consumidores.
- Por lo anterior, es factible usar el salado directo en lugar de la inmersión en salmuera debido a los beneficios potenciales tales como una menor contaminación ambiental y reducción de altos costos para mantener los parámetros requeridos por la misma que de no ser así podría verse afectada la homogeneidad del producto así como su calidad microbiológica siendo por tanto útil para los productores de queso artesanales e industriales.



9. Referencias

1. 3A Editores, S. A. (1983). *El queso en la historia*. Revista de Geografía Universal. Edición especial: El mundo del queso. pp. 3-10. México.
2. Alais, C., (1988). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. México: Continental.
3. Alba, J. (1964). *Reproducción y genética animal*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.
4. Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche*. Zaragoza: Acribia.
5. AOAC 2000 *Official Methods of Analysis* (17th edition). Association Of Official Analytical Chemists. Maryland DC, USA
6. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis* (15th edition). Association Of Official Analytical Chemists. Arlington VA, USA.
7. Battistotti, B., Bottazzi, V., Piccinardi, A., Volpato, G. (1985). *Quesos del mundo*. España: Ediciones Elfos.
8. Battro, P. (2010). *Quesos artesanales*. Argentina: Albatros.
9. Carr, S., (1983). *Guía de los quesos*. España: Folio
10. Castañeda, R., Borbonet, S., Ibarra, A., Ipar, J., Vásquez, A., Brito, A., Purtschert, N., Alfonso, R. (2010). *Quesos de América del Sur*. Buenos Aires: Albatros.
11. Chamorro, M. C., Losada, M. (2002). *El análisis sensorial de los quesos*. Madrid: Mundi-Prensa.
12. CODEX STAN 206-1999, *Norma General del Codex para el uso de términos lecheros*.
13. CONARGEN (2013). Bovinos de leche. Consejo Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios. Disponible en: <http://www.conargen.mx/index.php/asociaciones/bovinos-leche> [consultado el 18 de septiembre de 2015].
14. Crosa, M. J., Harispe, R., Mussio, P., Pelaggio, R., Repiso, L., Silvera, C. (2011) *Comparación de los cambios químicos y microbiológicos en la maduración del queso Colonia salado tradicionalmente y por impregnación en vacío*. INNOTECH [Online] 4:22
15. Crosa, M., Harispe, R., Mussio, P., Pelaggio, R., Repiso, L., Silvera, C. (2009). “Comparación de los cambios químicos y microbiológicos en la maduración del queso Colonia salado tradicionalmente y por impregnación al vacío”. *Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay*. No. 4 2009. Uruguay: UCU. pp. 22-27.
16. Delgado, F. J., Rodríguez-Pinilla, J., Márquez, G., Roa, I., Ramírez, R. (2015). *Physicochemical, proteolysis and texture changes during the storage of a mature soft cheese treated by high-pressure hydrostatic*. *Eur Food Res Technol* 240:1167–1176. Doi:10.1007/s00217-015-2420-3.
17. Eck, A. (1990), *El queso*. Barcelona: Omega.
18. Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., Guinee, P. (2004). *Cheese. Chemistry, physics and microbiology*. Vol. 2 Major cheese groups. UK: Elsevier academic press



19. Fucà, N., McMahon, D. J., Caccamo, M., Tuminello, L., La Terra, S., Manenti, M., Licitra, G. (2012). *Effect of brine composition and brining temperature on cheese physical properties in Ragusano cheese*. J Dairy Sci. 95:460–470. Doi:10.3168/jds.2011-4438
20. GanAfrica. (2012). *Etapas en la elaboración de quesos*. Consultado el 18/05/2014 disponible en: (<http://www.c-rural.org/es/actividades/ganaderia-caprina/productos-ganaderos-y-manejo/161-etapas-en-la-elaboracion-de-los-quesos>).
21. García, M., Quintero, R., López-Munguía, A. (2004). *Biotecnología Alimentaria*. México: Limusa.
22. García-Carreño FL, Dimes, L. E., Haard, N. F. (1993). *Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors*. Anal Biochem. 214:65-9
23. Gilbert, R. W. (1979). *Mechanism of salt absorption into Cheddar cheese*. Marschall Italian and Speciality Cheese Seminars.
24. Gómez, P. (2012). *D.O. España: Quesos*. España:Sicidea editorial.
25. González, C., Chafer, M., Fito, P., Chiralt, A. (2002). *Development of salt profiles on Manchego type cheese during brining. Influence of vacuum pressure*. J Food Eng. 53:67-73.
26. Gregory, A. G. (1988). *Desalination of sweet-type whey salt dripping for whey solids recovery*. Bull. Int. Dairy Fed. 212:38–49.
27. Guetouache, M., Guessas, B., Medjekal, S. (2014). *Composition and nutritional value of raw milk*. Issues Biol. Sci. Pharm. Res. 2:115-122. Doi: 10.15739/ibspr.005
28. Hervás, A. (2012). *El mercado del queso en México*. México: Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México, ICEX.
29. ISO 3433:2008|IDF 222:2008 *Cheese — Determination of fat content— Van Gulik Method*.
30. Jack, F. R., Paterson, A. (1992). *Texture of hard cheeses*. Trends Food Sci Tech. 3:160-164
31. Janevski, O., Hassan, A. N., Metzger, L. (2012). *Application of salt whey in process cheese food made from Cheddar cheese containing exopolysaccharides*. J. Dairy Sci. 95: 3609–3616. Doi:10.3168/jds.2011-5285.
32. Jonson, M., Paulus, K. (2005). *La Operación de Salado del Queso*. Mundo Lácteo y Cárnico, pp 14-16.
33. Kapoor, R., Metzger, L. E. (2004). *Evaluation of Salt Whey as an Ingredient in Processed Cheese*. J. Dairy Sci. 87:1143–1150. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73262-2
34. Law, B. A., Tamime, A. Y. (2010). *Technology of Cheesemaking*. U. K: Blackwell Publishing



