

UNIVERSIDAD DE LEÓN



FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**"Programa de Doctorado de Ciencias Veterinarias y
de los Alimentos"**

TESIS DOCTORAL

**Influencia de la raza, tratamiento térmico, cultivo iniciador
y tiempo de maduración en las características del queso
Zamorano**

**Effect of breed, heat treatment, starter culture and ripening
time on the characteristics of Zamorano cheese**

Domingo Fernández García

León, 2019



universidad
de león

*Memoria presentada para optar al grado de Doctor en el programa de doctorado
“Ciencias Veterinarias y de los Alimentos” por la Universidad de León*

DOCTORANDO

Domingo Fernández García

Universidad de León

TUTOR Y DIRECTOR

Dr. José María Fresno Baro

Universidad de León

CODIRECTOR

Dra. M^a Eugenia Tornadijo Rodríguez

Universidad de León

“Sin lugar a dudas, es importante desarrollar la mente de los hijos. No obstante, el regalo más valioso que se les puede dar, es desarrollarles la conciencia.”

John Gay (1685-1732)

“La familia es la primera célula esencial de la sociedad.”

Juan XXII (1881-1963)

“Mis héroes son y fueron mis padres, no me imagino teniendo a otras personas como héroes”.

Michael Jordan

Los autores desean expresar dar las gracias por su colaboración:

A la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León por la subvención de este proyecto de investigación: *“Influencia del tipo de raza de oveja y tratamiento de la leche en la calidad del queso Zamorano con D.O. durante su maduración”*. Proyecto ZA/01/CR/01.

A la Dirección del Consejo Regulador de la Denominación de Origen Queso Zamorano por habernos prestado toda su ayuda profesional y financiera.

Al panel de catadores del Consejo Regulador de la D.O. Queso Zamorano por su ayuda en la evaluación sensorial de los quesos.

A todos los ganaderos que han colaborado aportando la leche de oveja para la fabricación de los distintos lotes de queso.

A D. Ángel Sánchez, Técnico de Agricultura de la Junta de Castilla y León por toda la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

A D. Jaime Gacho, maestro quesero, por haber dedicado parte de su tiempo libre a la elaboración de los quesos de este proyecto de investigación.

Al I.E.S. Alfonso IX de Zamora por habernos brindado su planta piloto de lácteos para la elaboración de los quesos, en especial a su responsable el Profesor Claudio y a los alumnos del curso de industrias alimentarias.

Agradecimientos

He tenido la suerte de desarrollar esta tesis doctoral en un lugar que además de formarme como investigador me han apoyado como una familia. Por eso quiero agradecer a mi familia del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos estos años compartidos.

En primer lugar, a mis padres aquí, mi “Boss” (Chema) y María Eugenia. Me han formado científicamente y personalmente. Sin vosotros esta aventura no habría salido adelante.

A mis hermanos mayores. Bernardo, siempre dispuesto a ayudar, un tutor más con sus consejos y un gran amigo siempre. También a mi hermano Javi, por enseñarme el lado sostenible de la vida y la cromatografía.

A mis hermanas mayores. Leticia, sin tu discreta presencia el laboratorio no funcionaría igual de bien, sin duda fiel reflejo de tu persona. A pesar de darte mil veces las gracias siempre será insuficiente. También me acuerdo de mi querida Dolo, un beso enorme.

A mis hermanos pequeños. Ricardo por las mil vivencias juntos de verdadera amistad, tanto en el laboratorio como en la vida. Además, una parte esencial en esta tesis por su ayuda durante el experimental. No me olvido de mi hermano Avelino, sin duda un gran investigador, pero aún mejor persona, muchos de los buenos recuerdos de esta etapa son contigo.

A mis hermanas pequeñas. Mis dos Anitas, Noelia, Isabel, Patricia, Bea, Tania, Erica. Ha sido un gran placer cuidaros y guiaros en los primeros momentos en el laboratorio y luego ver orgulloso todo lo que habéis logrado. Aunque lo más destacable es la suerte que he tenido al conoceros y que me hayáis hecho partícipe de grandes momentos vividos a vuestro lado. Cine, viajes, cenas y un sinnúmero de grandes momentos del día a día hicieron que cada día de trabajo fuese una experiencia única.

A mis tías. Ana Bernardo, Merche, Pepa y Montse. Vuestra contagiosa alegría siempre me acompañó e hizo más fácil el discurrir de los días.

A mis primas de Perú: Daphne y Bettit, a las que cada pequeño detalle les hace sonreír; a mis primos de México: Luz, Sergio, Roberto...un placer sin duda vuestra visita.

Pero tenido el placer de realizar parte mi trabajo experimental en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, donde también he tenido una gran familia.

Destaco en primer lugar a Tiquio, a partes iguales padre, compañero, confidente y amigo para siempre. No podría separar de mi memoria mi paso durante estos años por el ICTAL sin tu figura a mi lado. Y gracias a mi madre aquí, Camino. Siempre pendiente de mí, ayudándome y aconsejándome.

También a mis hermanos mayores Javi y Miguel. Muchas horas de laboratorio a vuestro lado, pero también conversaciones y alguna que otra celebración han hecho que la palabra trabajo tuviese connotaciones de satisfacción, entretenimiento y diversión.

A mis hermanas del ICTAL: Rosana, infatigable en su búsqueda del optimismo utópico, imposible ser mejor persona; Eugenia, siempre alegre y dispuesta a ayudar; Elba y Eva, discretas y sencillas; María, alegría y donaire a la mopa. Quisiera tener un recuerdo especial

también para ti María que seguro que estarás haciendo que el cielo sea un lugar más hermoso. No me olvido de Cristina, también siempre con una buena palabra colgada de una sonrisa.

Por supuesto la fortuna me hizo nacer en una familia honrada, humilde y cariñosa. Así que esta tesis no habría tenido ni siquiera comienzo sin vosotros, mis padres Alipio y María. Gracias por intentar hacer de mí, sobre todo, una buena persona. También a mi hermano Pedro, no podría haber tenido nunca mejor hermano, espero poder estar a tu altura.

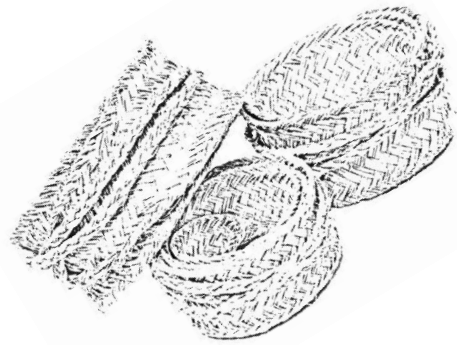
Y ya que esto es una tesis no podría cerrar estos agradecimientos sin una conclusión. La mía es que todo este camino de crecimiento científico y personal tenía como finalidad conocer a mi mujer, Diana, y gracias al amor tener el mejor de los resultados, el más prestigioso y el de mayor significación: Lucía y Miriam.

Índice

1	Introducción	15
1.1	Un poco de historia.....	16
1.2	Situación del sector lácteo	23
1.3	Producción de queso.....	27
1.4	El queso de oveja.....	29
1.5	Tecnología de transformación de la leche en queso	31
1.5.1	Selección y pretratamiento de la leche.....	32
1.5.2	Acidificación.....	34
1.5.3	Coagulación.....	35
1.5.4	Corte.....	36
1.5.5	Desuerado.....	37
1.5.6	Salado	37
1.6	Proceso de maduración del queso	38
1.6.1	Glucólisis.....	38
1.6.2	Lipólisis	39
1.6.3	Proteólisis	41
1.7	Los microorganismos de enemigos a aliados: los cultivos iniciadores	43
1.8	El queso Zamorano	48
2	Justificación y objetivos	52
3	Material y métodos	58
3.1	Elaboración de los quesos y toma de muestras	59
3.2	Análisis químicos y fisicoquímicos.....	60
3.3	Análisis microbiológicos.....	61
3.4	Análisis de los parámetros proteolíticos	62
3.4.1	Fracciones nitrogenadas	62
3.4.2	Determinación del contenido en caseínas	63
3.4.3	Determinación del perfil de péptidos.....	63
3.4.4	Determinación del contenido en aminoácidos libres	64
3.4.5	Determinación del contenido en aminas biógenas.....	66
3.5	Análisis de los parámetros lipolíticos.....	68

3.6	Determinación del color.....	69
3.7	Análisis del Perfil de Textura.....	69
3.8	Análisis sensorial.....	69
3.9	Análisis estadístico.....	71
4	Resultados y discusión.....	73
4.1	Cambios en el queso Zamorano durante la maduración.....	74
4.1.1	Análisis químicos y fisicoquímicos.....	74
4.1.2	Análisis microbiológicos.....	76
4.1.3	Análisis de los parámetros proteolíticos.....	77
4.1.4	Parámetros lipolíticos.....	87
4.1.5	Análisis del Perfil de Textura.....	90
4.1.6	Análisis sensorial.....	92
4.2	Influencia del tratamiento térmico sobre las características del queso Zamorano.....	96
4.2.1	Análisis químicos y fisicoquímicos.....	96
4.2.2	Análisis microbiológicos.....	97
4.2.3	Análisis de los parámetros proteolíticos.....	99
4.2.4	Parámetros lipolíticos.....	108
4.2.5	Análisis del Perfil de Textura.....	112
4.2.6	Análisis Sensorial.....	113
4.3	Influencia de la raza en las características del queso Zamorano.....	118
4.3.1	Análisis químicos y fisicoquímicos.....	118
4.3.2	Análisis microbiológicos.....	120
4.3.3	Análisis de los parámetros proteolíticos.....	121
4.3.4	Parámetros lipolíticos.....	130
4.3.5	Análisis del Perfil de Textura.....	134
4.3.6	Análisis sensorial.....	135
4.4	Efecto del tipo de cultivo iniciador autóctono sobre las características del queso Zamorano.....	139
4.4.1	Análisis químicos y fisicoquímicos.....	139
4.4.2	Perfil de ácidos grasos totales.....	141
4.4.3	Análisis microbiológicos.....	144
4.4.4	Análisis de los parámetros proteolíticos y lipolíticos.....	145
4.4.5	Parámetros del color.....	154
4.4.6	Análisis del Perfil de Textura.....	155

4.4.7	Análisis sensorial	157
5	Conclusiones	160
6	Bibliografía	164



1 Introducción

1.1 Un poco de historia

Durante las últimas décadas el desarrollo de nuevas técnicas en diferentes campos de investigación ha permitido a descubrir el verdadero origen del queso, que durante mucho tiempo habían permanecido en las tinieblas del desconocimiento.

Su origen parece situarse en el Neolítico y muy probablemente dándose la mano con el desarrollo de la domesticación del ganado y la explotación del mismo en su aptitud lechera.

Los datos arqueológicos indican que los primeros animales en domesticarse fueron las ovejas y las cabras (muy probablemente por su rusticidad y capacidad de adaptación a hábitats desfavorables) en los valles de los ríos Éufrates y Tigris, en el Asia Occidental. Los avances en las técnicas diagnósticas, tanto de los restos óseos como dentales de estos animales, y los estudios de DNA mitocondrial, en animales modernos y en restos arqueológicos de animales neolíticos, realizados en sinergia con modernos modelos estadísticos para la interpretación de las estrategias de manejo de los pastores seminómadas de esas regiones, han permitido situar los albores de la domesticación hace unos nueve milenios antes del nacimiento de Jesucristo en la zona del Fértil Crescente, la cuna de la agricultura (Bollongino et al., 2012; Conolly et al., 2012; Feliuss et al., 2014; Vigne, 2011; Vigne et al., 2011; Zeder, 2012).

El desarrollo de la producción de leche parece estar ligado al comienzo de la domesticación de las ovejas y cabras y con posterioridad de las vacas, incluso podría ser uno de los motivos para que inspiraran en primer lugar a los agricultores neolíticos iniciando la domesticación de los rumiantes. Este hecho podrían corroborarlo los restos arqueozoológicos de algunos de los perfiles de sacrificio realizados en la época (Vigne et al., 2011). No obstante, la primera evidencia científica directamente relacionada con el desarrollo de la lechería se sitúa en los restos arqueológicos que la vinculan con el amanecer de la alfarería 7000 años antes de Cristo. El uso de las técnicas analíticas ligadas a isótopos del carbono para el análisis de restos de lípidos en recipientes cerámicos de la antigüedad indica que eran restos de grasa láctea, por lo que esas ollas sirvieron para transportar o almacenar leche en su interior (Thissen et al., 2010).

Los restos de la grasa láctea en las vasijas cerámicas ha permitido seguir la propagación de la producción lechera con las migraciones de aquellos pastores neolíticos en los siguientes milenios hacia Europa (Copley et al., 2003; Cramp et al., 2014; Salque et al., 2012).

Los restos de grasa láctea no indican que se transportara queso u otros productos lácteos, pero según varios investigadores cuando se conserva sólo leche en los recipientes de

cerámica muy difícilmente se absorberían cantidades importantes de grasa, sin embargo, en la conservación de derivados lácteos como mantequilla o queso presentan absorciones muy superiores (Copley et al., 2005). Este factor junto al hecho de que se usaran telas en el interior de esas vasijas, similares a las usadas en muchos tipos de quesos para la separación de la cuajada del suero, parecen confirmar la hipótesis de que durante el séptimo milenio antes de Cristo se usaron este tipo de recipientes para la elaboración de quesos (Salque et al., 2012).

Evidentemente este protoqueso tenía que ser muy simple, muy parecido al que elaboran hoy día los pastores seminómadas del sudeste asiático, esto es: quesos frescos, blandos, de coagulación láctica y que podrían secarse al sol para prolongar su conservación y postergar su consumo (Kindstedt, 2012). En la figura I1 puede verse la evidencia arqueológica encontrada en Egipto que nos sitúa en estas hipótesis.

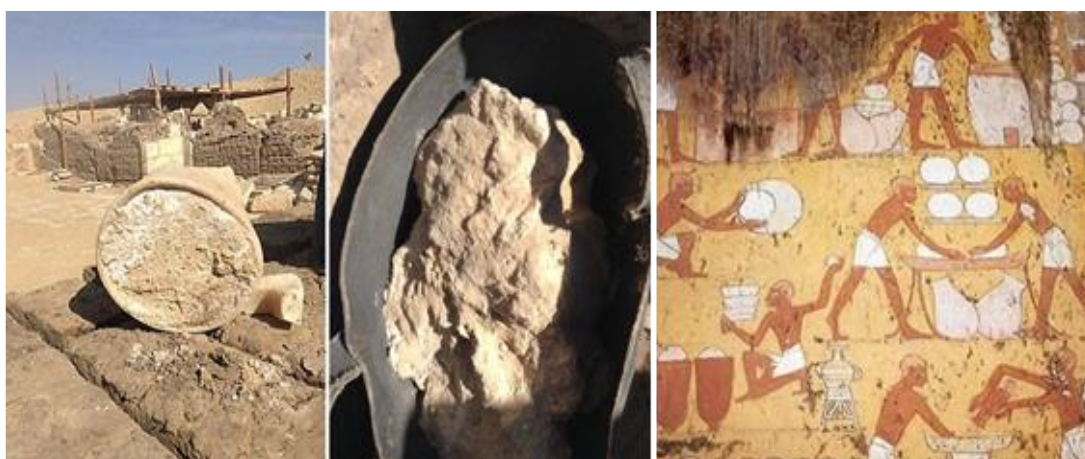


Figura I1. Vasija encontrada en un yacimiento arqueológico de Egipto con los restos de un queso presumiblemente de coagulación láctica de 3200 años de antigüedad y pinturas procedentes de la tumba de Ipy localizada en Tell El Amarna, gobernación de Menia, Egipto. *Livescience* (2018).

El ulterior desarrollo de los quesos coagulados enzimáticamente está puramente en el terreno de la especulación, ya fuera por conservación de la leche en estómagos de animales sacrificados donde actuaban las enzimas presentes en los mismos o por mera observación de los estómagos de animales jóvenes sacrificados en cuyo interior la leche estaba cuajada. Sea como fuere es evidente que observaron las cualidades distintivas de este tipo de quesos coagulados mediante enzimas lo que les permitió el desarrollo de productos con una menor humedad que los meramente coagulados mediante disminución del pH.

El desarrollo de tecnologías como utensilios para cortar la masa, recipientes para aplicar calor, mecanismos para aplicar presión, el empleo de la sal como conservante y sus propiedades en el sabor, el uso del medio en el que se desenvolvía el pastor neolítico para conservar y proporcionar matices propios (como ocurre al introducir los quesos en cuevas),

fue permitiendo un conocimiento más profundo y un mayor perfeccionamiento de las tecnologías y los productos (Kindstedt, 2014).

Recientes avances en metaproteómica (Mays et al., 2018) han demostrado el consumo de leche de origen bovino durante el Neolítico Medio, debido a la presencia de β -lactoglobulina, además otros autores también opinan que la presencia de β -lactoglobulina junto con la ausencia genética de lactasa en los restos arqueológicos encontrados, sugieren el consumo de cantidades pequeñas de leche o la reducción de lactosa mediante el procesado de la leche en otros productos (Charlton et al., 2019). De esto modo han abierto una línea de investigación que explore cómo las poblaciones neolíticas pueden haber estado consumiendo y procesando leche cruda y la posible variabilidad que puede haber existido dentro de estos procesos en el pasado.

Las primeras referencias escritas sobre queso datan de 4000 años a.C en Uruk, la gran ciudad de los sumerios. Son caracteres cuneiformes grabados en tablas de arcilla que reflejan los registros administrativos que tabulan los datos anuales de productos lácteos de los rebaños de ovejas y cabras pertenecientes al estado entre los que destacan el queso y el aceite de mantequilla, junto con referencias relacionadas con el uso de los productos lácteos en ritos religiosos (McCormick, 2012).

En estas tablas de Uruk hay algunos términos que se podrían traducir como cuajo animal o cuajo vegetal pero no hay evidencias de que se elaboraran quesos enzimáticos. Esto no sucede hasta la llegada del Imperio Hitita al final de la Edad de Bronce que mantuvo relaciones comerciales con los sumerios y se vieron altamente influenciados por estos. Así en las tablas de arcilla de escritura cuneiforme de los hititas se detalla el uso, en diversos rituales, de queso y también de cuajo, por lo que se puede entender que los quesos elaborados a partir del cuajo estaban ya muy establecidos (Hoffner, 1998). Además, ya habían acuñado una gran variedad de términos que establecían distinciones entre los diferentes tipos de queso (queso pequeño, queso grande, queso desmenuzado o rallado, queso frito, queso desmigado, queso lavado y queso envejecido de soldado (Carter, 1985). Esto último sugiere que los quesos fueron utilizados como ración militar algo que sucedería con posterioridad en otras civilizaciones como la griega o la romana.

Precisamente la civilización griega incorporaría a la vida diaria el queso, hasta el punto de incorporarlo en su literatura, como es el clásico La Odisea (Homero, 2006 [s VIII a.C.]), donde se describe a un Cíclope haciendo y almacenando quesos de oveja y cabra: *“Llegamos enseguida a su cueva y no lo encontramos dentro, sino que guardaba sus gordos rebaños en el pasto. Conque entramos en la cueva y echamos un vistazo a cada cosa: los canastos se inclinaban bajo el peso de los quesos”*

El más extendido era un queso que denominaban fresco y que probablemente era un queso elaborado a partir de leche cruda de oveja y cabra o mezcla de ambas, de coagulación enzimática, que apenas sufría un proceso de prensado y que se salaba en superficie o en salmuera muy similar a los quesos actuales de la región (Kamber, 2007).

La fama de algunos quesos hizo que se exportaran por comercio marítimo e incluso alguno adquirió tal fama que se denominaban con su lugar de origen, como los de las islas de Cythnos y Chios en el Mar Egeo (Migeotte and Lloyd, 2009). Casi con seguridad a partir del queso fresco que se almacenaba y posteriormente se maduraba en tarros de cerámica con salmuera surgió el queso tipo Feta que ha pervivido hasta nuestros días (Kamber, 2007).

Desde Sicilia también se comerciaba con Atenas, importando a Grecia un afamado queso de pequeño tamaño, coagulado de manera enzimática, de textura muy dura y seca que presentaba una larga vida útil y que se consumiría preferentemente rayado, análogo al queso Pecorino actual (Kindstedt, 2012).

La pasión por el queso se enlazó entre griegos y romanos a través de los etruscos que incluso dejaron rayadores de queso en bronce o hierro (Sherratt, 2004).

Durante la época del Imperio Romano el queso estaba ya ampliamente difundido e implantado en la dieta diaria, además solía formar parte de la ración tanto de los soldados como de sus generales durante las campañas. Muchas de estas tropas provenían del mundo agrícola así que eran expertos elaboradores de queso, por lo que es probable que incluso elaborasen sus propios quesos durante sus periodos de campaña como atestiguan los vestigios encontrados en forma de moldes de desuerado en diferentes campamentos romanos (Carreras, 2004; Menéndez-Argüín, 2002; Niblett et al., 2006).

El mismo Julio César en sus textos sobre la Guerra de las Galias (César, 1986), para ser exactos en su libro VI dedicado a la segunda expedición a Germania haciendo referencia a las costumbres de la zona, describe en su capítulo XXII “No se dedican a la agricultura, y la mayor parte de su vianda se reduce a leche, queso y carne”. Esto demuestra que, en los pueblos bárbaros, coetáneos a los romanos, también estaba muy arraigado el consumo de leche y productos lácteos, lo que indica que existía una cultura muy refinada y extensa por todos los pueblos de Europa a este respecto (Kindstedt, 2012).

Durante el Imperio Romano llegó a tal punto la pasión y la especialización en el buen hacer quesero que algunos de sus más afamados escritores como Varrón, Plinio el Viejo o Columela dejaron constancia de sus quesos y procesos. Precisamente Columela en su *De Re Agrícola* (Josephson, 1956) realiza una prolija descripción de la elaboración de queso.

Entre los procesos que se detallan estarían el calentamiento de la leche cruda, pero sin llegar a sobrecalentarla. También diferenció entre quesos blandos y duros, en el primer caso debían consumirse de forma rápida y los quesos duros tenían una mayor vida útil.

Describió con cierto detalle los distintos tipos de cuajo, recomendando el uso del procedente de corderos o cabritos, pero también hace una somera mención de la posibilidad de usar cuajos de origen vegetal como el procedente de ciertos cardos, del cártamo o la savia de higuera. Además, sugería utilizar la menor cantidad posible de cuajo para la obtención de un queso de más calidad. Otros procesos descritos por Columela fueron el desuerado utilizando moldes de mimbre, el prensado de los quesos y el salado tanto con sal seca como en forma de salmuera para conseguir un endurecimiento de los mismos. También citó técnicas de ahumado e incluso aconsejaba que la mejor manera de conservarlos era en estantes cerrados para que el producto estuviera tierno durante un tiempo más prolongado.

Cabe mencionar también la descripción que realiza de unos quesos prensados a mano y moldeados con la ayuda de agua caliente, algo que recuerda a los procesos llevados a cabo para la elaboración de los quesos de pasta filata.

En la figura I2 puede observarse el diagrama de flujo de la elaboración que proponía Columela, y que se tomó como referente de fabricación durante muchos años, de hecho, podemos observar que algunas elaboraciones no difieren en exceso de este proceso.

Avanzando en el tiempo de forma rápida llegaríamos a la Edad Media donde, en esta época de oscuridad cultural, el saber, como el conocimiento en general, se acunaba en las bibliotecas monásticas, por eso, el desarrollo de los quesos tuvo lugar principalmente en muchos monasterios y también en cierta medida en la zona del feudo, ya que gozaban de medios económicos y sociales.

Se fue pasando además a una mayor utilización de la leche de vaca, los pastos comunales feudales permitían a los campesinos criar una o dos vacas, mientras que la abundancia de terrenos monacales les permitía alimentar en buenas condiciones un menor número de animales y con una mayor producción en comparación con ovejas o cabras. Además, las diferencias de clima entre los territorios de Europa determinaron el tipo de queso que predominantemente se elaboraba. Las regiones más frías del norte podían elaborar quesos con mayor humedad y bajo pH, mientras que los países de clima más templado, tales como los del área mediterránea, elaboraron quesos de menor humedad y mayor duración (coagulaciones eminentemente enzimáticas).

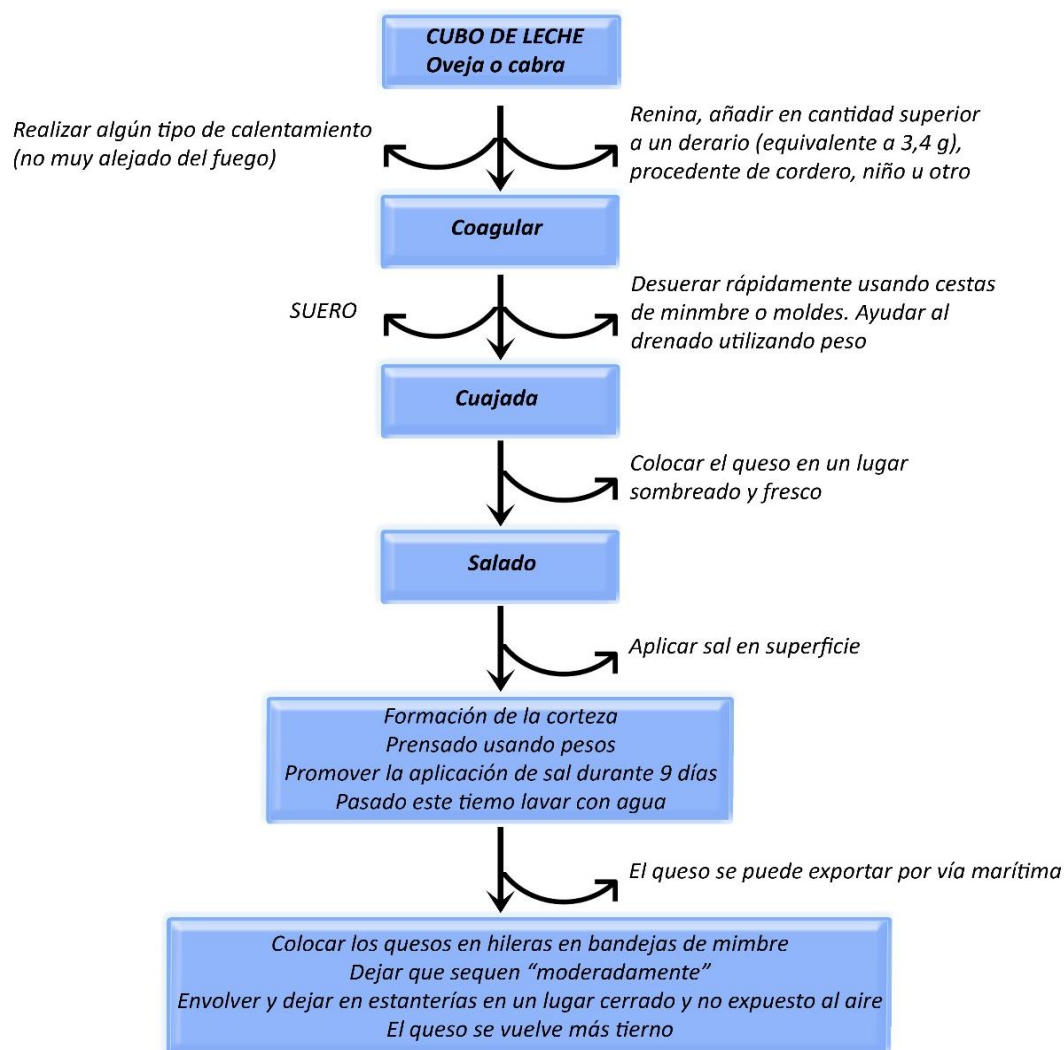


Figura I2. Diagrama de flujo de la descripción que hace Columela de la elaboración de los quesos romanos. Adaptado y traducido de Gobbetti et al. (2018).

Las particularidades de los microclimas, dentro incluso de las mismas regiones, el uso de bodegas o cuevas, no sólo por las condiciones del medio sino también por la microbiota propia presente en estos lugares, fueron aspectos que condicionaron la aparición de quesos de pasta blanda y corteza enmohecida o de los quesos de vena azul. La combinación de todos estos factores ha hecho que se fueran creando la ingente variedad de quesos que actualmente conocemos (Kindstedt, 2012, 2014).

El fervor por el queso de esta época ha quedado prolijamente reflejado en varias ilustraciones en forma de miniaturas que forman parte del *Tacuinum Sanitatis* (figura I3).

Al finalizar la Edad Media y ya con el comienzo de la Edad Moderna dejó de existir la superioridad de leche de oveja sobre la de vaca en la quesería, además nuevos métodos de cocción, prensado y salazón, dieron origen a nuevas variedades. Por otro lado, aparecen en

varias regiones de Europa una nueva generación de quesos de mayor formato, pudiendo llegar a alcanzar hasta los 40 kg de peso (Kindstedt, 2012; Montanari and Brombert, 2012). Se realizaron grandes avances a nivel técnico iniciándose una revolución industrial y científica, acompañándose también de nuevos entramados sociales y económicos. Estos aspectos originaron una mayor industrialización de los procesos y una búsqueda cada vez más intensa en cuanto a la calidad de los productos obtenidos y de sus procesos.

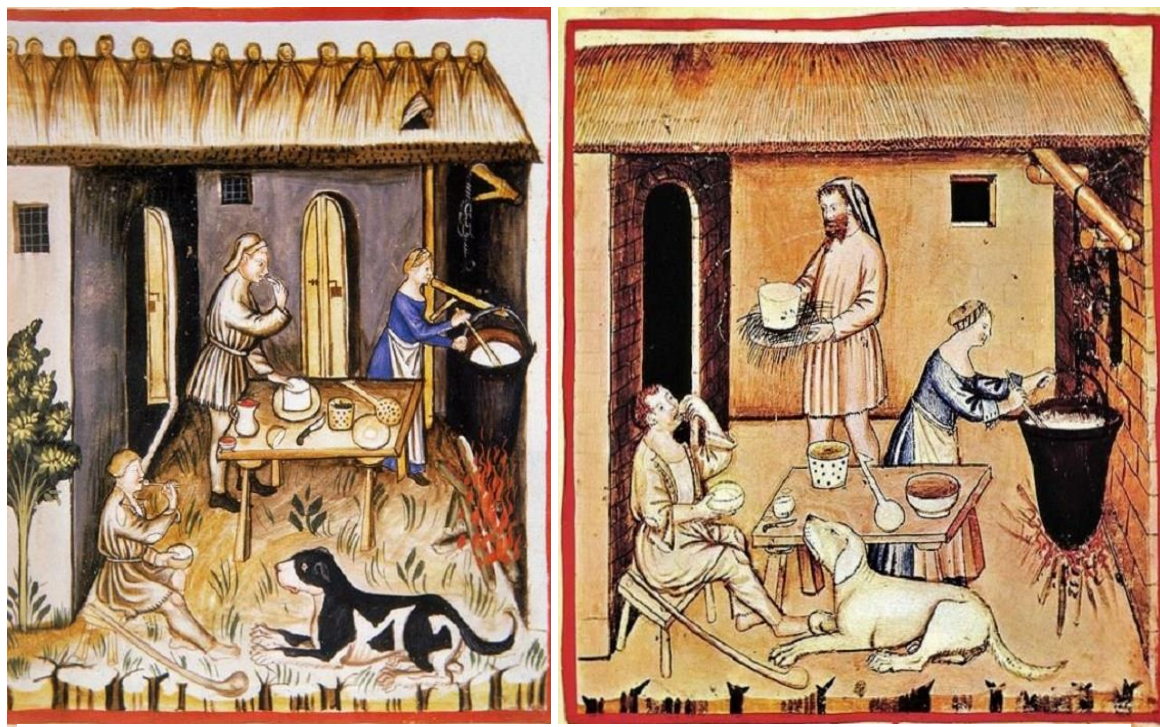


Figura 13. Elaboración de queso. Tacuinum Sanitatis. Folio 60, siglo XIV-XV

Como curiosidad cabe destacar que en este periodo podemos contar la importancia que tuvo el queso en una de las grandes obras escritas de la historia como fue *El Quijote*, donde en sus dos tomos existen multitud de referencias al queso (Cervantes Saavedra, 2015).

Y con la tendencia de avances científicos y la industrialización hemos llegado a la Edad Contemporánea, y para ser más exactos a las últimas décadas de la misma donde la informatización controla el desarrollo de productos, el consumo, donde no han dejado de gestarse constantemente nuevos cambios socioculturales y económicos. La convergencia tecnológica y el comercio electrónico ha disparado la competencia, así se invierte mucho en publicidad y se buscan innovaciones para la comodidad del consumo adaptado a las necesidades del momento o simplemente buscando un diseño atractivo (Kinsey y Buhr, 2003). También se buscan productos innovadores que inundan de referencias los mercados digitales. Aunque existen pocos estudios relacionados con el comercio electrónico en relación a los productos agroalimentarios es evidente que se está consolidando a pesar de que lo está haciendo a un ritmo inferior al esperado (Carpio y Lange, 2015). Así con los datos de 2012, el

9% de los usuarios de Internet dentro de la Unión Europea compraron alimentos y comestibles en Internet, siendo Reino Unido con un 21% el país con la mayor proporción de compradores de comida en formato de comercio electrónico mientras que en España sólo el 6% de los consumidores eligieron esta vía (Elghannam y Mesías, 2018).

El nuevo consumidor reclama la calidad máxima en los productos y exige unos controles que garanticen la seguridad alimentaria, pero también la búsqueda de propiedades que mejoren la salud. Asimismo, nuevas preocupaciones relacionadas con el medio ambiente han traído nuevos campos de desarrollo orientados tanto al bienestar animal como a la obtención de productos ecológicos o productos Bio. De este modo el mercado de lo ecológico presenta una tendencia creciente imparable en los últimos años (MAPA, 2019).

También en este periodo se ha invertido la tendencia de una elaboración en las grandes factorías a un nuevo auge de las elaboraciones tradicionales, siendo valoradas por muchos consumidores incluso por encima de los industriales (Bouma et al., 2014; Wang et al., 2015). Los nuevos modelos de familia, con tendencia a ser monofamiliares en muchos casos, requiere de piezas más pequeñas o envasados en loncheados o cuñas cada vez de menor tamaño, de un solo uso.

1.2 Situación del sector lácteo

El ganado ovino es el que presenta un mejor aprovechamiento de los pastos áridos o semiáridos y de los subproductos agrícolas fibrosos, razón por la cual esta especie se ha explotado tradicionalmente en las zonas áridas y secas, aprovechando ecosistemas no aptos para la explotación del ganado vacuno.

Más de la mitad de la población ovina mundial está localizada en países en vías de desarrollo donde principalmente se explota por su carne en el mercado local.

En cuanto leche de oveja la mayor producción se encuentra en los países de la región mediterránea y en Oriente Próximo. Los países con un mayor censo mundial de ovejas de aptitud lechera son China, la República Árabe Siria, la República Islámica de Irán, Turquía y Argelia, siendo los mayores productores de leche, Turquía y Grecia (FAO, 2018).

Dentro de la Unión Europea (UE) destacan por su censo ovino Reino Unido, España, Rumania, Grecia, Italia y Francia, de los cuales el Reino Unido y España representan casi el 46% de la cabaña ovina europea, el primero con el 25% y España, que ocupa el segundo lugar, con un 17% del total de cabezas de oveja de la UE (EUROSTAT, 2018).

Si nos centramos en el sector lácteo, en la Europa de los 28, España es el séptimo país productor de leche de vaca, con el 4% del total. La producción de nuestro país asciende a los primeros puestos en relación a la leche de oveja, donde España ocupa el primer puesto con el

17% del total, y de la leche de cabra, con la que alcanzamos el segundo puesto y el 22% del total (INLAC, 2016a).

En España la principal especie productora de leche es la bovina (87,5%), pero por ello no se pueden despreciar la producción en las especies ovina (6,4%) y caprina (6,1%) destacando por su ausencia la producción de leche de camella y búfala (MAPA, 2018a), como se puede observar en la Figura I4.

En nuestro país las principales Comunidades Autónomas con un mayor censo ovino

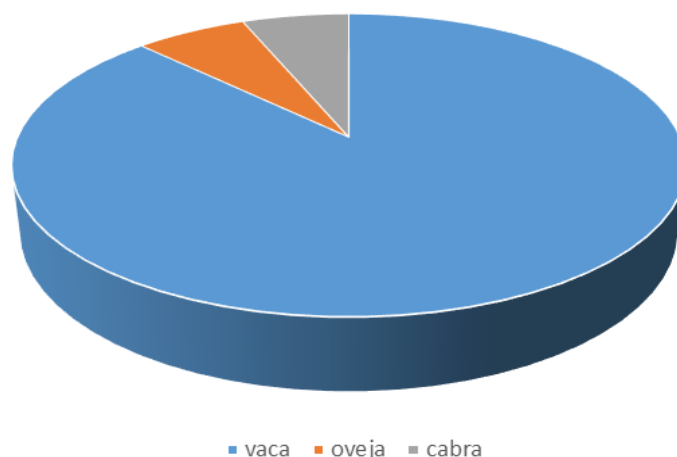


Figura I4. Distribución, por especie, de la producción leche en España durante el año 2016. Fuente: MAPA (2018).

son Extremadura (21,9%), Castilla y León (19,1%), Andalucía (14,6%), Castilla-La Mancha (14,4%) y Aragón (10,98%). Estas 5 comunidades representan el 80,8 % del censo nacional.

Analizando la producción láctea de la especie ovina vemos que en Europa los mayores productores son Grecia y España, que aportan el 25% cada uno al total, seguidos por Italia y Polonia con el 18% y el 14%, respectivamente (European Commission, 2019). En España realizando el estudio por Comunidades Autónomas, como se puede observar en la figura I5 el principal productor de leche de oveja en España es Castilla y León (57,1%), seguida de Castilla la Mancha (31,2%), Madrid (2,6%), Navarra (2,3%) y Extremadura (2,2%) (FEGA, 2018). Esto supone que la producción de leche de oveja en estas comunidades representa el 95,4% del total de la leche producida en España por esta especie.

Si estudiamos la distribución a nivel provincial el 51,6% de las ovejas de ordeño se encuentran repartidas entre Zamora (14,9%), Ciudad Real (12,6%), Valladolid (10,5%), León (7,3%) y Palencia (6,3%).

Las razas Churra y Castellana de leche y cruzamientos con razas foráneas (Awassi, Assaf, etc....) son las principales protagonistas de la producción en Castilla-León y la oveja Manchega en Castilla la Mancha.

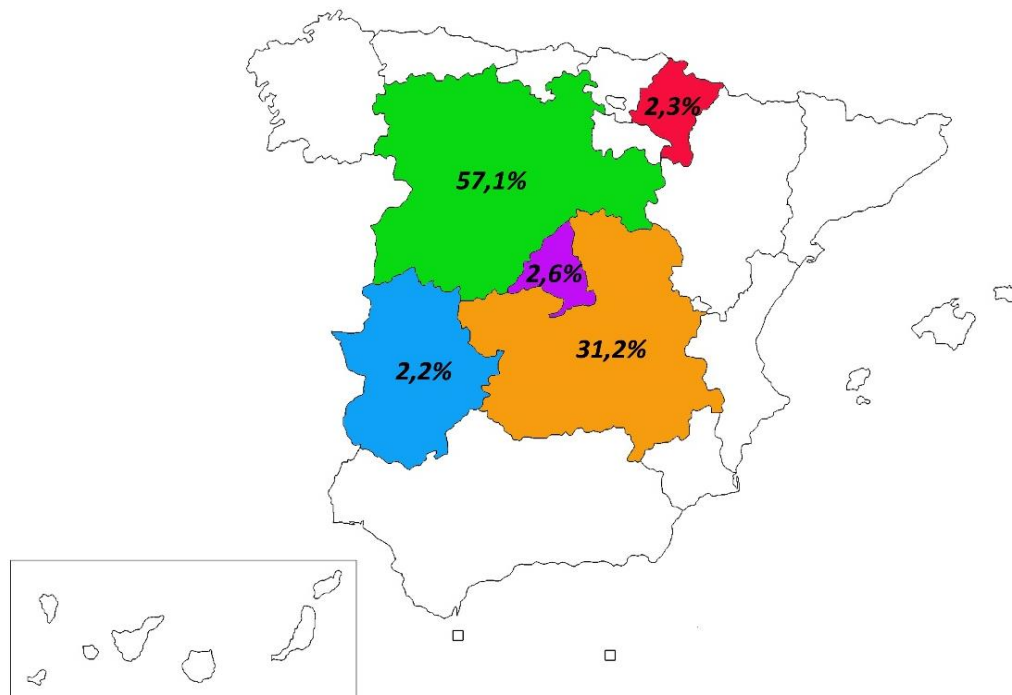


Figura 15. Distribución de la producción láctea de la especie ovina dividida por las 5 principales Comunidades Autónomas productoras. (Datos extraídos DATOS DE LAS DECLARACIONES OBLIGATORIAS DEL SECTOR LÁCTEO OVINO / CAPRINO desde junio de 2017 a mayo de 2018, FEGA, 2018).

Para estas regiones, la planificación reproductiva y la estrategia cría-ordeño dependen del calendario forrajero concreto de cada explotación y del nivel de producción de leche del genotipo que se explote (MAPA, 2018b).

Dentro de los subsectores ganaderos en España el lácteo es el segundo en cuanto a su importancia por detrás del porcino. Ello se debe no sólo su relevancia económica al generar en su conjunto aproximadamente 12 mil millones de euros anuales, también debido a su contribución al desarrollo y a la fijación de población rural, generando empleo en torno a 80 mil personas.

A lo largo de los últimos años existe una tendencia descendente en el consumo tanto en forma de leche líquida como de algunos de los diversos productos lácteos, según el MAPA (2018c), presentando durante el año 2017 un descenso del 0.3% en el consumo de leche líquida respecto al año anterior. Esto es debido a que disminuyen tanto el consumo de leche entera

como desnatada, aunque ha aumentado el consumo de leche semidesnatada. Por otro lado, la producción de leche ovina ha evolucionado muy positivamente.

En cuanto a los derivados lácteos han aumentado en su conjunto su consumo en un 0,6% respecto al año anterior. Entre los derivados lácteos se incluyen: batidos de leche, batidos de yogurt, leches fermentadas, mantequilla, queso, helados y tartas, nata, natillas, flanes preparados, cuajadas, crema de chocolate, crema catalana, postres con nata, otros derivados lácteos. En la figura I6 puede observarse la evolución en el consumo de los derivados lácteos durante el año 2017 respecto al año anterior. También puede observarse en esa figura la importancia, referida a volumen de mercado, en cuanto a presencia en los hogares españoles, donde el 37,7% corresponde a las leches fermentadas, mientras que en segundo lugar aparece el queso con un 20%. Si bien es cierto que debido al mayor valor añadido de los quesos esa importancia se invierte cuando se representa el valor de los productos donde en ese caso los quesos representan el 44,7% y con el 25,4 % se sitúan las leches fermentadas.

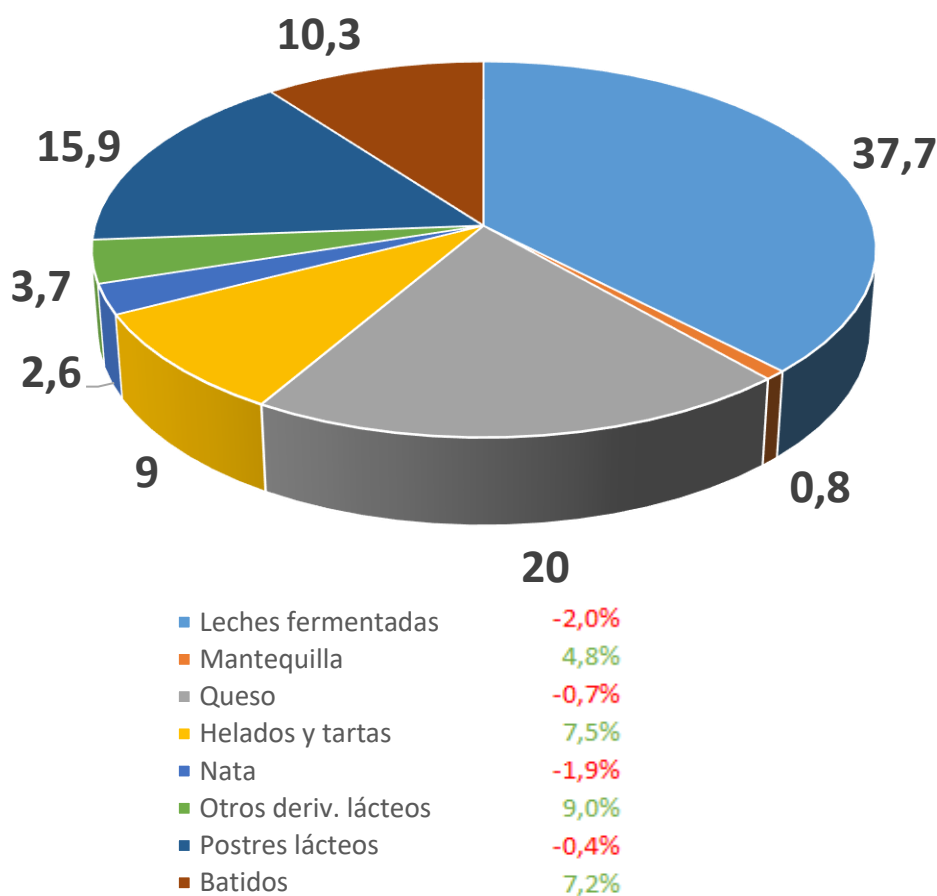


Figura I6. Evolución en el consumo de los derivados lácteos y su importancia en el mercado (%) durante el año 2017. Fuente: MAPA (2018).

1.3 Producción de queso

La elaboración de queso es una de las industrias más importantes en todo el mundo, aunque ya sea porque en unos casos su elaboración se realiza de forma artesanal como en otros, por una gran diversificación de productos, su producción se practica generalmente a una pequeña escala (Andiç et al., 2014).

La Unión Europea (figura I7) produce alrededor del 50% de los quesos a nivel mundial (10.235 mil toneladas) seguida por Estados Unidos, con cerca del 29% de la producción mundial; Rusia, Brasil, Argentina, Canadá y México serían los siguientes productores con menos del 5% de la producción mundial cada uno de ellos (European Commission, 2019).

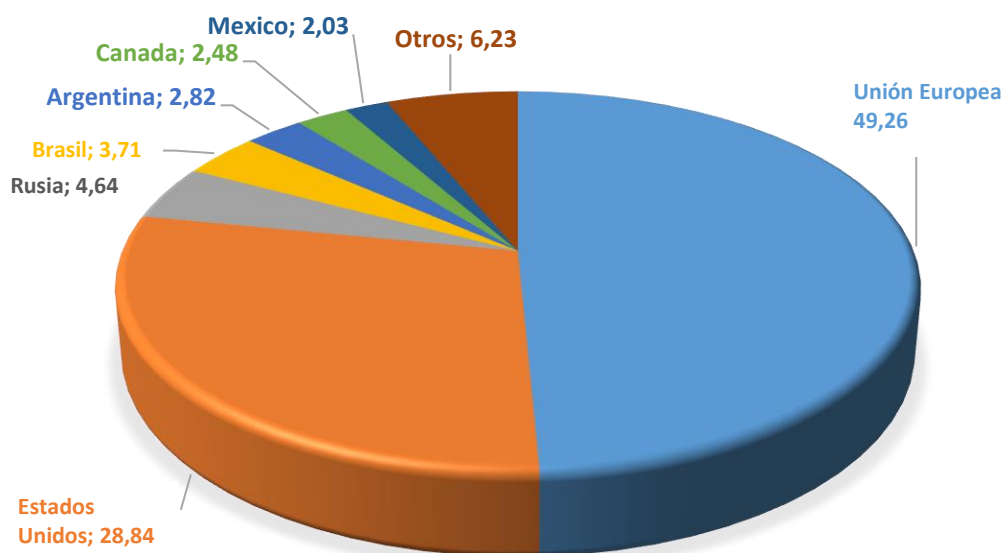


Figura I7. Datos de la producción mundial de queso. Fuente: European Commission (2019).

Dentro de la Unión Europea (European Commission, 2019), y como puede verse en la figura I8, Alemania es el mayor productor de quesos con un 20% (2.550 mil toneladas) del total, seguido por Francia con un 18% de la producción. España se situaría en octavo lugar con, aproximadamente, el 4,30% de la producción europea de queso.

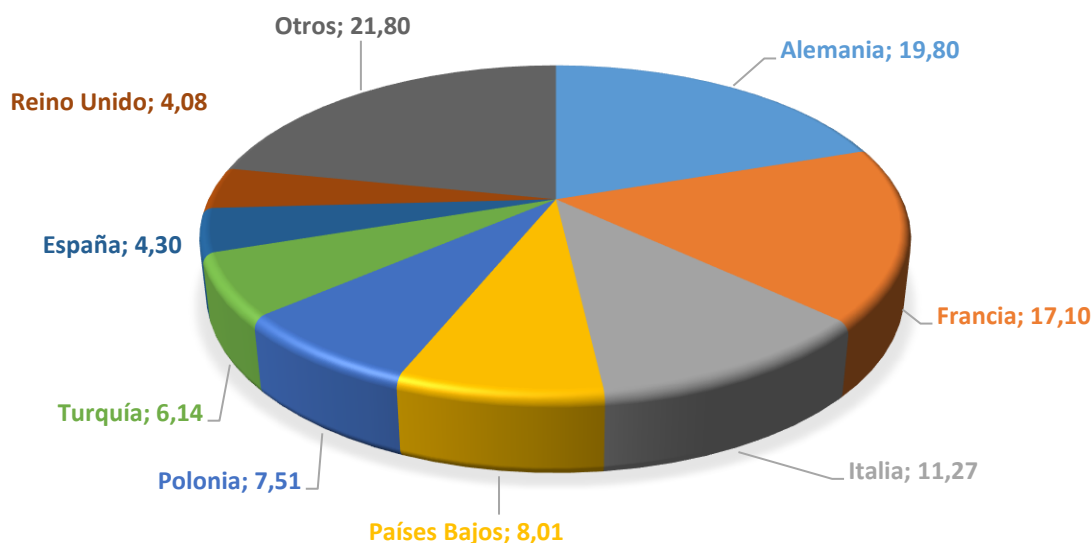


Figura I8. Datos de la producción de queso en la Unión Europea. Fuente: European Commission (2019).

Sin embargo, España es el primer país productor de queso de oveja puro dentro de la UE-28 (figura I9), siendo responsable del 31,70% de las 237 mil toneladas totales producidas por los países miembros, seguido por Italia y Francia con un 30,14% y 26,76%, respectivamente (European Commission, 2019). Estos datos nos dan una idea clara de la importancia que el queso de oveja presenta en nuestro país.

Castilla y León es una comunidad autónoma del noroeste de España con una importante presencia de la Industria agroalimentaria, en la que destaca el sector lácteo como uno de los grandes motores de la misma. López del Paso et al. (2018) indicaron que la agroindustria de Castilla y León aportó alrededor del 8,4% de la facturación de la industria agroalimentaria en España, siendo la tercera comunidad autónoma en importancia en este sector, sólo superada por Cataluña y Andalucía. Representó, además, el 28,7% de la industria manufacturera de la región. Otro dato a tener en cuenta, y no es un dato menor, es que proporcionó empleo a 37.641 personas. Esto último algo de vital importancia en un territorio cada vez más envejecido y despoblado.

El mismo informe refleja que el sector lácteo representó cerca del 5,4% de las empresas agroalimentarias dentro de Castilla y León.

Castilla y León es el tercer productor de leche de vaca (16,0%) por detrás de Galicia y Aragón (29,7% y 16,3%, respectivamente) (FEGA, 2018) y el segundo productor de leche de cabra con un 17,9% del total, sólo detrás de Andalucía que produce el 36,8%. Además, es el principal productor de leche de oveja en España, como ya hemos descrito anteriormente

(figura I5), con un 57,1% del total, seguida de Castilla-La Mancha (31,2%) y más alejadas, Madrid (2,6%), Navarra (2,3%) y Extremadura (2,2%) (FEGA, 2018).

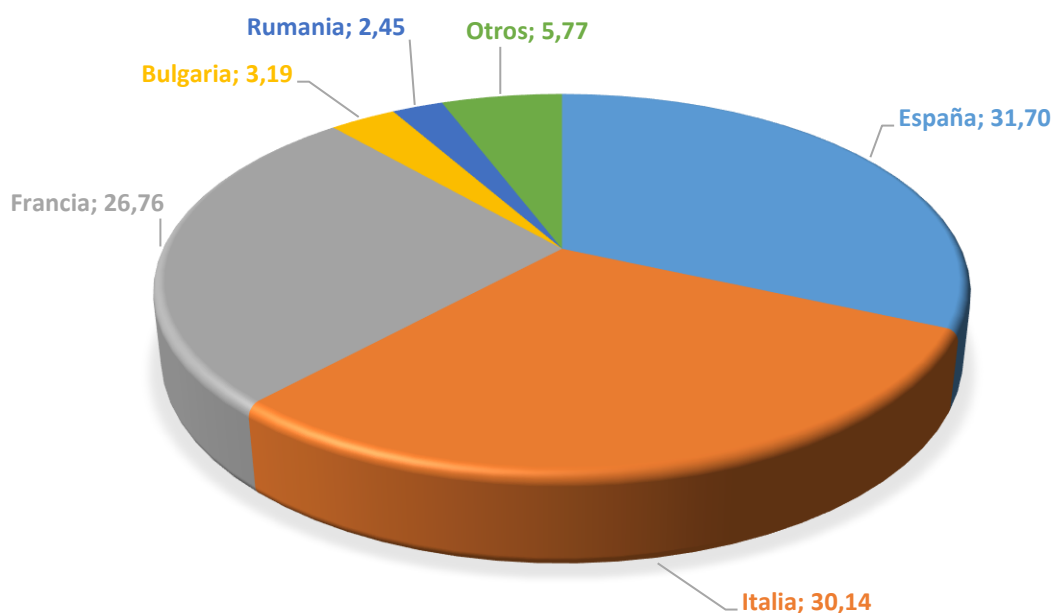


Figura I9. Datos de la producción de queso puro de oveja en la Unión Europea. Fuente: European Commission (2019).

El censo ovino en España sitúa a Castilla y León en segundo lugar (18,3%) por detrás de Extremadura (22,1%) y seguido de Castilla la Mancha (15,9%) y Andalucía (14,4%) (MAPA, 2018d), destacando sobremanera Zamora, que constituye la región de toda Europa con más cabezas de ovino, y con el 64% de los productores que son elaboradores de queso, según una encuesta realizada por (INLAC, 2016b). De este queso, el 60% es puro de oveja, lo que proporciona una clara idea de la importancia que el sector lácteo, el ovino y el queso de oveja presentan en Castilla y León.

1.4 El queso de oveja

Como hemos visto el queso es un producto de gran importancia tanto por su volumen de consumo como por su precio dentro del sector lácteo.

Si nos centramos en el queso de oveja vemos que España hasta el 2015 era el mayor productor de quesos de oveja de la UE con un 34,6% del total, seguido de Italia con 30,4%. También para los quesos de mezcla (aunque en este caso no se sabe cuánta cantidad pertenece a leche de oveja) con un 40,2% seguido de Grecia con un 36,9%. Sin embargo, en 2016 sufrió un importante descenso, pasando a ser Italia el mayor productor de quesos de oveja con un 33,1% de la producción, estando España en segundo lugar con un 30,6%. Del mismo modo

ocurrió con los quesos de mezcla donde Grecia ocupó el primer lugar (42,7%) y España quedó relegada al segundo (32,8%).

Y es que, a pesar de la crisis, del descenso en el censo ovino y de la caída de los precios de la leche ha habido un gran crecimiento en la producción motivado, entre otras razones por la mejora genética, de los sistemas productivos y la introducción de razas foráneas de mayor producción láctea (Assaf, Awassi y Lacaune fundamentalmente). Además, hay una demanda de leche de oveja de calidad por parte de la industria quesera tanto para la elaboración de quesos puros de oveja como para quesos de mezcla. Esto se ve reflejado en el último informe de consumo del año 2017 (MAPA, 2018c) donde la producción de quesos de oveja aumentó en 1,4% respecto al año anterior.

Y es que como hemos visto España ocupa los primeros lugares como productor de este tipo de quesos en Europa y gracias a una incipiente apertura de los mercados exteriores se ha favorecido el incremento de la demanda de leche de oveja, pasando de 386,1 mil toneladas en el año 2010 a 514,2 mil toneladas en el año 2017 (aunque ha caído ligeramente en los dos últimos años ya que en el año 2015 se llegaron a alcanzar las 544,2 mil toneladas, (MAPA, 2018e)).

En cuanto al origen de la leche de oveja destinada a la elaboración de quesos, en Castilla y León, las dos principales razas productoras de leche de oveja son la Churra y la Castellana. La raza Churra es la segunda raza española por importancia numérica.

Se trata de una raza labriega, sedentaria y muy ligada a las explotaciones de secano de la meseta, debido a su rusticidad se ha adaptado perfectamente al clima mediterráneo continentalizado de Castilla y León.

La raza Churra, después de varios años, ha vuelto a recuperar el protagonismo, siendo considerada en la actualidad como la mejor raza lechera autóctona y la que más posibilidades de futuro (sin olvidar la raza Castellana) tiene en Castilla y León. Su rendimiento medio es de 117 litros para una lactación de 120 días (MAPA, 2018f).

La raza Castellana es más rústica y sobria que la Churra y además presenta una menor producción láctea con valores medios de 110 litros en 120 días de lactación (MAPA, 2018f).

La leche de ambas razas, muy rica en materia grasa y proteína, se utiliza como base en la elaboración del queso Zamorano con Denominación de Origen Protegida.

Ahora bien, en la actualidad estamos asistiendo a la invasión progresiva de nuestra cabaña ovina de otras razas de ovejas extranjeras como Awassi, Milchschaf, Lacaune, Assaf, etc. La última de ellas (Assaf) es la que más ampliamente se encuentra distribuida en la Comunidad de Castilla y León. Se trata de una raza o agrupación de origen israelí creada en el Instituto Center Volcani en el año 1955 (Goot, 1986) obtenida mediante cruzamiento de ovejas

de las razas Awassi y machos de raza Milchschaf con el fin de mejorar su fecundidad y precocidad y el número de mellizos.

La raza Assaf fue introducida por primera vez en España por un ganadero leonés de Gordoncillo, José Luis Moncada, que entre los años 1977 y 1980 importó desde Israel un total de 320 ovejas y 77 carneros de esta raza. Desde aquí se fue extendiendo primero mediante la venta de sementales a ganaderos de la zona, luego mediante cruzamientos por absorción con las razas Churra y Castellana. De este modo se fue asentando en primer lugar en Castilla y León y a continuación en España y Portugal la raza Assaf española (De la Fuente et al., 2006). Presenta una gran capacidad lechera con rendimiento medio de 400 litros para una lactación de 180 días. Esta gran productividad láctea, así como la escasa influencia que tiene la época del año en la misma adaptándose muy bien a diversos tipos de pasto y en climas calientes o fríos y el hecho de ser muy indicada para explotaciones intensivas, ha determinado que cada vez haya mayor número de productores que han apostado por esta raza, bien como tal o bien mediante cruces con Churra o Castellana, lo cual supondría un peligro para nuestras razas autóctonas. Por contra, la raza Assaf presenta como aspecto negativo cuando lo comparamos con nuestras razas autóctonas, menores valores en su contenido en materia grasa y proteína con respecto a los de la raza Churra, lo cual posiblemente tendrá influencia sobre la calidad final de los productos elaborados a partir de dichas materias primas.

1.5 Tecnología de transformación de la leche en queso

El proceso de elaboración de queso consta de una serie de complejas reacciones fisicoquímicas que abarcan sus dos principales fases: elaboración y maduración. La bioquímica de la maduración se estudiará más adelante.

La elaboración de queso es básicamente un proceso de coagulación de la leche, mediante el cual la leche se transforma en un gel constituido por un retículo proteico en que quedan retenidas la grasa, el suero y constituyentes solubles. Durante la maduración se produce una deshidratación, en esa pérdida de agua la grasa y la proteína se concentran de 6 a 12 en función del tipo de queso.

El grado de deshidratación que se consigue depende además de la composición bioquímica de la leche, de la extensión y constitución de las etapas que componen el proceso de elaboración. Estas etapas son 1) la preparación de la leche, 2) el proceso de acidificación, 3) la coagulación, operaciones de corte, calentamiento o agitación, entre otros, 4) desuerado (incluyendo moldeado y prensado), 5) salado y 6) maduración.

El contenido del queso de humedad, sal, el nivel de pH alcanzado y la microbiota que presenta son los que regulan la maduración y por tanto afectan al sabor, al aroma y textura

del queso; siendo durante la etapa de elaboración donde se fundamenta la naturaleza y la calidad del queso.

1.5.1 Selección y pretratamiento de la leche

En primer lugar, hay que partir del concepto de que un buen producto final pasa necesariamente por una materia prima de origen también de calidad óptima, en este caso, la obtención o selección de una leche de partida de elevados estándares en cuanto a su calidad microbiológica y química. El proceso de coagulación y la aptitud de la cuajada resultante se ven afectados por parámetros composicionales de la leche como son la cantidad de grasa, caseína, calcio o el pH.

Todos los componentes de la leche, así como su química relacionada, están ampliamente revisados (Fox et al., 2015). Muchas de las anomalías sufridas por el queso están relacionadas con la cantidad de células somáticas, debiendo excluirse la leche de los animales con mamitis en la elaboración de queso, asimismo también debe estar ausente de contaminantes químicos y de antibióticos que inhiban el crecimiento de los cultivos bacterianos o generen problemas de resistencias. También hay que tener en cuenta que la leche debe estar ausente de bacterias contaminantes, que en el queso estarían concentradas, siendo una fuente potencial de defectos en el queso o causante de problemas para la salud del consumidor (McSweeney, 2017)

Otro de los pasos previos en el proceso de producción de queso se realiza tras el ordeño y es el enfriado de la leche a 4°C. Esto evita que la leche se acidifique en exceso ralentizando la actividad de la microbiota presente en la misma, sin embargo, el frío actúa seleccionando las bacterias psicrótrofas que actúan de manera negativa durante la coagulación del queso. Por este motivo en algunos casos para evitarlo se realiza una termización de la leche (tratamiento térmico de 62-65°C durante 15-20 segundos).

En ocasiones se requiere de una etapa de estandarización, donde se pueden englobar procesos como el desnatado o la adición de nata, la concentración mediante ultrafiltración, o las adiciones de leche en polvo descremada o el retentado de la ultrafiltración que, además de cumplir con el objetivo de búsqueda de homogeneidad en los distintos lotes de un producto a lo largo de todo el año, aumentarían los rendimientos en el proceso productivo (Gobbetti et al., 2018).

También es habitual la adición de CaCl_2 (en cantidad de 0.1- 0.2 g/L de leche) a la leche pasteurizada por la importancia que presenta el ión Ca^{+2} durante el proceso de coagulación (favoreciéndola y dando lugar a una cuajada más firme).

Tradicionalmente en la elaboración de quesos se empleaba leche cruda, sin embargo, muchos de los microorganismos presentes en la microbiota adventicia de la leche son

indeseables. Algunos de ellos como *Clostridium tyrobutyricum* pueden crecer desde su forma esporulada durante la maduración de los quesos, dando lugar a lo que se denomina hinchazón tardía. Para su control además de una buena higiene de la granja, se pueden eliminar en su mayoría aplicando una bactofugación de la leche, también realizando la microfiltración de la misma. Además, mediante la adición de lisozima o nitratos se consigue inhibir su crecimiento.

La elaboración de estos quesos se puede realizar de forma artesanal o de manera industrial. Los primeros suelen seguir la elaboración tradicional en la que se emplea de forma general leche cruda, mientras que en la elaboración industrial se emplea leche pasteurizada.

La combinación de temperatura y tiempo más comúnmente utilizada en la leche para elaboración de quesos suele ser 72-74°C durante 15-20 segundos. Con este proceso se consigue un doble objetivo. Por lado se consigue un objetivo tecnológico, logrando que el producto final obtenido sea más uniforme mediante la eliminación de la microbiota banal, que en muchos casos es indeseable pudiendo generar defectos o alteraciones en el aroma, sabor y la textura. Pero se logra un objetivo en cuanto a la seguridad alimentaria al destruir los microorganismos patógenos que pudiera presentar la leche, fundamentalmente en quesos que se vayan a consumir sin madurar o con un periodo de maduración inferior a 60 días.

A pesar de que hoy en día, los quesos son considerados como uno de los alimentos más seguros, es preciso tener en cuenta que el uso de leche cruda como materia prima en la elaboración de quesos constituye un punto crítico a controlar dentro del análisis de puntos críticos (APPCC) y donde se deben extremar las buenas prácticas. Esto es debido a que bacterias patógenas pueden ser transmitidas a través de los productos lácteos, incluido el queso. Ello ha quedado constatado porque a lo largo de las últimas décadas, y en relación con el consumo de queso elaborado a partir de leche cruda, se han producido diversos brotes de infección por *Salmonella* (Ung et al., 2019), *Listeria monocytogenes*, (AECOSAN, 2019, 2018) *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) (Jones et al., 2019), *Staphylococcus aureus* (Guzman-Hernandez et al., 2016; Ostyn et al., 2010), o incluso *Brucella* (Jansen et al., 2019) y *Mycobacterium bovis* (Bapat et al., 2017; Harris et al., 2007; Silva et al., 2018).

En todos los casos las investigaciones detalladas demostraron que la contaminación fue la leche cruda o, en algunos casos, leche pasteurizada contaminada tras el tratamiento térmico. Así mismo, en otras ocasiones, la contaminación de los quesos derivaba del uso de bacterias procedentes de la leche cruda como cultivos en su elaboración (aislar cultivos a partir de la leche cruda es algo bastante habitual en tecnología artesanal en países como Francia), pero también debido a la microbiota contaminante prevalente en los entornos de fabricación.

1.5.2 Acidificación

Consiste en la producción de ácido láctico mediante la fermentación por las BAL de la lactosa (Gobbetti et al., 2018).

En origen, con las elaboraciones a partir de leche cruda, la microbiota propia de la leche era la que conseguía la acidificación de los quesos, pero en muchos casos era impredecible y, además, algunas bacterias eran formadoras de gas o daban lugar a sabores y texturas no deseadas. No obstante, se sigue empleando la microbiota autóctona o indígena para la elaboración de muchas variedades artesanales de queso.

Con el tiempo se fueron introduciendo los cultivos iniciadores, los cuales contenían cepas de BAL de identidad y concentración conocida y con un control de la acidificación muy estudiado, siendo su empleo el más extendido en las elaboraciones a nivel industrial. Generalmente se emplean cultivos mesófilos como en el caso de las pastas prensadas no cocidas (como el queso Zamorano o el queso Manchego) y termófilos como el caso de las pastas prensadas cocidas (Emmental, Grana Padano).

Pero además también se recurre para acidificación al empleo, entre otros, de HCl, glucono delta lactona. Mediante esta acidificación indirecta se consiguen evitar algunos de los defectos de los cultivos iniciadores, reduciendo los tiempos de fabricación, controlando cómo se lleva a cabo y evitando la sensibilización a fagos. Pero también se pierden las ventajas de los mismos que tienen lugar, fundamentalmente, durante la etapa de maduración, tanto a nivel de aromas y sabores, pero sobre todo a nivel de textura.

Para la elaboración de queso con un alto nivel de calidad es indispensable lograr una velocidad de acidificación adecuada debido a que el ácido actúa con diferentes propiedades en la fabricación de queso (Law y Tamime, 2011):

- Favorece la coagulación por el cuajo.
- Desestabiliza las caseínas provocando la coagulación láctica y retiene coagulante en la cuajada durante la elaboración de quesos enzimáticos, a mayor cantidad de cuajo residual mayores efectos sobre la proteólisis durante la maduración, de forma que la calidad del queso se puede ver afectada.
 - Afecta a la fuerza del coágulo llegando a repercutir sobre el rendimiento del queso en el caso de pérdida de finos.
 - La sinéresis del gel, esto es la capacidad para perder humedad, está relacionada de manera directamente proporcional con la acidificación, siendo óptima en el punto isoeléctrico. Este hecho afecta a la humedad del queso, a mayor humedad en el queso también será mayor la velocidad de maduración, pero menos estable.
 - Frena el crecimiento de algunas bacterias (incluyendo algunos patógenos).

- La acidificación causa la solubilización de fosfato de calcio coloidal desde la caseína. Esto, además de la pérdida de fosfato de calcio, aumenta la carga neta repulsiva entre las moléculas de caseína de forma inicial pero después disminuye al acercarse al punto isoeléctrico de las caseínas. Con ello se ve afectada la red formada en cuando a la movilidad y forma de agregarse de forma definitiva las moléculas de caseína, influyendo de manera determinante en propiedades relacionadas con la textura (diferencias de textura entre un queso Emmental y un Grana Padano) o la capacidad de fusión y extensibilidad de la cuajada (como en el caso de la Mozzarella). Así puede decirse con carácter general que los quesos con un pH más bajo presentan una textura más quebradiza debido a que se pierde calcio durante el desuerado.

1.5.3 Coagulación

Esta es la etapa primordial en la elaboración de todas las variedades de queso. A través de ella se produce la coalescencia de las caseínas formando un gel que englobaría la grasa presente.

La coagulación puede tener lugar mediante las siguientes acciones (Gobbetti et al., 2018):

- (1) la acción del cuajo,
- (2) la acidificación hasta un pH de 4,6, y mediante
- (3) una acidificación hasta un pH aproximado de 5,2 combinada con un calentamiento a 90 ° C. Este tipo de quesos se suelen elaborar a partir de suero o una mezcla de suero y leche desnatada, de esta forma se consigue la recuperación de proteínas de alto valor nutricional. El más conocido es el Ricotta tradicional italiano o requesón en su denominación española.

La mayor parte de las variedades de queso se elaboran mediante coagulación enzimática mediada por cuajo, y de forma tradicional usando el cuajo de ternero lactante. Sin embargo, ante la escasez del mismo, se han tenido que buscar alternativas. Así existen cuajos de origen vegetal, como el extraído de la flor del cardo *Cynara cardunculus* de elevada actividad proteolítica, productor de sabores ligeramente amargos y muy empleada en la elaboración de quesos españoles como la Torta del Casar o el Queso de la Serena, y también, en quesos semicurados (Shah et al., 2014); de origen animal donde se han ido buscando otras alternativas como el cuajo extraído de cordero, camello, búfalo o porcino. También se emplean proteinasas propias de algunas especies de mohos y en los últimos años cabe destacar un gran desarrollo e investigación de nuevas vías entre las que sobresale el empleo de cuajos recombinantes de ternero empleando mohos y bacterias para su síntesis (Jaros and Rohm, 2017; Uniacke-Lowe and Fox, 2017).

La coagulación tiene lugar en dos fases: una fase primaria puramente enzimática donde el cuajo actúa específicamente sobre la micela de caseína hidrolizando la κ -caseína a

nivel de los aminoácidos Phe₁₀₅-Met₁₀₆, dando lugar al caseino-macropéptido, correspondiendo a la porción de la κ -caseína que otorga la estabilidad a la micela y que se solubiliza en la fase acuosa y, por otro lado, a la para- κ -caseína de carácter hidrofóbico, la cual permanece anclada a la superficie de la micela; y una fase no enzimática de agregación de las micelas que comenzaría una vez que se ha hidrolizado un 85% de la κ -caseína. La estabilidad de las micelas disminuye tanto que se agregan a temperaturas superiores a 20°C con la presencia de Ca⁺² en concentraciones críticas (Fox et al., 2015).

Además, es conocido que la actividad de las enzimas coagulantes se ve influenciada por el pH, la concentración de NaCl (a concentraciones medias y altas se inhibe la hidrólisis de la β -caseína por la quimosina) y por la cantidad de calcio coloidal. Si añadimos CaCl₂ se reduce el tiempo de coagulación al reducir el pH ligeramente, pero también da una cuajada más firme debido a que mantenemos el calcio coloidal respecto al calcio soluble evitando la desmineralización de la cuajada, hecho que es más notorio en los quesos cuya leche es sometida a pasterización antes de su elaboración.

1.5.4 Corte

Con este proceso por un lado se inician los procesos de deshidratación del queso, es decir se inicia la sinéresis o el desuerado. Hay que tener en cuenta que los quesos con más humedad van a madurar más rápido, pero el control de la misma será peor.

El proceso de corte es muy importante para la obtención de los diferentes tipos de quesos, así un queso fresco apenas se corta porque requiere gran cantidad de humedad, mientras que las pastas prensadas o cocidas precisan de un tamaño grano muy pequeño. Pero no sólo es importante el tamaño del grano, también es de vital importancia la elección del momento a la hora de empezar a cortar. Este aspecto está directamente relacionado con la coagulación. Durante la etapa de coagulación se están formando constantemente nuevos agregados de micelas. Así si comenzamos a cortar cuando la cuajada es excesivamente débil puede ocurrir que el tamaño del grano sea muy pequeño y haya gran cantidad de finos, la red de micelas pierde suero y no es capaz de englobar a la grasa, pero su capacidad de seguir agregando sigue intacta por lo que se produce una intensa retracción del coágulo favoreciendo de manera más intensa la expulsión de suero (Law y Tamime, 2011). De manera opuesta si la cuajada ya tiene una consistencia elevada durante el corte será más difícil expulsar el agua de la red de caseínas.

Ya sea por exceso de debilidad o de dureza de las micelas puede ocasionar problemas durante la elaboración de quesos (en el primer caso pérdida de rendimiento por eliminación de finos y grasa, en el segundo por excesiva retención de suero en el interior de la cuajada con posibles postacidificaciones y proteólisis incontroladas dando lugar a péptidos que originan

sabores amargos). Pero en función de la tecnología de elaboración puede que sea deseable la elección de un corte temprano o tardío.

1.5.5 Desuerado

Como ya se ha comentado el desuerado comienza con el corte y será de mayor o menor intensidad en función del tamaño de corte, pero también del momento del mismo.

Los cultivos iniciadores continúan con el descenso del pH, que combinado con la agitación y el aumento de temperatura presenta una gran influencia sobre el control de la humedad.

Cuanto mayor sea el descenso de pH tras el corte una mayor salida de suero tendrá lugar, del mismo modo a mayor temperatura empleada durante el proceso de agitación también habrá una mayor salida de suero.

La intensidad del trabajo de agitación también va a influir, así cuanto más intensa y durante más tiempo se aplique mayor será el desuerado.

Además, si tras la eliminación del suero el queso es llevado a una prensa (además de dar forma al queso y favorecer la unión de la cuajada) también ayuda a la salida de suero, de nuevo teniendo en cuenta que la velocidad de enfriamiento y de descenso de pH de los fermentos, así como la presión ejercida, también influirán en la cantidad de humedad que retenga el queso.

1.5.6 Salado

La mayor parte de los quesos se someten a un proceso de salado, ya sea mediante adición de sal a la cuajada, por frotado de la superficie del queso con sal seca o mediante inmersión en una salmuera líquida de concentración de sal controlada.