35. Licitra, G., Campo, P., Maneti, M., Portelli, G., Scuderi, S., Carpino, S., Barbano, D. (2000) *Composition of Ragusano Cheese During Aging*. J Dairy Sci 83:404–411. Doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74896-X
36. Lynch, J., Barbano, D., Fleming, J. (2002) *Determination of the total nitrogen content of hard semi hard and processed cheese by the kjeldahl method: collaborative study* AOAC International 85:445-455.
37. McGee, H. (2004). *On food and cooking the science and lore of the kitchen*. USA: Scribner
38. McSweeney, P. (2004). *Biochemistry of cheese ripening*. Int J Dairy Technol. 57:127-144.
39. Messens, W., Dewettinck, K., Huyghebaert, A. H. (1999). *Transport of sodium chloride and water in Gouda cheese as affected by high-pressure brining*. Int Dairy J. 9:569-576. Doi:10.1016/S0958-6946(99)00126-0
40. Nair, S. S., Mistry, V. V., Nauth, K. R. (2004). *Reduction of Salt (NaCl) Losses During the Manufacture of Cheddar Cheese*. J. Dairy Sci. 87:2831–2838. Doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73411-6
41. Nantet, B., Rance, P., Lyon, N., Ribaut J. C. (1994). *Quesos del mundo*. Italia: Limusa.
42. Norma FIL/IDF 12^a 1969 *determination of salt sodium chloride content of butter (reference method)*.
43. NORMA Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, *Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias*.
44. NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, *Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*.
45. NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, *Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba*.
46. Park, J. W. (2000). *Surimi and surimi seafood*. Food Sci Technol. 2a Ed. New York .
47. Parmentier, K. 2000. *Determination of volume of industrial waste from Wisconsin's dairy products industry*. University of Wisconsin, Green Bay.
48. Paulson, B. M., McMahon, D. J., Oberg, C. J. (1998). *Influence of Sodium Chloride on Appearance, Functionality and Protein Arrangements in Nonfat Mozzarella Cheese*. J Dairy Sci 81:2053-2064. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75780-7
49. Ponce de Leon-González, L., Wendorff, W., Ingham, B., Jaeggi, J., Houck, K. (2000). *Influence of Salting Procedure on the Composition of Muenster-Type Cheese*. J Dairy Sci. 83:1396-1401. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75008-9
50. Rao, R. D., Wendorff, W. L. (2003). *Compositional differences between whey, salty whey, and press whey from commercial manufacture of Cheddar cheese*. J. Dairy Sci. 86:365.
51. SAGARPA. (2009). *Escenario Base 09-18, Proyecciones para el Sector Agropecuario de México*. México: Gobierno Federal.



52. SAGARPA/Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP, (2015). *Boletín de Leche enero-marzo de 2015*. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/wp-content/uploads/boletinleche/boletinlechenero-marzo_2015.pdf [consultado el 02 de junio de 2015].
53. Sánchez, E. S., Simal, S., Femenia, A., Llull, P., Rosselló, C. (2001). *Proteolysis of Mahon cheese as affected by acoustic-assisted brining*. Eur Food Res Technol. 212:147–152. Doi: 10.1007/s002170000263
54. Sanderson, W. B., Brady, A. P., Whitehead, G. F., Oldham, I. J., Brockwell, I. P. (1996). *Recycling salt solution in cheese processing and apparatus therefore*. Murray Goulburn Co-Operative Co. Limited, Australia.
55. Santiago, M., (2007). *Manual de normas de control de calidad de leche cruda*. México: SEDESOL/Liconsa.
56. Stable micro systems (2010). *Comparison of hardness of cereal bars by shearing*. TA XT2 application study. Reino Unido: Texture expert probes and product guide.
57. Stable micro systems (2010). *Exterior and interior hardness of almonds using a craft knife*. TA XT2 application study. Reino Unido: Texture expert probes and product guide.
58. Sutherland, B.J. (1974). Control of salt absorption and whey drainage in Cheddar cheese manufacture. Aust. J. Dairy Technol. 29:86–93.
59. Triviño, M., (2010). *Sustitución parcial de sal (cloruro de sodio, NaCl) por cloruro de potasio y/o magnesio (KCl y/o MgCl₂) en queso Gauda semidescremado*. Tesis de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Ingeniería en Alimentos de la Universidad Austral de Chile. 2010. Valdivia, Chile
60. Tunick, M. H. (2014). *The Science of cheese*. Oxford University Press. N Y.
61. Villegas de Gante, A., (2004). *Tecnología quesera*. México: Trillas.
62. Villegas, A, (1993). *Los quesos mexicanos*. México: CIESTAAM: Universidad Autónoma de Chapingo
63. Walstra, P. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. España: Acribia.
64. Walstra, P., Wouters, J., Geurts, T. (2006). *Dairy Science and Technology*. Boca Raton: Taylor & Francis Group 2° Edición.
65. Ying, Lu y McMahan, D. J. (2014). *Effects of sodium chloride salting and substitution with potassium chloride on whey expulsion of Cheddar cheese*. J. Dairy Sci. 98 :78–88. Doi: 10.3168/jds.2014-8600
66. Zall, R. R., El-Samragy, Y. A. (1988). *Utilization of salt whey for the production of yeast protein*. Cult. Dairy Prod. J. 28–31.
67. Zayed, G., Winter, J. (1995). *Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44:362–366. Doi: 10.1007/BF00169930



68. Zayed, G., Zahran, A. S. (1991). *Lactic acid production from salt whey using free and agar immobilized cells*. Lett Appl Microbiol. 12:241–243. Doi:10.1111/j.1472-765X.1991.tb00549.x
69. Zimmermann, K. (2010) *Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos*. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas Puebla. Sta. Catarina Mártir, Cholula, Puebla.



10. Anexos

10.1. Ficha de cata

Universidad Autónoma del Estado de México
 Facultad de Química
 Maestría en Ciencias Químicas
 Química en Alimentos



Ficha de evaluación queso madurado.

Edad: _____ Sexo: _____ Ocupación: _____

Analice las tres muestras de queso que se le presentan siguiendo el orden de izquierda a derecha, marque la opción que considere adecuada para cada caso en las siguientes características, no pase a la siguiente muestra antes de haber respondido todas las preguntas y tome agua para limpiar el paladar entre cada muestra.

donde:

1 = me desagrada mucho

2 = me desagrada

3 = me es indiferente

4 = me gusta

5 = me gusta mucho

Código	A	B
Color		
Olor		
Textura		
Flavor		
Retrogusto		

¡Gracias por su ayuda!



10.2. Artículo

Effect of brining and direct salting on physicochemical, textural characteristics and acceptance of a hard cheese of bovine milk.

Effect of salting on characteristics of hard cheese.

Marian Salgado Maya¹, Beneranda Murúa Pagola², Daniel Díaz Bandera¹, Miriam Tonanzin Catalina Estefanía García Gómez¹, María Paz Fernández-Albalat Ruiz³, Juan Ventura Trillo Novo³, Octavio Dublán García¹.

¹Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Campus "Cerrillo". Km. 3.5, Carretera Toluca-Tlachaloya, El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México C.P. 50180.

²Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las Campanas s/n, Las Campanas, Santiago de Querétaro, Querétaro, México, C.P. 76010

³Aula de Productos Lácteos y Tecnologías Alimentarias. Universidad de Santiago de Compostela. Rua Montirón; nº152, Lugo, España. C.P. 27002.

*1Corresponding author: Octavio Dublán-García Chemistry Faculty. Autonomous University of the State of Mexico. Colon Street. 50000 Toluca de Lerdo, State of Mexico. E-mail: octavio_dublan@yahoo.com.mx. Tel. +52 1 (722) 2965514

Abstract

Brining is the most used salting method by ripened cheese producers, nevertheless this could cause some inconvenient from the needed cares of brine to maintain its quality to contamination risks not only on cheese but in the environment when it is not properly discarded as it generates a great amount of chlorides discharged to the ground. For all of the above the



objective of this study was to make an evaluation of the effect of two types of salting to determine if the direct method is most suitable for its use as an alternative both in the artisanal and industrial fields. Cheeses made with both methods were analyzed for physicochemical (fat content, moisture, ashes, titratable acidity, pH, protein content and chlorides) textural characteristics (strength needed for the first bite) and acceptance (color, aroma, texture, flavor and aftertaste), finding no significant difference excepting for higher protein and lower fat content on direct salting but protein degradation showed on electrophoresis along with texture, proved that none of them affected the final characteristics of cheese, accomplishing a product with a similar profile, making acceptable to salt cheese with a direct method over brining.

Key words: cheese salting, brining, sodium chlorides, texture, acceptance.

Introduction

Salting is a very ancient food preservation technique, along with fermentation and dehydration, it was a classic food conservation method, according to Guinee (2004) salting purposes in cheese are various, from flavor enhancement to determination of the water activity that controls enzyme activity and biochemical changes that lead to de flavor and aroma development, also microbial growth during ripening and crusting which also affects the texture (Payne & Morrison, 1999).

The most common ways of salting are, incorporating salt directly to curd, rubbing dry salt to cheese surface and cheese immersion in a brine solution, the amount and how this salt is absorbed influences the composition of the final product (Ponce de León et al., 2000).



In ripened cheeses the most widely used salting method is brining, Jonson & Paulus (2005) explains that during this process, sodium and chloride ions move within the cheese due to a difference in the osmotic pressure between the brine and cheese humidity, thus there is an interchange in which water diffuses outside the cheese and salt enters its matrix to reach a balance. On the other hand when a cheese is pulled out of the brine, its salt content in the surface and center is significantly different, much time is needed for the salt to become homogeneously distributed (Guinee & Fox, 1987) it can take months depending on the type of cheese or even fail to occur (Battro, 2010). About this salt discrepancy, Triviño (2010) points out that obtained pH is low as starter cultures carry on with lactic fermentation affecting the maturation course of cheese. It has been suggested that to obtain an uniform ripening on the cheese, salt distribution is as important as the salt content itself (Messens et al., 1999)

Brine requires specific conditions, it is a saturated solution $0.320 \text{ kg}\cdot\text{L}^{-1}$ of NaCl (Battro, 2010), the cheese should also have a similar temperature to brine to avoid thermal shock, causing the cheese to fissure.

In a study carried out by the Winsconsin-Madison University about the influence of salting procedure on the composition of Muenster-type cheese they concluded that the differences between both salting methods weren't significant so it could be elaborated with either, but direct salting was more appealing given the possibility to decrease chloride discharges to the environment due to the subsequent disposal of used brine (Ponce de León et al., 2000).

Furthermore maintaining right parameters for brining may carry several difficulties, being that as osmotic pressure forces salt to penetrate cheese matrix, whey together with some proteins, fat and bacteria stays in the brine, changing the pH, salt content and especially microbiological



quality, for example *Listeria monocytogenes* is able to survive high concentrations of Sodium Chloride leading to cheese contamination.

Several studies have confirmed that there is a relationship between the composition of the brine and the final properties of the brined cheese (McMahon et al., 2009; Morris et al., 1985; Geurts et al., 1972, 1974). Fucà et al. (2012) concluded that for higher salt concentrations of the brine, whey expulsion and moisture loss by osmosis was enhanced due to the contraction of the cheese protein matrix, additionally high calcium levels tightened protein-protein hydrophobic interactions favoring also whey expulsion resulting in important volume changes.

There are some treatments to keep adequate characteristics of brines and avoid all of the above but the downside is their high monetary and/or energetic costs (Jonson et al., 2005). Given that direct cheese salting requires less space and needs no special handle unlike the conditions demanded for brining and the fact that chloride discharges are lesser, a study must be conducted to indicate if physicochemical and textural characteristics of a cheese salted by a direct method are similar to those of a brined one thus avoiding issues generated by hard cheese processing at this stage. Having a scientific basis of the salting method, it can be extrapolated to both industrial and artisanal fields.

Materials and methods

2.1 Cheese manufacture

Hard cheese was made with bovine milk containing 4.2 % fat. Milk was pasteurized at 72 °C for 15 s, cooled to 38 °C and inoculated with 2 units of a culture mixture consisting of *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus*



helveticus y *Streptococcus thermophilus* (Lyofast MOT 096 FE). Milk was ripened for 50 min at 38 °C, calcium chloride solution was added at 0.02 % based on milk. Coagulant (calf rennet “*El Danes*”) was added, using the amount suggested by the manufacturer (1:10000), allowing milk to coagulate for 55 min at 35 °C. The curd was then cut in approximately 3 mm dices, afterwards the curd was cooked at 39 °C for 20 min and then pressed under the whey for 5 min with a 266 g•kg⁻¹ weight to make it more compact, and it was then drained. The curd was split into two portions, one of them was mixed with 2 % of salt (Direct Salting = DS), both this and the unsalted curd were placed in 450 g molds and a mechanical press was used for an 18 h period. The unsalted molded curd was placed in a saturated brine (23 %) for 200 min (Brining = B). Finally cheeses obtained with both treatments were stored at controlled conditions (12 °C and 80 % RH) for 90 d. Samples were taken at 0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 d of age. The experiment was done twice.