El empleo de la sal se realiza debido a que actúa en diferentes puntos. Por ejemplo, ayuda a la formación de corteza, aunque hay que tener precaución, en el caso de empleo de salmueras, de no usarlas muy diluidas y sin la adición de calcio, pudiendo dar lugar a cortezas blandas y limosas. Por otro lado, actúa favoreciendo el desarrollo de los *Lactococcus* usados como iniciadores o cultivos secundarios como *Penicillium roqueforti*, a bajas concentraciones de sal, mientras controla el crecimiento de bacterias al disminuir la A_w (actividad de agua) contribuyendo a la seguridad del producto al influir en el crecimiento exacerbado de bacterias que deterioren el producto e incluso de microorganismos patógenos. Su empleo favorece la sinéresis (se pierden 2 kg de agua por cada kg de sal absorbida), y como resultado de la eliminación de suero se reduce la humedad lo que también retroalimenta la influencia sobre los microorganismos y las enzimas. Afecta al sabor, proporcionando sabor *per se* y contribuyendo al desarrollo de aromas, a veces negativos (una cantidad baja de sal puede dar

lugar a una proteólisis excesiva de la β -caseína, originando péptidos amargos). Influye en la textura, al intervenir en la hidratación y en las interacciones sobre la red formada por las caseínas durante la maduración de los quesos.

Sin embargo, también contribuye a aumentar la cantidad de sodio de la dieta con los consiguientes efectos adversos que esto conlleva, como la hipertensión.

Como puede verse la sal influye en una compleja red de factores concomitantes que actúan en varios puntos de la elaboración de quesos muy bien estudiada por diferentes autores (Bae et al., 2017; El-Bakry, 2012; McSweeney, 2007).

1.6 Proceso de maduración del queso

La maduración del queso implica cambios bioquímicos complejos que repercuten en las características de sabor (McSweeney, 2017; McSweeney and Sousa, 2000) y en la textura de los quesos (McSweeney, 2017). Los procesos bioquímicos que tienen lugar son la lipólisis, la proteólisis y el metabolismo de la lactosa residual. Además, otras reacciones que afectan al lactato, citrato, ácidos grasos y aminoácidos (McSweeney, 2017) contribuyen también al desarrollo del aroma, sabor y textura deseada en los quesos (McSweeney y Sousa, 2000).

Entre los procesos que tienen lugar destacan la glucólisis, la lipólisis y la proteólisis.

1.6.1 Glucólisis

Este proceso está caracterizado por la transformación del azúcar mayoritario de la leche que es la lactosa a ácido láctico. Dicha transformación empieza desde el mismo momento en que se añade el cultivo iniciador.

Parte de la lactosa es eliminada durante el desuerado como lactosa o en forma de ácido láctico tras iniciarse la fermentación por las bacterias ácido lácticas. Sin embargo, las cuajadas frescas todavía tienen altos contenidos en lactosa y es esencial disminuir su cantidad durante las primeras etapas para la obtención de quesos de calidad (McSweeney, 2017). Además, favorece el descenso del pH en el queso, lo que contribuye a su seguridad al controlar el crecimiento de microorganismos potencialmente peligrosos.

Sin embargo, el metabolismo de la lactosa influye de diferente forma en función del tipo de queso que se busca y su tecnología de elaboración. En los quesos suizos y el Parmesano, las altas temperaturas empleadas en su proceso (52–55°C) y los fermentos termófilos (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus*), condicionan la utilización de la lactosa. El estreptococo termófilo comienza a utilizar la glucosa de la lactosa produciendo ácido L- láctico, no llegando a consumir la galactosa que se acumula en la cuajada. Cuando la temperatura

alcanza el óptimo para el crecimiento de los *Lactobacillus* galactosa positivos, estos metabolizarían la galactosa transformándola en DL-lactato.

Los quesos de tipo suizo, como el Emmetal, se maduran a elevadas temperaturas (20-24°C) para favorecer el desarrollo de *Propionibacterium* que genera ojos cuando utilizan el ácido láctico produciendo ácido propiónico, ácido acético y CO₂. La mayor parte del CO₂ difunde en la masa del queso o es eliminado, pero una parte contribuye a la formación de ojos (Daly et al., 2010).

En otros casos la producción de gas genera defectos. Esto ocurre con el metabolismo anaerobio de *Clostridium tyrobutyricum* sobre el ácido láctico, lo que conlleva la producción de ácidos orgánicos, ácido butírico en su mayoría, y gases tales como CO₂ e hidrógeno. La presión de los gases acumulados provoca grietas que hinchan el queso, además de generar sabores y aromas indeseables (Garde et al., 2011; Zabaleta et al., 2016).

Pero es en los quesos de corteza enmohecida mixta (Camembert, Brie) donde mayor importancia tiene el metabolismo del ácido láctico. Después de la elaboración de los quesos en su corteza proliferan levaduras, *Geotrichum candidum* y *Penicillium camemberti* que metabolizan el ácido láctico que ha migrado desde el interior del queso hasta su superficie. En primer lugar, se transforma en CO₂ y H₂O, lo que aumenta el pH y una vez agotado el ácido láctico la desaminación de los aminoácidos aumenta todavía más el pH de la corteza. Estos fenómenos contribuyen junto con la proteólisis y la migración del fosfato cálcico hacia el exterior a que se produzca en sentido contrario un reblandecimiento del queso, esto es, desde la superficie hacia el interior (McSweeney, 2017).

1.6.2 Lipólisis

La transformación de los glicéridos de la leche en ácidos grasos libres, se denomina lipólisis y es esencial para el desarrollo del sabor en el queso. El sabor viene principalmente determinado por los ácidos grasos de cadena corta, pero, además, los ácidos grasos también pueden actuar como precursores a la hora de producir una amplia gama de otros compuestos que contribuyen al sabor, tales como ésteres, lactonas y metilcetonas (Thierry et al., 2017).

Los ácidos grasos libres con mayor influencia en el aroma del queso son los de cadena corta e intermedia. Sin embargo, presentan unas cantidades similares en el queso y en la leche a excepción del C_{4:0} (butírico) que se encuentra en una mayor proporción en la grasa del queso que en la de la leche. Este hecho sugiere una liberación selectiva de este ácido graso por parte de las lipasas presentes en el queso o procedentes de la microbiota del mismo. Y es que las enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de la grasa en el queso pueden presentar diferentes orígenes: la leche, la preparación del cuajo natural (esterasa pregástrica), lipasas de origen microbiano (a través del cultivo iniciador, con cultivos iniciadores adjuntos o con bacterias no

iniciadoras) y también, probablemente, mediante su adición como lipasas exógenas para acelerar estos procesos en diversos tipos de queso (McSweeney, 2017).

La leche de forma natural presenta una potente lipasa que en la misma no desarrolla todo su potencial. Migra a la glándula mamaria desde la sangre donde realiza el metabolismo de los triglicéridos plasmáticos. En la leche podría producir ya una rancidez notable, pero esto no ocurre bajo circunstancias normales debido a que la lipasa y la grasa están compartimentadas; en su mayoría la lipasa está asociada con las micelas de caseína y la grasa se encuentra en los glóbulos grasos rodeada de una membrana de lipoproteínas. Sin embargo, cuando esta membrana se daña durante el ordeño, la homogeneización o mediante la formación de espuma, se puede desencadenar una importante lipólisis que genere sabores extraños en quesos y otros productos lácteos (Collins et al., 2003).

La lipasa nativa de la leche presenta una mayor afinidad por los ácidos de cadena corta e intermedia debido a su distribución de forma mayoritaria en la superficie de la emulsión, esto es en la interfase enzima-sustrato.

También se ha podido comprobar que en los quesos elaborados con leche cruda la lipólisis debido a este enzima es mayor, ya que su actividad se ve inhibida en los tratamientos térmicos habituales de 72° C durante 15 segundos (McSweeney, 2017).

Otro origen de las lipasas sería a través del uso del cuajo natural que es empleado en la elaboración de algunos tipos de queso, en concreto una esterasa pregástrica. Ésta se secreta en la base de la lengua de los rumiantes lactantes como reflejo a la succión y llegaría al abomaso donde se mezclaría con la leche. La preparación del cuajo se iniciaría al desecar estos abomasos que contienen esta enzima, pero dada lo antihigiénico de esta práctica está prohibido en muchos países. A pesar de ello se ha conseguido aislar y purificar la esterasa pregástrica para su utilización en la elaboración de ciertos quesos artesanales ya que actúa de forma específica sobre los ácidos grasos de cadena corta esterificados en la posición 3 de los triglicéridos proporcionando altos niveles de lipólisis (Calvo and Fontecha, 2004).

Sin embargo, el principal origen de las lipasas en muchos de los quesos que se elaboran es el proveniente de las enzimas lipolíticas microbianas. En este sentido hay que destacar que las lipasas y esterases procedentes de las BAL, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus*, a pesar de presentar una baja actividad lipolítica, comparada con otros grupos microbianos, son las responsables de la lipólisis en quesos como el Cheddar (McSweeney, 2017). Tanto las lipasas como las esterases en las BAL son de origen intracelular y ven favorecida su acción cuando la leche de partida presenta una hidrólisis previa, así los cultivos iniciadores pueden liberar con mayor facilidad ácidos grasos libres (FFA) a partir de mono o diglicéridos previamente formados por otras lipasas como la lipasa nativa de la leche o las procedentes de bacterias Gram negativas. Pero es la alta concentración de este tipo de bacterias durante el

periodo de maduración lo que las convierte en los principales agentes de la liberación de FFA en cantidades significativas (Collins et al., 2003). Así mismo las bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSBAL) también pueden contribuir de manera efectiva en este punto. El proceso de maduración y la intervención microbiana ha sido ampliamente estudiado por diferentes autores, así tenemos algunos ejemplos: la actividad débilmente lipolítica o esterolítica de *Pediococcus* (Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki, 1989), la elevada actividad lipolítica en los quesos de corteza lavada producida por *Brevibacterium linens* (Ratray and Fox, 1997), la llevada a cabo en los quesos madurados con mohos del género *Penicillium* (McSweeney and Sousa, 2000), o la capacidad lipolítica que presenta *Propionibacterium*, hasta 100 veces superior a las BAL en los quesos Suizos (Collins et al., 2003).

1.6.3 Proteólisis

La proteólisis constituye el evento más complejo que se produce durante la maduración de los quesos y el que genera los cambios más importantes. Tiene lugar debido a la acción de las proteasas naturales de la leche, del cuajo agregado, de los cultivos iniciadores y secundarios, y de las enzimas (Fox et al., 2015). Es responsable de los cambios en la matriz proteica, modificando su textura y aumentando el pH (Sousa et al., 2001). También es responsable de la liberación de aminoácidos, muchos de los cuales contribuyen directa o indirectamente al sabor y pueden ser precursores de aminas biógenas. Por lo tanto, los quesos son ambientes óptimos para la formación de aminas (Buňková et al., 2010). El perfil y los niveles de aminas biógenas en los quesos dependen de la cantidad de proteína en la materia prima, la actividad proteolítica de las enzimas utilizadas durante la fabricación, los microorganismos presentes en el queso, la actividad de la descarboxilasa sobre los aminoácidos y el cofactor piridoxina fosfato (Álvarez González et al., 2014).

El 80% de la proteína de la leche se encuentra en forma de una asociación de coloides denominadas micelas de caseínas y estabilizadas mediante fosfato cálcico, que se presentan como cuatro tipos principales: α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseína. La desestabilización enzimática de las micelas de caseína o el ajuste a su punto isoeléctrico (pH 4.6) puede resultar en coagulación o gelificación (Huppertz et al., 2017).

Por lo tanto, es fácil adivinar que la proteólisis empieza por una hidrólisis de las caseínas que sería causada por el coagulante utilizado y en menor medida por la plasmina presente en la leche. El cuajo natural de origen animal está compuesto mayoritariamente por quimosina y en los cuajos de síntesis representa el 100%. Su papel durante la coagulación de la leche es la hidrólisis específica del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína, proteína estabilizadora de la caseína, facilitando así la formación del gel.

Por su parte la plasmina, proteasa nativa de la leche, presenta un sistema proteolítico muy complejo siendo su acción especialmente eficaz sobre las α_2 - y β -caseínas. La hidrólisis de la β -caseína comporta la constitución de las γ -caseínas y la fracción proteosa-peptona.

La acción del cuajo y de la plasmina de la leche origina péptidos de gran tamaño (insolubles en agua) y otros de tamaño intermedio (solubles en agua).

Los péptidos grandes provenientes de la α_1 -cn por acción de la quimosina o de la β -cn por la acción de la plasmina, posteriormente, por acción de las enzimas aportadas por el cultivo iniciador y por las bacterias no iniciadoras, darán lugar a los productos finales de la proteólisis (péptidos de pequeño tamaño molecular y a los aminoácidos libres). Las bacterias lácticas poseen una proteinasa asociada a la pared celular mientras que las peptidasas, que son intracelulares, son liberadas tras la lisis celular y son las responsables de la producción de aminoácidos libres.

Hay que tener en cuenta que los agentes implicados tanto en la proteólisis primaria como secundaria varían en función del tipo de queso. Por ejemplo, el cuajo tendrá gran importancia en quesos de pasta prensada no cocida, como el Zamorano, pero apenas tendrá efecto sobre la hidrólisis de las caseínas en los quesos de pasta cocida debido a su inactivación por las altas temperaturas. En este caso el efecto de la plasmina tendrá más importancia sobre esta primera fase de la proteólisis (Donnelly, 2014).

Para entender mejor este proceso se muestra el esquema de la proteólisis con los distintos agentes de la misma y los productos que originan en la figura I10.

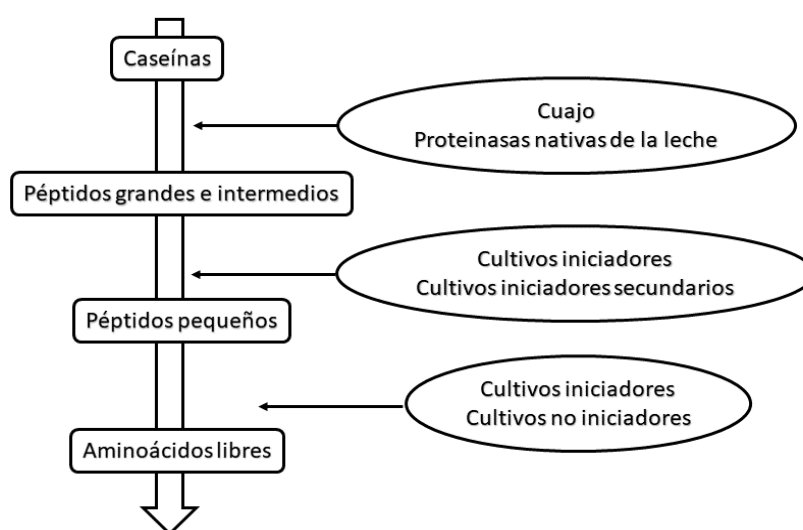


Figura I10. Agentes responsables de la proteólisis durante la maduración de los quesos.

1.7 Los microorganismos de enemigos a aliados: los cultivos iniciadores

Casi siempre que escuchamos hablar de microorganismos se suelen asociar a agentes causantes de enfermedades y esto sucede desde el planteamiento a cargo de Pasteur de la teoría de la enfermedad microbiana, algo que en los últimos años parece cobrar vigencia con cada nueva investigación (Morris, 2016). Pero hay que decir que son parte fundamental de nuestra vida, sería impensable el funcionamiento de nuestro sistema gastro-intestinal, y sus correlaciones con nuestra salud, sin la microbiota propia que lo puebla, adquirida, según indican estudios recientes, desde el mismo canal del parto (Avelar Rodriguez et al., 2019; Valdes et al., 2018).

Del mismo modo ocurre con muchos procesos tecnológicos, como los productos fermentados, y el queso en particular, como en el estudio que nos ocupa, donde los microorganismos son esenciales para que se puedan llevar a cabo. Así los microorganismos tienen en primer lugar una función tecnológica en los productos fermentados y posteriormente el consumo de los mismos aporta beneficios a nuestra salud mediante las propiedades funcionales de esos microorganismos (propiedades probióticas, antimicrobianas, antioxidantes,...), incluso el consumo de alimentos fermentados se enfoca en recientes estudios como fuente dietética de organismos vivos sobre nuestro organismo (Marco et al., 2017; Rezac et al., 2018; Tamang et al., 2016).

Pero no hay que obviar que la calidad bacteriológica de la leche varía considerablemente y, aunque cada vez es mejor, siempre se corre un riesgo, por ello la mayoría del queso se elabora utilizando la leche pasteurizada. Con la utilización de este tratamiento térmico se elimina más del 99% de las bacterias presentes en la leche de partida, incluyendo las BAL que podrían producir una acidificación del producto (Law and Tamime, 2011).

Posteriormente se hace necesaria la aportación de cultivos iniciadores a la leche. En Francia, por ejemplo, es bastante usual el empleo de cultivos producidos en las propias lecherías. Además, esta práctica es algo que se conoce desde hace muchas décadas, dejando el suero de la elaboración del día anterior y añadiendo una parte a la leche del nuevo día de elaboración, con el consecuente aporte de los microorganismos exclusivos para ese queso en concreto. Así los cultivos tradicionales suelen estar formados por muchas cepas de muchas especies microbianas, en ocasiones incluyendo levaduras y mohos, así como bacterias; contribuyendo de forma específica a la complejidad del queso final (Powell et al., 2011). Pero estos procesos están restringidos a productos tradicionales muy concretos y, por lo tanto, de escasa aplicación industrial, donde se busca que los cultivos iniciadores mantengan un rendimiento reproducible y estén exentos de microorganismos que originen efectos no controlables. Así que lo cierto es que lo más usual es el empleo de cultivos iniciadores

adquiridos de un proveedor comercial, desarrollados para cada tipo de tecnología utilizada en la quesería.

Pero, ¿por qué es necesario el empleo de cultivos iniciadores en el queso? El papel de los mismos es esencial en todas las fases de la producción de quesos, pero especialmente durante la maduración de los mismos. En principio su crecimiento en la leche transforma la lactosa en ácido láctico, esta conversión da lugar a un pH óptimo para que tenga lugar la coagulación y el producto final, así como el contenido de humedad adecuado. Pero, además, durante la maduración proporcionarán tanto el desarrollo del aroma, como del sabor y de la textura.

Las BAL constituyen un grupo heterogéneo de géneros capaces de fermentar la lactosa y su transformación en ácido láctico. Se caracterizan por ser gram positivos, catalasa negativos, no producen esporas, siendo anaerobios estrictos, anaerobios facultativos o microaerófilos (Settanni and Moschetti, 2010). Las últimas revisiones taxonómicas en las BAL, además de los géneros de todos conocidos como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, a otros como *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Khalid, 2011).

Las BAL juegan un importante papel tanto en la elaboración de quesos como en la de otros alimentos fermentados. Así mismo constituyen parte de la microbiota habitual de los quesos elaborados con leche cruda y participan activamente en la maduración de los mismos, contribuyendo, entre otros factores, al desarrollo de la textura, del sabor y del aroma de los quesos. Del mismo modo, es frecuente que el industrial añada cultivos lácticos en la elaboración de este producto a partir de leche pasteurizada, asegurándose así de un transcurso adecuado del proceso de fermentación-maduración de los quesos (Leroy y De Vuyst, 2004). Las BAL, además de impulsar la fermentación, son partícipes en el desarrollo de otras características fisicoquímicas, tecnológicas y sensoriales del producto. Además, contribuyen a la seguridad del alimento. En este sentido diferentes cepas de LAB son capaces de producir compuestos antimicrobianos, enzimas, exopolisacáridos, vitaminas o incluso presentar propiedades probióticas, que hacen que el producto sea no sólo más seguro sino más saludable (Leroy and De Vuyst, 2004).

Hay que destacar también que gracias a los cultivos iniciadores se ha conseguido mejorar la calidad final de los productos lácteos, al mismo tiempo que han permitido una estandarización del proceso industrial. Por esta razón, y con la adicional de dirigir mejor el proceso madurativo de los quesos, los cultivos son frecuentemente añadidos también en las elaboraciones con leche cruda.

La producción industrial de cultivos iniciadores requiere del cumplimiento de una serie de requisitos entre los que destacaríamos los relacionados con la seguridad (ausencia de patogenicidad o producción de metabolitos nocivos o toxinas, ausencia de efectos adversos tras el consumo, etc.), y los relacionados con sus propiedades funcionales (como supervivencia de cultivos probióticos en el tracto digestivo y en un amplio rango de pH, temperaturas o concentraciones de sal, así como su posible contribución tanto a aspectos sensoriales como de textura adecuados en el producto, por ejemplo son capaces de degradar las caseínas y convertir los aminoácidos en compuestos que contribuyen al sabor) (Huys et al., 2013).

Algunas especies que pertenecen a las BAL se designan como microorganismos iniciadores (SBAL) y actúan durante la producción de queso, en la conversión de la lactosa en ácido láctico, disminuyendo el pH; otras especies, conocidas como no iniciadoras (NSBAL) presentan su actividad durante la maduración del queso, es microbiota adventicia y determinan simultáneamente las características organolépticas del producto final (Carafa et al., 2019).

Dentro de las especies de *Lactococcus* empleadas como cultivos iniciadores las más comúnmente empleadas son *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. El uso de lactococos en el queso es necesario para el consumo de la lactosa y la producción inicial de ácido láctico, con el consiguiente descenso de pH, este hecho es fundamental para favorecer la coagulación del queso y para la seguridad del mismo. Además, los lactococos intervienen en la proteólisis en los quesos de pasta prensada. Las proteasas presentes en su pared o las peptidasas intracelulares contribuyen de manera fundamental a la degradación de las caseínas, afectando a la textura y aroma de los quesos.

No obstante, se ha visto que los quesos elaborados con leche pasteurizada presentaban una diferencia en cuanto a la microbiota nativa respecto a los quesos elaborados con leche cruda y ésta era fundamentalmente debido a las NSBAL (Ballesteros et al., 2006). Esta diferencia aportaba a los quesos de leche cruda, que poseían altos recuentos de NSBAL, una mayor intensidad del sabor y del aroma además de presentar una proteólisis más acentuada. La adición de lactobacilos mesófilos como adjuntos de las cepas de *Lactococcus* utilizados como iniciadores, a la leche pasteurizada, se presenta como una alternativa al uso de leche cruda, contribuyendo a la maduración del queso (McSweeney, 2017).

Entre los microorganismos que se pueden emplear como NSBAL destacan diferentes especies de *Lactobacillus*. Muchos autores han encontrado que el empleo de los mismos como adjunto en la elaboración de quesos participa de forma fundamental en el desarrollo tanto del aroma como de la textura de los quesos y ayuda a controlar algunos defectos, como los debidos a la producción de gas en el queso durante el almacenamiento (Gürsoy and Türkmen, 2018; Lynch et al., 2014; Settanni and Moschetti, 2010); acelera la formación de aminoácidos libres (Poveda et al., 2015) o intensifica el aroma (O'Brien et al., 2017). Asimismo, pueden favorecer

la formación de péptidos bioactivos (Baptista et al., 2018) e intervienen en la producción de ácido linoleico conjugado (Ares-Yebra et al., 2019), además de otras propiedades funcionales (Aljewicz et al., 2014; de Moraes et al., 2018; Plessas et al., 2017). En los últimos años se está estudiando con gran interés su contribución en la maduración de los quesos y en relación con alguno de dichos estudios cabe destacar que *Lactobacillus plantarum* es una especie frecuentemente aislada de quesos elaborados con leche cruda, por ejemplo de queso de Armada (Herreros et al., 2003), de quesos madurados como el queso Roncal (Oneca et al., 2003), o quesos de pasta hilada como el queso Oaxaca mexicano (Caro et al., 2013). Otros estudios se focalizan en el estudio de sus propiedades tecnológicas (Ares-Yebra et al., 2019; González et al., 2015, 2010; Herreros et al., 2003; Menéndez et al., 2000) y más recientemente también funcionales (Bautista-Gallego et al., 2014; Renes et al., 2017a, 2017b; Songisepp et al., 2012). Los enterococos pueden tener un doble papel, higiénico-sanitario y tecnológico, ya que pueden intervenir en la maduración de los quesos e incluso han sido ensayados como iniciadores en la elaboración de algunas variedades de quesos (Giraffa, 2002). La actividad antibacteriana de este género ha sido puesta de manifiesto en diversos estudios como el realizado por García-Cano et al. (2014) que demostraron que las cepas de *Enterococcus* aisladas del queso Cotija mostraron potencial antibacteriano que podría ser útil en la tecnología de conservación de alimentos, ya que, en su caso, produjeron hidrolasas peptidoglucanos activas contra bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas tales como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella entérica*.

En los últimos años se han estudiado los efectos de muchas cepas y sus posibles beneficios en la elaboración de quesos. Las fuentes bibliográficas al respecto de los microorganismos y los quesos en cuya maduración intervienen se muestran en la tabla I1.

Tabla I1. Bibliografía correspondiente al uso de NSBAL en la elaboración de distintos quesos.

Género	Especie	Queso/Usos	Bibliografía	
Lactobacillus	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Cheddar	Wang et al. (2018)	
		Miniature cheeses	Ares-Yebra et al. (2019)	
		Feta	Papadopoulou et al. (2018)	
		Brazilian cheeses	Campagnollo et al. (2018)	
		Akawi cheese	Ayyash et al. (2018)	
		Pico cheese	Ribeiro et al. (2018)	
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Dutch-type		Bielecka and Cichosz (2017)
			Semihard artisanal goat	Pachlová et al. (2018) Meng et al. (2018)
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Feta		Kumar et al. (2015)
			Prato	Baptista et al. (2018)
	<i>Lactobacillus casei</i>	Feta		Kumar et al., 2015
			Cheddar-type	Reale et al. (2016)
	<i>Lactobacillus mucosae</i>		Goat cheese	de Moraes et al. (2018)
	<i>Lactobacillus nodensis</i>		Gouda	O'Brien et al. (2017)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Cheddar		Liu et al. (2018)	
		Semihard artisanal goat	Meng et al., 2018	
<i>Lactobacillus curvatus</i>		Dutch-type	Pachlová et al., 2018	
<i>Lactobacillus amylovorus</i>		Cheddar	Lynch et al. (2014)	
<i>Lactobacillus brevis</i>		Brazilian cheeses	Campagnollo et al., 2018	
Enterococcus	<i>Enterococcus faecalis</i>		Brazilian cheeses	Campagnollo et al., 2018
	<i>Enterococcus faecium</i>		Greek Graviera	Vandera et al. (2019)
	<i>Enterococcus faecium</i>		Traditional Greek	Lianou et al. (2017)
	<i>Enterococcus durans</i>	Fresh cheese		Coelho et al. (2014)
			Greek Graviera	Vandera et al., 2019
	<i>Enterococcus durans</i>		Caciocavallo Palermitano cheese	Guarrasi et al. (2017)
	<i>Enterococcus lactis</i>		Caciocavallo Palermitano cheese	Guarrasi et al., 2017
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>		Caciocavallo Palermitano cheese	Guarrasi et al., 2017
	<i>Enterococcus faecalis</i>		Caciocavallo Palermitano cheese	Guarrasi et al., 2017
	<i>Enterococcus gallinarum</i>		Caciocavallo Palermitano cheese	Guarrasi et al., 2017
	<i>Enterococcus raffinosus</i>		Zamorano cheese	(Renes et al., 2014)

En la elaboración de los quesos de pasta prensada se suelen emplear cultivos iniciadores comerciales mixtos mesófilos, que generalmente están compuestos por especies del género *Leuconostoc* y distintas variedades de *Lactococcus lactis*, y termófilos como *Streptococcus thermophilus*, además de varias especies de lactobacilos (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*). Sin embargo, algunos Consejos Reguladores (De Pasquale et al., 2019) han empezado a plantearse el empleo de cultivos iniciadores autóctonos presentes en el producto de origen y que aportaría las características organolépticas propias del mismo, además al seleccionar sólo algunas cepas se consigue una homogeneidad del producto, evitando uno de los grandes inconvenientes en quesos tradicionales que se elaboraban con leche cruda como es la heterogeneidad entre lotes, y consiguiendo de modo paralelo dar características aromáticas y de sabor diferenciales a los quesos pasteurizados. Así se ha ido explorando en los últimos años el empleo de cepas seleccionadas de cultivos iniciadores autóctonos como coadyuvantes (NSBAL), de los cuales se ha llevado a cabo una minuciosa caracterización y genotipado durante las etapas de fabricación y maduración de los quesos, seleccionando aquellas cepas con mejor aptitud tecnológica.

1.8 El queso Zamorano

El queso Zamorano es una variedad de pasta prensada no cocida que se elabora en la provincia de Zamora (Castilla y León, España), a partir de leche de oveja cruda o pasteurizada obtenida de las razas Churra y Castellana. En la fabricación tradicional de queso Zamorano, la leche cruda se coagula con cuajo animal a 28–32°C durante 30–45 min y la cuajada se corta en trozos del tamaño de granos de arroz y se calienta mientras se agita a 36–38°C. Después de desuerar, la cuajada se transfiere a los moldes, los cuales son prensados hasta adquirir un pH final de 5,4-5,5. Posteriormente los quesos se salan en salmuera y se maduran durante al menos 100 días, aunque generalmente se consumen con más de 6 meses de maduración.

Los quesos resultantes presentan una forma cilíndrica con un tamaño aproximado de mide 8–12 cm de altura y 18–22 cm de diámetro, y un peso que ronda los 3–3,5 kg. Su pasta es firme y su corteza puede variar del amarillo al pardo oscuro. El queso tradicional Zamorano de leche cruda posee un aroma característico a la leche de oveja y presenta gran similitud con el queso Manchego.

En España, las figuras de calidad distintiva son la Denominación de Origen Protegida (DOP) y la Indicación Geográfica Protegida (IGP). Estas características diferenciadoras de calidad se basan en (1) un área geográfica definida donde se producen las materias primas y se fabrican los productos, y (2) el factor humano, es decir, la influencia de las personas que participan en todos estos procedimientos.

El Reglamento (CE) nº 510/2006 del Consejo, de 20 de marzo de 2006, establece las definiciones de DOP e IGP, las dos figuras reglamentarias en un marco de protección aplicado

a los productos agrícolas y alimenticios. Según el citado Reglamento, el término “denominación de origen” (DO) se aplicaría al nombre de una región, un lugar específico o, en casos excepcionales, un país, utilizado para describir un producto agrícola o un producto alimenticio cuando éste: (1) es originario de esa región, lugar o país específico, (2) la calidad o características de las cuales se deben esencialmente o exclusivamente a un entorno geográfico particular con sus factores naturales y humanos inherentes, y (3) la producción, procesamiento y preparación del mismo tienen lugar en el país o en la zona geográfica definida.

El queso Zamorano con DOP, que se estableció como marca de calidad en el año 1993, siendo por tanto una de las más antiguas en España y permaneciendo como referencia de calidad quesera nacional e internacional durante estos 25 años. Siendo el único queso de Castilla y León que tiene reconocida esta distinción de calidad por la Unión Europea. Asimismo, es un importante motor económico para la región ya que representa el 1,04 % en cuanto al valor económico total de los quesos con DOP e IGP en España (MAPA, 2018g).

El queso Zamorano está protegido con un DO desde 1993, como se comentó anteriormente, y está registrado como DOP en el Reglamento (CE) nº 1107/96 de la Comisión. Según la Orden de 6 de mayo de 1993 (BOE nº 120, de 20 de mayo de 1993), ese nombre hace referencia a un queso graso de pasta comprimida elaborado con leche de oveja de las razas Churra y Castellana españolas y con un tiempo de maduración de al menos 100 días, que se modificó y aprobó según consta en el Reglamento de Ejecución (UE) 2015/625 (European Commission, 2015) para su aplicación también en el cruce F1. El Reglamento de Ejecución (UE) 2015/625 de la DOP queso Zamorano señala “es un queso graso de pasta prensada elaborado con leche de oveja de las razas Churra, Castellana y procedentes del primer cruce (F1) de madres de la raza Churra y Castellana y padre de la raza Assaf española, no pudiendo, en este último caso, realizar reposición de la propia explotación”. No obstante, existen ganaderías e industrias que están demandando la inclusión de nuevas razas en la DOP Queso Zamorano para adaptarse a los cambios que se están sucediendo en la cabaña ovina de Zamora y basándose también en que no deberían existir diferencias en los quesos elaborados con leche de razas autóctonas o extranjeras. Por el contrario, otros productores acogidos a la DOP señalan que las características de un queso elaborado con razas distintas a las autóctonas presentan diferencias importantes en la calidad final. Sea como fuere, tanto en uno como en otro caso, las pruebas aportadas por ambos grupos son meramente subjetivas.

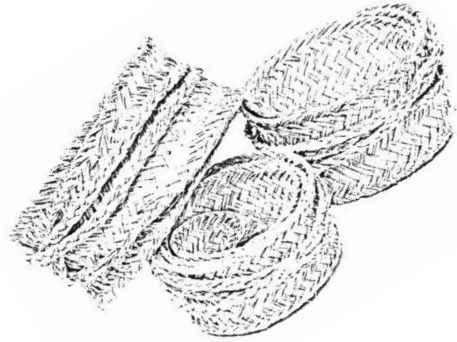
El queso Zamorano, tras la aprobación del nuevo pliego de condiciones de la DOP Queso Zamorano según Reglamento de Ejecución (UE) 2015/625 de la Comisión (European Commission, 2015), quedaría definido como un queso graso de pasta prensada elaborado con leche de oveja de las razas Churra, Castellana y procedentes del primer cruce (F1) de madres de la raza Churra y Castellana y padre de la raza Assaf española, no pudiendo, en este último

caso, realizar reposición de la propia explotación. Con una maduración mínima de 100 días para los quesos de más de 1,5 kg y de 60 días mínimo para los quesos de menos de 1,5 kg.

Es, por lo tanto, un queso que requiere de un periodo de maduración pudiendo ser superior a los 9 meses en el caso de los quesos añejos, e incluso llegando a alcanzar hasta 16-18 meses en bodega para quesos reserva o gran reserva. Durante este periodo de maduración tienen lugar una serie de procesos que irán conformando las características propias del producto desde el punto de vista fisicoquímico y sensorial.

Existen algunos estudios sobre la calidad del queso Zamorano DOP (Fernández-García et al., 2004; Fernández et al., 2016; Ferrazza et al., 2004; Lurueña-Martínez et al., 2010). Sin embargo, hay poca información disponible sobre la actividad proteolítica y su efecto sobre la calidad, la seguridad, la textura y acerca de su influencia sobre las propiedades sensoriales que van adquiriendo los quesos durante la maduración. Estos aspectos son importantes tanto desde el punto de vista de la estandarización y aceptación del producto como desde el que afecta a la salud pública. Las aminas biógenas, en niveles bajos, pueden impartir características funcionales y de sabor al queso. Sin embargo, algunas aminas pueden acumularse si hay condiciones higiénico-sanitarias inadecuadas durante el procesamiento. Altas concentraciones de tiramina e histamina son indeseables debido a los efectos adversos para la salud humana, incluyendo como síntomas más comunes dolores de cabeza, sofocos, náuseas, palpitaciones cardíacas y alteraciones en la presión arterial (EFSA, 2011). Por lo tanto, la concentración de aminas biógenas se puede usar como un indicador de las condiciones higiénicas que prevalecen durante la fabricación y también del riesgo potencial para la salud (Álvarez González et al., 2014; EFSA, 2011).

El Consejo Regulador de la DOP Queso Zamorano tiene como función principal velar por que sus productos guarden todas las garantías de calidad que les exige el reglamento con el fin de que los consumidores no se vean engañados a la hora de comprar un producto. Por otra parte, son necesarios estudios científico-técnicos que permitan observar las diferencias o similitudes existentes entre los productos acogidos a la denominación de origen y los que se encuentran fuera de esa marca de calidad. Además, si a ello unimos el hecho de que una parte importante de queso Zamorano con DOP es también fabricado con leche pasteurizada, se requieren estudios que permitan comprobar el efecto de la aplicación de dicho tratamiento térmico en la calidad final del queso.



2 Justificación y objetivos

Son varios los factores que contribuyen al desarrollo de las características de los quesos, y por consiguiente a su calidad, entre los cuales podemos destacar: el tiempo y condiciones de maduración, el tipo de leche, su calidad microbiológica, la tecnología de elaboración, las condiciones de maduración y la microbiota láctica o más concretamente, en los quesos elaborados con leche pasteurizada, el cultivo iniciador empleado.

La maduración es una etapa fundamental en la elaboración de los quesos. Se trata de un proceso dirigido por un sistema enzimático complejo, en el que intervienen enzimas naturales de la leche, la enzima coagulante y los enzimas microbianos. La actividad de estos agentes sobre los componentes mayoritarios de la leche puede verse influenciada por distintos parámetros intrínsecos (pH, actividad del agua y concentración sal/humedad, entre otras) y extrínsecos (temperatura y humedad relativa ambiental, velocidad del aire, tiempo de maduración, etc.). La maduración de los quesos transcurre por lo general, en cámaras especiales con control de la temperatura y la humedad relativa del ambiente.

La elaboración de quesos de oveja de pasta prensada generalmente conlleva tiempos prolongados de maduración, durante los cuales transcurren fenómenos glucolíticos, proteolíticos y lipolíticos. Dichos fenómenos suponen no solo la liberación de compuestos sápidos y aromáticos, sino también la modificación parcial de la textura inicial de la cuajada, como consecuencia de la hidrólisis de las caseínas y de los péptidos resultantes. El tiempo de maduración constituye un factor clave para que se produzcan con mayor o menor intensidad dichos cambios químicos, bioquímicos y físicos, los cuales van a repercutir en la calidad final de los quesos.

La pasteurización de la leche asegura la calidad higiénica de los productos al eliminar los patógenos potenciales que se pueden encontrar en la leche cruda. Sin embargo, se ha demostrado que afecta a la composición microbiológica y química del queso (Grappin and Beuvier, 1997; Ortigosa et al., 2005). Algunos estudios, si bien son conscientes de los riesgos de no usar la pasteurización, reseñan ciertos beneficios en el uso de leche cruda al mantener una alta taxonomía de bacterias con una gran diversidad en comunidades microbianas de quesos autóctonos y tradicionales. Esta biodiversidad combinada con determinados métodos de elaboración particulares serían claves para desarrollar quesos artesanales con sus características específicas, incluyendo un menor riesgo de patógenos (Montel et al., 2014; Yoon et al., 2016). De hecho, es práctica también extendida en las queserías inocular un cultivo iniciador a la leche cruda con objeto de que dirigir adecuadamente el proceso madurativo y reducir los riesgos de crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes.

Los cultivos lácticos desarrollan un papel fundamental no sólo en el inicio de la maduración, al desarrollar acidez y favorecer la coagulación, sino también posteriormente al

contribuir al proceso madurativo de los quesos. El empleo de cultivos autóctonos, constituidos por cepas de bacterias lácticas “autóctonas” constituye una interesante oportunidad para elaborar quesos tradicionales con leche pasteurizada que conserven sus propiedades sensoriales y características peculiares. Estudios previos de caracterización de quesos tradicionales permitieron el aislamiento de un amplio y representativo número de cepas de bacterias lácticas, las cuales fueron posteriormente identificadas a nivel de especie y caracterizadas desde un punto de vista tecnológico y de producción de compuestos bioactivos. Las cepas con mejores aptitudes tecnológicas han sido empleadas en el diseño de cultivos iniciadores para comprobar su participación en la maduración de algunos quesos tradicionales, entre los cuales destaca el queso Zamorano.

Por otro lado, es sabido desde hace tiempo que la pasteurización de la leche ejerce diferencias en cuanto al sabor, comparado con los quesos elaborados con leche cruda, ya que por un lado reduce defectos sensoriales, pero por otro disminuye el sabor general del queso madurado (Chambers et al., 2010; Mendia et al., 1999). El tratamiento térmico también afecta a la lipólisis, presentando menores niveles los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada respecto a los elaborados con leche cruda (Hickey et al., 2007), aunque algunos autores en sus estudios no llegaron a observar diferencias significativas ni a nivel de proteólisis ni tampoco en la lipólisis entre quesos de leche cruda o pasteurizada (Pappa et al., 2017; Zengin et al., 2011). Mendia et al. (1999) también observaron que el queso elaborado a partir de leche pasteurizada presentaba diferencias en sus atributos sensoriales, presentando una textura más cremosa que en los que se utilizaba leche cruda como materia prima.

En la elaboración del Queso Zamorano con Denominación de Origen Protegida (DOP) se emplea leche de las razas de oveja Churra y Castellana. Cabe señalar que la raza Churra es la segunda raza española por importancia numérica con un rendimiento medio de 215 L para una lactación de 150 días. No obstante, en los últimos años se han ido introduciendo razas extranjeras de mayor producción láctea, aunque con menores contenidos en grasa y proteína. En este sentido, hay que tener en cuenta que la leche empleada para la elaboración de los quesos de oveja puede provenir de las ovejas de raza Assaf, predominante en la zona desde la década de los 70, absorbiendo a gran parte de los rebaños de las razas Churra y Castellana, autóctonas de la zona (Acero Adámez, 2009). En base a ello los fabricantes de queso, pertenecientes a los distintos Consejos Reguladores de las diferentes DOP, contemplan la inclusión de las mismas o sus cruces. Esta resolución también ha sido adoptada por los elaboradores de Queso Zamorano DOP.

En el supuesto de que las razas autóctonas influyan positivamente en la calidad de los quesos, ello podría repercutir en diferentes aspectos:

- El mantenimiento de la variabilidad: en Europa, la mitad de las razas que existían a principios del siglo XX ya han desaparecido (FAO, 2019),

- La sostenibilidad: las razas autóctonas como la Churra o Castellana están perfectamente adaptadas a los tradicionales sistemas de pastoreo, y esto ayuda a mantener la vegetación en un estado que proporciona un hábitat adecuado para tipos particulares de vida silvestre (Haw, 2012). Podemos señalar algunos ejemplos como el de Eslovenia, que informa que la comercialización de productos de alto valor (por ejemplo, quesos y otros productos lácteos) contribuye a la conservación de extensos pastizales seminaturales y de su biodiversidad asociada. Al tratarse de productos con precios más altos, el beneficio permite la inversión en mano de obra y habilidades necesarias para administrar estos sistemas (FAO, 2019). Otro ejemplo es el de Alemania, que en la Reserva de la Biosfera de Rhön, con el lema "protección a través del uso", varias prácticas de gestión, incluida la reintroducción de razas de ganado en peligro de extinción como la oveja Rhön, contribuyen a la conservación del paisaje agrícola. Además, para muchos hogares, las ventas de productos agrícolas, forestales o acuáticos, así como la venta de ovejas y cabras, constituyen un medio para financiar gastos en salud y educación (Otte et al., 2012).

- Económicos: diferentes estudios han reseñado que la raza afecta a la calidad final del queso y, por consiguiente, repercute en el prestigio y valor que adquieren los quesos en el mercado. La leche de vaca presenta diferencias en cuanto a cantidad y en calidad de componentes como grasa o proteína en función de la raza (De Marchi et al., 2008; Di Gregorio et al., 2017; Dillon et al., 2003; Vanbergue et al., 2017). De igual modo se observan diferencias con respecto a la leche de cabra de diferentes razas (Hayaloglu et al., 2013; Vacca et al., 2018). Además, también hay estudios del efecto que ejerce la raza sobre propiedades como el rendimiento quesero, la coagulación de la leche, la repercusión sobre la firmeza de la cuajada y sinéresis, aspectos todos ellos ligados a la calidad final de los quesos (Stocco et al., 2017; Vacca et al., 2018).

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue estudiar la repercusión que diferentes variables de tipo tecnológico y genético (tiempo de maduración, tratamiento térmico de la leche, origen de la misma, referido a la raza ovina y cultivo iniciador) ejercieron sobre las características y la calidad del queso Zamorano.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- 1.- Estudiar la evolución de las características fisicoquímicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales del queso Zamorano, a lo largo de la maduración.

- 2.- Comprobar la influencia que tuvo el tratamiento térmico de la leche sobre las características del queso Zamorano al final del proceso madurativo.

3.- Evaluar el efecto que el empleo de leche de razas de ovejas Churra y Assaf, así como sus mezclas, ejercieron sobre las características del queso Zamorano al final de su maduración.

4.- Investigar el efecto de la adición de varios cultivos autóctonos, elaborados a partir de cepas de bacterias lácticas, provenientes de quesos tradicionales elaborados con leche cruda y seleccionadas en función de su aptitud tecnológica, en las características del queso Zamorano.



3 Material y métodos

3.1 Elaboración de los quesos y toma de muestras

Se utilizó leche de las razas Churra y Assaf de distintos ganaderos de la provincia de Zamora para la elaboración de los quesos. Para cada elaboración de queso se emplearon 200 L de leche.

Se elaboraron 10 lotes de queso Zamorano: 5 lotes con leche cruda y 5 lotes con leche pasteurizada con las siguientes mezclas de leche de oveja: 100% Churra, mezcla de 75% Churra:25 % Assaf, mezcla 50% Churra:50% Assaf, mezcla 25% Churra:75% Assaf y, por último, 100% Assaf.

El procedimiento de elaboración fue semejante en todos los quesos y básicamente se resume como sigue. Se partió de leche cruda o pasteurizada cuando fue requerido (tratamiento térmico de 72°C/20 seg) y se calentó en la cuba a 30-32°C, momento en el que se añadió cloruro de calcio (0,2 g/L), nitrato y el cultivo iniciador (fermento acidificante constituido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus. lactis* subsp. *cremoris*) al 1-1,5% directamente a cuba, se agitó la leche y se dejó en reposo durante unos 30 min. Al cabo de este tiempo, se añadieron 25 mL de cuajo ovino líquido (>70% quimosina, de fuerza 150±10% IMCU, Arroyo, Santander, España) por cada 100 L de leche. La coagulación transcurrió en aproximadamente 40-45 min. Seguidamente, se realizó el corte de la cuajada con liras durante unos 20 min y, luego se procedió al trabajado de la cuajada cortada durante unos 30 min hasta obtener un tamaño de grano de arroz, incrementando simultáneamente la temperatura de la cuajada a razón de 1°C cada 5 min hasta alcanzar 36°C. Cuando el grano hubo adquirido la consistencia adecuada, se retiró el suero y se procedió al llenado de los moldes, colocando previamente un paño para facilitar el desuerado de la masa. A continuación, los moldes fueron trasladados a una prensa neumática donde permanecieron a una presión de 3,5-4 kg/cm durante 8-10 h. Finalizado este tiempo, la cuajada prensada fue retirada de los moldes e introducida en una salmuera al 20% y 8-10°C donde permanecieron durante 24 h. Por último, los quesos salazonados fueron conducidos a las cámaras de maduración. Para este estudio se utilizaron las cámaras de una industria quesera integrante del Consejo regulador Queso Zamorano donde permanecieron a 10°C y 80-85% de Humedad relativa durante el tiempo de maduración.

En cada lote se obtuvieron 12 quesos de aproximadamente 3 kg de peso. En cada uno de los lotes de queso elaborados se tomaron muestras de queso con 1 día (queso sin salazonar), 60, 120, 180, 240 y 300 días de maduración. Cada muestra estaba integrada por 2 quesos de 3 kg cada uno.

Las muestras de leche y de quesos fueron trasladados al laboratorio en neveras a una Tª de 4°C donde fueron preparados para los diferentes análisis a realizar (descortezado y picado a tamaño uniforme). Las muestras fueron envasadas en paquetes de aproximadamente 50 g cada uno, identificadas y almacenadas a congelación (-30°C) hasta el momento de su

análisis. Los análisis microbiológicos, extracto seco, pH, acidez titulable y actividad de agua se realizaron en todos los casos el mismo día de la recogida.

También se elaboraron cuatro lotes de queso Zamorano (por duplicado) en la Planta Piloto del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León (ICTAL) siguiendo el procedimiento descrito a continuación. Se partió de leche de oveja que se pasteurizó a 72°C durante 15 segundos. Posteriormente, se calentó en una cuba a 30-32°C y se procedió a la adición de cloruro de calcio (0,2 g/L) y del cultivo iniciador al 1%. [Lote A: cultivo comercial CHOOZIT™ LYO MA 011 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*); Lote B: cultivo autóctono con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239); Lote C: cultivo autóctono con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1736); Lote D: cultivo autóctono con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Enterococcus raffinosus* (TAUL 1351)]. Al cabo de media hora, se añadieron 30 mL de cuajo animal líquido (>70% quimosina, de fuerza 150±10% IMCU, Arroyo, Santander, España) por cada 100 L de leche, produciéndose la coagulación en 40-45 minutos. Seguidamente, se realizó el corte de la cuajada con liras durante unos 20 minutos hasta obtener el tamaño de un grano de arroz; luego se procedió a su agitación durante unos 30 minutos, fase en la cual la temperatura de la cuajada se incrementó a razón de 1°C cada 5 minutos hasta alcanzar 36°C. Cuando el grano adquirió la consistencia deseada, se procedió a la retirada del suero y al llenado de los moldes a los que se les colocó un paño para facilitar el desuerado de la masa. Los moldes fueron trasladados a una prensa neumática y sometidos a una presión de 3,5-4 kg/cm² durante 4-5 horas. La cuajada prensada se introdujo en una salmuera al 20% y 8-10°C durante 16 horas. Por último, los quesos se llevaron a las cámaras de maduración donde permanecieron a 10°C y 80-85% de humedad relativa durante 100 días de maduración.

Se recogieron muestras de cada uno de los lotes a los 60 y 100 días de maduración. Cada muestra estaba integrada por dos quesos de 1,5 kg cada uno, lo cual supone un total de 16 quesos analizados. Éstos fueron trasladados al laboratorio bajo condiciones de refrigeración (4°C) para ser posteriormente descortezados y triturados hasta un tamaño de grano uniforme. Las muestras fueron envasadas en paquetes de 30 g cada uno y almacenadas a congelación (-30°C) hasta el momento de su análisis.

3.2 Análisis químicos y fisicoquímicos

Se llevaron a cabo las determinaciones del contenido en extracto seco, proteína y grasa en la leche empleada como materia prima y en el queso.

Los contenidos en extracto seco, proteína y grasa de la leche fueron determinados según las normas ISO 6731:2010, ISO 8968-1:2014 e ISO 1211:2010, respectivamente.

Los contenidos en extracto seco, proteína y grasa de los quesos fueron determinados según las normas ISO 5534:2004, ISO 8968-1:2014 e ISO 3432:2008, respectivamente.

El contenido NaCl en queso fue determinado de acuerdo a la norma 935.43 (AOAC, 2000b). El contenido en lactosa fue determinado mediante la norma 984.15 (AOAC, 2005) usando el kit enzimático (R-biopharm, Roche, Germany). Las medidas del pH y la acidez titulable fueron llevadas a cabo de acuerdo a las normas 140.22 (AOAC, 1980a) y 162.47 (AOAC, 1980b), respectivamente. La actividad de agua (aw) se determinó mediante un Aqualab Dew Point Analyzer CX-2 (DECAGON Devices Inc., Pullman, WA, USA).

Para el contenido en ácidos grasos metilados se realizó la extracción de la grasa del queso siguiendo la metodología descrita por de Jong y Badings (1990), posteriormente la grasa se metiló con metóxido sódico conforme al procedimiento de Aldai et al. (2005). Los metil ésteres de los ácidos grasos (FAMES) fueron separados por cromatografía de gases (GC) con una columna capilar Tekno TR-CN 100 (60 m x 0,25 mm de diámetro x 0,2 m espesor; Teknokroma, Barcelona, España) en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (modelo 6890, Wilmington, EE.UU.), equipado con un inyector automático (modelo 7683, Hewlett-Packard) y un detector de masas selectivo (modelo 5973, Hewlett-Packard). Las temperaturas de inyección y el detector fueron 230°C. La columna se mantuvo a 50°C durante 1 minuto después de la inyección; programando la temperatura para un incremento de 15°C/min hasta 200°C, que fue mantenida durante 3 min, para a continuación incrementarla 2°C/min hasta alcanzar 220°C, temperatura que fue mantenida durante 5 min. Se utilizó helio como gas portador con un flujo de 1 mL/min. La muestra fue inyectada en modo split (relación 10:1). El ácido nonanoico (C_{9:0}) se añadió como patrón interno. La identificación de FAMES se realizó a partir de los tiempos de retención mediante el uso de estándares de ésteres metílicos.

Las áreas de los picos en el cromatograma se calcularon con el uso de factores respuesta.

Todos los análisis fueron llevados a cabo al menos por duplicado.

3.3 Análisis microbiológicos

Los cultivos iniciadores utilizados en este trabajo fueron: un cultivo comercial CHOOZIT™ LYO MA 011 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) (Dupont); un cultivo iniciador autóctono integrado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239); un cultivo iniciador autóctono integrado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1736); y finalmente, un cultivo iniciador autóctono con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Enterococcus raffinosus* (TAUL 1351)].

Las cepas lácticas empleadas en los cultivos autóctonos fueron seleccionadas en base a sus características tecnológicas (Herrerros et al., 2005, 2004, 2003). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) fue seleccionada por su capacidad acidificante y proteolítica; *L. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 12) por su capacidad aminopeptidasa y carboxipeptidasa. *Enterococcus raffinosus* (TAUL 1351) fue incluida por su actividad carboxipeptidasa y esterolítica. La cepa de *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1736) fue contemplada por su actividad aminopeptidasa y β -galactosidasa.

Con objeto de conocer la evolución de los principales grupos microbianos se llevaron a cabo análisis en la leche y en el queso a lo largo de la maduración. Se tomaron 50 g de leche o de queso a lo largo de la maduración siguiendo la norma ISO 707:2008, seguidamente fueron homogeneizados con 200 mL de una disolución estéril de citrato sódico al 2% (p/v) (Panreac, Barcelona, Spain) a una temperatura de 40-45°C durante 3 min en un Stomacher 400 Lab Blender (Seward Medical, London, U.K.), obteniendo la dilución 1:5. A continuación se prepararon diluciones decimales mezclando 10 mL de la dilución madre con 90 mL de agua de peptona estéril al 0,1% (p/v) (Oxoid, Unipath, Ltd. Basingstoke, U.K.) de acuerdo con la norma ISO 6887-5:2010. Un mL de cada dilución fue inoculado en masa en cada medio de cultivo indicado a continuación, incubando a la temperatura óptima de cada grupo microbiano durante el tiempo requerido para efectuar el recuento en las placas con un número de colonias entre 30 y 300. La microbiota aeróbica mesófila fue recontada en Plate Count Agar (PCA) (Oxoid) tras incubación a 30°C durante 48h. Los recuentos de las bacterias ácido lácticas se llevaron a cabo en Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) (Oxoid) tras incubación a 30°C durante 72 h. Los recuentos de *Enterobacteriaceae* se llevaron a cabo en Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (Oxoid) tras incubación a 37°C durante 18-24 h.

Se realizaron recuentos de lactococos específicamente en M17 agar (Biokar) mediante incubación a 30°C durante 18 a 24 h y recuentos de lactobacilos en agar ROGOSA (Oxoid), incubando a 30°C durante 5 días.

Se inoculó en profundidad un volumen de 1 mL de cada dilución, por duplicado, en PCA, MRS agar, y también para ROGOSA agar. Las placas de ROGOSA y VRBGA fueron cubiertas con una capa del mismo medio antes de su incubación para generar condiciones de microaerofilia. Para los recuentos en agar M17, se inocularon volúmenes de 0,1 mL de cada dilución por duplicado.

3.4 Análisis de los parámetros proteolíticos

3.4.1 Fracciones nitrogenadas

El nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6) se analizó siguiendo el método de Bütikofer et al. (1993). La obtención del nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (NS-TCA12%)

se realizó mezclando partes iguales de NS-pH 4,6 y TCA al 24% y filtrando la mezcla a través de un filtro Whatman n° 40 (Whatman Biosystems, Maidstone, UK). Se llevó a cabo la extracción del nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NS-PTA5%) mediante adición de 35 mL de H₂SO₄ 3,95M y 15 mL de TCA 33% a 50 mL del extracto de NS-pH 4,6 y posterior filtración mediante un filtro Whatman n° 40. Para la determinación del contenido en nitrógeno en cada una de las fracciones se empleó el método macro-Kjeldahl (ISO 27871, 2011). La digestión se llevó a cabo en un bloque Büchi 435 Digestion Unit (Büchi, Flawil, Suiza), acoplado a una unidad Büchi 412 Scrubber (Büchi, Flawil, Suiza) para neutralización de los gases. La destilación del nitrógeno se realizó en una unidad Büchi Distillation Unit B-323 (Büchi, Flawil, Suiza).

La cuantificación del nitrógeno se realizó siguiendo la norma ISO 8968-1:2014.

3.4.2 Determinación del contenido en caseínas

La preparación de las muestras se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Farkye et al. (1991). La separación e identificación de las caseínas y sus productos de degradación se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de urea-poliacrilamida (UREA-PAGE) (Andrews, 1983). Para la tinción de los geles se siguió la técnica descrita por Blakesley y Boezi (1977). Finalmente, la cuantificación de las bandas electroforéticas se realizó mediante un analizador de imagen, utilizando el software Diversity One version 1.0. (New York, NY, EE.UU) expresando los resultados como porcentaje de la densidad óptica total.

3.4.3 Determinación del perfil de péptidos

Los extractos solubles en agua (WSE) del queso fueron obtenidos según lo descrito por Andersen et al. (2010) con algunas modificaciones. Para ello se tomaron 20 g de queso a los que se añadieron 100 mL de agua mili-Q a 40°C, se homogeneizaron con un Ultra Turrax a 12500 rpm dos veces durante 1 min dejando otro min de descanso entre ambas. El homogeneizado permaneció 1 h a 40°C en agitación, posteriormente se llevó a centrifugación a 3000 g durante 30 min a 4°C. Finalizado el proceso se filtró a través de lana de vidrio y papel Whatman No. 40 (Maidstone, England). Se tomaron 20 mL de WSE fraccionados y se ultrafiltraron con membranas Vivaspin 15R (Sartorius Stedim Biotech, Gottingen, Germany) de un tamaño molecular de corte de 10 kDa, hasta que estuvieron disponibles aproximadamente 9,5 mL y se completaron hasta 10 mL. El permeado resultante se congeló a una temperatura de -32°C hasta su utilización. El análisis del perfil de péptidos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) siguiendo el procedimiento descrito por Parra et al. (2000). A partir de 10 mL de los permeados se tomaron alícuotas de 1 mL y se pasaron a través de filtros de jeringa de 0,45µm.

Se inyectaron 20 μL de cada una de las muestras en un cromatógrafo Waters 2695 (Milford, MA, USA). La separación se realizó en una columna Waters Symmetry300 C_{18} 5 μm de poro (4,6 x 250 mm; 300 Å) y precolumna Waters Symmetry300 (4,6 x 20 mm) termostaticada a 50°C. La detección se llevó a cabo en un equipo Waters PDA 996 (Milford, MA, USA) a una longitud de onda de 214nm.

Las muestras se eluyeron con un gradiente de 2 disolventes: A, 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA, grado secuencial, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) en agua de grado HPLC desionizada, mientras que el disolvente B consistió de 0.1% TFA (v/v) en mezcla (1:1) de acetonitrilo y agua.

La velocidad de flujo fue de 1 mL min^{-1} y las condiciones del gradiente fueron 100% de A durante 5 min. A continuación, el gradiente pasó de 0% a 100% de B durante los siguientes 40 min. En cada cromatograma se establecieron 3 zonas en función del tiempo de retención: zona 1 o hidrofílica (13-22 min), zona 2 o de hidrofobicidad intermedia (22-30 min) y zona 3 o muy hidrofóbica (30-45 min). También se estableció una relación de péptidos hidrofóbicos (suma de áreas de zonas 2 y 3) respecto a los hidrofílicos (suma de áreas de la zona 1). Los resultados se establecieron como áreas relativas obtenidas al dividir la suma de todas las áreas de los picos del cromatograma incluidos en cada zona por el área total de picos del cromatograma, excluyendo el área de los picos hidrofóbicos mayoritarios que se solapan con los aminoácidos Phe y Trp (19,24 y 24,22 min, respectivamente).

3.4.4 Determinación del contenido en aminoácidos libres

La separación, identificación y cuantificación de los aminoácidos libres se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa, siguiendo el procedimiento descrito por (Alonso et al., 1994) con algunas modificaciones.

Para realizar esta extracción, se homogeneizaron 5 g de queso con 50 mL de ácido perclórico 0,6 N durante 3 min en un Omni-Mixer. La mezcla obtenida se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min, se extrajo el sobrenadante (previa eliminación de la fracción grasa superior), el cual se filtró a través de un papel Whatman n° 541 (Whatman, Maidstone, Reino Unido). A continuación, se ajustó el pH del filtrado a un valor de $7,0 \pm 0,2$ con una disolución de hidróxido potásico al 30% y se refrigeró a una temperatura de 4°C durante 12 h. Pasado este tiempo, los extractos obtenidos se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,45 μm (Millipore, Molsheim, Francia), para retirar las sales precipitadas. Las muestras se mantuvieron a congelación a -30°C hasta el momento del análisis.

Para la derivatización de las muestras se partió de una alícuota de 0,4 mL y se procedió a su evaporación en centrífuga Speed-Vac (Savant Plus SC110A, Savant Instruments, Inc, Farmingdale, NY, EE.UU.). Una vez evaporadas, se derivatizaron mediante la adición de 20 μL de la mezcla que contenía fenilisotiocianato como agente derivatizante. A continuación, se

mezclaron en un vortex, y se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se realizó una segunda desecación en Speed-Vac. Las muestras derivatizadas se resuspendieron en 1 mL de disolución diluyente y se agitaron hasta su completa resuspensión. Seguidamente, se centrifugaron durante 5 min a 3500 rpm, en una microcentrífuga Eppendorf 5414 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Finalmente se filtraron a través de filtros de jeringa Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore, Molsheim, Francia), pasándolo a viales para proceder a su análisis.

Se inyectaron 20 µL de cada una de las muestras en un cromatógrafo Waters 2695 (Milford, MA, USA). La separación se realizó en una columna de fase reversa C18 Brisa LC2 de Teknokroma (Barcelona España) con 5 µm de poro (4,6 x 250 mm) termostatizada a 50°C. La detección se llevó a cabo en un equipo Waters 2487 (Milford, MA, USA) de absorción dual a 254 nm.

Tabla M1. Condiciones cromatográficas empleadas en el análisis.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% Fase A	% Fase B	Curva
0	0	100	0	6
5	0,90	100	0	8
20	0,80	78	22	6
40	0,75	54	46	6
42	0,80	0	100	6
43	1,00	0	100	6
44	1,00	100	0	6
46	1,25	100	0	6
47	0,90	100	0	6

La fase móvil A constaba de una mezcla en proporción 94:6 (v/v) de acetato sódico y acetonitrilo, mientras que el eluyente B se preparó mezclando agua MilliQ y acetonitrilo HPLC en proporción de 40:60 (v/v). El gradiente empleado se muestra en la tabla M1.

La columna permaneció termostatizada a 50 ± 1°C durante todo el análisis y la longitud de onda del detector fue ajustada a 254 nm.

Para poder cuantificar correctamente los aminoácidos libres, se prepararon 25 disoluciones patrón con las siguientes concentraciones de cada aminoácido: 12,5 mM de tirosina y 25 mM para el resto de los aminoácidos. Se emplearon 8 diluciones madre con la mezcla de aminoácidos y a partir de ellas se obtuvieron las curvas de calibración para cada aminoácido. Estas curvas patrón se emplearon para cuantificar los aminoácidos libres del queso por el método estándar externo, el cromatograma resultante de los patrones se puede ver en la figura M1.

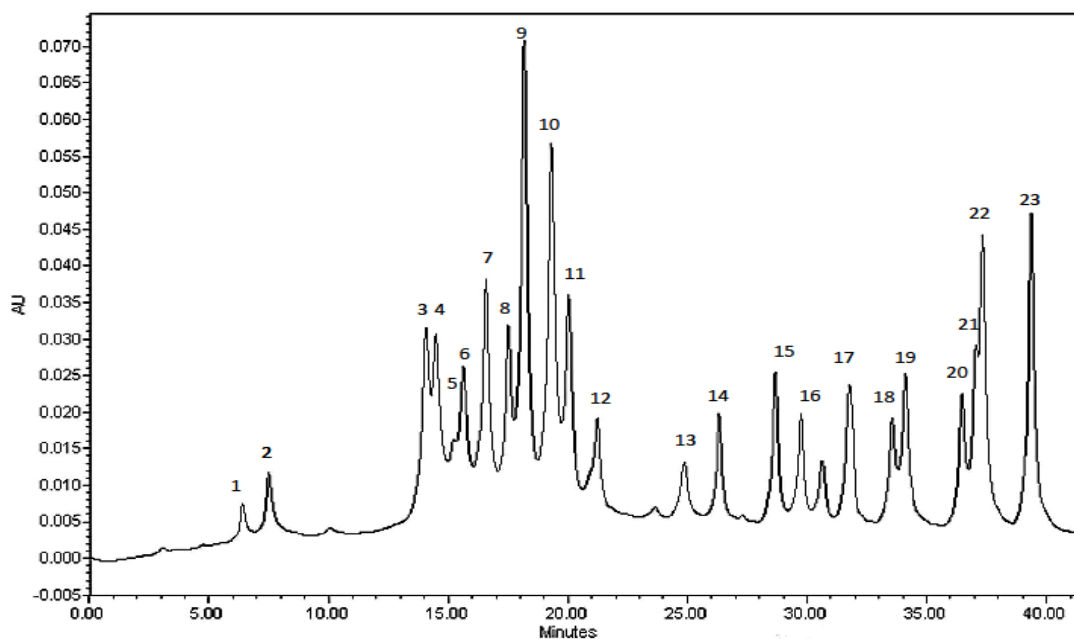


Figura M1. Cromatograma de los patrones de aminoácidos.

Los aminoácidos esperados son: 1. ácido aspártico (Asp), 2. ácido glutámico (Glu), 3. asparagina (Asn), 4. serina (Ser), 5. glutamina (Gln), 6. glicina (Gly), 7. histidina (His), 8. citrulina (Cit), 9. arginina + taurina (Arg-Tau), 10. ácido γ -aminobutírico + treonina (Gaba-Thr), 11. alanina (Ala), 12. prolina (Pro), 13. etanolamina (Eta), 14. tirosina (Tyr), 15. valina (Val), 16. metionina (Met), 17. cisteína (Cys), 18. isoleucina (Ile), 19. leucina (Leu), 20. fenilalanina (Phe), 21. triptófano (Trp), 22. ornitina (Orn) y 23. lisina (Lys).

3.4.5 Determinación del contenido en aminas biógenas

La separación, identificación y cuantificación de las aminas biógenas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa según el procedimiento descrito por Moret et al. (2005), con algunas modificaciones.

Se preparó una solución madre estándar agregando una cantidad pesada con precisión entre 8,8 y 57,5 mg de cada amina a un matraz volumétrico de 25 mL, enrasando con agua MiliQ. Las soluciones estándar se almacenaron a 4°C hasta su uso. Se obtuvo una línea de calibración para cada amina biógena dansilada mediante el análisis de las soluciones estándar diluidas en diferentes concentraciones.

La extracción de las aminas biógenas se realizó mediante un Omni-Mixer Sorwall (Newton, Conn, EEUU) donde se homogeneizaron 10 g de queso con 20 mL de la disolución de ácido clorhídrico 0,1 N y 100 µL de la disolución de estándar interno (1,7-diaminoheptano; 0,6 mg/mL) durante 2 min. El homogeneizado obtenido fue centrifugado a 4°C en una centrifuga Eppendorf 5804F (Hamburgo, Alemania) a 11000 rpm durante 20 min. Esta operación se repitió dos veces. El sobrenadante se llevó a un volumen final de 50 mL con HCl 0,1 N.

Para la derivatización de las muestras se emplearon tubos de ensayo, protegidos de la luz. Se mezcló 1 mL del extracto de cada muestra con 200 µL de una solución de hidróxido de sodio 2 N, 300 µL de una solución de bicarbonato sódico a saturación y 1 mL de una solución de cloruro de dansilo en acetona (10 mg/mL). Los tubos herméticamente cerrados, se agitaron y se introdujeron en un baño de agua a 40°C durante 60 min. Posteriormente, y una vez enfriados a temperatura ambiente, se les añadió 100 µL de una solución de hidróxido de amonio al 25% y se mantuvieron en la oscuridad durante 15 min. A continuación, se añadió 1 mL de éter dietílico, se agitaron y fueron centrifugados a 4000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se recogió en un tubo de ensayo cerrado, procediendo a una segunda extracción. Ambos sobrenadantes fueron mezclados y desecados bajo corriente de nitrógeno. Finalmente, el residuo seco se redisolvió en 2 mL de acetonitrilo y se filtró con un filtro de jeringa de 0,45 µm de diámetro (Pall Corporation, Madrid, España).

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con un cromatógrafo constituido por un módulo de separación Waters 2690 Alliance (Milford, MA, EEUU), un detector Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Milford, MA, EEUU), una precolumna Waters Spherisorb® Guard Cartridge (5 µ ODS2 x 4,6 mm x 10 mm), una columna Waters Spherisorb® Analytical Column (5 µ ODS2 x 4,6 mm x 250 mm) y utilizando el programa informático Millennium32 Chromatography Manager versión 3.05 de Waters™ (Milford, MA, EEUU).

Las fases móviles utilizadas fueron agua MiliQ desionizada (fase A) y acetonitrilo LiChrosolv (fase B) bajo las condiciones de gradiente que se describen en la tabla M2.

Tabla M2. Condiciones del gradiente de las fases móviles utilizadas en la determinación del contenido en aminas biógenas en el queso Zamorano.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% Fase A	% Fase B	Curva
0	0,8	100	0	-
9	0,8	35	65	9
10	0,8	20	80	9
18	0,8	15	85	9
23	0,8	0	100	9
25	0,8	0	100	9
30	0,1	100	0	9

3.5 Análisis de los parámetros lipolíticos

La determinación del grado de lipólisis de la materia grasa se llevó a cabo mediante el índice de acidez de la grasa según la ISO 1740:2004.

Para cuantificación de los ácidos grasos libres se extrajo la grasa del queso siguiendo el procedimiento descrito por de Jong y Badings (1990) con algunas modificaciones.

Se pesó 1 g de queso junto con 3 g de sulfato sódico anhidro, 0,3 mL de ácido sulfúrico 2,5 M y 1 mL de la disolución de los estándares internos. A continuación, se extrajo la grasa 3 veces añadiendo cada vez, 3 mL de la mezcla de éter dietílico-heptano y centrifugando a 2500 rpm, durante 2 min a 20°C de temperatura. Finalmente, se recogió la fase orgánica, compuesta por la grasa y el éter dietílico-heptano, y se procedió a la separación de los ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos libres se separaron de los triglicéridos mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando columnas de polipropileno con relleno de aminopropil Sep-Pak® Vac 3cc (500 mg) (Waters, Milford, Ireland).

Las columnas de aminopropil se equilibraron con 10 mL de heptano. Seguidamente, se añadieron 9 mL de la fase orgánica recogida. La fracción de lípidos neutros se eluyó con 10 mL de la mezcla cloroformo-2 propanol y los ácidos grasos libres se eluyeron con 5 mL de la disolución de ácido fórmico en éter dietílico. Finalmente, esta fracción se recogió en viales para su posterior inyección automática en el cromatógrafo.

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos libres del queso se realizó por cromatografía de gases, usando un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series GC System (Hewlett Packard, Wilmington, USA), equipado con un inyector automático Hewlett Packard 7683 (Hewlett Packard, Wilmington, USA) y un detector de masas Hewlett Packard 5973 (Hewlett Packard, Wilmington, USA).

La separación de los distintos ácidos grasos libres se llevó a cabo en una columna Teknokroma TRACSIL TR-WAX; 25 m x 0,32 mm x 0,52 µm (Teknokroma, Barcelona, España).

Se emplearon estándares internos en disolución (ácido pentanoico [C_{5:0}], ácido nonanoico [C_{9:0}] y ácido heptanoico [C_{17:0}] en heptano, 0,5 mg/mL (p/v)) y se prepararon disoluciones de 1000 ppm en heptano de los siguientes ácidos grasos: acético [C_{2:0}], butírico [C_{4:0}], caproico [C_{6:0}], caprílico [C_{8:0}], cáprico [C_{10:0}], decenoico [C_{10:1}], láurico [C_{12:0}], mirístico [C_{14:0}], miristoleico [C_{14:1}], pentadecanoico [C_{15:0}], palmítico [C_{16:0}], palmitoleico [C_{16:1}], esteárico [C_{18:0}], oleico [C_{18:1}], linoleico [C_{18:2}], linolénico [C_{18:3}], octodecadienoico conjugado [C_{18:2} conjugado].

Seguidamente, se efectuaron 8 diluciones de la disolución madre que fueron colocadas en viales para su inyección automática en el cromatógrafo de gases, obteniendo las

correspondientes curvas de calibración para cada ácido graso para la cuantificación de los mismos.

Las condiciones cromatográficas emplearon helio como gas portador a un flujo de 2 mL/min, una temperatura del inyector de 230 °C y una temperatura del detector de 190 °C.

La temperatura del horno fue de 65 °C al inicio, con un incremento de temperatura de 10 °C/min hasta alcanzar los 240 °C que se mantuvieron durante 20 min. Se empleó un split/splitless: 1:10.

Los cromatogramas fueron procesados por medio del programa informático HP G1701BA versión B.01.00 Chemstation Software (HP, Wilmington, USA).

3.6 Determinación del color

Se realizó la medida instrumental del color siguiendo el método descrito por Diezhandino et al. (2016) se realizó utilizando un colorímetro de reflectancia Konica CM-700d (Minolta, Osaka, Japón). Lectura en posición MAV y una máscara MAV con cristal de diámetro 8 mm como ventana de medida. Los valores se expresaron en la escala CIELab (L*, luminosidad; a*, índice rojo-verde; b*, índice amarillo-azul). El programa utilizado para el tratamiento de los datos fue Color Data Software CM-S100w SpectraMagic TM NX ve. 1.9, Pro USB (Minolta, Osaka, Japón). Los análisis se realizaron sobre muestras longitudinales de queso con 1 cm de grosor, realizando en cada una de ellas un total de 12 medidas en diferentes puntos.

3.7 Análisis del Perfil de Textura

Los parámetros de la textura (fracturabilidad, dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, masticabilidad y gomosidad) fueron determinados con un texturómetro Stable Micro Systems Texturometer model TA-XT2i (Aname, Madrid, España), utilizando el análisis instrumental del perfil de textura descrito por Bourne (2002). Las muestras fueron extraídas con un sacabocados y se comprimieron hasta un 80% de su altura inicial empleando dos ciclos de compresión a velocidad constante. Cada muestra fue analizada por quintuplicado.

3.8 Análisis sensorial

La calidad e intensidad de las características sensoriales de los quesos se evaluó mediante un jurado de catadores (6-10 catadores) entrenado por el Consejo Regulador de la DOP “Queso Zamorano” siguiendo las normas ISO 8586:2012. Se evaluaron 26 descriptores agrupados en 4 grupos de atributos: aspecto, olor, textura, sabor y aroma; según figura en la ficha de cata oficial del Consejo Regulador del Queso Zamorano que se presenta a continuación (tabla M3).