2.2 Physicochemical analysis

The protein content of the cheese was calculated using a modification of the Kjeldahl method described by Lynch et al. (2002), test was carried out on a Büchi digestion unit K-424 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) and for the distillation a Büchi distillation unit K-350 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) was used; fat content by Gerber method (ISO 3433:2008), moisture content was determined by drying on a Novatech E-180-ED-ESP oven (Tlaquepaque, Mexico) the cheese samples (3 ± 0.1 g) at 100 °C to constant weight according to AOAC method 926.08:1990, ash content by the method of calcination in a muffle furnace (62700, Barnstead Thermolyne, Dubuque, Iowa) at 550 °C (AOAC 935.42:1990), pH was measured on a solid pH meter for food and dairy insertion electrode (Model HI 99161, Hanna



Instruments, Romania) and titratable acidity was determined by the AOAC 920.124:2000 method. Salt content was determined using a modification of the Mohr reference method for sodium chloride content of butter (Fil 12A 1969).

2.3 SDS-PAGE electrophoresis

Sample protein extract was obtained by dissolving 0.1 g of sample in 100 μL of urea 8 M and 800 μL of loading sample buffer keeping it in boiling water during 10 min. Protein extract underwent SDS-PAGE electrophoresis using a modification of the method reported by García-Carreño et al. (1993). The separating gel was composed of 16 % acrylamide/bis (2.67 % C, 30 % T) made up in Tris/HCl 1.5 M buffer, pH 8.8. Both gel buffers contained 10 % SDS and the stacking gel was composed of 5 % acrylamide/bis (2.67 % C, 30 % T) in Tris/HCl 0.5 M buffer, pH 6.8. Gels containing 10 μL of sample and 5 μL of Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio Rad USA) as molecular weight standard were analyzed on a mini-Protean tetra cell, 4 gel system (Biorad Laboratories, Richmond, CA), gels were run at 200 V about 45 min at 4 °C and stained for 30-40 min in a 0.1 % coomassie blue R-250 dissolved and later de-stained by washing with several changes of 15 % acetic acid and 40 % methanol solution.

2.4 Texture Analysis

Textural analysis was carried out using a TA-XT2i texture analyzer and Texture Expert software 1.22 version. A cut test was made using a Craft knife to obtain the profile of the needed strength for the first bite on the cheese, the sample consisted of a square prism 15 mm wide per 30 mm long, 2 h before testing it was equilibrated at 22 ± 0.5 °C and penetration of

the probe was 8 mm perpendicularly at a $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ cross-head speed using a 25 Kg Texture Analyzer Load Cell (Stable micro systems, 2010).

2.5 Color Determination

Color measurements were made in the rind and center of the cheese using a CM-2002 Minolta spectrophotometer (Minolta camera co. LTd, Japan), with Spectra Magic version 1.01 (Minolta Co., Ltd. CyberChrome, Inc. 1997) software, the spectrophotometer was calibrated with a white standard plate and results were expressed as CIELAB values in a 0 to 100 scale L^* for lightness, the a^* as a red-green indicator and b^* for yellow-blue indicator, with a D65 illuminating reference and a 10° diaphragm vision angle of a 20 mm diameter (Park, 2000).

2.6 Sensory analysis

An acceptance test was conducted at the end of the ripening time (90 d) using a hedonic scale of 5 points (1 = dislike extremely, 2 = dislike moderately, 3 =neither like nor dislike, 4= like moderately and 5= like extremely) with an untrained panel, each judge had to evaluate a sample of both treatments on the following attributes: color, aroma, texture on mouth, flavor and aftertaste.

2.7 Statistical analysis

All tests were made by triplicate, one-way ANOVA was used, all data was analyzed using IBM SPSS Statistics Version 24 (2006, SPSS Ibérica 165 S.L.U. Madrid, Spain). Post-hoc means comparisons were made based on p-values ($\alpha < 0.05$) using the Tukey method. As for the



sensory evaluation a one-way ANOVA was also employed but with a Student-Newman-Keuls post-hoc test.

Results

3.1 Physicochemical analysis

The composition of the cheese is shown in Table 1, at the beginning of the process, moisture between different treatments showed significant differences, but as ripening period passed by it decreased getting to a similar result. No statistically significant differences were found for ashes, titratable acidity and sodium chlorides for the two treatments at same sampling time.

Fat and protein content were significantly different between B and DS, fat was slightly lower ($p < 0.05$) on the DS unlike protein that presented a higher amount ($p < 0.05$) on the DS.

3.2 SDS-PAGE electrophoresis

There was no significant difference found in the two proteolysis patterns (Figure 1) for each sampling time demonstrating that cheese evolution was alike for both treatments, as ripening time went on, patterns changed making the presence of lower molecular weight protein fractions

3.3 Texture Analysis

All measurements obtained for the cutting test of the cheese are in Table 2, for the center there were no significant differences between the two treatments at every sampling stage



and for the rind same behavior was observed excepting sample DS-5 (75 d) where significant differences ($p < 0.05$) were found regarding BS-5, however at the end of the maturation samples got even observing no more significant differences between DS-6 and BS-6 (90 d).

3.4 Color Determination

Values are presented on table 3, for the rind results of DS and B at the same sampling period CIELAB values were not statistically different excepting for b on samples DS4 and B4, where significant differences ($p < 0.05$) were found but this ceased on the next set of samples and through the end of maturation. Color measurements in the center of the cheese revealed that there were no significant differences for each pair of samples.

3.5 Sensory Analysis

Table 4 shows results for sensory evaluation, all parameters got a score between, 4= like moderately and 5= like extremely, also no significant difference was found for the two treatments for none of the evaluated parameters.