Tabla M3. Ficha de cata empleada en el análisis sensorial del queso Zamorano.

Queso N°	Pésimo	Deficiente	Incorrecto	Correcto	Bueno	Muy Bueno	Excelente
ASPECTO							
Intensidad de color							
Tamaño de ojos							
Nª de ojos							
AROMA							
Láctico							
Fresco, limpio							
Plantas aromáticas							
Aceitoso, graso							
Frutos secos							
Vainilla							
Cera							
TEXTURA							
Elasticidad							
Friabilidad							
Adhesividad							
Granulosidad							
Solubilidad							
Dureza							
Mantecosidad							
Rugosidad							
Sequedad							
SABOR							
Salado							
Leche fresca							
Ácido							
Picante							
Dulzón							
Regusto y persistencia							

IMPRESIÓN GLOBAL (1-10)

OBSERVACIONES/DEFECTOS

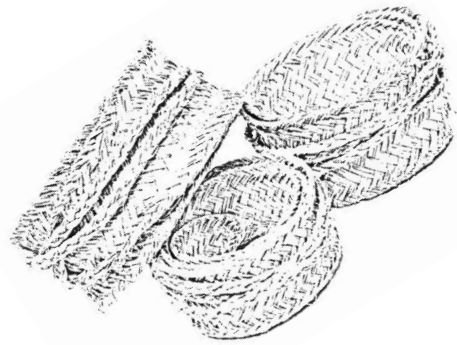
Paralelamente también se realizó una cata abierta al público con un número de catadores que osciló de 83 hasta 121. Se les solicitó que rellenaran una hoja de cata simplificada puntuando de 1 a 10 en la cual se evaluó: aspecto, olor, aroma/sabor, textura/sensaciones trigeminales de los quesos, llevando a cabo también una valoración global de los mismos. Para el análisis de estos datos se eliminaron los datos más extremos tanto superiores como inferiores.

Además, también se evaluaron los atributos de olor, textura y sabor de los quesos mediante una prueba de ordenamiento afectivo siguiendo la metodología explicada por Alarcon Hernandez (2005).

3.9 Análisis estadístico

Los análisis se realizaron al menos por duplicado. Las diferencias significativas se evaluaron para el tiempo de maduración realizando un análisis de varianza (ANOVA) mediante el test de Fisher LSD y pruebas de agrupamiento de datos mediante el análisis de componentes principales, utilizando el programa Statistica 7.0 (Tulsa, USA).

En el caso del análisis sensorial mediante pruebas afectivas de ordenamiento, el tratamiento de los datos se llevó a cabo mediante el test de Friedman.



4 Resultados y discusión

4.1 Cambios en el queso Zamorano durante la maduración

4.1.1 Análisis químicos y fisicoquímicos

En la tabla C1.1 se muestra la evolución seguida por el contenido de los diferentes parámetros composicionales a lo largo de la maduración del queso Zamorano.

Tabla C1.1. Cambios en los principales parámetros químicos y fisicoquímicos durante la maduración de los diferentes lotes de queso Zamorano.

	Días de maduración					
	1	60	120	180	240	300
ES	54,26 ± 1,98 ^a	63,88 ± 1,50 ^b	67,19 ± 1,52 ^c	70,19 ± 1,30 ^d	72,28 ± 1,26 ^e	73,65 ± 1,13 ^f
Grasa	54,52 ± 3,13 ^c	53,85 ± 2,47 ^{bc}	52,74 ± 3,01 ^b	49,48 ± 2,24 ^a	52,35 ± 2,43 ^b	54,93 ± 3,04 ^c
Proteína	20,99 ± 0,77 ^a	24,06 ± 0,88 ^b	25,14 ± 0,83 ^c	26,34 ± 0,73 ^d	27,09 ± 0,59 ^e	27,68 ± 1,47 ^f
Cloruros	0,14 ± 0,05 ^a	1,76 ± 0,08 ^b	1,80 ± 0,19 ^b	1,91 ± 0,20 ^c	1,94 ± 0,14 ^c	2,08 ± 0,17 ^d
S/H	0,31 ± 0,13 ^a	4,90 ± 0,29 ^b	5,49 ± 0,54 ^c	6,41 ± 0,74 ^d	7,00 ± 0,60 ^e	7,90 ± 0,77 ^f
Lactosa	1,45 ± 0,19 ^c	0,28 ± 0,20 ^b	0,08 ± 0,13 ^a	ND	ND	ND
pH	5,52 ± 0,13 ^b	5,35 ± 0,08 ^a	5,36 ± 0,08 ^a	5,37 ± 0,08 ^a	5,36 ± 0,09 ^a	5,38 ± 0,05 ^a
AT	1,46 ± 0,36 ^b	1,22 ± 0,06 ^a	1,57 ± 0,09 ^{bc}	1,64 ± 0,09 ^{cd}	1,62 ± 0,12 ^{cd}	1,71 ± 0,12 ^d
A _w	0,994 ± 0,002 ^f	0,956 ± 0,003 ^e	0,944 ± 0,004 ^d	0,935 ± 0,004 ^c	0,930 ± 0,004 ^b	0,917 ± 0,007 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados

Valores con distinto superíndice para un mismo parámetro fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función del tiempo de maduración. ND: No detectado

ES: extracto seco (g/100 g); grasa (g/100 g ES); proteína (g/100 g ES); cloruros (g NaCl/100 g); S/H: sal/humedad (%); Lactosa (g/100 g ES); pH; AT: Acidez titulable (g ac. láctico/100 g ES); A_w: actividad de agua

El contenido en extracto seco aumentó a lo largo de la maduración, mientras que los de proteína y grasa, expresada como extracto seco, permanecieron constantes desde el inicio hasta el final de la misma. La cantidad de sal, expresada como g de cloruro sódico por 100 g de queso, se incrementó de manera significativa ($p \leq 0,05$) durante los primeros dos meses de maduración, manteniéndose a partir de este momento estable alcanzando unos valores medios finales al cabo de 10 meses de 2,08 g de NaCl/100 g. El aumento del contenido en sal fue debido en gran medida al proceso de deshidratación sufrido por el queso como consecuencia de fenómenos osmóticos y de difusión originados por el salado en salmuera unido a la pérdida de humedad derivada de la localización de los quesos en cámaras de oreado, en primer lugar, y de maduración, después, con humedades relativas bajas. Estos valores fueron similares a los descritos por otros autores para otros quesos del mismo tipo como el Manchego (Pavia et al., 2000) y también en estudios previos con queso Zamorano (Ferrazza et al., 2004). Dado el alto contenido en extracto seco de los quesos, la relación sal/humedad fue incrementándose de manera significativa ($p \leq 0,05$) durante la maduración. Los valores entre los 6 y 10 meses de maduración se mantuvieron en el rango de 6-8%. A estas concentraciones muchos de los procesos bioquímicos se ven comprometidos. Así a un 6% y un 8% de sal/humedad, el 30%

de la α 1-caseína y el 80% β -caseína, y el 60% de la α 1-caseína y el 95% β -caseína, respectivamente, permanecieron sin hidrolizar (Lawrence et al., 1987). La sal afecta a la hidratación de la caseína y, por lo tanto, afecta la capacidad de retención de agua del gel de caseína. La adición de sal al queso produce, de manera general, una mayor hidratación de las proteínas. Sin embargo, a concentraciones elevadas, se asocia con una disminución en la hidratación de caseína; por lo tanto, el aumento en la concentración de sal hace que la matriz del queso se vuelva más firme y rígida (Bae et al., 2017). Además, el contenido en sal afecta al crecimiento de microorganismos patógenos y a la actividad de los cultivos iniciadores en el queso (Ayyash et al., 2013). Así los cultivos iniciadores presentan diferente sensibilidad a la sal, pero en general a bajas concentraciones de sal se estimula su crecimiento y a elevadas concentraciones se inhibe tanto de bacterias potencialmente indeseables como el de los iniciadores (Ardö et al., 2014).

El contenido en lactosa no fue detectado a partir de los 120 días de maduración. Los valores de acidez titulable siguieron una evolución inversa a la lactosa, aumentando su contenido durante los primeros 4 meses de maduración, permaneciendo posteriormente prácticamente constantes (1,60-1,70 g ácido láctico/100 g ES). En el caso del pH, los valores experimentaron un descenso hasta los 60 días, no observándose cambios significativos en los mismos el resto de la maduración, siéndolos valores medios finales de aproximadamente 5,35.

Estos resultados fueron similares a los descritos por otros autores para quesos de oveja (Cabezas et al., 2007; Farahani et al., 2014; Ferrazza et al., 2004). El queso Zamorano presentó unos altos contenidos en materia grasa, los cuales llevan a clasificarlo como una variedad grasa. Este alto contenido está relacionado con el alto contenido de grasa de la leche de oveja Churra utilizada en su elaboración, así como la falta de estandarización de la misma. Dado el alto contenido en extracto seco del queso Zamorano, derivado del intenso desuerado aplicado a la cuajada, la presencia de grasa en alta concentración, contribuirá a relajar la matriz de caseína, aportando elasticidad y cremosidad al queso. El intenso desuerado conjuntamente con la actividad de la microbiota aportada en el cultivo iniciador contribuyeron a la rápida metabolización de la lactosa durante los primeros dos meses de maduración, lo que se tradujo en la reducción significativa del pH. La ausencia posterior de lactosa unida a la capacidad tampón de la masa del queso contribuyeron posteriormente a que los valores de pH se mantuvieran invariables durante el resto de la maduración.

La evolución de los parámetros químicos y fisicoquímicos está correlacionada con la que experimentan las principales poblaciones microbianas, ya que no debemos olvidar que el queso constituye un complejo ecosistema que comprende una diversidad de especies que intentan adaptarse a las condiciones que imperan en cada momento, contribuyendo a su vez a los cambios que operan en el queso. En nuestro estudio consideramos que los principales parámetros que influyeron en la actividad microbiana y enzimática durante la maduración del

queso Zamorano serán la actividad del agua (con valores inferiores a 0,953 a partir de los 6 meses) pero sobre todo la concentración sal/humedad al regular los recuentos de las bacterias acidolácticas presentes y el tipo de microbiota dominante y, con ello, las características finales del queso.

4.1.2 Análisis microbiológicos

En la tabla C1.2 se muestra la evolución de los recuentos obtenidos en PCA para la microbiota aerobia mesófila, en agar MRS para bacterias lácticas, en general, y en medio VRBGA para las enterobacteriáceas.

Tabla C1.2. Cambios en los recuentos de las poblaciones microbianas durante la maduración del queso Zamorano.

	Días de maduración					
	1	60	120	180	240	300
PCA	8,94 ± 0,38 ^c	8,48 ± 0,42 ^c	7,54 ± 1,07 ^b	6,85 ± 1,49 ^a	6,89 ± 1,16 ^{ab}	6,67 ± 1,31 ^a
MRS	8,99 ± 0,33 ^c	8,54 ± 0,34 ^c	7,56 ± 1,11 ^b	6,56 ± 1,98 ^a	6,50 ± 2,12 ^a	6,59 ± 1,77 ^a
VRBGA	3,28 ± 1,87 ^c	1,14 ± 1,19 ^b	0,17 ± 0,52 ^a	ND	ND	ND

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (expresados en log ufc/g)

Valores con distinto superíndice para un mismo parámetro fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función del tiempo de maduración. ND: No detectado.

Los recuentos en PCA fueron un reflejo de la evolución que experimentó la microbiota láctica en MRS, al constituir este grupo la microbiota dominante del queso durante la elaboración y maduración. En el queso con un día de maduración, los recuentos en PCA y MRS fueron de prácticamente 9 (log ufc/g), consecuencia tanto del efecto de la multiplicación microbiana como de la concentración de la misma por la retención física que tiene lugar durante la etapa de coagulación. Los recuentos en PCA y agar MRS mantuvieron valores entre 9 y 8,5 (log ufc/g) durante los dos primeros meses de maduración, disminuyendo en una log ufc/g hasta los 4 meses de maduración. A partir de este momento, los recuentos se mantuvieron con valores en torno a 6,7-6,9 para PCA y 6,5-6,6 para agar MRS hasta el final de la maduración. Los recuentos obtenidos en las primeras etapas de la maduración y el descenso observado entre los 4 y los 6 meses de maduración es un fenómeno que ha sido ya descrito por otros autores con quesos similares como el Manchego (Poveda et al., 2003). Este descenso estaría relacionado con el establecimiento en el queso de condiciones más restrictivas de acidez, actividad del agua y concentración salina, descritas en el apartado anterior, las cuales limitan la diversidad microbiana y ejercen un efecto selectivo sobre las poblaciones microbianas a favor de aquéllas más ácido tolerantes y resistentes a concentraciones más altas de sal/humedad. Estos aspectos junto con la competencia ejercida por las bacterias lácticas contribuyeron a inhibir la población de enterobacteriáceas, las cuales no fueron detectadas a partir de los cuatro meses de maduración. Como fue señalado en el apartado anterior, a partir

de los dos meses se produjo un incremento de la acidez titulable y el contenido en sal/humedad, además un descenso significativo de la A_w restringiendo el crecimiento microbiano. Este hecho resultó positivo desde el punto de vista higiénico-sanitario al inhibir el desarrollo de enterobacteriáceas, pero a su vez también provocó una reducción de los recuentos en PCA y MRS en 2 log ufc/g, limitando su participación en los procesos bioquímicos desarrollados a lo largo de la maduración del queso Zamorano.

4.1.3 Análisis de los parámetros proteolíticos

4.1.3.1 Fracciones Nitrogenadas

La tabla C1.3 muestra la evolución seguida por las diferentes fracciones nitrogenadas analizadas a lo largo de la maduración del queso Zamorano: nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH4,6), nitrógeno polipeptídico, nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (NS-TCA12%), nitrógeno peptídico y nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (NS-PTA5%).

Tabla C1.3. Cambios en las fracciones nitrogenadas durante la maduración del queso Zamorano.

	Días de maduración					
	1	60	120	180	240	300
NS-pH4,6	5,73 ± 0,60 ^a	15,47 ± 0,98 ^b	17,46 ± 1,36 ^c	21,73 ± 1,90 ^d	20,21 ± 1,33 ^e	21,35 ± 1,95 ^e
NS-TCA12%	1,30 ± 0,12 ^a	5,00 ± 0,30 ^b	6,13 ± 0,39 ^c	7,81 ± 0,47 ^d	7,60 ± 0,53 ^d	8,19 ± 0,93 ^e
NS-PTA5%	0,62 ± 0,06 ^a	1,19 ± 0,24 ^b	1,68 ± 0,53 ^c	2,20 ± 0,75 ^d	2,19 ± 0,76 ^d	2,51 ± 0,96 ^d
Npp	4,43 ± 0,52 ^a	10,47 ± 0,74 ^b	11,60 ± 0,80 ^c	12,64 ± 0,72 ^d	12,61 ± 0,80 ^d	13,27 ± 0,99 ^e
Np	0,67 ± 0,08 ^a	3,80 ± 0,39 ^b	4,39 ± 0,44 ^c	5,11 ± 0,50 ^d	5,50 ± 0,63 ^e	5,71 ± 0,49 ^e

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados

Valores con distinto superíndice para un mismo parámetro fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función del tiempo de maduración.

NS-pH4,6: nitrógeno soluble a pH 4,6; NS-TCA12%: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12%; NS-PTA5%: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%; Npp: nitrógeno polipeptídico; Np: nitrógeno peptídico.

Valores expresados como % de cada una de las fracciones/nitrógeno total.

Como puede observarse se produjo un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de todas las fracciones nitrogenadas estudiadas. El contenido en NS-pH4,6, expresado como % del NT, se cuadruplicó durante los primeros 6 meses de maduración, para posteriormente mantenerse sin cambios en unos valores medios de aproximadamente un 22%. De igual manera, el porcentaje de NS-TCA12%, expresado como NT, siguió una tendencia similar, si bien en este caso los valores medios finales oscilaron entre 7-9%. Estos valores fueron indicativos de una moderada proteólisis primaria en el queso Zamorano estudiado, así como de una más limitada profundidad, ya que los valores de NS-TCA12% representaron, por lo general, aproximadamente un 30-40% del NS-pH4,6. Estos resultados vinieron corroborados por la evolución seguida por la fracción del nitrógeno polipeptídico, cuyos valores fueron incrementándose durante toda la maduración, llegando a ser la segunda fracción nitrogenada

en importancia desde el punto de vista cuantitativo, representando del orden del 60% del NS-pH_{4,6} y casi duplicando el NS-TCA_{12%}. Estos resultados implicaron una mayor participación en la proteólisis del queso Zamorano de las enzimas coagulantes y de las proteinasas liberadas por la microbiota presente, frente a las peptidasas y aminopeptidasas microbianas. Tanto el nitrógeno peptídico como el NS-PTA_{5%}, expresados como %NT, fueron los que presentaron los valores más bajos de todas las fracciones nitrogenadas, oscilando los valores medios finales en torno al 5% y 2-3%, respectivamente. La actividad aminopeptidasa, medida como % NS-PTA_{5%}, únicamente representaba el 20-25% del NS-TCA_{12%}, correspondiendo el 75-80% restante a la actividad peptidasa.

Nuestros resultados fueron similares o menores o mayores a los descritos por otros autores para el queso Manchego a los 60 días de maduración (Ballesteros et al., 2006), pero ligeramente inferiores a los resultados obtenidos por (Pavia et al., 2000); también similares a los obtenidos en queso Idiazábal a los 180 días de maduración (Mendia et al., 2000) siendo ligeramente inferiores, en nuestro caso, los valores de NS-TCA_{12%}. Tanto la moderada extensión como sobre todo la escasa profundidad determinada en el queso Zamorano eran explicadas por la reducida actividad enzimática microbiana debido a las difíciles condiciones ambientales reinantes en la masa del queso caracterizadas por una baja actividad del agua y una alta relación de sal/humedad, las cuales fueron más marcadas a partir de los 180 días de maduración.

4.1.3.2 Caseínas y sus productos de degradación

En la figura C1.1 se muestra un electroferograma del queso Zamorano DOP donde se puede observar la evolución tanto de las caseínas (α_s - y β -cn) como de sus productos de degradación (γ -cn y pre α_s -cn). Así mismo, en la tabla C1.4 se presenta la evolución seguida por las proporciones medias relativas de las caseínas y sus productos de degradación, expresadas como porcentaje de la densidad óptica total, durante la maduración del queso Zamorano.

El queso Zamorano se caracterizó por presentar una moderada degradación de los dos principales tipos de caseína (α_s -cn y β -cn), hecho que ya fue corroborado en el apartado anterior al estudiar las fracciones nitrogenadas. En todas las fracciones de caseína se produjeron cambios significativos en sus proporciones durante la maduración, siendo más acusadas en la α_s -cn y pre α_s -cn.

Tabla C1.4. Cambios de las caseínas y sus productos de hidrólisis, expresados como % de la densidad óptica total, durante la maduración del queso Zamorano.

	Días de maduración					
	1	60	120	180	240	300
γ-a	4,05 ± 1,00 ^c	4,43 ± 0,74 ^{cd}	3,22 ± 0,37 ^b	2,37 ± 0,33 ^a	4,94 ± 1,31 ^d	4,76 ± 1,28 ^d
γ-b	3,48 ± 0,78 ^{ab}	3,91 ± 0,37 ^{bc}	4,48 ± 0,51 ^c	3,15 ± 0,50 ^a	6,73 ± 1,45 ^d	6,04 ± 1,95 ^d
γ-c	2,57 ± 0,51 ^{ab}	2,96 ± 0,55 ^{bc}	2,46 ± 0,30 ^a	5,02 ± 0,82 ^e	3,19 ± 0,73 ^c	3,76 ± 1,38 ^d
β-cn	41,46 ± 2,13 ^c	46,08 ± 2,79 ^d	37,79 ± 2,14 ^b	39,14 ± 2,18 ^b	31,16 ± 3,63 ^a	30,41 ± 2,18 ^a
α_s-cn	45,04 ± 3,57 ^b	27,36 ± 2,36 ^a	28,31 ± 1,87 ^a	28,32 ± 1,83 ^a	27,28 ± 3,25 ^a	28,25 ± 2,65 ^a
preα_s-cn	3,39 ± 3,24 ^a	15,27 ± 1,76 ^b	23,75 ± 1,58 ^c	22,00 ± 1,70 ^d	26,70 ± 1,21 ^e	26,79 ± 2,02 ^e

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para cada caseína y sus productos de degradación fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función del tiempo de maduración.

Los valores de la fracción α _s-cn se redujeron en un 50% durante los dos primeros meses de maduración, permaneciendo posteriormente constantes hasta el final de la misma. De esta manera se produjo un incremento significativo de los productos de su degradación (fracción pre α _s-cn). Dicho incremento fue más acusado durante los primeros 4 meses de maduración, manteniéndose prácticamente invariable hasta los 300 días. Dentro de la fracción pre α _s-cn, las bandas más oscuras cercanas a la α _s-cn se corresponden con la fracción α _{s1}-cn, la cual se trata de polipéptidos insolubles derivados de la hidrólisis de la α _s-cn por la quimosina (Exterkate et al., 1995) y también, aunque en menor medida, de las proteinasas extracelulares de las bacterias acidolácticas presentes en el queso (Di Cagno et al., 2006). Algunos autores han señalado que en la hidrólisis de la α _s-cn podría jugar un papel importante también la proteinasa ácida o catepsina D (Hurley et al., 2000); sin embargo, no consideramos que fuera muy importante en el queso Zamorano, ya que su pH está ligeramente alejado del óptimo de acción de esta proteinasa ácida y además, mayoritariamente es solubilizada en el suero y se elimina durante el desuerado, a diferencia de la enzima coagulante, que puede retenerse en la matriz de la cuajada hasta en un 15%.

En el caso de la fracción de β -cn, se produjo una hidrólisis significativa durante la maduración, si bien fue mucho menor que en la fracción α _s-cn, resultando ser de aproximadamente un 35%. Este comportamiento es muy similar al descrito por otros autores para otras variedades de queso con la excepción de las de pasta cocida, donde el tratamiento térmico aplicado a la cuajada durante el desuerado contribuye a activar la proteasa alcalina de la leche, resultando en un mayor grado de hidrólisis de la β -cn (Choi et al., 2006; Gorostiza et al., 2004). La β -cn constituye el sustrato principal de la proteasa alcalina o plasmina, dirigiéndose su acción en tres localizaciones: Lys28-Lys29, Lys105-His106 y Lys107-Glu108 originando 3 polipéptidos denominados γ 1-cn, γ 2-cn y γ 3-cn, respectivamente (Bastian and Brown, 1996; Fox et al., 2015). Los porcentajes de la fracción γ -cn en el queso Zamorano se

incrementaron significativamente durante la maduración, siendo al cabo de 300 días de aproximadamente un 35%.

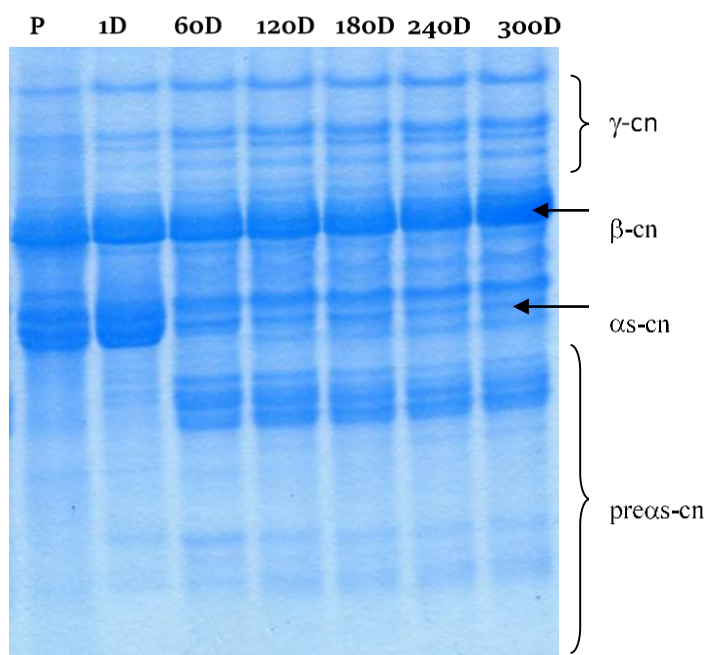


Figura C1.1. Electroferograma típico del queso Zamorano a lo largo de la maduración.

Nuestros resultados pusieron de manifiesto que en el queso Zamorano, la proteólisis primaria fue más importante que la secundaria, hecho que ya había sido corroborado durante el fraccionamiento químico del nitrógeno, donde el nitrógeno polipeptídico resultó ser una de las fracciones más abundantes durante toda la maduración. Este nitrógeno polipeptídico se corresponde con las fracciones de γ -cn y $\text{pre}\alpha_s$ -cn, las cuales son insolubles y pueden ser cuantificadas mediante electroforesis. Los valores de pH reinantes en el queso Zamorano estaban más próximos al rango de actividad óptima de las enzimas coagulantes, pero más alejados del de la plasmina (en torno a pH 7,5), explicando la mayor degradación de la fracción α_s -cn. No obstante, la baja actividad del agua y, sobre todo, la alta relación sal/humedad fueron los parámetros responsables de la moderada proteólisis primaria del queso Zamorano, estando muy limitada a partir de los 180 días de maduración. Durante los primeros 4 meses de maduración, la fuerza iónica en el queso favorecía la interacción entre las enzimas y caseínas. Sin embargo, a partir de ese momento, la relación sal/humedad se incrementó por encima del 6%, provocando una insolubilización de las caseínas y una mayor interacción entre las mismas, lo que dificultaba el acceso de las proteinasas al centro activo y, con ello, una reducción de la proteólisis (Exterkate et al., 1997).

4.1.3.3 Perfil de péptidos

La tabla C1.5 presenta las áreas relativas de las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas de los cromatogramas a partir de los permeados del extracto soluble analizados a lo largo de la

maduración del queso Zamorano. La zona 1 se corresponde con la fracción de péptidos hidrofílicos, mientras que la zona 3 incluye los péptidos de carácter hidrofóbico. La zona 2 se corresponde con los péptidos de hidrofobicidad intermedia.

Tabla C1.5. Áreas relativas de las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas de los cromatogramas a partir de los permeados del extracto soluble a lo largo de la maduración del queso Zamorano.

	Días de maduración					
	1	60	120	180	240	300
Zona 1	0,26 ± 0,06 ^a	0,24 ± 0,07 ^a	0,29 ± 0,08 ^{ab}	0,36 ± 0,12 ^{bc}	0,41 ± 0,16 ^c	0,42 ± 0,15 ^c
Zona 2	0,25 ± 0,05 ^a	0,37 ± 0,03 ^d	0,38 ± 0,04 ^d	0,35 ± 0,03 ^c	0,32 ± 0,06 ^{bc}	0,32 ± 0,04 ^b
Zona 3	0,49 ± 0,07 ^d	0,39 ± 0,09 ^c	0,33 ± 0,10 ^{bc}	0,30 ± 0,11 ^{ab}	0,25 ± 0,11 ^{ab}	0,27 ± 0,12 ^a
Hfob /Hfil	5,95 ± 3,52 ^{bc}	7,26 ± 4,01 ^c	4,92 ± 2,17 ^{ab}	4,23 ± 1,97 ^{ab}	3,48 ± 2,10 ^a	3,46 ± 1,94 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para cada zona fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante la maduración.

Zona 1: péptidos hidrofílicos; Zona 2: péptidos de hidrofobicidad intermedia; Zona 3: péptidos hidrofóbicos; Hfob/Hfil: relación de péptidos hidrofóbicos respecto a hidrofílicos.

El incremento experimentado por los péptidos de la zona 1, que incluye a los péptidos hidrofílicos, fue significativo hasta los 6 meses de maduración, manteniéndose constante hasta el final de la misma donde se alcanzaron valores medios finales de 0,42. De manera inversa, la zona correspondiente a los péptidos hidrofóbicos (zona 3) experimentó un descenso significativo ($p \leq 0,05$) en los primeros 180 días, estabilizándose a partir de ese momento, donde representaron casi la mitad del porcentaje de los péptidos hidrofílicos. Pavia et al. (2000) también encontraron unos resultados análogos con un aumento de los péptidos hidrofílicos en el periodo que estudiaron (90 días) mientras que para los péptidos hidrofóbicos encontraron un aumento hasta 60 días, para posteriormente incrementarse de manera moderada, siendo el tiempo de maduración un factor significativo que afecta a la evolución de péptidos.

La relación entre los péptidos hidrofóbicos respecto a los hidrofílicos, mostró un aumento hasta los 60 días de maduración. Este aumento estuvo influenciado por el incremento de los péptidos de la zona 2 o de hidrofobicidad intermedia, para luego ir disminuyendo con el paso del tiempo hasta alcanzar los menores valores a partir de los 240 días de maduración. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mallatou et al. (2004) en queso de oveja, siendo muy similares también a los descritos por (Picon et al., 1994) para el queso Manchego, a pesar de que nuestra relación de péptidos hidrofóbicos/hidrofílicos fue mayor que la obtenida por estos autores. Durante la maduración del queso, deben facilitarse las condiciones para que la proteólisis se desarrolle de manera óptima con el fin de reducir el contenido en péptidos hidrofóbicos, dado que su acumulación por encima de determinados niveles ha sido relacionada por algunos autores (Lemieux y Simard, 1992) con el desarrollo de sabores amargos indeseables en el queso, limitando su calidad. Hay que tener en cuenta que las caseínas de la leche presentan un abundante contenido en aminoácidos hidrofóbicos, los cuales

forman parte de péptidos derivados de la acción hidrolítica de la enzima coagulante y proteinasas microbianas sobre la α_s -cn y β -cn.

La cantidad de péptidos en la fracción nitrogenada del NS-pH4,6 al inicio de la maduración fue relativamente baja, aumentando de forma significativa a lo largo de la misma. Se pudo establecer una analogía entre la cantidad de péptidos y el tiempo de maduración, de modo similar al establecido por Sforza et al. (2012). También se detectó un incremento del número de picos de los cromatogramas a lo largo del tiempo de maduración (Figura C1.2), aumentando por consiguiente la posibilidad de encontrar péptidos biofuncionales (Öztürk y Akin, 2018).

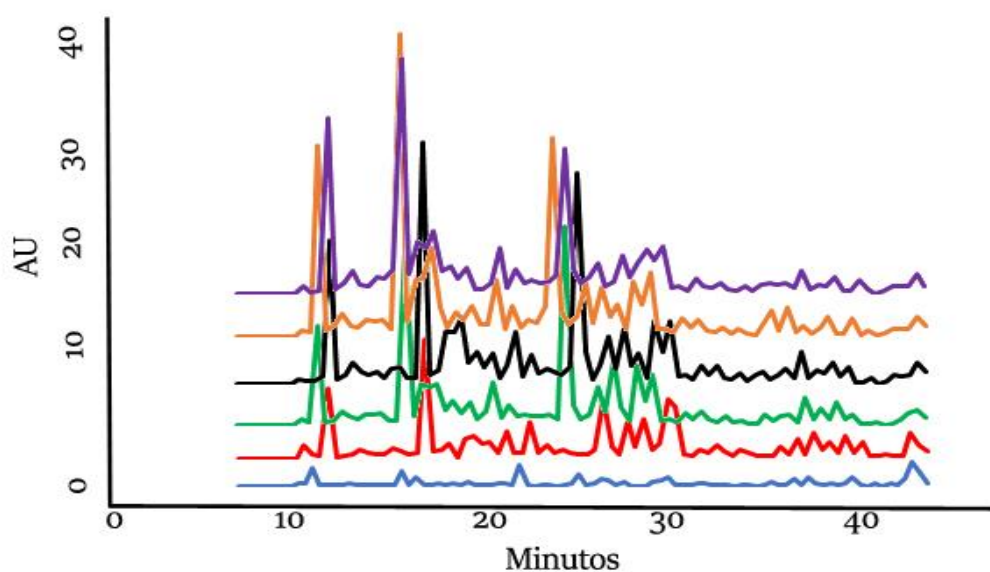


Figura C1.2. Evolución del perfil peptídico a lo largo de la maduración. Líneas de color azul, rojo, verde, negro, naranja y morado para 1, 60, 120, 180, 240 y 300 días de maduración, respectivamente. Zona 1: 13-22 minutos; zona 2: 22-30 minutos; zona 3: 30-45 minutos.

4.1.3.4 Aminoácidos libres

La tabla C1.6 muestra la evolución seguida por el contenido medio de cada uno de los aminoácidos libres analizados en el queso Zamorano a lo largo de la maduración.

El contenido medio de cada aminoácido libre se incrementó de forma significativa ($p \leq 0,05$) con el transcurso de la maduración, alcanzando los máximos valores entre los 240 y 300 días. Los aminoácidos mayoritarios fueron la suma de Gln+Gly, Leu, Glu, Val y Lys, respectivamente, representando aproximadamente el 64% de la cantidad total de aminoácidos al final de la maduración. Estos resultados fueron similares a los descritos por otros autores (Diana et al., 2014; Poveda et al., 2004). A los 180 días de maduración, la cantidad total media de aminoácidos fue de 3338 mg/100 g de queso, siendo la misma, superior a los 2394 mg/kg obtenidos por Poveda et al. (2004) para queso Manchego con un tiempo de tiempo de maduración 150 días. De igual manera, el contenido medio en aminoácidos libres en el queso

Zamorano al término de la maduración fue de 4462 mg/100 g de queso, resultando ser mayores que los descritos por Diana et al. (2014), que en un trabajo llevado a cabo con 16 quesos de oveja obtuvieron unos valores mínimos de 465 mg/100 g y máximos de 4148 mg/100 g.

Tabla C1.6. Cambios en el contenido en aminoácidos libres durante la maduración del queso Zamorano.

	Días de maduración					
	1	60	120	180	240	300
Asp	8,22 ± 2,73 ^a	23,62 ± 14,59 ^a	43,58 ± 33,24 ^a	84,60 ± 68,60 ^b	111,08 ± 90,71 ^b	116,79 ± 92,84 ^b
Glu	37,66 ± 10,14 ^a	95,49 ± 69,93 ^a	189,61 ± 121,15 ^a	426,66 ± 378,34 ^b	616,92 ± 514,57 ^b	632,12 ± 546,03 ^b
Asn	12,38 ± 7,23 ^a	40,41 ± 30,57 ^{ab}	95,38 ± 64,11 ^{bc}	172,44 ± 133,58 ^{cd}	231,98 ± 177,09 ^d	238,64 ± 188,49 ^d
Ser	11,62 ± 4,68 ^a	25,49 ± 12,14 ^{ab}	39,39 ± 18,78 ^b	68,27 ± 42,16 ^c	87,18 ± 53,72 ^{cd}	100,80 ± 63,52 ^d
Gln+Gly	65,92 ± 83,00 ^a	204,76 ± 139,80 ^b	480,72 ± 339,69 ^c	733,47 ± 459,63 ^{cd}	927,79 ± 566,10 ^d	965,22 ± 598,43 ^d
His	13,84 ± 2,00 ^a	20,66 ± 5,13 ^{ab}	26,85 ± 7,64 ^b	42,58 ± 13,71 ^c	53,89 ± 23,31 ^d	61,16 ± 29,74 ^d
Cit	3,70 ± 1,89 ^a	13,89 ± 5,43 ^b	21,59 ± 7,70 ^b	36,43 ± 15,54 ^c	45,60 ± 19,70 ^{cd}	50,47 ± 22,87 ^d
Tau	16,87 ± 21,39 ^a	40,86 ± 55,68 ^{ab}	55,57 ± 66,10 ^{abc}	77,17 ± 101,79 ^{bc}	80,84 ± 105,54 ^{bc}	94,97 ± 118,00 ^c
Gaba	3,47 ± 4,28 ^a	15,42 ± 14,32 ^{ab}	44,74 ± 57,44 ^{bc}	52,25 ± 62,95 ^c	54,99 ± 68,68 ^c	58,73 ± 69,29 ^c
Arg+Thr	21,08 ± 9,01 ^a	54,33 ± 22,83 ^{ab}	82,00 ± 42,51 ^b	123,52 ± 62,61 ^c	151,96 ± 76,63 ^c	156,55 ± 74,68 ^c
Ala	9,92 ± 7,08 ^a	32,10 ± 15,15 ^{ab}	50,57 ± 28,00 ^b	80,51 ± 49,66 ^c	104,85 ± 65,85 ^{cd}	112,72 ± 71,58 ^d
Pro	12,49 ± 4,37 ^a	19,20 ± 3,60 ^{ab}	29,70 ± 16,89 ^{bc}	45,23 ± 28,24 ^{cd}	61,76 ± 43,81 ^{de}	65,52 ± 38,05 ^e
Tyr	7,47 ± 4,45 ^a	21,69 ± 14,37 ^a	31,47 ± 18,86 ^{ab}	54,80 ± 41,53 ^{bc}	76,06 ± 52,54 ^{cd}	82,27 ± 62,35 ^d
Val	23,42 ± 23,92 ^a	91,52 ± 61,24 ^{ab}	167,06 ± 98,34 ^{bc}	234,98 ± 157,22 ^{cd}	296,85 ± 191,24 ^d	299,49 ± 192,71 ^d
Met	3,30 ± 3,62 ^a	13,28 ± 10,15 ^{ab}	27,39 ± 18,16 ^{bc}	46,02 ± 32,91 ^{cd}	62,53 ± 42,52 ^{de}	68,67 ± 47,23 ^e
Cys	4,96 ± 3,38 ^a	8,78 ± 6,41 ^{ab}	13,76 ± 9,61 ^b	20,55 ± 11,32 ^c	22,31 ± 15,31 ^c	22,18 ± 12,97 ^c
Ile	4,33 ± 4,55 ^a	19,83 ± 13,85 ^{ab}	35,28 ± 22,92 ^{bc}	58,79 ± 45,07 ^{cd}	84,30 ± 61,01 ^{de}	87,73 ± 63,06 ^e
Leu	33,55 ± 38,03 ^a	156,52 ± 95,04 ^{ab}	274,17 ± 135,95 ^b	432,05 ± 263,35 ^c	514,45 ± 302,13 ^{cd}	581,19 ± 334,71 ^d
Phe	14,66 ± 11,75 ^a	52,31 ± 24,23 ^b	78,20 ± 25,87 ^c	106,32 ± 47,46 ^d	127,78 ± 55,09 ^d	125,80 ± 55,19 ^d
Trp	7,99 ± 3,44 ^a	46,39 ± 18,20 ^b	63,98 ± 22,45 ^c	82,32 ± 17,86 ^d	94,76 ± 24,38 ^d	110,75 ± 34,36 ^e
Orn	4,33 ± 4,64 ^a	18,98 ± 22,83 ^{ab}	24,36 ± 27,21 ^{abc}	34,15 ± 34,17 ^{bc}	33,94 ± 38,30 ^{bc}	43,66 ± 50,62 ^c
Lys	25,37 ± 10,25 ^a	69,86 ± 30,11 ^{ab}	124,72 ± 61,69 ^b	234,58 ± 155,11 ^c	319,54 ± 192,66 ^{cd}	342,71 ± 234,80 ^d

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para cada aminoácido (mg/100 g de queso) fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante la maduración.

El incremento del contenido en aminoácidos libres, tanto individual como globalmente, no fue gradual durante toda la maduración, observándose dos tendencias. La primera de ellas se corresponde con los primeros 6 meses de maduración, donde el contenido de aminoácidos libres aumentó del orden de nueve veces con respecto a los quesos de 1 día, mientras que, en la segunda tendencia, que va desde los 6 a los 10 meses, dicho incremento apenas fue de 1,3-1,4 veces. Este comportamiento, como era de esperar, fue muy similar al

seguido por el NS-PTA5%, dado que es esta fracción nitrogenada está integrada principalmente por los aminoácidos libres liberados durante la proteólisis. Los bajos valores de A_w , así como la elevada relación de sal/humedad establecidas en la matriz del queso a partir de los 180 días contribuyeron a limitar la actividad aminopeptidasa microbiana al ejercer un efecto desnaturante de las enzimas. Existe una alta correlación entre el contenido en aminoácidos libres y otros parámetros fisicoquímicos y bioquímicos estudiados, así pudimos comprobar que se establecía una alta correlación positiva entre el contenido en aminoácidos libres con la A_w y con el ES (con valores de +0,6). También con las fracciones nitrogenadas en alta medida, principalmente, como era de esperar, con el NS-PTA5% (+0,75). Del mismo modo, también se establecieron correlaciones positivas con el contenido en péptidos hidrofílicos (+0,7) y negativas con los péptidos hidrofóbicos (-0,7).

Con el fin de estudiar más en profundidad los diferentes aminoácidos libres a lo largo de la maduración, se aplicó un análisis de componentes principales. En este análisis, el porcentaje de la varianza acumulada con 2 componentes principales (CP) o factores, explicaba el 85% de la variación observada en el contenido de aminoácidos durante la maduración. La

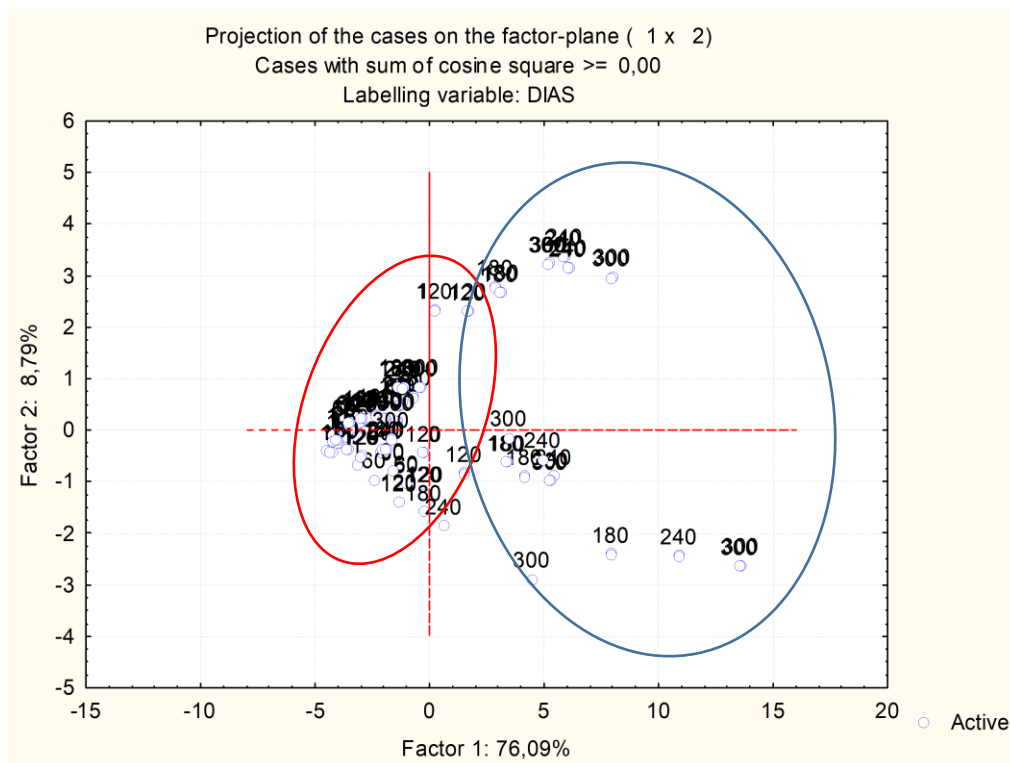


Figura C1.3. Análisis de componentes principales para el estudio de aminoácidos libres en el queso Zamorano a lo largo de la maduración.

figura C1.3 muestra cómo los datos correspondientes a todos los aminoácidos se aglutinaron entre el día 1 y el día 120 y posteriormente entre el día 180 y el final de la maduración. A medida que avanzaba la maduración, se incrementó el efecto ejercido por el PC 1. Como puede observarse en la figura C1.4, que representa la proyección de las variables, el PC 1 mostró una

elevada correlación con la mayor parte de los aminoácidos libres, al igual que fue descrito en el queso Manchego por Poveda et al. (2004), mientras que el PC 2 presentó una buena correlación, concretamente, con un aminoácido, el GABA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Diana et al. (2014). Este aminoácido, aunque de cantidad minoritaria, presenta una gran importancia por sus propiedades bioactivas, ya que, entre otras funciones, se le atribuye un efecto en la reducción de la presión arterial (Pouliot-Mathieu et al., 2013). En nuestro estudio la cantidad media de GABA al final de la maduración (58 mg/100 g de queso) fue superior al valor medio descrito por Diana et al. (2014) para otros quesos de oveja españoles (40 mg/100 g de queso).

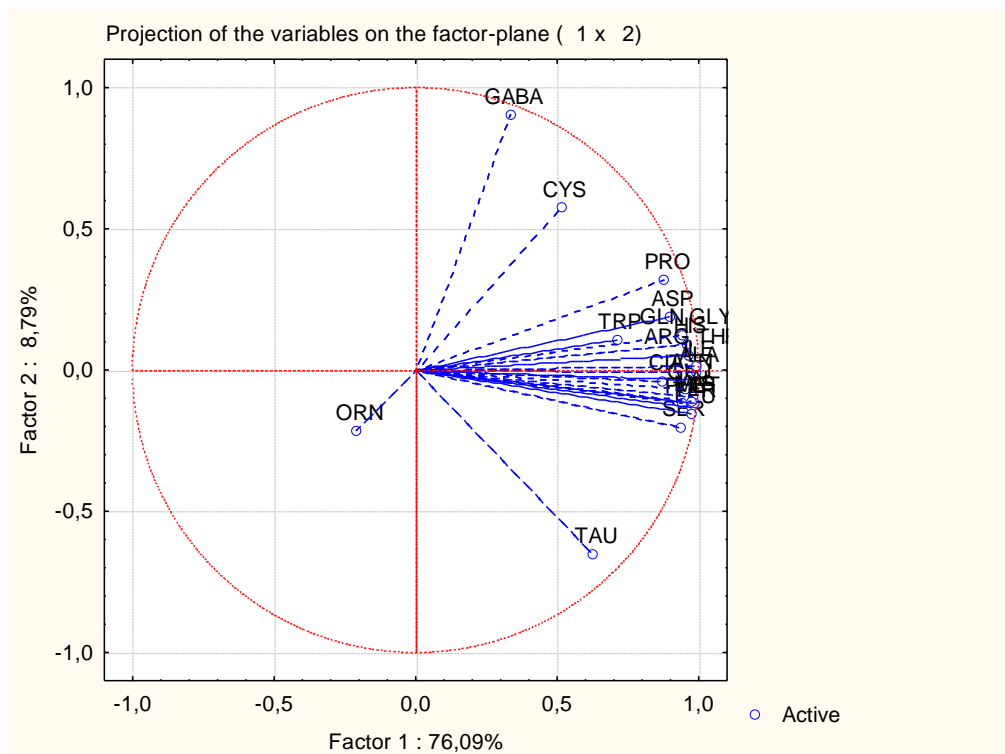


Figura C1.4. Análisis de componentes principales para el estudio de aminoácidos libres en el queso Zamorano a lo largo de la maduración mediante la representación de las

4.1.3.5 Aminas biógenas

La evolución del contenido en aminas biógenas durante la maduración del queso Zamorano se muestra en la tabla C1.7. Todas las aminas biógenas estudiadas presentaron un incremento gradual, de aproximadamente siete veces, hasta el final de la maduración, pasando de 56,19 mg/kg en los quesos de un día a 409,02 mg/kg en los quesos de diez meses. Esta evolución fue similar a la descrita por otros autores para quesos de pasta prensada (Ordóñez et al., 1997; Pinho et al., 2001; Schneller et al., 1997). No obstante, el contenido total de aminas biógenas del queso Zamorano fue inferior al descrito para el queso Pecorino (Lanciotti et al., 2007; Schirone et al., 2011), queso Toma (Gennaro et al., 2003) o queso Terrincho (Pintado et al., 2008).

En cuanto al perfil de aminas biógenas, la feniletilamina, putrescina, espermina y tiramina resultaron ser las mayoritarias en el queso Zamorano con un periodo de maduración entre los seis y diez meses, tiempo óptimo para el consumo de esta variedad. Este perfil fue muy similar al descrito por Pintado et al. (2008) para el queso Terrincho, aunque en nuestro estudio el contenido en cadaverina fue mucho más bajo.

Resultó llamativo el bajo contenido en histamina del queso Zamorano a lo largo de la maduración, el cual no superó los 40 mg/kg. Esta amina biógena es una de las más problemáticas al estar asociada con brotes de intoxicación, siendo utilizada como un indicador de calidad higiénico-sanitaria de los alimentos. Teniendo en cuenta el contenido de histamina y tiramina detectado en queso Zamorano, un consumo moderado del mismo hasta un tiempo de maduración de 240 días puede considerarse seguro de acuerdo con las recomendaciones de (Novella-Rodríguez et al., 2003).

El contenido en poliaminas (espermina y espermidina) en el queso Zamorano fue mayor que el descrito por Novella-Rodríguez et al. (2003) y Komprda et al. (2008) para otros quesos de pasta prensada madurados. Estas aminas no proceden de procesos descarboxilativos y su presencia en el queso se debe a la leche utilizada en su elaboración, aumentando su concentración en el mismo a medida que progresa la maduración, debido a la reducción en el contenido de humedad experimentado por el queso. Bardócz (1995) considera que el queso constituye una de las fuentes más importantes de ingestión de poliaminas, las cuales juegan un papel positivo en el crecimiento y renovación de las células.

Tabla C1.7.- Contenido medio en aminas biógenas a lo largo de la maduración del queso Zamorano.

	Días de maduración					
	1	60	120	180	240	300
Try	1,93±0,49 ^a	5,68±1,40 ^b	10,38±2,09 ^c	12,77±2,42 ^d	19,05±3,49 ^e	30,62±3,90 ^f
Phe	4,38±0,63 ^a	8,12±1,13 ^b	34,09±2,31 ^c	54,06±1,87 ^d	76,29±1,84 ^e	91,05±3,34 ^f
Put	11,54±0,67 ^a	24,52±2,99 ^b	30,50±3,89 ^{bc}	38,27±6,32 ^c	54,19±7,15 ^d	73,35±12,47 ^e
Cad	29,10±2,11 ^a	30,14±0,45 ^{ab}	31,23±1,43 ^{bc}	32,31±1,99 ^{cd}	32,92±1,48 ^d	35,35±1,38 ^e
Ht	7,27±0,38 ^a	8,23±0,78 ^a	10,66±0,93 ^b	12,00±1,16 ^b	21,24±2,86 ^c	37,18±5,89 ^d
Tyr	1,14±0,20 ^a	20,67±1,53 ^b	28,73±2,60 ^c	37,18±5,08 ^d	50,05±4,33 ^e	65,51±7,02 ^f
Spd	0,61±0,11 ^a	1,55±0,19 ^b	2,58±0,36 ^c	3,46±0,48 ^d	5,01±1,11 ^e	6,80±1,40 ^f
Sp	0,22±0,05 ^a	23,94±1,66 ^b	29,33±2,95 ^c	36,53±5,36 ^d	46,84±4,84 ^e	69,16±7,48 ^f

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para cada amina biógena (mg/kg de queso) fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante la maduración.

Try: triptamina; Phe: feniletilamina; Put: putrescina; Cad: cadaverina; Ht: histamina; Tyr: tiramina; Spd: espermidina; Sp: espermina.

Finalmente, señalar que la concentración total de aminas biógenas detectadas en el queso Zamorano representó al final de la maduración aproximadamente el 40% de la cantidad máxima señalada por Taylor (1985), a partir de la cual podrían comenzar a plantearse problemas toxicológicos por la ingestión de queso.

4.1.4 Parámetros lipolíticos

El estudio de la lipólisis fue llevado a cabo mediante dos procedimientos: análisis del índice de acidez de la grasa y análisis de los ácidos grasos libres mediante cromatografía de gases.

La tabla C1.8 muestra la evolución de los valores medidos obtenidos para el índice de acidez de la grasa y para el contenido en ácidos grasos libres (FFA) durante la maduración del queso Zamorano.

Como puede observarse, la lipólisis en el queso Zamorano se incrementó de manera significativa ($p \leq 0,05$) durante toda la maduración. El aumento del índice de acidez de la grasa fue de aproximadamente 5 veces, alcanzando valores medios finales de 3,51 mg KOH/g grasa. Los ácidos grasos libres mayoritarios a lo largo de toda la maduración resultaron ser el palmítico ($C_{16:0}$), oleico ($C_{18:1}$), esteárico ($C_{18:0}$), mirístico ($C_{14:0}$), cáprico ($C_{10:0}$) y caproico ($C_{6:0}$), suponiendo al cabo de 10 meses un 78% del total de ácidos grasos libres. Nuestros resultados fueron similares a los descritos para el queso Manchego por Cabezas et al. (2007) y queso Tulum por Tekin y Güler (2019). Este comportamiento también fue seguido por tanto por los SFA, MUFA y PUFA, que también aumentaron durante el tiempo de maduración.

En el estudio de los componentes principales se pudo comprobar que 2 factores fueron capaces de explicar el 89,25 % de la varianza. En la figura C1.5 se puede observar cómo la proyección de los datos en el plano consiguió discriminar las diferentes muestras de queso Zamorano en función del tiempo de maduración. Por una parte, se formó un primer grupo integrado por las muestras de queso desde 1 hasta 120 días; un segundo grupo con las muestras de 180 y 240 días de maduración; y finalmente un tercer grupo con los quesos de 300 días con los valores más altos de todos los ácidos grasos libres y que se correlaciona negativamente en mayor medida con el PC 1. Por consiguiente, se pudo establecer que la lipólisis en el queso fue más intensa a partir de los 4 meses, como fue observado tanto por la suma total de FFA como por el índice de acidez de la grasa.

Tabla 1.8. Evolución del índice de acidez de la grasa y del contenido en ácidos grasos libres (FFA) a lo largo de la maduración del queso Zamorano.

	Días de maduración					
	1	60	120	180	240	300
IAG	0,65 ± 0,18 ^a	0,82 ± 0,19 ^{ab}	1,12 ± 0,34 ^b	2,38 ± 0,80 ^c	2,69 ± 0,84 ^c	3,51 ± 1,25 ^d
C _{2:0}	2,40 ± 0,72 ^a	4,78 ± 3,16 ^b	5,40 ± 3,71 ^b	5,65 ± 3,94 ^b	6,29 ± 4,30 ^b	6,77 ± 4,84 ^b
C _{4:0}	8,48 ± 0,34 ^a	9,31 ± 0,62 ^{ab}	10,00 ± 0,99 ^b	11,26 ± 1,86 ^c	12,18 ± 2,47 ^{cd}	12,59 ± 2,53 ^d
C _{6:0}	15,34 ± 0,84 ^a	16,90 ± 1,52 ^{ab}	18,34 ± 1,96 ^b	21,69 ± 3,96 ^c	23,45 ± 5,10 ^{cd}	24,90 ± 5,77 ^d
C _{8:0}	3,44 ± 0,38 ^a	4,34 ± 1,13 ^{ab}	4,66 ± 0,84 ^b	5,97 ± 1,62 ^c	6,53 ± 2,04 ^{cd}	7,47 ± 2,83 ^d
C _{10:0}	11,87 ± 1,59 ^a	15,20 ± 2,83 ^{ab}	17,26 ± 3,57 ^b	21,78 ± 5,92 ^c	24,52 ± 7,72 ^{cd}	26,72 ± 8,88 ^d
C _{10:1}	0,13 ± 0,21 ^a	0,40 ± 0,27 ^b	0,51 ± 0,24 ^{bc}	0,68 ± 0,27 ^{cd}	0,74 ± 0,27 ^{de}	0,86 ± 0,33 ^e
C _{12:0}	2,87 ± 1,58 ^a	6,46 ± 2,91 ^b	8,48 ± 3,28 ^b	12,14 ± 5,13 ^c	14,81 ± 6,47 ^{cd}	16,81 ± 7,05 ^d
C _{14:0}	10,21 ± 2,01 ^a	15,85 ± 4,95 ^{ab}	19,75 ± 6,23 ^b	26,04 ± 8,49 ^c	31,63 ± 12,34 ^{cd}	34,24 ± 14,04 ^d
C _{14:1}	0,06 ± 0,14 ^a	0,26 ± 0,20 ^{ab}	0,39 ± 0,27 ^{bc}	0,60 ± 0,31 ^c	0,84 ± 0,45 ^d	0,95 ± 0,51 ^d
C _{15:0}	0,78 ± 0,25 ^a	0,99 ± 0,30 ^{ab}	1,27 ± 0,38 ^b	1,74 ± 0,54 ^c	2,17 ± 0,81 ^d	2,45 ± 0,91 ^d
C _{16:0}	15,90 ± 3,70 ^a	24,66 ± 6,49 ^b	32,61 ± 9,44 ^b	42,55 ± 14,60 ^c	48,68 ± 7,57 ^{cd}	55,88 ± 21,51 ^d
C _{16:1}	0,35 ± 0,19 ^a	0,54 ± 0,24 ^a	0,80 ± 0,30 ^b	1,11 ± 0,39 ^c	1,27 ± 0,44 ^c	1,52 ± 0,52 ^d
C _{18:0}	13,16 ± 1,96 ^a	15,44 ± 2,44 ^b	17,14 ± 2,67 ^{bc}	19,21 ± 3,24 ^{cd}	20,34 ± 4,02 ^d	23,18 ± 5,56 ^e
C _{18:1}	10,65 ± 2,19 ^a	15,49 ± 3,51 ^{ab}	20,94 ± 5,29 ^b	28,66 ± 8,70 ^c	36,55 ± 14,65 ^d	42,86 ± 17,99 ^d
C _{18:2}	1,62 ± 0,57 ^a	2,34 ± 0,75 ^{ab}	3,07 ± 1,18 ^{bc}	4,07 ± 1,33 ^c	5,37 ± 2,44 ^d	6,45 ± 3,03 ^d
C _{18:3}	0,07 ± 0,13 ^a	0,14 ± 0,20 ^a	0,22 ± 0,19 ^{ab}	0,33 ± 0,25 ^b	0,55 ± 0,30 ^c	0,73 ± 0,41 ^d
C _{18:2} CONJUGADO	0,16 ± 0,15 ^a	0,21 ± 0,15 ^a	0,36 ± 0,16 ^b	0,45 ± 0,17 ^{bc}	0,50 ± 0,14 ^c	0,66 ± 0,23 ^d
SFA	84,45 ± 5,69 ^a	113,92 ± 7,36 ^b	134,92 ± 9,34 ^b	170,60 ± 12,44 ^c	192,22 ± 14,03 ^{cd}	211,00 ± 15,86 ^d
MUFA	11,18 ± 5,24 ^a	16,69 ± 7,55 ^{ab}	22,64 ± 10,19 ^b	31,25 ± 14,04 ^c	39,97 ± 18,03 ^{cd}	46,19 ± 18,03 ^d
PUFA	1,85 ± 0,87 ^a	2,68 ± 1,25 ^{ab}	3,64 ± 1,61 ^b	4,97 ± 2,19 ^b	6,60 ± 2,87 ^{bc}	7,83 ± 3,32 ^c

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para el índice de acidez de la grasa y los FFA fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante la maduración.

IAG: índice de acidez de la grasa (mg KOH/100 g de grasa); FFA (mg/100 g de queso) siendo acético [C_{2:0}], butírico [C_{4:0}], caproico [C_{6:0}], caprílico [C_{8:0}], cáprico [C_{10:0}], decenoico [C_{10:1}], láurico [C_{12:0}], mirístico [C_{14:0}], miristoleico [C_{14:1}], pentadecanoico [C_{15:0}], palmítico [C_{16:0}], palmitoleico [C_{16:1}], esteárico [C_{18:0}], oleico [C_{18:1}], linoleico [C_{18:2}], linoléico [C_{18:3}], octodecadienoico conjugado [C_{18:2} conjugado]; ácidos grasos saturados [SFA]; ácidos grasos monoinsaturados [MUFA]; ácidos grasos poliinsaturados [PUFA].

Además, como puede observarse en la figura C1.6, al respecto de la proyección de las variables, el PC1, que explica un 80,86% de la variación, se correlacionaba negativamente con casi todos los FFA, con unos valores que oscilaron entre -0,85 a -0,99, a excepción fundamentalmente de C_{10:1}, C_{18:2} conjugado y C_{16:1}, que se vieron afectados por el PC2 que explicaba el 8,39% de la variabilidad. Por lo tanto, la mayor parte de los ácidos grasos están agrupados a la izquierda del PC1 al igual que los lotes a los 240-300 días de maduración indicando una mayor cantidad de FFA y por lo tanto ejerciendo un mayor efecto sobre estos tiempos.

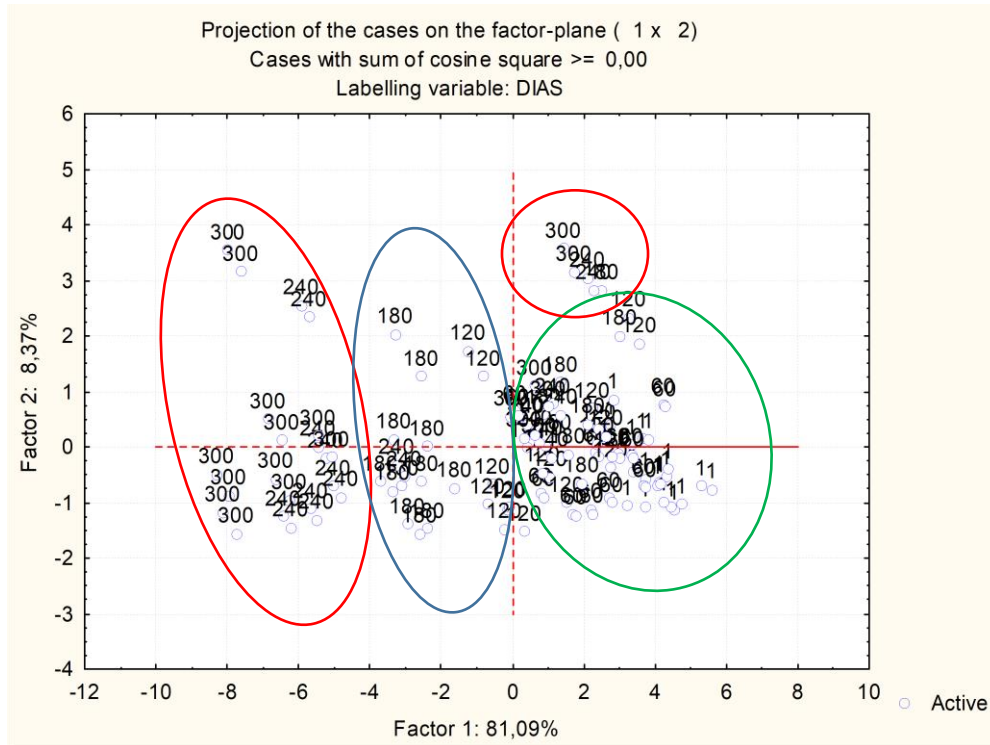


Figura C1.5. Análisis de componentes principales para el estudio de los ácidos grasos libres en el queso Zamorano a lo largo de la maduración.

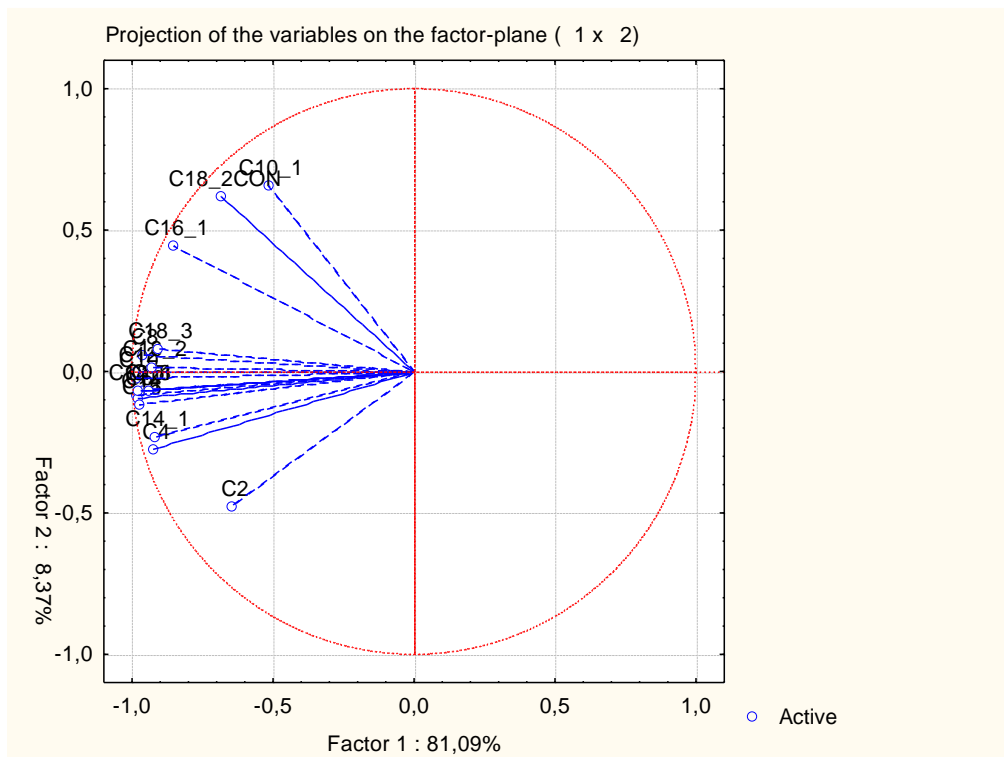


Figura C1.6. Análisis de componentes principales para el estudio de los ácidos grasos libres en el queso Zamorano a lo largo de la maduración mediante la representación de las proyecciones.

La lipólisis es junto con la proteólisis uno de los eventos bioquímicos de mayor importancia durante la maduración de los quesos, en cuanto que afecta en gran medida a la formación de aroma y sabor, pero también tiene incidencia en otras propiedades sensoriales como el color y la textura. Los FFA contribuyen en gran medida a la generación de aroma y sabor, tanto por sí mismos como actuando de precursores de otros compuestos (metil cetonas, ésteres, alcoholes secundarios, lactonas y alcanos) (Gobbetti et al., 2007). No obstante, en variedades de quesos como el Zamorano, el grado de lipólisis desde un punto de vista cuantitativo es mucho menor que en variedades maduras por mohos. Este hecho es debido a que los agentes responsables de la lipólisis como es la lipasa nativa de la leche se encontraría inactivada en los casos donde sea aplicado tratamiento de pasteurización o en los casos donde se elaboren con leche cruda, su actividad se vería muy limitada por las condiciones de pH reinantes en el queso Zamorano, las cuales están muy alejadas del óptimo de su actividad (en torno a pH de 7,0) (McSweeney y Sousa, 2000). Así mismo, otros agentes lipolíticos derivarían de las lipasas/esterasas de la microbiota acidoláctica presente en el queso, si bien la actividad de las bacterias utilizadas como cultivo iniciador en la elaboración de queso Zamorano es nula o poco importante en comparación con otras bacterias secundarias como algunas especies de lactobacilos o enterococos (Drouault et al., 2002). Además, esta escasa lipólisis del queso Zamorano estaría relacionada con la alta relación sal/humedad y alto contenido en extracto seco del queso, que actuarían limitando el desarrollo microbiano y la actuación de sus enzimas.

4.1.5 Análisis del Perfil de Textura

El empleo del análisis del perfil de la textura se ha convertido en una herramienta objetiva e indispensable a la hora de realizar una correcta caracterización de los productos alimentarios y del queso en concreto, al proporcionar información acerca de parámetros como la dureza, elasticidad, adhesividad, gomosidad o masticabilidad. Además, la textura es un aspecto clave en la percepción de calidad por parte del consumidor.

La tabla C1.9 muestra la evolución de los valores medios de diferentes parámetros de textura durante la maduración del queso Zamorano desde 60 a 300 días de maduración.

Todos los parámetros del análisis de perfil de textura estudiados se caracterizaron por mostrar un incremento significativo ($p \leq 0,05$) durante la maduración del queso Zamorano con la excepción de los valores de cohesividad y elasticidad ($p \geq 0,05$). La cohesividad en el queso viene determinada por los agregados proteicos que constituyen la matriz tridimensional, los cuales están influenciados por el pH. Según han descrito Pastorino et al. (2003), a valores de pH de 5,3, como es el caso del queso Zamorano, la matriz se caracterizaba por la presencia de grandes agregados proteicos de alta densidad de 10-12 nm de diámetro que daban lugar a quesos con una estructura relativamente homogénea. Dado que el pH no variaba durante la maduración, el tipo de agregados sería muy similar no estableciéndose diferencias en la cohesividad del queso. En cuanto a la ausencia de diferencias en los valores de elasticidad

durante la maduración, las mismas estarían relacionadas con el alto grado de deformación aplicada (80%) a las muestras de queso, ocasionando una destrucción total de la muestra e impidiendo su posterior recuperación elástica.

Tabla C1.9. Cambios en los valores medios de los parámetros de textura del queso Zamorano durante la maduración.

	Días de maduración				
	60	120	180	240	300
Fracturabilidad	25,78 ± 5,40 ^a	30,40 ± 4,67 ^a	37,33 ± 7,39 ^b	68,18 ± 14,79 ^d	58,21 ± 7,57 ^c
Dureza	96,65 ± 16,84 ^a	118,28 ± 21,64 ^b	151,64 ± 28,72 ^c	215,67 ± 31,41 ^d	210,02 ± 23,73 ^d
Adhesividad	-5,60 ± 1,71 ^b	-4,87 ± 0,80 ^{ab}	-5,94 ± 0,75 ^{bc}	-4,73 ± 2,12 ^{ab}	-4,63 ± 1,22 ^a
Cohesividad	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Elasticidad	0,42 ± 0,03	0,43 ± 0,05	0,45 ± 0,07	0,42 ± 0,08	0,41 ± 0,14
Gomosidad	12,11 ± 2,25 ^a	16,15 ± 3,80 ^b	21,27 ± 5,80 ^c	28,41 ± 5,06 ^d	29,33 ± 4,53 ^d
Masticabilidad	5,16 ± 1,14 ^a	7,07 ± 2,20 ^a	9,59 ± 3,53 ^b	10,32 ± 3,51 ^{bc}	12,22 ± 4,90 ^c

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para cada parámetro de textura fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante la maduración.

Fracturabilidad (N); dureza (N), adhesividad (Nxs); Elasticidad (mm); el resto de parámetros son adimensionales.

Por otra parte, los valores de adhesividad, a pesar de mostrar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con el curso de la maduración, presentaron valores bajos y estables, los cuales fueron muy similares en todos los puntos de muestreo.

Los parámetros de textura más influenciados por el tiempo de maduración fueron la fracturabilidad, la dureza, gomosidad y masticabilidad ($p \leq 0,05$), llegándose a duplicar los valores al término de la maduración con respecto a los que presentaban a los 2 meses. A este respecto, cabe destacar que los valores medios de la dureza se incrementaron desde 96,65 N a los 60 días hasta 210,02 N a los 300 días de maduración. Dicho aumento se explicaría principalmente la deshidratación que sufre el queso durante la maduración (véase tabla C1.1). Durante la maduración, el contenido en agua de la red tridimensional proteica que constituye el queso se reduce haciendo que la matriz proteica incremente su dureza (García et al., 2016). Además, el incremento en la cantidad de proteína como consecuencia de la pérdida de humedad, contribuirá a que se establezcan mayor número de interacciones proteína-proteína, dando lugar a la formación de una red más densa y, con ello, un aumento en la dureza de los quesos (Dimitreli y Thomareis, 2007). De igual manera, la reducción en el grado de hidratación de la masa del queso, además de aumentar la dureza contribuyó a que la fracturabilidad también se incrementara, hecho descrito también por otros autores en quesos de oveja madurados durante 180 días (Farahani et al., 2014), o en quesos semiduros de oveja (Juan et al., 2007).

Finalmente, señalar que como tanto la gomosidad como la masticabilidad se ven influenciadas por la dureza (gomosidad = dureza x cohesividad y masticabilidad = gomosidad x elasticidad), por lo tanto, la pérdida de humedad que experimentó el queso, junto con el resto

de factores indicados anteriormente, contribuyeron a explicar su evolución durante la maduración, caracterizándose la misma por un incremento de ambos parámetros, siendo preciso ejercer mayor fuerza a la hora de masticar las muestras.

4.1.6 Análisis sensorial

La tabla C1.10 muestra la evolución de los valores medios de diferentes atributos sensoriales relacionados con el aspecto, olor, textura y sabor, respectivamente, durante la maduración del queso Zamorano, así como la valoración global del producto.

Por lo que respecta a los atributos del aspecto, no fueron observadas diferencias significativas entre las muestras con la excepción del color, aunque en este caso apenas fueron reseñables. Todos los quesos se caracterizaron por presentar una coloración amarillenta con tendencia a tonos pajizos, así como un número pequeño de ojos (principalmente de carácter mecánico) de distribución algo irregular en la masa.

Los atributos relacionados con el olor apenas mostraron diferencias significativas durante la maduración, con la excepción del olor a láctico, a fresco y a frutos secos, los cuales se hacían más marcadas en las muestras de queso Zamorano de mayor tiempo de maduración. Las múltiples y diversas reacciones bioquímicas desarrolladas durante la maduración dan lugar a la formación directa de diferentes compuestos volátiles o bien a través de la formación de ésteres contribuyendo a incrementar la complejidad del aroma y sabor del queso. La lipólisis juega un importante papel en la formación de FFA que son precursores de compuestos aromáticos como metil cetonas, lactonas y alcoholes (Khattab et al., 2019), luego, el ligero aumento en la valoración de algunos de estos parámetros, podría estar relacionado con la mayor lipólisis ocurrida al avanzar la maduración.

En relación con los atributos sensoriales de textura, apenas se observaron diferencias durante la maduración. Los valores de elasticidad fueron ligeramente superiores durante las primeras etapas de la maduración, mientras que los de friabilidad y dureza se incrementaron como consecuencia de la pérdida de humedad del queso. Estos resultados coincidían con lo reseñado previamente para estos mismos parámetros determinados en el análisis del perfil de textura. La proteólisis de los quesos durante la maduración contribuyó a la liberación de compuestos de menor peso molecular caracterizados por presentar mayor grado de interacción con el agua, contribuyendo a la hidratación del queso con la saliva formando un bolo alimenticio con mayor grado de adherencia.

Tabla C1.10. Evolución de los valores medios de diferentes atributos sensoriales relacionados con el aspecto, olor, textura y sabor, así como la valoración global del producto durante la maduración del queso Zamorano, realizado mediante panel de cata.