Discussion

Physicochemical parameters for dairy products are highly important, as moisture, pH, fat protein and salt content, among others provide elements for cheese evolution therefore impacting on final features of the product such as textural and sensory properties.



Moisture (Table 1) indicates the amount of water present in each sample, as observed in this study it decreases over time, during the 3 months of aging, the cheese moisture total decrease of 25.17 % for B and 20.83 % for DS caused increases in other components such as ashes (DS = 1.92 %; B = 1.63 %), fat (DS = 13 %; B = 12 %), protein (DS = 25.33 %; B = 22.91 %) and chlorides (DS = 1.21 %; B = 1.18 %), as reported in Licitra et al. (2000). Fuca et al. (2012) also found a relationship between high salt content and a greater moisture loss which results in greater fat and protein content. Major moisture loss occurred during the first month (DS = 17 %; B = 12.33 %), but as maturation continued it stabilized and stop presenting significant differences from sample 4 to 6 (60 – 90 d), the cheese showed no significant differences for the analyzed physicochemical parameters between DS ad B for each period. pH and titratable acidity showed no significant difference between samples at the beginning and end of maturation as reported by Crosa et al. (2011), however, values of both parameters had ups and downs along ripening time. Tarakci et al. (2004) explains this phenomenon as an initial increase in acidity given by hydrogen formation along with lactic acid and the subsequent diminishment is occurred by acid assimilation of yeasts and molds. Fat presented a lower content on the DS and in case of protein an opposite behavior was shown having a higher concentration on the DS cheese, in spite of this, further testing suggested that this compositional difference did not affect the final structure, texture, sensory properties and evolution of cheese, by not finding significant difference between samples in both textural and sensory analysis. On the cutting test, the profile of needed strength for the first bite on the cheese was obtained for both rind and center of samples (table 2), this values seemed to increase over time as moisture decreased, creating a more shrunken and compact structure, texture development is quite remarkable having an increment of 9.64 N on the rind for DS and



8.15 N for B, in the case of the cheese center the raise was $DS = 8.97$ N and $B = 8.72$ N. In the center results an abnormality on the texture evolution is perceived, DS-5 value is superior to DS-6 whereas the opposite is expected, with reference to this Šarić et al. (2016) points out that textural age-related changes may be expressed as hardening generated by dehydration and softening influenced by proteolysis. Sensory data on table 4 also highlights the acceptance among consumers of final products for the two kinds of cheese salting, an important influence is not shown regardless of the slight protein and fat difference on the scores for any of the analyzed attributes (color, aroma, texture, flavor and aftertaste) getting results over 4 (like moderately) for all of them. Moreover SDS-PAGE electrophoresis as seen in figure 1 resulted on a similar pattern for the proteolysis regardless of the minor percentage of protein on BS, also lower molecular weight protein fractions were observed making the protein hydrolysis more evident, a process partially given because of the enzymes on cheese.

For color (values on table 3), L^* values on the rind for both samples went down through time which means that the product darkness increased over ripening time, but no significant differences were displayed between each sample set, for a^* values increases and decreases were observed however there were no significant differences for the samples at the end of this study. A similar pattern was exposed for parameter b^* , the decrease in L^* criterion coincides with the investigation on Egyptian gouda cheese performed by El-Nimr et al. (2010). Regarding the center of the cheese the same kind of behavior was noticeable in the three parameters, but presenting higher values compared to those of the rind for the case of L^* and lower for a^* and b^* making evident that a lighter color is obtained for the inside of cheese relating to the rind.



For all of the above replacement of B for DS is possible and some upsides may be observed, for example higher costs of brine maintenance can be avoided as well as chloride polluting discharges to the environment. A previous study on Muenster type cheese revealed that method of application of salt did not affect final composition and using direct salt addition to curd, and a significant reduction in chloride discharges was achieved (Ponce de León et al., 2000). On the other hand a disadvantage that could be observed for DS is the leftover salty whey of the process, which unlike sweet whey cannot be used as easily to obtain byproduct, nevertheless some researchers have worked to solve the problem, Gregory (1988), achieved a 90 % removal of the salt in this kind of whey and 80 % of its solids could be added to sweet whey to improve its exploitation. Kapoor & Metzger (2004) experimented using salty whey on the formulation of a processed cheese based food, making possible to replace 7.6 % of the original formulation with salty whey, furthermore according to this study probed that approximately 55% of the salty whey produced on the cheddar cheese making in the USA could be used to make a processed cheese, additionally it could be used to make cheese imitations which could further increase this percentage. Another study carried out by Nair et al. in 2004 to evaluate the effect of different cheese making technologies on salt retention of cheddar cheese, accomplishing to improve it by the use of homogenization and condensation of milk. In view of the results obtained in this research and the potential advantages, DS could be advised as an alternative for B, thus avoiding to affect physicochemical and textural attributes as well as acceptability of hard cheese allowing to apply this knowledge in the industrial and artisanal fields.

Conclusions



According to the results obtained in this study samples of both treatments showed no significant differences in textural characteristics and acceptance of the hard cheeses at the end of ripening, for the physicochemical parameters, fat presented a lower content on the DS and a higher content of proteins, nevertheless this compositional difference had no effects on the sensory, textural and protein evolution of cheese, which may be seen as a nutritional advantage for the consumers. This could indicate it is feasible to use DS over B due to potential benefits such as a minor environmental contamination caused for inadequate disposal of brine and the upper cost of maintaining right parameters for the brine, which if not kept, could affect product homogeneity and microbiological quality thus being meaningful for either industrial or artisanal cheese producers.

Acknowledgments

Marian Salgado thanks the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico) for a graduate scholarship.

References

1. AOAC 2000 Official Methods of Analysis (17th edition). Association Of Official Analytical Chemists. Maryland DC, USA
2. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th edition). Association Of Official Analytical Chemists. Arlington VA, USA.
3. Battro P (2010) Quesos artesanales. Albatros, Argentina
4. Crosa MJ, Harispe R, Mussio P, Pelaggio R, Repiso L, Silvera C (2011) Comparación de



- los cambios químicos y microbiológicos en la maduración del queso Colonia salado tradicionalmente y por impregnación en vacío. INNOTEC [Online] 4:22-27
5. El-Nimr A, Eissa H, El-Abd M, Mehriz A, Abbas H, Bayoumi H (2010) Water Activity, Color Characteristics and Sensory Properties of Egyptian Gouda Cheese during Ripening. *J Am Sci* 6: 447-453.
 6. Fucà N, McMahon DJ, Caccamo M, Tuminello L, La Terra S, Manenti M, Licitra G (2012) Effect of brine composition and brining temperature on cheese physical properties in Ragusano cheese. *J Dairy Sci* 95:460-70. Doi: 10.3168/jds.2011-4438
 7. García-Carreño FL, Dimes LE, Haard NF. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal Biochem.* 214:65-9
 8. Geurts TJ, Walstra P, Mulder H (1972) Brine composition of the defect 'soft rind' in cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 26:168–179.
 9. Geurts TJ, Walstra P, Mulder H (1974) Transport of salt and water during salting of cheese.1. Analysis of the processes involved. *Neth. Milk Dairy J.* 28:102–129.
 10. Gregory, A. G. (1988). Desalination of sweet-type whey salt dripping for whey solids recovery. *Bull. Int. Dairy Fed.* 212:38–49.
 11. Guinee TP (2004) Salting and the role of salt in cheese. *Int J Dairy Technol* 57:99 – 109. doi:10.1111
 12. Guinee TP, Fox PF (1987) Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. *Cheese: chemistry, physics and microbiology.* 1:251-297.
 13. ISO 3433:2008|IDF 222:2008 Cheese — Determination of fat content— Van Gulik Method.
 14. Jonson, M; Paulus K. (2005). La Operación de Salado del Queso. *Mundo Lácteo y*



- Cárnico, pp 14-16.
15. Kapoor R., Metzger L. E. (2004). Evaluation of Salt Whey as an Ingredient in Processed Cheese. *J. Dairy Sci.* 87:1143–1150
 16. Licitra G, Campo P, Manenti M, Portelli G, Scuderi S, Carpino S, Barbano DM (2000) Composition of Ragusano Cheese During Aging. *J Dairy Sci* 83:404–411. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74896-X
 17. Lynch J, Barbano D, Fleming J (2002) Determination of the total nitrogen content of hard semi hard and processed cheese by the Kjeldahl method: collaborative study AOAC International 85:445-455.
 18. McMahon D, Motawee M, McManus W (2009) Influence of brine concentration and temperature on composition, microstructure and yield of feta cheese. *J. Dairy Sci.* 92:4169–4179. Doi:10.3168/jds.2009-2183
 19. Messens W, Dewettinck K, Huyghebaert A (1999) Transport of sodium chloride and water in Gouda cheese as affected by high-pressure brining. *Int Dairy J* 9:569-576 Doi: 10.1016/S0958-6946(99)00126-0
 20. Morris H, Guinee T, Fox P (1985) Salt diffusion in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 68, 1851-1858. Doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)81041-9
 21. Nair, S. S., Mistry, V. V., Nauth, K. R. (2004). Reduction of Salt (NaCl) Losses During the Manufacture of Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 87:2831–2838
 22. Norma FIL/IDF 12^a 1969 determination of salt sodium chloride content of butter (reference method).
 23. Park J (2000) Surimi and surimi seafood. *Food Science and Technology*. CRC Press, New York.
 24. Payne M, Morrison K (1999) A multi-component approach to salt and water diffusion in



cheese Int Dairy J 9:887-894. Doi: 10.1016/S0958-6946(99)00157-0

25. Ponce de Leon-González L, Wendorff W, Ingham B, Jaeggi J, Houck K (2000). Influence of Salting Procedure on the Composition of Muenster-Type Cheese. *J Dairy Sci* 83:1396–1401 doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75008-9
26. Šarić L, Šarić B, Mandić A, Hadnađev M. Gubić J, Milovanović I, Tomić J. (2016) Characterization of extra-hard cheese produced from donkeys' and caprine milk mixture. *Dairy Sci. & Technol* 96:227–241 DOI 10.1007/s13594-015-0261-2
27. Stable micro systems (2010). Exterior and interior hardness of almonds using a craft knife. TA XT2 application study. Reino Unido: Texture expert probes and product guide.
28. Tarakci Z, Sagun E, Sancak H, Durmaz H (2004) The effect of salt concentration on some characteristics in Herby cheese. *Pakistan Journal of Nutrition* 3:232-236. Doi:10.3923/pjn.2004.232.236
29. Triviño M (2010) Sustitución parcial de sal (cloruro de sodio, NaCl) por cloruro de potasio y/o magnesio (KCl y/o MgCl₂) en queso Gauda semidescremado. Dissertation, Universidad Austral de Chile