	Días de maduración				
	60	120	180	240	300
ASPECTO					
Intensidad de color	3,97 ± 0,41 ^a	4,24 ± 0,57 ^{ab}	4,03 ± 0,49 ^a	3,98 ± 0,67 ^b	4,14 ± 0,63 ^b
Tamaño de ojos	3,77 ± 0,81	3,72 ± 0,66	3,52 ± 0,56	3,87 ± 0,88	3,89 ± 0,67
N ^a de ojos	3,59 ± 0,74	3,73 ± 0,76	3,55 ± 0,51	3,88 ± 0,82	3,79 ± 0,64
OLOR					
Láctico	4,07 ± 0,59 ^a	4,28 ± 0,59 ^a	4,22 ± 0,45 ^a	4,62 ± 0,68 ^b	4,60 ± 0,63 ^b
Fresco, limpio	4,21 ± 0,57 ^{ab}	4,33 ± 0,62 ^{abc}	4,15 ± 0,48 ^a	4,58 ± 0,71 ^{bc}	4,59 ± 0,64 ^c
Plantas aromáticas	4,05 ± 0,33	4,07 ± 0,43	4,09 ± 0,36	4,30 ± 0,56	4,28 ± 0,51
Aceitoso, graso	4,14 ± 0,33	4,09 ± 0,41	4,09 ± 0,37	4,24 ± 0,56	4,21 ± 0,52
Frutos secos	4,04 ± 0,24 ^a	4,00 ± 0,35 ^a	4,07 ± 0,30 ^{ab}	4,22 ± 0,47 ^{ab}	4,27 ± 0,39 ^b
Vainilla	4,01 ± 0,29	3,99 ± 0,42	4,06 ± 0,30	4,22 ± 0,48	4,14 ± 0,43
Cera	3,94 ± 0,32	3,96 ± 0,35	4,06 ± 0,30	4,16 ± 0,42	4,15 ± 0,43
TEXTURA					
Elasticidad	4,13 ± 0,55	4,19 ± 0,60	4,00 ± 0,56	4,04 ± 0,66	4,04 ± 0,66
Friabilidad	3,79 ± 0,57	4,03 ± 0,60	4,04 ± 0,53	4,11 ± 0,81	4,14 ± 0,65
Adhesividad	3,74 ± 0,50 ^a	4,01 ± 0,61 ^{ab}	4,01 ± 0,48 ^{ab}	4,06 ± 0,79 ^{ab}	4,23 ± 0,55 ^b
Granulosidad	3,90 ± 0,38	3,85 ± 0,43	3,72 ± 0,50	3,91 ± 0,76	4,03 ± 0,54
Solubilidad	3,85 ± 0,54	4,01 ± 0,52	4,04 ± 0,55	4,21 ± 0,77	4,17 ± 0,59
Dureza	3,98 ± 0,36	4,03 ± 0,43	4,06 ± 0,37	4,20 ± 0,58	4,16 ± 0,49
Mantecosidad	3,80 ± 0,34	3,76 ± 0,46	3,85 ± 0,53	4,06 ± 0,63	3,97 ± 0,59
Rugosidad	3,83 ± 0,44	3,87 ± 0,53	3,85 ± 0,67	3,93 ± 0,68	4,01 ± 0,52
Sequedad	3,83 ± 0,54	3,89 ± 0,59	3,80 ± 0,60	3,79 ± 0,73	3,88 ± 0,71
SABOR					
Salado	3,68 ± 0,43	3,72 ± 0,51	3,87 ± 0,58	3,80 ± 0,51	3,84 ± 0,63
Leche fresca	3,80 ± 0,51	3,93 ± 0,56	3,86 ± 0,63	4,06 ± 0,74	3,93 ± 0,68
Ácido	3,03 ± 0,49 ^a	3,32 ± 0,62 ^{ab}	3,45 ± 0,62 ^b	3,54 ± 0,69 ^b	3,53 ± 0,67 ^b
Picante	3,74 ± 0,51	3,96 ± 0,62	3,80 ± 0,58	3,98 ± 0,67	4,04 ± 0,66
Dulzón	3,51 ± 0,56	3,61 ± 0,63	3,57 ± 0,61	3,85 ± 0,70	3,90 ± 0,66
Amargo	3,93 ± 0,72 ^b	3,72 ± 0,77 ^{ab}	3,60 ± 0,75 ^{ab}	3,42 ± 0,77 ^a	3,38 ± 0,48 ^a
Regusto y persistencia	3,30 ± 0,70 ^a	3,78 ± 0,57 ^b	3,96 ± 0,87 ^b	4,20 ± 0,69 ^b	4,14 ± 0,54 ^b
VALORACIÓN GLOGAL					
Valoración global	5,17 ± 0,31 ^a	5,29 ± 0,32 ^a	6,06 ± 0,38 ^b	7,08 ± 0,40 ^c	7,11 ± 0,36 ^c

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para cada atributo del análisis sensorial fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante la maduración.

Los atributos relacionados con los parámetros de aspecto, olor, textura y sabor se puntuaron entre 1 y 7.

La valoración global se evaluó entre 1 y 10.

En cuanto al sabor, de nuevo, todos los valores de los descriptores analizados aumentaron a lo largo de la maduración excepto los del sabor amargo que fueron mayores al inicio de la misma para ir reduciéndose significativamente ($p \leq 0,05$) hasta los 10 meses. El amargor, como señalamos en el apartado de péptidos, predomina en las primeras etapas de la maduración como consecuencia del acúmulo de péptidos de carácter hidrofóbico (Kirmaçi et al., 2014), los cuales posteriormente serán degradados por peptidasas hacia aminoácidos libres. Así mismo, los diferentes procesos bioquímicos que intervienen en la maduración del

queso serán los responsables del incremento en la persistencia y retrogusto de los quesos. En general, se pudo observar que todos los parámetros en estudio presentaron las mejores puntuaciones al final de la maduración (240-300 días). La mayor intensidad de los atributos gustativos a lo largo de la maduración podría relacionarse con las mayores cantidades de fracciones de nitrógeno soluble en agua (NS-pH4,6) y nitrógeno soluble fosfotúngstico (NS-PTA5%) durante la evolución de los quesos (Ballesteros et al., 2006). Otros autores también han obtenido que estas fracciones son las principales responsables del sabor del queso y que en quesos con una degradación más intensa de las caseínas α s y β y niveles más altos de fracciones de nitrógeno y aminoácidos libres, obtuvieron puntuaciones más altas para los atributos olfativos y gustativos característicos (Mendia et al., 2000), al igual que nos ocurre a nosotros.

Todo lo expresado anteriormente, se vio reflejado de manera significativa en la valoración global de los quesos que fue llevada a cabo con un panel de consumidores integrado por público general, mostrándose la evolución de los valores medios durante la maduración del queso Zamorano en la tabla C1.11. Las puntuaciones globales se fueron incrementado durante toda la maduración, estableciéndose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en todos los puntos de muestreo, pasando de unos valores medios de aproximadamente 5 en las muestras de queso con 60 y 120 días hasta otros próximos a 7 a partir de los 240 días de maduración. Cabe destacar que los atributos que mayor influencia tuvieron en los catadores a la hora de aportar una puntuación a los quesos fueron el olor y sabor, sobre todo su complejidad, equilibrio y persistencia tanto a nivel nasal como en boca.

Tabla C1.11. Evolución de los valores medios de diferentes atributos sensoriales relacionados con el aspecto, olor, textura y sabor, así como la valoración global del producto durante la maduración del queso Zamorano, realizado mediante panel de consumidores

	Días de maduración				
	60	120	180	240	300
Aspecto	4,34 ± 0,49 ^a	4,89 ± 0,34 ^b	4,90 ± 0,45 ^b	5,31 ± 0,41 ^c	5,51 ± 0,39 ^d
Olor	5,13 ± 0,45 ^a	5,60 ± 0,36 ^b	5,57 ± 0,43 ^b	5,96 ± 0,40 ^c	6,09 ± 0,40 ^c
Sabor	5,51 ± 0,45 ^a	5,90 ± 0,40 ^b	5,93 ± 0,64 ^b	6,53 ± 0,55 ^c	6,66 ± 0,79 ^c
Textura/Trigeminales	4,43 ± 0,49 ^a	4,97 ± 0,24 ^b	5,06 ± 0,46 ^b	5,27 ± 0,46 ^c	5,66 ± 0,50 ^d
Valoración global	5,01 ± 0,46 ^a	5,58 ± 0,36 ^b	5,80 ± 0,45 ^c	6,17 ± 0,46 ^d	6,79 ± 0,66 ^e

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para cada parámetro del análisis sensorial fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) durante la maduración.

Todos los parámetros evaluados se puntuaron entre 1 y 10.

4.2 Influencia del tratamiento térmico sobre las características del queso Zamorano

4.2.1 Análisis químicos y fisicoquímicos

En la tabla C2.1 se muestran los valores medios de los principales parámetros químicos y fisicoquímicos para el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración.

Tabla C2.1. Principales parámetros químicos y fisicoquímicos del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración.

	Tratamiento térmico	
	Crudo	Pasteurizado
ES	72,74 ± 0,89	71,60 ± 1,50
Grasa	53,61 ± 2,31 ^b	50,99 ± 1,67 ^a
Proteína	26,74 ± 0,37 ^a	27,44 ± 0,54 ^b
Cloruros	1,86 ± 0,08 ^a	2,02 ± 0,13 ^b
S/H	6,81 ± 0,20	7,14 ± 0,81
Lactosa	ND	ND
pH	5,39 ± 0,10	5,33 ± 0,07
AT	1,60 ± 0,17	1,67 ± 0,05
A _w	0,930 ± 0,004	0,931 ± 0,005

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasteurizada)

Valores con distinto superíndice para cada parámetro fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico. ND: No detectado

ES: extracto seco (g/100 g); Grasa (g/100 g ES); Proteína (g/100 g ES); Cloruros (g NaCl/100 g); S/H: sal/humedad (%); Lactosa (g/100 g ES); pH; AT: Acidez titulable (g ac. láctico/100 g ES); A_w: actividad de agua.

El contenido medio de extracto seco no presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$) pero fue ligeramente inferior en los quesos elaborados con leche pasteurizada. Por el contrario, los contenidos medios en grasa y proteína mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$), siendo más elevado en materia grasa y proteína para los lotes de queso elaborados con leche cruda y pasteurizada, respectivamente. La pasteurización de la leche implicaba un mayor daño en los glóbulos grasos, así como una mayor homogenización de la grasa con respecto a la leche cruda, traducándose en una mayor pérdida de la misma durante el proceso de desuerado, dado el intenso corte y agitación a la que es sometida la cuajada de esta variedad de queso. Por lo que respecta al mayor contenido en proteína en los quesos elaborados con leche pasteurizada podría estar asociado al efecto desnaturizante de las proteínas del suero por el calor, las cuales se insolubilizan y quedan retenidas en la matriz proteica que constituye la cuajada. Como se puede observar, estas diferencias en el contenido proteico no resultaron ser muy importantes dado que las condiciones de temperatura y tiempo aplicadas en la pasteurización no fueron muy intensas. Las proteínas desnaturizadas del

lactosuero se caracterizan por presentar una buena capacidad de retención de agua, lo que podría explicar que los quesos elaborados con leche pasteurizada mostraran un menor contenido en extracto seco.

Como ya había sido resaltado en el capítulo del tiempo de maduración, no fue detectada la presencia de lactosa en ninguno de los quesos a partir de prácticamente 2 meses de maduración y como tal, los parámetros fisicoquímicos que podrían verse afectados por su presencia como el pH y la acidez titulable no presentaron diferencias significativas entre los quesos.

El contenido en sal fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) en los quesos elaborados con leche cruda. Dado que el salado de los quesos está muy estandarizado en la elaboración del queso Zamorano al realizarse en salmueras bajo las mismas condiciones de temperatura, pH y tiempo, la mayor concentración de sal en los quesos elaborados con leche pasteurizada podría estar asociada a la desnaturalización parcial de las proteínas del suero que contribuirían a una mayor retención de agua en la cuajada, así como a una textura ligeramente menos compacta, lo que facilitaría una mayor penetración de sal en la matriz (Celik and Turkoglu, 2007). No obstante, cuando el contenido salino se expresaba como porcentaje de humedad, las diferencias entre quesos fueron mínimas, no resultando ser significativas (6,81 con leche cruda frente a 7,14 con leche pasteurizada).

Por último, señalar que no hubo diferencias en los valores de A_w dada la similitud existente en los parámetros que influyen principalmente la misma (extracto seco y contenido en sal) entre los quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada.

4.2.2 Análisis microbiológicos

En la tabla C2.2 se muestran los recuentos de las poblaciones microbianas analizadas en el queso Zamorano de 240 días de maduración elaborado con leche cruda y pasteurizada.

En nuestro estudio se pudo observar que tanto los recuentos de la microbiota aerobia mesófila total (PCA) como de las bacterias acidolácticas (MRS) presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico aplicado a la leche, con valores más bajos en los quesos elaborados con leche pasteurizada. Estos valores fueron similares a los descritos por Ferrazza et al. (2004) para el queso Zamorano elaborado con leche pasteurizada y por Etayo et al. (2006) para el queso Idiazabal, Manchego y Zamorano elaborados con leche cruda.

Tabla C2.2. Recuentos de las poblaciones microbianas del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración.

	Días de maduración	
	Cruda	Pasteurizada
PCA	7,78 ± 0,48 ^b	5,86 ± 0,80 ^a
MRS	8,20 ± 0,17 ^b	4,52 ± 1,52 ^a
VRBGA	ND	ND

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasteurizada) expresados en log ufc/g. Valores con distinto superíndice para un mismo parámetro fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico. ND: No detectado

El tratamiento de pasteurización de la leche produce una higienización de la misma, destruyendo la microbiota patógena y una gran parte de la banal. Este hecho llevó a la adición de cultivos iniciadores comerciales a la leche y que en nuestro estudio estaban integrados por bacterias lácticas mesófilas con propiedades acidificantes, principalmente cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, si bien es una práctica común en algunos productores de queso Zamorano su complementación con microorganismos termófilos y co-cultivos constituidos por cepas de lactobacilos. La adición de estos cultivos iniciadores contribuyó a estandarizar el proceso de elaboración. De igual manera, también fueron adicionados a la leche cruda los mismos tipos de cultivos iniciadores que a la leche pasteurizada. Aunque no sería necesario, se trata de una práctica habitual en la elaboración de queso Zamorano debido a que las mejoras realizadas en el sistema de ordeño y recogida de la leche han dado lugar a que la leche cada vez presente recuentos microbianos más bajos dando ocasionando lo que se conoce en quesería como “leches muertas”, siendo preciso la adición de cultivos acidificantes que ayuden a la coagulación de la leche y homogenización del resto de etapas implicadas en la elaboración del queso. Este hecho explicaría los mayores recuentos microbianos en el queso elaborado con leche cruda, los cuales prácticamente duplicaban en MRS los presentes en los quesos de leche pasteurizada debido a la suma de la microbiota presente de manera natural en la leche cruda y la aportada por el cultivo iniciador. Tal y como ha sido descrito por otros autores (Feutry et al., 2012), gran parte de los recuentos en MRS estarían constituidos por lactobacilos, al ser este un género muy resistente a las condiciones de pH, sal/humedad y actividad del agua instauradas en el queso durante su maduración.

Finalmente, y por lo que se refiere a los recuentos en VRBGA, si bien estuvieron presentes durante los primeros 2 meses de maduración en los quesos elaborados con leche cruda, aunque en niveles bajos, y ausentes en los de pasteurizada en ese mismo tiempo (datos no mostrados), las condiciones ambientales que se fueron estableciendo durante la maduración, y que básicamente venían determinadas por el efecto combinado del pH, la A_w y

la concentración sal/humedad, inhibieron el desarrollo de Enterobacteriáceas a partir de los 2-4 meses tal y como ha sido descrito por Ferrazza et al. (2004) y Etayo et al. (2006).

4.2.3 Análisis de los parámetros proteolíticos

4.2.3.1 Fracciones Nitrogenadas

La tabla C2.3 muestra las diferencias entre las fracciones nitrogenadas del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada al cabo de 240 días de maduración.

Todas las fracciones nitrogenadas, a excepción del nitrógeno peptídico, presentaron valores más elevados en los quesos elaborados con leche cruda, aunque sólo se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para NS-pH4,6, NS-PTA5% y N peptídico (Np).

Tabla C2.3. Fracciones nitrogenadas del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada al cabo de 240 días de maduración.

	Días de maduración	
	Cruda	Pasterizada
NS-pH4,6	20,86 ± 0,87 ^b	19,67 ± 1,47 ^a
NS-TCA12%	7,74 ± 0,51	7,50 ± 0,53
NS-PTA5%	2,82 ± 0,20 ^b	1,49 ± 0,43 ^a
Npp	12,93 ± 0,62	12,36 ± 0,87
Np	5,09 ± 0,48 ^a	5,92 ± 0,43 ^b

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasterizada).

Valores con distinto superíndice para un mismo parámetro fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico.

NS-pH4,6: nitrógeno soluble a pH 4,6; NS-TCA12%: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12%; NS-PTA5%: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%; Npp: nitrógeno polipeptídico; Np: nitrógeno peptídico.

Valores expresados como % de cada una de las fracciones/nitrógeno total.

La extensión de la proteólisis fue ligeramente superior en los quesos elaborados con leche cruda al presentar valores medios de NS-pH4,6 significativamente diferentes a los elaborados con leche pasterizada (Albenzio et al., 2001; Aydemir, 2018; Fox and McSweeney, 1996; Gaya et al., 1990). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la profundidad de proteólisis desde un punto de vista cuantitativo, presentando ambos quesos valores semejantes de NS-TCA12%. Sin embargo, un análisis más profundo de las fracciones nitrogenadas que integran el NS-TCA12% nos permitió comprobar la existencia de un diferente comportamiento en las fracciones de N peptídico y NS-PTA5%. Así, mientras los valores de NS-PTA5% en los quesos de leche cruda casi duplicaron a los presentes en los elaborados con leche pasterizada, el contenido en N peptídico fue casi un 20% superior en los quesos de leche pasterizada. Estos resultados fueron indicativos de una mayor actividad aminopeptidasa microbiana en los quesos con leche cruda, que actuaría hidrolizando los péptidos de bajo peso molecular (reduciendo los valores de N peptídico) con la consiguiente liberación de aminoácidos libres (incremento de contenido en NS-PTA5%). Esta mayor

actividad aminopeptidasa estaría no solo asociada a los mayores recuentos en MRS de bacterias lácticas en los quesos de leche cruda, sino también a un mayor predominio dentro de los mismos de lactobacilos, algunas de cuyas especies se ha comprobado contribuían a la proteólisis del queso (Renes et al., 2019b).

4.2.3.2 Caseínas y sus productos de degradación

La tabla C2.4 muestra los valores medios de cada una de las caseínas y productos de su hidrólisis del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración. La figura C2.1 presenta un electroferograma típico del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración.

Tabla C2.4. Caseínas y sus productos de hidrólisis, expresados como % de la densidad óptica total, en el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración.

	Tratamiento térmico	
	Crudo	Pasteurizado
$\gamma 1$ -cn	4,74 \pm 1,64	4,96 \pm 1,01
$\gamma 2$ -cn	7,52 \pm 1,36 ^b	5,69 \pm 1,08 ^a
$\gamma 3$ -cn	3,35 \pm 0,68	2,94 \pm 0,79
β -cn	31,05 \pm 4,88	31,48 \pm 1,70
α_s -cn	26,22 \pm 4,02	28,66 \pm 1,64
pre α_s -cn	27,12 \pm 1,44	26,26 \pm 0,67

Valores medios \pm desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasteurizada)

Valores con distinto superíndice para cada caseína y sus productos de degradación fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico.

Como puede ser observado, no se establecieron diferencias significativas en las diferentes fracciones caseínicas analizadas entre los quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada, excepto en el caso de la fracción $\gamma 2$ -cn, que resultó ser ligeramente superior en los quesos de leche cruda. Estos datos nos permiten concluir, al igual que se había señalado en el estudio de las fracciones nitrogenadas, que la proteólisis primaria en ambos tipos de queso fue prácticamente igual. Dado que esta proteólisis está asociada mayoritariamente a la enzima coagulante (Exterkate et al., 1995; Ferrazza, 2002; Fox et al., 2015) y que en ambos casos se utilizó una misma cantidad durante su elaboración era lógico pensar que no habría grandes diferencias entre quesos. No obstante, es preciso reseñar ligeras diferencias en la fracción de α_s -cn y pre α_s -cn, las cuales presentaron menores y mayores valores, respectivamente, en los quesos elaborados con leche cruda, siendo indicativos de un mayor grado de proteólisis. Estas ligeras diferencias estarían explicadas por la presencia de mayores recuentos microbianos en los quesos de leche cruda, los cuales liberan al queso durante la maduración proteinasas extracelulares cuyo sustrato específico es la fracción α_s -cn.

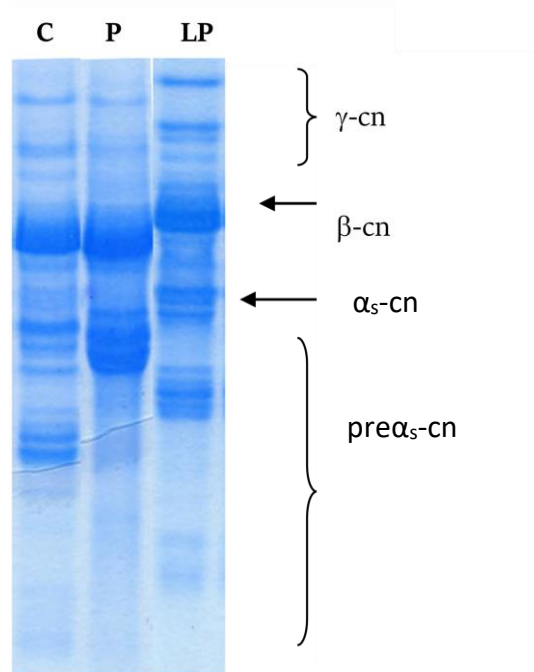


Figura C2.1. Electroferograma típico del queso Zamorano de 240 días de maduración en función del tratamiento térmico aplicado a la leche. LC: leche cruda; P: patrón; LP: leche pasteurizada.

Las fracciones de γ -cn son producto de la degradación de la β -cn principalmente por la acción de la plasmina (proteasa alcalina de la leche), originando γ_1 -cn (f29-209), γ_2 -cn (f106-209) y γ_3 -cn (f108-209), así como de proteosa-peptona (Fox et al., 2015). En general, se ha descrito por otros autores (Fox et al., 2015; Ismail y Nielsen, 2010) que la pasterización contribuye a incrementar la actividad de la plasmina como consecuencia de la inactivación de sus inhibidores y la activación del plasminógeno. Sin embargo, en nuestro estudio no fueron observadas diferencias en la fracción β -cn y en sus productos de la hidrólisis, y cuando fueron observadas como es el caso de la fracción γ_1 -cn, resultaron ser mayores en los quesos elaborados con leche cruda. Ello nos llevó a concluir que la limitada degradación de la β -cn por parte de la plasmina estaría condicionada por la instauración en ambos tipos de quesos de valores semejantes de pH y relación sal/humedad (en torno a pH 5,3 y sal/humedad de 7), muy alejados del óptimo de acción de la proteasa alcalina.

4.2.3.3 Perfil de péptidos

En la tabla C2.5 se presentan las áreas relativas de las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas de los cromatogramas a partir de los permeados del extracto soluble analizados en el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada con 240 días de maduración.

Tabla C2.5. Áreas relativas de las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas de los cromatogramas a partir de los permeados del extracto soluble del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada al cabo de 240 días de maduración.

	Tratamiento térmico	
	Crudo	Pasterizado
Zona 1	0,54 ± 0,09 ^b	0,27 ± 0,04 ^a
Zona 2	0,29 ± 0,07 ^a	0,35 ± 0,02 ^b
Zona 3	0,16 ± 0,03 ^a	0,35 ± 0,08 ^b
Hfob /Hfil	1,66 ± 0,44 ^a	5,52 ± 0,93 ^b

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasterizada)

Valores con distinto superíndice para cada zona fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico. Zona 1: péptidos hidrofílicos; Zona 2: péptidos de hidrofobicidad intermedia; Zona 3: péptidos hidrofóbicos; Hfob/Hfil: relación de péptidos hidrofóbicos respecto a hidrofílicos.

En todas las zonas se establecieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función de la aplicación del tratamiento térmico a la leche utilizada en la elaboración del queso Zamorano. En los quesos elaborados con leche cruda predominaron los péptidos hidrofílicos, mientras que en los elaborados con leche pasterizada fueron los hidrofóbicos. Este efecto quedó corroborado por la relación entre péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos, la cual fue de más de tres veces superior en los quesos de leche pasterizada. Taborda et al. (2008) en un estudio realizado con queso de oveja Manchego, también observaron una mayor proporción de péptidos hidrofóbicos en los quesos elaborados con leche pasterizada. En nuestro trabajo, y tal y como ha sido señalado en otros apartados previos, estas diferencias estarían asociadas a la presencia de mayores recuentos y diversidad de bacterias lácticas en los quesos elaborados con leche cruda y, con ello, del nivel de peptidasas que actuarán hidrolizando los péptidos hidrofóbicos de mayor peso molecular en otros de menor tamaño y carácter más polar. Este hecho pudo ser comprobado en nuestro estudio al observar al comparar los cromatogramas del perfil de péptidos obtenidos en el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada (figura C2.2) al igual que había sido descrito por Benfeldt y Sorensen (2001) y Somers y Kelly (2002).

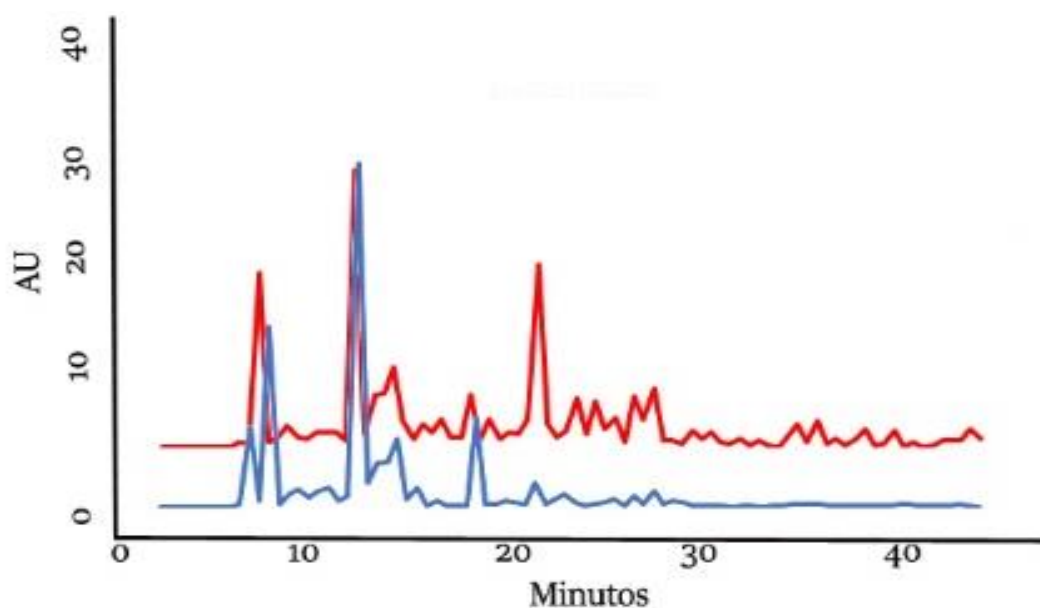


Figura C2.2. Perfil peptídico en función del tratamiento térmico. Líneas de color azul y rojo para quesos de leche cruda y pasteurizada con 240 días de maduración, respectivamente. Zona 1: 13-22 minutos; zona 2: 22-30 minutos; zona 3: 30-45 minutos.

4.2.3.4 Aminoácidos libres

En la tabla C2.6 se presentan los valores medios obtenidos en el análisis de los aminoácidos libres del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración.

La gran mayoría de los aminoácidos libres analizados presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada. El contenido total de aminoácidos libres en el queso Zamorano elaborados con leche cruda fue de 6243,28 mg/100 g de queso, frente a los 1874,30 mg/100 g de queso en el pasteurizado. Estos datos corroboran los descritos previamente en el estudio de la fracción del NS-PTA5%, siendo indicativos de una intensa actividad aminopeptidasa en los quesos de leche cruda.

La cantidad total de aminoácidos libres obtenida en nuestro estudio para el queso Zamorano elaborado con leche cruda fue ligeramente superior a la referida por otros autores para quesos de oveja (Diana et al., 2014) pero inferior a la descrita por Centi et al. (2017), en queso Pecorino Abruzzese. En el caso del queso Zamorano elaborado con leche pasteurizada, los valores finales de aminoácidos libres se encontraban dentro del rango descrito por Diana et al. (2014) y Poveda et al. (2004), siendo casi dos o tres veces inferiores a los descritos por Ferrazza (2002) y Renes et al. (2019) en otros trabajos sobre queso Zamorano.

En cuanto al perfil aminoacídico señalar que los aminoácidos mayoritarios en los quesos de leche cruda fueron Glu, Gln+Gly, Leu, Lys, Val, Asn y Arg+Thr, representando casi el 75% del total de aminoácidos; mientras que, en los quesos de leche pasteurizada, los aminoácidos mayoritarios fueron Gln+Gly, Leu, Glu, Lys, Val, Phe y Trp, representando casi el 66% del total. Estos perfiles, si bien son bastante similares a los descritos por otros autores (Ferrazza, 2002; Poveda et al., 2015; Renes et al., 2019b), presentaron notables diferencias en sus contenidos como consecuencia de los niveles y diversidad de la microbiota presente en cada una de las variedades de quesos.

Tabla C2.6. Contenido en aminoácidos en queso Zamorano con 240 días de maduración en función del tratamiento térmico aplicado a la leche de partida.

	Tratamiento térmico	
	Cruda	Pasteurizada
Asp	179,32 ± 74,08 ^b	35,75 ± 7,23 ^a
Glu	1016,66 ± 380,85 ^b	168,33 ± 99,58 ^a
Asn	366,82 ± 128,04 ^b	77,08 ± 62,72 ^a
Ser	124,73 ± 48,60 ^b	44,79 ± 10,29 ^a
Gln+Gly	1414,60 ± 233,15 ^b	369,98 ± 183,19 ^a
His	73,26 ± 14,12 ^b	32,08 ± 2,81 ^a
Cit	57,56 ± 17,11 ^b	29,92 ± 14,36 ^a
Tau	109,94 ± 136,03	47,82 ± 42,32
Gaba	127,34 ± 56,64 ^b	48,68 ± 18,10 ^a
Arg+Thr	221,12 ± 17,78 ^b	74,08 ± 14,72 ^a
Ala	158,93 ± 40,64 ^b	43,74 ± 13,15 ^a
Pro	94,02 ± 36,88 ^b	25,18 ± 6,57 ^a
Tyr	117,49 ± 32,82 ^b	28,54 ± 20,96 ^a
Val	447,45 ± 132,29 ^b	126,72 ± 50,23 ^a
Met	95,75 ± 29,56 ^b	24,70 ± 12,67 ^a
Cys	27,43 ± 18,01	16,85 ± 9,14
Ile	135,71 ± 33,99 ^b	26,24 ± 9,84 ^a
Leu	726,47 ± 270,15 ^b	274,71 ± 65,71 ^a
Phe	170,72 ± 38,87 ^b	78,29 ± 16,32 ^a
Trp	103,52 ± 25,90	84,62 ± 18,44
Orn	ND ^a	71,31 ± 15,25 ^b
Lys	474,44 ± 121,10 ^b	144,89 ± 57,91 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasteurizada)

Valores con distinto superíndice para cada aminoácido (mg/100 g de queso) fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico.

Finalmente, reseñar que en los quesos elaborados con leche cruda no fue detectada la presencia de Orn a diferencia de lo que ocurría en los de leche pasteurizada. Un resultado similar fue encontrado por (Krause et al., 1997), que observaron que en algunos de los quesos tratados térmicamente en su estudio la cantidad de Orn se veía reducida de forma significativa. Las propiedades bioactivas descritas para la Orn y Gaba (Diana et al., 2014), podrían resultar muy interesantes a la hora de abordar la comercialización del queso de oveja desde un punto de vista más saludable, destacando el queso Zamorano elaborado con leche pasteurizada por su

mayor contenido en Orn, mientras que el elaborado con leche cruda presentaba mayores niveles de Gaba.

El análisis de componentes principales permitió agrupar los datos de aminoácidos libres con dos CP que explicaban el 84,11% de la variación (figura C2.3). Además, este análisis permitió una separación clara de los quesos en función de si había o no sido aplicado tratamiento térmico a la leche de oveja. Comprobamos que los lotes de queso Zamorano elaborados con leche cruda estaban asociados con el CP1 en la zona positiva, mientras que los lotes elaborados con leche pasteurizada, aunque asociados al CP1 lo hacían en su zona negativa.

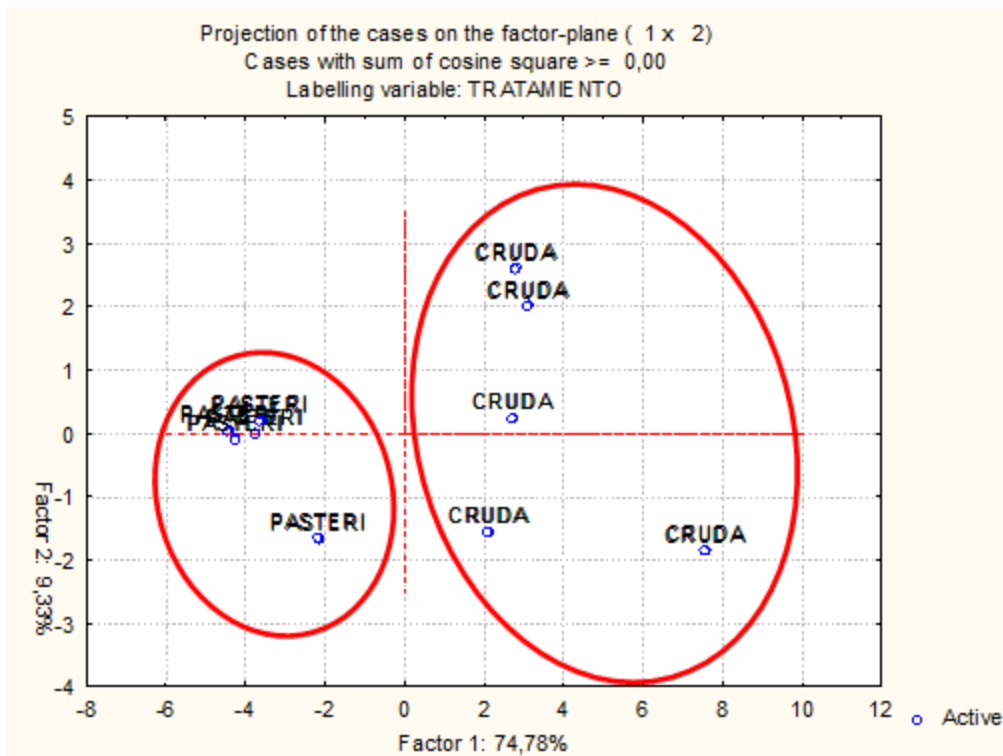


Figura C2.3. Análisis de componentes principales para el estudio de aminoácidos libres en el queso Zamorano con 240 días de maduración en función del tratamiento térmico.

Al estudiar la proyección de las variables (figura C2.4) se observó como todos los aminoácidos estaban fuertemente relacionados con el CP1 en su componente positiva (en la mayoría de los casos por encima del 0,90), excepto la Orn que lo hace en su componente negativa (-0,85), donde se agrupaban todos los quesos elaborados con leche pasteurizada. Estudios en quesos Grana Padano elaborados con leche cruda obtuvieron cantidades bajas de Cit y residuales de Orn (D’Incecco et al., 2016). Estos aminoácidos se generan por catabolismo de la Arg a través de la vía de la arginina desaminasa, lo que ocurre de forma común en las especies de LAB, principalmente heterofermentativas (Fröhlich-Wyder et al., 2015). Esta vía catabólica se desencadena ante situaciones de estrés (como son altas temperaturas y bajo pH) como forma alternativa de encontrar energía. El modelo aceptado implica la absorción de Arg libre en la célula bacteriana por un sistema antitransportador y su degradación en Cit por la

arginina desaminasa. La Cit intracelular puede excretarse al medio o convertirse en Orn mediante las enzimas citoplasmáticas ornitín-transcarbamilasa y carbamato quinasa. Posteriormente, la Orn se excretaría al medio (D'Incecco et al., 2016). Por lo tanto, pensamos que la ausencia de Orn en el queso crudo junto a una mayor cantidad de Cit en los quesos elaborados con leche cruda respecto a los pasterizados implicarían un mayor estrés en las BAL supervivientes al tratamiento térmico, buscando una alternativa diferente a la hora de obtener energía.