Table 1: Physicochemical analysis

Sample	Fat content	Moisture	Ashes	Titratable acidity	pH	Protein content	Sodium Chlorides
DS-0	28.50 ^a ± 0.55	47.00 ⁱ ± 0.89	3.31 ^a ± 0.28	1.96 ^a ± 0.19	4.69 ^g ± 0.19	6.03 ^a ± 0.12	1.40 ^a ± 0.00
B-0	32.00 ^b ± 1.10	41.66 ^h ± 0.82	3.40 ^a ± 0.46	2.12 ^{abcd} ± 0.25	4.58 ^{cdef} ± 0.25	6.41 ^a ± 0.17	1.40 ^a ± 0.00
DS-1	34.50 ^c ± 0.55	35.16 ^g ± 1.72	---	1.99 ^{ab} ± 0.02	4.49 ^{ab} ± 0.02	---	1.88 ^b ± 0.12
B-1	37.50 ^{de} ± 0.55	33.66 ^g ± 0.52	---	2.40 ^{abcd} ± 0.08	4.41 ^a ± 0.08	---	1.96 ^{bc} ± 0.24
DS-2	36.50 ^d ± 0.55	30.00 ^f ± 1.10	4.76 ^{bc} ± 0.12	2.12 ^{abcd} ± 0.39	4.47 ^{ab} ± 0.39	---	2.28 ^{bcd} ± 0.15
B-2	40.00 ^{gh} ± 1.10	29.33 ^{ef} ± 1.51	4.35 ^b ± 0.05	2.56 ^d ± 0.06	4.49 ^{abc} ± 0.06	---	2.16 ^{bcd} ± 0.20
DS-3	38.50 ^{ef} ± 1.64	27.00 ^{de} ± 0.63	---	2.42 ^{bcd} ± 0.13	4.53 ^{bcd} ± 0.13	---	2.38 ^{cde} ± 0.16
B-3	41.00 ^{gh} ± 1.10	26.00 ^{cd} ± 0.89	---	2.41 ^{bcd} ± 0.14	4.52 ^{bcd} ± 0.14	---	2.35 ^{cde} ± 0.23
DS-4	39.50 ^{fg} ± 0.55	24.00 ^{bc} ± 0.63	5.23 ^d ± 0.14	2.09 ^{abc} ± 0.23	4.63 ^{efg} ± 0.23	---	2.53 ^{de} ± 0.21
B-4	43.00 ^{ij} ± 1.10	23.16 ^{ab} ± 0.41	4.85 ^{cd} ± 0.05	2.02 ^{abc} ± 0.44	4.54 ^{bcd} ± 0.44	---	2.35 ^{cde} ± 0.29
DS-5	41.50 ^{hi} ± 0.55	22.33 ^{ab} ± 0.52	---	2.47 ^{cd} ± 0.31	4.65 ^{fg} ± 0.31	---	2.60 ^e ± 0.20
B-5	44.00 ^j ± 1.10	21.66 ^{ab} ± 0.82	---	2.38 ^{abcd} ± 0.02	4.61 ^{defg} ± 0.02	---	2.51 ^{de} ± 0.28
DS-6	41.50 ^{hi} ± 0.55	21.83 ^{ab} ± 3.54	5.23 ^d ± 0.37	2.35 ^{abcd} ± 0.05	4.67 ^{fg} ± 0.05	31.36 ^e ± 1.00	2.61 ^e ± 0.21
B-6	44.00 ^j ± 1.10	20.83 ^a ± 1.47	5.03 ^{cd} ± 0.08	2.28 ^{abcd} ± 0.23	4.61 ^{defg} ± 0.23	29.32 ^b ± 0.87	2.58 ^{de} ± 0.34

DS = Direct Salting, B = Brining Sample number: 0= 0d, 1= 15d, 2= 30d, 3= 45d, 4= 60, 5= 75d and 6= 90d

Means with the same superscript letters within a column are not significantly different (P > 0.05)

Means of three replicates ± Standard deviation

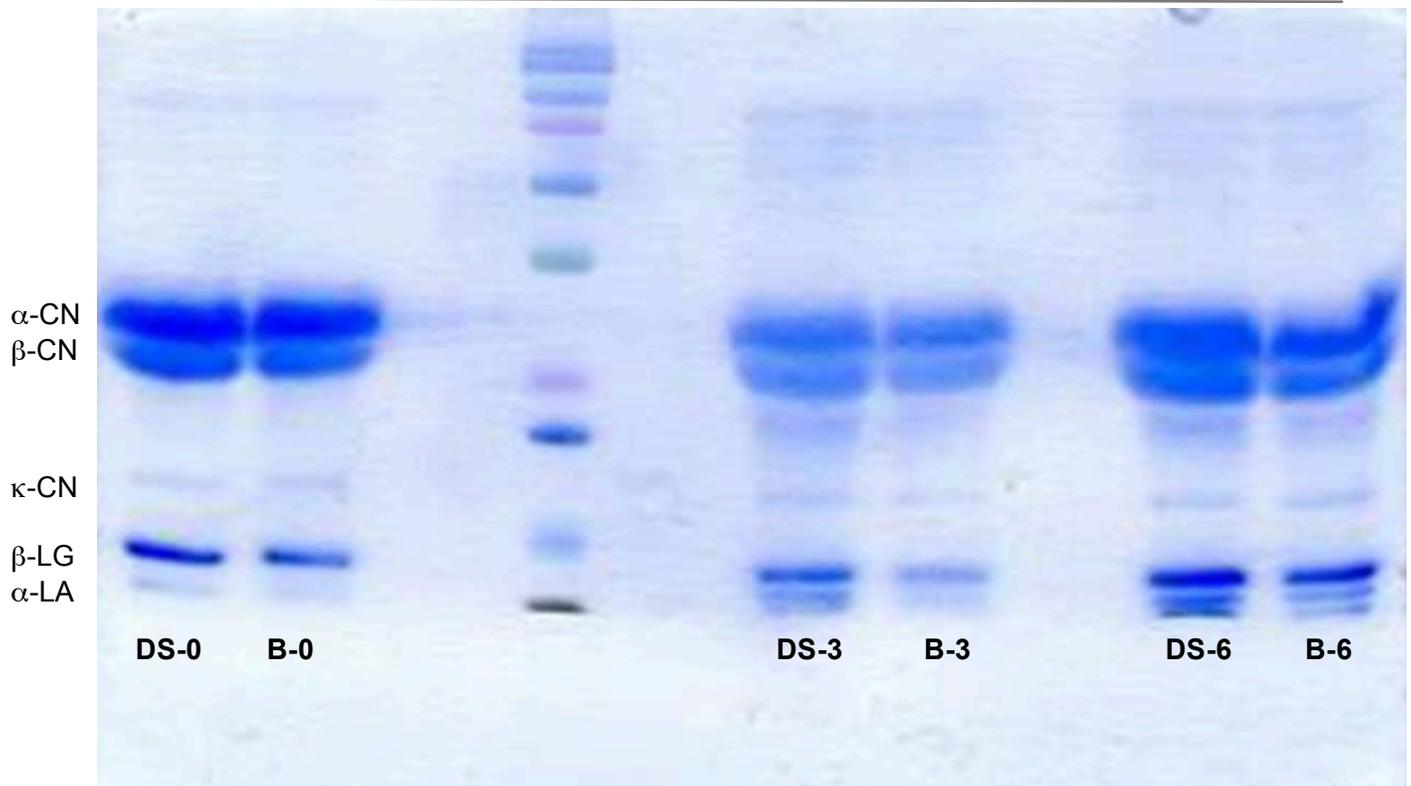


Figure 1: SDS-PAGE electrophoresis

DS = Direct Salting, B = Brining Sample number: 0= 0d, 3= 45d and 6= 90d



Table 2: Texture analysis

Sample	Rind strenght	Center strenght
DS-0	1.26 ^a ± 0.14	1.18 ^a ± 0.15
B-0	1.41 ^a ± 0.09	1.29 ^a ± 0.08
DS-1	1.83 ^{ab} ± 0.48	1.88 ^{ab} ± 0.19
B-1	2.29 ^{ab} ± 0.56	2.26 ^{abc} ± 0.41
DS-2	3.48 ^{cd} ± 0.53	3.42 ^{abcd} ± 0.82
B-2	3.75 ^{cd} ± 0.20	3.88 ^{bcd} ± 0.34
DS-3	5.36 ^{cd} ± 0.52	4.46 ^{cde} ± 1.10
B-3	5.01 ^{cd} ± 0.95	4.86 ^{de} ± 0.44
DS-4	6.14 ^{de} ± 2.38	7.21 ^f ± 1.75
B-4	6.75 ^{de} ± 0.27	6.47 ^{ef} ± 0.20
DS-5	10.05 ^e ± 1.73	10.39 ^e ± 2.88
B-5	7.75 ^{ef} ± 1.08	8.57 ^{fg} ± 0.72
DS-6	10.90 ^e ± 0.74	10.15 ^e ± 1.82
B-6	9.56 ^{fg} ± 0.78	10.01 ^e ± 1.20

DS = Direct Salting, B = Brining Sample number: 0= 0d, 1= 15d, 2= 30d, 3= 45d, 4= 60, 5= 75d and 6= 90d
 Means with the same superscript letters within a column are not significantly different (P > 0.05)
 Means of three replicates ± Standard deviation



Table 3: Color determination

Sample	Rind			Center		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
DS-0	86.56 ^c ± 1.00	2.39 ^a ± 0.33	19.52 ^a ± 1.76	87.61 ^g ± 1.83	2.13 ^{abc} ± 0.20	18.35 ^a ± 0.42
B-0	85.05 ^c ± 1.48	2.27 ^a ± 0.16	22.95 ^{ab} ± 1.09	87.80 ^g ± 1.09	2.25 ^{bcd} ± 0.25	19.93 ^{ab} ± 1.06
DS-1	66.94 ^{ab} ± 2.93	4.58 ^d ± 0.33	25.15 ^{bc} ± 0.60	86.00 ^{fg} ± 0.89	2.61 ^{cde} ± 0.25	21.45 ^{ab} ± 1.29
B-1	69.21 ^b ± 3.45	4.38 ^d ± 0.47	27.17 ^c ± 1.41	86.31 ^{fg} ± 0.25	2.87 ^{cde} ± 0.52	23.68 ^{bc} ± 0.58
DS-2	65.50 ^{ab} ± 10.85	4.34 ^d ± 0.40	21.93 ^{ab} ± 2.06	82.85 ^{ef} ± 1.29	2.79 ^{cde} ± 0.30	22.71 ^{bc} ± 2.04
B-2	65.88 ^{ab} ± 3.29	4.01 ^{cd} ± 0.44	24.83 ^{bc} ± 2.72	82.03 ^{ef} ± 1.43	3.19 ^e ± 0.28	25.66 ^c ± 1.32
DS-3	64.08 ^{ab} ± 2.94	3.90 ^{bcd} ± 0.23	22.22 ^{ab} ± 1.02	78.79 ^{de} ± 1.48	2.97 ^{de} ± 0.16	23.34 ^{bc} ± 2.24
B-3	63.46 ^{ab} ± 2.68	2.89 ^{ab} ± 0.51	24.79 ^{bc} ± 1.20	78.73 ^{de} ± 0.94	2.74 ^{cde} ± 0.33	25.71 ^c ± 2.08
DS-4	64.07 ^{ab} ± 6.29	3.04 ^{abc} ± 0.37	20.08 ^a ± 2.26	76.80 ^d ± 6.21	2.48 ^{bcd} ± 0.16	22.14 ^{abc} ± 2.93
B-4	61.68 ^{ab} ± 2.81	2.93 ^{abc} ± 1.20	25.26 ^{bc} ± 0.75	74.64 ^{cd} ± 1.37	2.51 ^{cde} ± 0.55	25.68 ^c ± 1.89
DS-5	59.51 ^a ± 2.05	2.65 ^a ± 0.56	21.42 ^{ab} ± 2.26	67.15 ^{ab} ± 2.01	2.29 ^{bcd} ± 0.50	23.73 ^{bc} ± 2.21
B-5	61.37 ^{ab} ± 2.75	2.69 ^a ± 0.82	24.46 ^{bc} ± 2.14	71.15 ^{bc} ± 1.26	2.58 ^{cde} ± 0.44	26.11 ^c ± 2.34
DS-6	58.83 ^a ± 2.05	2.12 ^a ± 0.53	21.56 ^{ab} ± 3.74	65.63 ^a ± 0.08	1.36 ^a ± 0.74	20.64 ^{ab} ± 2.59
B-6	61.23 ^{ab} ± 1.79	2.28 ^a ± 0.32	22.73 ^{ab} ± 3.01	68.66 ^{ab} ± 2.35	1.70 ^{ab} ± 0.39	23.26 ^{bc} ± 2.79

DS = Direct Salting, B = Brining Sample number: 0= 0d, 1= 15d, 2= 30d, 3= 45d, 4= 60, 5= 75d and 6= 90d

Means with the same superscript letters within a column are not significantly different (P > 0.05)

Means of three replicates ± Standard deviation



Table 4: Sensory analysis

Attribute	DS-6	B-6
Colour	4,66 ^a	4,80 ^a
Aroma	4,42 ^a	4,40 ^a
Texture	4,24 ^a	4,36 ^a
Flavor	4,42 ^a	4,62 ^a
Aftertaste	4,20 ^a	4,46 ^a

DS = Direct Salting, B = Brining Sample number: 0= 0d, 1= 15d, 2= 30d, 3= 45d, 4= 60, 5= 75d and 6= 90d
Means with the same superscript letters within a row are not significantly different (P > 0.05)