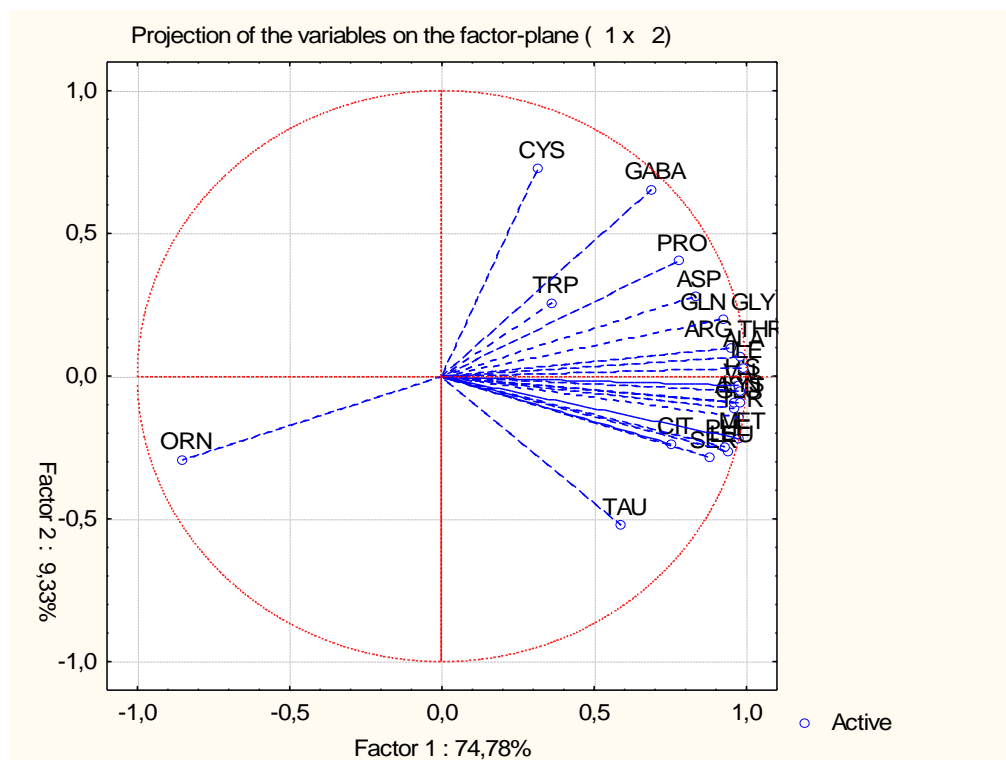


Figura C2.4. Análisis de componentes principales para el estudio de aminoácidos libres en función del tratamiento térmico mediante la representación de las proyecciones.

4.2.3.5 Aminas biógenas

La tabla C2.7 muestra el contenido medio de aminas biógenas en el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada al cabo de 240 días de maduración.

Los contenidos de todas las aminas biógenas presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los quesos de 240 días de maduración elaborados con leche cruda y con leche pasterizada, con la excepción de la cadaverina y espermidina. Las diferencias más acusadas, a nivel individual, fueron observadas para la feniletilamina, putrescina y espermina, cuyas concentraciones en el queso Zamorano elaborado con leche cruda fueron aproximadamente 9,6, 6,3 y 2,4 veces superiores, respectivamente, a las encontradas en el queso elaborado con leche pasterizada. Cabe destacar que, si bien triptamina e histamina presentaron diferencias

significativas entre ambos tipos de quesos, sus valores no fueron especialmente superiores en los lotes de queso elaborados con leche cruda.

El contenido total en aminas biógenas en el queso Zamorano elaborado con leche cruda con 240 días de maduración fue de 529,58 mg/kg frente a los 172,17 mg/kg de queso Zamorano elaborado con leche pasteurizada. Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores para quesos de similares características (Gaya et al., 2005; Gennaro et al., 2003; Schneller et al., 1997), si bien, en todos estos estudios la concentración final de aminas biógenas fue muy superior a la obtenida para el queso Zamorano. En un trabajo reciente realizado por Renes et al. (2019) sobre queso Zamorano elaborado con leche pasteurizada, el contenido total de aminas biógenas resultó ser superior al nuestro. En general, estas diferencias entre variedades de quesos estaban asociadas, por una parte, con las condiciones higiénico-sanitarias establecidas durante su elaboración y, por otra, con los recuentos microbianos mantenidos a lo largo de la maduración (Pintado et al., 2008).

Tabla 2.7.- Contenido en aminas biógenas del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada a los 240 días de maduración.

	Tratamiento térmico	
	Cruda	Pasterizada
Try	22,81 ± 8,14 ^b	15,28 ± 4,50 ^a
Phe	210,84 ± 273,38 ^b	21,90 ± 30,47 ^a
Put	101,88 ± 101,94 ^b	16,14 ± 4,94 ^a
Cad	32,15 ± 1,78	33,63 ± 2,91
Ht	27,23 ± 6,92 ^b	15,26 ± 6,19 ^a
Tyr	61,08 ± 20,46 ^b	39,03 ± 5,72 ^a
Spd	6,75 ± 5,89	3,22 ± 2,82
Sp	66,85 ± 11,76 ^b	27,69 ± 4,28 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasterizada)

Valores con distinto superíndice para cada amina biógena (mg/kg de queso) fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico.

Try: triptamina; Phe: feniletilamina; Put: putrescina; Cad: cadaverina; Ht: histamina; Tyr: tiramina; Spd: espermidina; Sp: espermina.

El queso Zamorano elaborado con leche cruda presentó unos recuentos tanto de mesófilos aerobios totales en PCA como en MRS de 7,78 y 8,20 (log ufc/g), respectivamente, mientras que los elaborados con leche pasteurizada se redujeron entre 2 y 4 log ufc/g (tabla C2.2). De igual manera, los quesos elaborados con leche cruda presentaron mayores recuentos de enterobacteriáceas que los elaborados con leche pasteurizada durante las primeras etapas de la maduración y, además, se mantuvieron viables durante más tiempo (ver apartado sobre el efecto del tiempo de maduración). La presencia de recuentos microbianos altos, especialmente de enterococos y enterobacterias, ha sido relacionada con mayores concentraciones de aminas biógenas en el queso (Schneller et al., 1997), las cuales han sido

asociadas por algunos autores a una importante actividad descarboxilasa atribuida a estos géneros (Pintado et al., 2008; Tittarelli et al., 2019). No obstante, consideramos que las principales diferencias en el contenido en aminas biógenas entre los lotes de queso Zamorano elaborados con leche cruda y pasteurizada estuvieron relacionadas con la mayor presencia dentro de microbiota láctica de especies del género *Lactobacillus* y, sobre todo, por un mayor grado de profundidad de la proteólisis en los quesos elaborados con leche cruda. De hecho, el contenido medio en aminoácidos libres en el queso Zamorano elaborado con leche cruda en esta fase de la maduración triplicó el presentado por los quesos elaborados con leche pasteurizada. Fernandez-Garcia et al. (2000) también señalaron que, en los quesos de leche cruda, era más probable hallar la presencia de una población considerable de bacterias lácticas con actividad descarboxilasa positiva, pudiendo contribuir el mayor contenido en aminoácidos libres a la mayor formación de aminas biógenas, como también fue observado en nuestro trabajo.

Por otra parte, otro factor importante que contribuiría a explicar las diferencias de concentración de aminas biógenas entre el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada, vendría determinado por la presencia del piridoxal fosfato, ya que como señalan (Novella-Rodriguez et al., 2003), dicho compuesto actúa como cofactor en la actividad descarboxilasa, siendo inactivado durante la pasteurización de la leche.

Finalmente, señalar que la no detección de Orn en las muestras de queso elaborado con leche cruda, podría estar relacionada con su transformación en aminas biógenas. En el estudio llevado a cabo por Benkerroum (2016), se describe cómo la Orn puede sufrir una reacción de descarboxilación mediante la enzima ornitina-descarboxilasa transformándose en putrescina y liberando CO₂. Según este autor, en esta vía se produce una fuerza motriz de protones para que las bacterias puedan resistir el estrés ácido (condiciones del queso) y generar una reserva de ATP para sobrevivir a épocas de escasez de nutrientes. Esta enzima ornitina-descarboxilasa es especialmente común entre las enterobacterias pero, además, también puede presentarse en bacterias lácticas de los géneros lactobacilos y enterococos pueden también contribuir a la formación de putrescina (Barbieri et al., 2019). En los quesos con leche cruda se dieron las condiciones de mayores recuentos de enterobacterias en las primeras fases de la maduración y unos recuentos de putrescina mucho más elevados que para los quesos de leche pasteurizada.

4.2.4 Parámetros lipolíticos

El grado de lipólisis sufrido por el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada a los 240 días de maduración se llevó a cabo analizando el índice de acidez de la grasa y el contenido en ácidos grasos libres (FFA), los cuales se muestran en la tabla C2.8.

Tanto los valores del índice de acidez de la grasa como el contenido en FFA se vio influenciado significativamente ($p \leq 0,05$) por el tratamiento de pasterización utilizado en la elaboración del queso Zamorano. Los quesos elaborados con leche cruda presentaron mayores concentraciones de FFA que los elaborados con leche pasterizada, excepto para $C_{10:1}$, $C_{16:1}$ y los isómeros del $C_{18:2}$. El contenido total de FFA y el índice de acidez de la grasa en los quesos de leche cruda resultó ser aproximadamente un 40% superior al obtenido en los de leche pasterizada. Chávarri et al. (2000) en un estudio sobre el queso de oveja Idiazábal con 180 días de maduración elaborado con leche pasterizada describieron también un 30% menos de ácidos grasos libres que en los quesos elaborados con leche cruda.

En nuestro estudio, el ácido oleico ($C_{18:1}$) prácticamente duplicó el contenido en los quesos de leche cruda (47,93 mg/100 g de queso) con respecto a los de leche pasterizada (26,15 mg/100 g de queso). Porcentualmente, los quesos de leche pasterizada presentaron mayor cantidad de $C_{4:0}$, $C_{6:0}$ y $C_{18:0}$ que los de leche cruda, aunque, estos presentaron un porcentaje ligeramente superior en el resto de FFA y notablemente superior en el $C_{18:1}$ (resultados no mostrados). Así, pues, tanto en los quesos de leche cruda como en los de leche pasterizada, los FFA mayoritarios serían $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ y $C_{18:1}$, representando su suma aproximadamente el 51% y el 46% del total de los FFA, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los descritos por Zengin et al. (2011) para quesos de oveja turcos, en los que los FFA mayoritarios también fueron $C_{16:0}$, $C_{14:0}$ y $C_{18:1}$.

La cantidad de SFA, MUFA y PUFA fue también superior en los quesos elaborados con leche cruda, observándose diferencias significativas en los mismos ($p \leq 0,05$). El SFA mayoritario fue el $C_{16:0}$, mientras que MUFA mayoritario fue el $C_{18:1}$, tal como hemos señalado previamente y que está relacionado en el contenido en que se presentan de manera natural en la grasa de los rumiantes. En cambio, el porcentaje de SFA y MUFA (80-81% y 17-15%, respectivamente) resultó similar con independencia del tratamiento térmico, siendo estos resultados similares a los obtenidos por otros autores (Chávarri et al., 2000; Zengin et al., 2011).

La importancia de los FFA en el queso radica en su influencia en el perfil sensorial tanto positiva como negativamente, sobre todos los ácidos grasos libres de cadena corta ($C_{2:0}$ - $C_{12:0}$). Además, también se relacionan con sensaciones trigeminales como el picante que produce el $C_{4:0}$ (butírico), principalmente en quesos de larga maduración (Hickey et al., 2007; Sert et al., 2014). De nuevo, los quesos elaborados con leche cruda presentaron un mayor contenido en FFA de cadena corta siendo significativamente distintos ($p \leq 0,05$) de los lotes elaborados a partir de leche pasterizada. Estas diferencias en el grado de lipólisis estarían asociadas probablemente con la inactivación de la lipasa de la leche durante la pasterización (Aydemir, 2018; Hickey et al., 2007), así como a la mayor biodiversidad microbiana que presenta el queso elaborado con leche cruda, la cual contribuye con sus enzimas lipolíticas. Tanto la lipasa nativa

de la leche como las microbianas se caracterizan por hidrolizar específicamente los ácidos grasos esterificados en las posiciones sn1 y sn3 de los triacilglicéridos, que es donde se sitúan principalmente los ácidos grasos de cadena corta en la grasa láctea (Campbell and Marshall, 2016).

Tabla C2.8. Contenido medio de ácidos grasos libres (FFA) (mg/100 g grasa) del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada al cabo de 240 días de maduración.

	Tratamiento térmico	
	Cruda	Pasterizada
IAG	3,28 ± 0,41 ^b	2,20 ± 0,83 ^a
C _{2:0}	9,69 ± 3,15 ^b	2,53 ± 0,15 ^a
C _{4:0}	14,32 ± 0,94 ^b	9,93 ± 0,90 ^a
C _{6:0}	27,42 ± 1,60 ^b	19,95 ± 4,57 ^a
C _{8:0}	7,88 ± 0,74 ^b	5,56 ± 2,50 ^a
C _{10:0}	30,37 ± 2,72 ^b	19,54 ± 7,40 ^a
C _{10:1}	0,72 ± 0,14	0,79 ± 0,36
C _{12:0}	19,83 ± 2,69 ^b	10,33 ± 5,41 ^a
C _{14:0}	41,51 ± 4,98 ^b	22,56 ± 9,34 ^a
C _{14:1}	1,21 ± 0,15 ^b	0,46 ± 0,28 ^a
C _{15:0}	2,78 ± 0,33 ^b	1,65 ± 0,75 ^a
C _{16:0}	62,58 ± 7,03 ^b	35,85 ± 13,52 ^a
C _{16:1}	1,39 ± 0,18	1,29 ± 0,76
C _{18:0}	22,83 ± 1,61 ^b	18,40 ± 4,69 ^a
C _{18:1}	47,93 ± 7,11 ^b	26,15 ± 11,19 ^a
C _{18:2}	6,96 ± 1,79 ^b	4,06 ± 2,21 ^a
C _{18:3}	0,73 ± 0,21 ^b	0,41 ± 0,31 ^a
C _{18:2} CONJUGADO	0,52 ± 0,14	0,52 ± 0,19
SFA	239,20 ± 21,32 ^b	146,30 ± 48,37 ^a
MUFA	51,25 ± 7,22 ^b	28,69 ± 12,07 ^a
PUFA	8,22 ± 1,81 ^b	4,99 ± 2,68 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasterizada)

Valores con distinto superíndice para el índice de acidez de la grasa y los FFA fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico.

IAG: índice de acidez de la grasa (mg KOH/100 g de grasa); FFA (mg/100 g de queso) siendo acético [C_{2:0}], butírico [C_{4:0}], caproico [C_{6:0}], caprílico [C_{8:0}], cáprico [C_{10:0}], decenoico [C_{10:1}], láurico [C_{12:0}], mirístico [C_{14:0}], miristoleico [C_{14:1}], pentadecanoico [C_{15:0}], palmítico [C_{16:0}], palmitoleico [C_{16:1}], esteárico [C_{18:0}], oleico [C_{18:1}], linoleico [C_{18:2}], linolénico [C_{18:3}], octodecadienoico conjugado [C_{18:2} conjugado]; ácidos grasos saturados [SFA]; ácidos grasos monoinsaturados [MUFA]; ácidos grasos poliinsaturados [PUFA].

El análisis de componentes principales a los que fueron sometidos los ácidos grasos libres (figura C2.5), permitió establecer una división clara entre los quesos elaborados con leche cruda y pasterizada. Los dos primeros componentes principales explicaron el 88% de la varianza, estando los lotes de leche cruda asociados principalmente con la zona positiva del componente CP1 y los de leche pasterizada con la zona negativa del componente CP1. Así mismo, pudo observarse cómo los lotes de queso Zamorano elaborados con leche cruda estaban mucho más agrupados que los elaborados a partir de leche pasterizada, los cuales presentaron un mayor grado de dispersión.

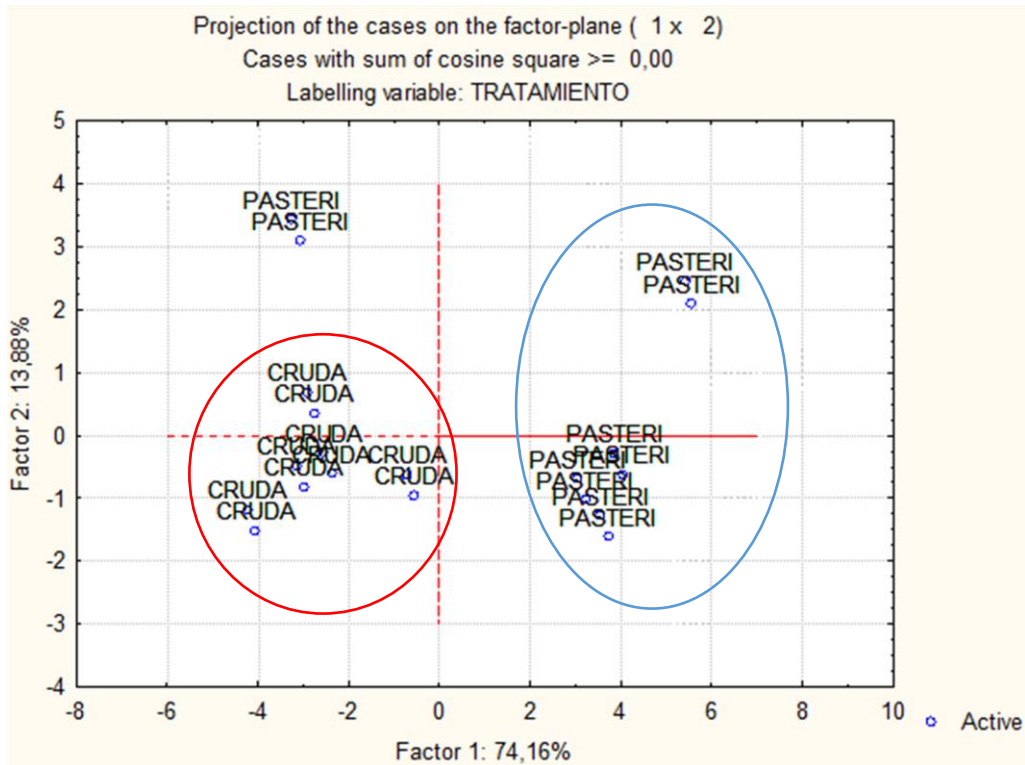


Figura C2.5. Análisis de componentes principales para el estudio de los ácidos grasos libres del queso Zamorano en función del tratamiento térmico.

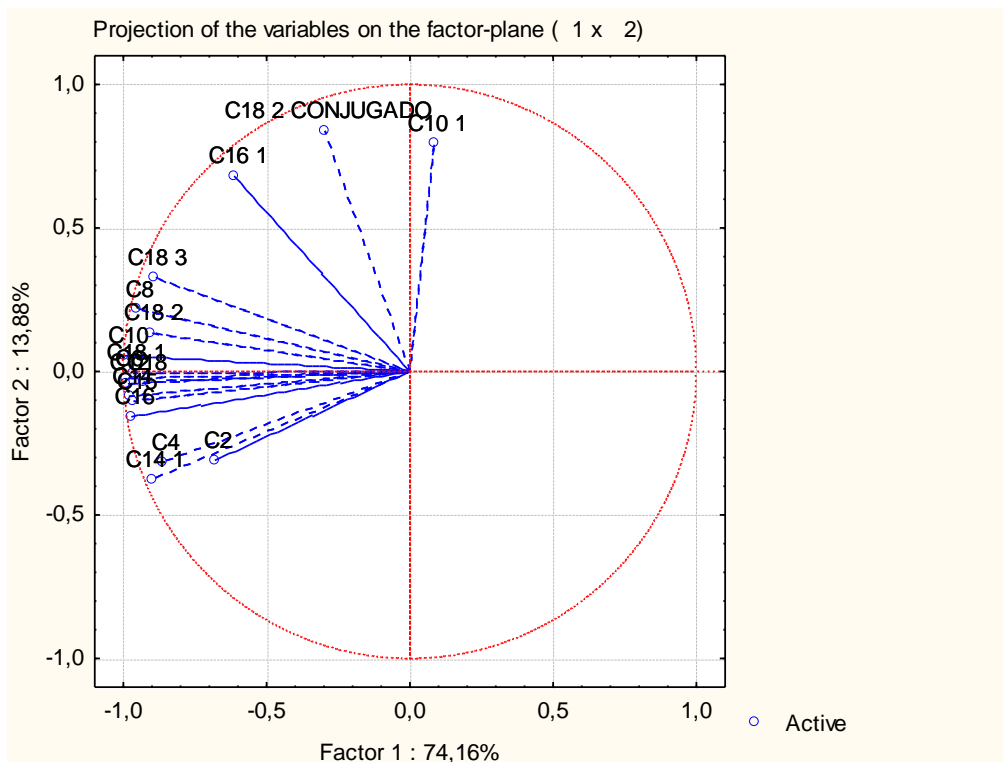


Figura C2.6. Análisis de componentes principales para el estudio de los ácidos grasos libres en el queso Zamorano en función del tratamiento térmico mediante la representación de las proyecciones.

Si nos centramos en la proyección de las variables (figura C2.6) podemos observar cómo en su mayoría los FFA están altamente correlacionados con el componente negativo del CP1 (con valores cercanos al -0,9), excepto $C_{2:0}$, $C_{10:1}$, $C_{16:1}$ y los isómeros del $C_{18:2}$ que presentaron una baja correlación. Del mismo modo, los isómeros del $C_{18:2}$ mostraron una correlación positiva (0,83) con el CP2.

De esta manera queda muy clara la asociación de los ácidos grasos, en su mayoría, con los lotes de leche cruda por agruparse también en la componente negativa del CP1, ya que todos esos FFA presentaron unas concentraciones más altas para los quesos de leche cruda. Las excepciones ya mencionadas asociadas con la componente positiva del CP2 se sitúan en la zona correspondiente a lotes de queso elaborado con leche pasteurizada debido a que para estos FFA las cantidades o fueron similares o incluso superiores a los lotes de leche cruda.

4.2.5 Análisis del Perfil de Textura

El conocimiento del comportamiento que presenta la textura es muy importante para la percepción que el consumidor va a tener sobre la calidad del queso. Dada la complejidad del análisis de la textura, se hace preciso corroborar los resultados obtenidos por el panel de cata mediante índices más objetivos que incluyen el uso de métodos instrumentales (Viñas et al., 2007).

En la tabla C2.9 se muestran los valores medios de diferentes parámetros correspondientes al análisis del perfil de textura del queso Zamorano elaborados con leche cruda y pasteurizada a los 240 días de maduración.

Tabla 2.9. Valores medios de los parámetros de textura del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración.

	Tratamiento térmico	
	Cruda	Pasteurizada
Fracturabilidad	61,54 ± 7,48 ^a	74,83 ± 17,54 ^b
Dureza	202,36 ± 21,73	228,98 ± 34,89
Adhesividad	-4,20 ± 2,27	-5,27 ± 1,94
Cohesividad	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Elasticidad	0,29 ± 0,03 ^a	0,43 ± 0,06 ^b
Gomosidad	26,96 ± 4,41	29,86 ± 5,47
Masticabilidad	7,82 ± 1,36 ^a	12,81 ± 3,20 ^b

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasteurizada).

Valores con distinto superíndice para cada parámetro de fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico.

Fracturabilidad (N); dureza (N), adhesividad (Nxs); Elasticidad (mm); el resto de parámetros son adimensionales.

Apenas se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de la mayoría de los parámetros de textura analizados, excepto en el caso de la fracturabilidad, elasticidad y masticabilidad, cuyos valores medios fueron significativamente ($p \leq 0,05$) inferiores en el queso Zamorano elaborado con leche cruda.

En principio podría resultar llamativo que las muestras de queso elaboradas con leche cruda, que presentaban el mayor porcentaje de extracto seco, fueran las que tuvieron menor fracturabilidad y masticabilidad. Sin embargo, los quesos elaborados con leche cruda se caracterizaron por un menor contenido en proteína y mayor contenido en materia grasa, los cuales contribuirían a la formación de una matriz proteica menos densa y lubricada, precisando de menor grado de masticación para su deglución. A este hecho, también podría contribuir la mayor extensión y profundidad de la proteólisis que mostraron los quesos elaborados con leche cruda y coincide con los resultados encontrados por otros autores (Kirmaçi et al., 2014) donde el aumento de la proteólisis conduce a una menor dureza y por lo tanto una menor masticabilidad ya que este parámetro depende de la dureza.

4.2.6 Análisis Sensorial

Las puntuaciones medias otorgadas por el panel de cata para los diferentes atributos sensoriales analizados: apariencia, olor, textura y sabor, en el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasterizada al cabo de 240 días de maduración se recogen en la tabla C2.10; también se incluyen las valoraciones globales otorgadas a cada uno de los quesos.

En cuanto a la apariencia, todos presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$), recibiendo las mayores puntuaciones los quesos elaborados con leche cruda, los cuales se caracterizaron por coloraciones amarillento-pajizas y un mayor número ojos, así como una distribución más uniforme de los mismos.

Un comportamiento muy similar al señalado para la apariencia, también fue descrito para los atributos del olor, estableciéndose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre todos ellos, correspondiendo las mayores puntuaciones a los quesos de leche cruda excepto para el olor a cera que no presentó diferencias significativas. Estos resultados fueron similares a los descritos por Aydemir y Dervisoglu (2010) y Westling et al. (2016) que encontraron que los quesos de leche cruda presentaron una mayor intensidad de aroma y sabor.

Todos los parámetros relacionados con la textura presentaron mayores valoraciones en quesos de leche cruda, siendo significativamente diferentes de los lotes elaborados con leche pasterizada ($p \leq 0,05$). Estos resultados no fueron coincidentes con los analizados instrumentalmente, resultando incluso contrapuestos para algún parámetro. La elasticidad, la dureza y la adhesividad medidas de forma instrumental fueron mayores en los quesos de leche pasterizada, mientras que obtuvieron menores puntuaciones por el panel de cata. Por su parte, Aydemir y Dervisoglu (2010) reseñaron que los quesos elaborados con leche cruda eran más firmes y elásticos, mientras que los elaborados con leche pasterizada presentaban una textura más granular. Con respecto a otros parámetros evaluados, sí que se observó concordancia entre la textura medida instrumentalmente y con el panel de cata, ya que, por ejemplo, los

lotes de queso elaborados con leche pasteurizada presentaron mayor gomosidad instrumental y resultaron ser menos solubles según el panel de cata.

En cuanto a los atributos del sabor, ninguno de los descriptores evaluados presentó diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre el queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada, excepto para el sabor amargo y el regusto y persistencia. El sabor amargo recibió mayor puntuación en los quesos de leche pasteurizada, mientras que el regusto y persistencia fueron mejor valorados en los quesos de leche cruda. Este mayor grado de amargor estaría probablemente relacionado con la mayor relación de péptidos hidrofóbicos que presentaron los quesos elaborados con leche tratada térmicamente (Gómez et al., 1997; Topçu and Saldamli, 2006). Ballesteros et al. (2006) también obtuvieron mayores puntuaciones respecto al sabor característico a leche de oveja en los quesos Manchego elaborados con leche cruda. Mendia et al. (2000), en el estudio madurativo del queso Idiazábal a partir de leche cruda, concluyeron que cuanto mayor era el grado de proteólisis y de degradación de α - y β -cn y mayores valores para las fracciones nitrogenadas y de aminoácidos libres, mayores eran las puntuaciones para los atributos olfativos y gustativos. Por consiguiente, y teniendo en cuenta que los quesos Zamorano elaborados con leche cruda en nuestro estudio mostraron también un mayor grado de profundidad de proteólisis y resto de requisitos indicados anteriormente, parece lógico que fueran los que presentaran mejores puntuaciones para la mayoría de parámetros sensoriales. Hecho que posteriormente fue corroborado por la valoración global de los quesos, en la cual los quesos de leche cruda recibieron puntuaciones de 7,25 frente a 6,91 para los de leche pasteurizada.

En todos los casos, independientemente de haber o no diferencias significativas, los lotes de queso obtenidos con leche cruda fueron los que arrojaron unas mejores puntuaciones, hecho que posteriormente fue constatado por el panel de consumidores (tabla C2.11), donde, aunque la valoración global fue buena, resultó ser algo más baja (6,31 y 6,08 para cruda y pasteurizada, respectivamente) que la otorgada por el panel de cata.

Tabla C2.10. Valores medios de diferentes atributos sensoriales relacionados con el aspecto, olor, textura y sabor, así como la valoración global del producto del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración.

Tipo de leche		
	Cruda	Pasteurizada
ASPECTO		
Intensidad de color	4,31 ± 0,70 ^b	3,65 ± 0,46 ^a
Tamaño de ojos	4,29 ± 0,87 ^b	3,44 ± 0,70 ^a
Nº de ojos	4,26 ± 0,76 ^b	3,49 ± 0,72 ^a
OLOR		
Láctico	5,03 ± 0,63 ^b	4,20 ± 0,46 ^a
Fresco, limpio	5,06 ± 0,64 ^b	4,10 ± 0,42 ^a
Plantas aromáticas	4,57 ± 0,63 ^b	4,03 ± 0,33 ^a
Aceitoso, graso	4,54 ± 0,54 ^b	3,93 ± 0,40 ^a
Frutos secos	4,46 ± 0,49 ^b	3,97 ± 0,33 ^a
Vainilla	4,46 ± 0,56 ^b	3,98 ± 0,21 ^a
Cera	4,31 ± 0,49	4,00 ± 0,29
TEXTURA		
Elasticidad	4,34 ± 0,57 ^b	3,74 ± 0,61 ^a
Friabilidad	4,63 ± 0,61 ^b	3,59 ± 0,65 ^a
Adhesividad	4,46 ± 0,61 ^b	3,66 ± 0,76 ^a
Granulosidad	4,43 ± 0,48 ^b	3,39 ± 0,63 ^a
Solubilidad	4,68 ± 0,55 ^b	3,73 ± 0,68 ^a
Dureza	4,57 ± 0,54 ^b	3,83 ± 0,35 ^a
Mantecosisidad	4,48 ± 0,52 ^b	3,63 ± 0,41 ^a
Rugosidad	4,26 ± 0,58 ^b	3,60 ± 0,63 ^a
Sequedad	4,14 ± 0,72 ^b	3,44 ± 0,56 ^a
SABOR		
Salado	3,72 ± 0,68	3,88 ± 0,30
Leche fresca	4,37 ± 0,82	3,76 ± 0,50
Ácido	3,71 ± 0,84	3,36 ± 0,48
Picante	4,06 ± 0,80	3,90 ± 0,56
Dulzón	3,89 ± 0,88	3,82 ± 0,50
Amargo	3,08 ± 0,44 ^a	3,77 ± 0,89 ^b
Regusto y persistencia	4,58 ± 0,61 ^b	3,81 ± 0,55 ^a
VALORACIÓN GLOBAL		
Valoración global	7,25 ± 0,31	6,91 ± 0,42

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasteurizada).

Valores con distinto superíndice para cada atributo del análisis sensorial fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico.

Los atributos relacionados con los parámetros de aspecto, olor, textura y sabor se puntuaron entre 1 y 7.

La valoración global se evaluó entre 1 y 10.

Tabla C2.11. Valores medios de diferentes atributos sensoriales relacionados con el aspecto, olor, textura y sabor, así como la valoración global del del queso Zamorano elaborado con leche cruda y pasteurizada al cabo de 240 días de maduración, realizado mediante panel de consumidores.

	Tipo de leche	
	Cruda	Pasteurizada
Aspecto	5,33 ± 0,43	5,29 ± 0,40
Olor	6,03 ± 0,46	5,87 ± 0,30
Sabor	6,84 ± 0,46 ^b	6,21 ± 0,46 ^a
Textura/Trigeminales	5,40 ± 0,33 ^b	5,12 ± 0,30 ^a
Valoración global	6,31 ± 0,30 ^b	6,08 ± 0,48 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (5 de cruda y 5 de pasteurizada).

Valores con distinto superíndice para cada parámetro del análisis sensorial fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tratamiento térmico.

Todos los parámetros evaluados se puntuaron entre 1 y 10.

4.3 Influencia de la raza en las características del queso Zamorano

4.3.1 Análisis químicos y fisicoquímicos

En la tabla C3.1 se muestran los valores medios correspondientes a los principales parámetros químicos y fisicoquímicos de la leche de partida y de los quesos elaborados con la misma al cabo de 240 días de maduración.

Tabla C3.1. Contenidos medios de los principales parámetros químicos y fisicoquímicos de la leche y del queso Zamorano elaborado con la misma al cabo de 240 días de maduración.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
<i>Leche</i>					
Extracto seco	18,61 ± 0,05 ^b	17,82 ± 0,11 ^a	17,42 ± 0,31 ^a	17,71 ± 0,09 ^a	17,81 ± 0,17 ^a
Grasa	7,71 ± 0,02 ^c	7,05 ± 0,03 ^b	6,48 ± 0,20 ^a	6,57 ± 0,04 ^a	6,78 ± 0,21 ^a
Proteína	5,53 ± 0,02 ^b	5,21 ± 0,04 ^a	5,17 ± 0,06 ^a	5,16 ± 0,06 ^a	5,20 ± 0,03 ^a
Lactosa	5,08 ± 0,01 ^c	5,22 ± 0,01 ^d	5,07 ± 0,04 ^{bc}	5,10 ± 0,02 ^b	5,01 ± 0,01 ^a
<i>Queso</i>					
Extracto seco	70,42 ± 1,07 ^a	73,26 ± 0,50 ^b	71,92 ± 1,85 ^b	72,50 ± 0,20 ^b	72,76 ± 0,16 ^b
Grasa	52,20 ± 0,39	52,19 ± 4,78	50,76 ± 0,54	52,76 ± 2,00	53,61 ± 1,66
Proteína	26,82 ± 0,34	27,08 ± 0,85	27,10 ± 0,29	27,07 ± 0,25	27,39 ± 0,95
Cloruros	1,87 ± 0,07	1,96 ± 0,21	1,88 ± 0,08	1,96 ± 0,16	2,03 ± 0,08
S/H	6,33 ± 0,46 ^a	7,30 ± 0,67 ^{bc}	6,69 ± 0,19 ^{ab}	7,13 ± 0,57 ^{bc}	7,44 ± 0,34 ^c
Lactosa	ND	ND	ND	ND	ND
pH	5,52 ± 0,07 ^b	5,31 ± 0,03 ^a	5,33 ± 0,04 ^a	5,34 ± 0,03 ^a	5,30 ± 0,02 ^a
AT	1,45 ± 0,19 ^a	1,68 ± 0,04 ^b	1,70 ± 0,07 ^b	1,69 ± 0,03 ^b	1,65 ± 0,03 ^b
A _w	0,934 ± 0,002 ^b	0,931 ± 0,004 ^b	0,932 ± 0,002 ^b	0,931 ± 0,001 ^b	0,924 ± 0,002 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para un mismo parámetro fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza. ND: No detectado.

Datos para leche (g/100 g de leche). Datos para queso: Extracto seco (g/100 g); Grasa (g/100 g ES); Proteína (g/100 g ES); Cloruros (g NaCl/100 g); S/H: sal/humedad (%); Lactosa (g/100 g ES); pH; AT: Acidez titulable (g ac. láctico/100 g ES); A_w: actividad de agua.

Todos los parámetros químicos de la leche presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza. El efecto más acusado fue observado para los contenidos en materia grasa y proteína, y, por ende, sobre el extracto seco total, al ser estos los parámetros que más contribuyeron al mismo. En todos los casos, las muestras con mayor proporción de leche de la raza Churra en su composición fueron las que presentaron los valores más altos de materia grasa, proteína y extracto seco. Mientras que a medida que se incorporaba leche de la raza Assaf, dichos valores se iban reduciendo, si bien sin establecerse diferencias significativas ($p \geq 0,05$) a partir de la mezcla 50%Ch:50%A. Estudios llevados a cabo por otros autores en

distintas razas de bovino (De Marchi et al., 2008; Vanbergue et al., 2017) o de cabra (Hayaloglu et al., 2013; Kondyli et al., 2012; Pizzillo et al., 2005) ya habían descrito la influencia del factor raza en la composición inicial de la leche. (Bland et al., 2015), que analizaron el efecto de la inclusión de leche de vaca Jersey (más rica en sólidos totales) con leche de vaca Holstein (con menor contenido en sólidos), utilizando los mismos porcentajes de mezcla que en nuestro estudio, concluyendo a través de los análisis de composición de la leche que había diferencias no sólo entre los parámetros composicionales de las leches de las diferentes razas sino también en función de las mezclas establecidas.

Con respecto a los quesos Zamorano elaborados, se pudo observar que el tipo de raza empleada ejerció diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para el contenido en extracto seco, sal/humedad, pH, acidez titulable y A_w , si bien en este último parámetro dichas diferencias fueron mínimas. Resulta curioso que sean los lotes de queso 100% Churra, cuya leche de partida presentó un mayor contenido en sólidos totales, fueran los que mostraron un menor contenido en extracto seco. Probablemente, estos valores estaban asociados con diferencias en el corte de la cuajada y su posterior agitación de los granos en la fase de desuerado durante la fabricación de los quesos. No obstante, han sido descritos resultados similares a los nuestros en otros estudios realizados con leche de cabra o vaca (Bland et al., 2015; Soryal et al., 2005). Lo que si fue observado en nuestro estudio es que el mayor contenido en sólidos totales de la leche de oveja Churra (atendiendo fundamentalmente al porcentaje de grasa y proteína) afectaba principalmente al rendimiento quesero. De hecho, a mayor concentración de leche Churra empleada en las elaboraciones de queso, más kg de queso fueron obtenidos (resultados no mostrados).

La ausencia de diferencias significativas en el contenido en grasa y proteína de los quesos, con valores medios similares independientemente del porcentaje de leche Churra o Assaf empleado, podría estar a mínimos cambios relacionados con la tecnología empleada. En la elaboración artesanal y siguiendo el procedimiento tradicional, no se lleva a cabo un control objetivo del proceso de coagulación y desuerado, pudiendo establecerse diferencias no solo en el contenido en humedad final del queso sino también en otros parámetros como el pH. Los mayores valores de pH en los quesos elaborados con leche 100% Churra estarían relacionados con el mayor grado de metabolización del ácido láctico y de proteólisis de los mismos como veremos más adelante, contribuyendo a la generación de compuestos alcalinizantes, que actúan incrementando el pH durante la maduración.

4.3.2 Análisis microbiológicos

En la tabla C3.2 se muestran los valores medios correspondientes a los recuentos de la microbiota aerobia mesófila total (PCA), láctica (MRS) y enterobacteriáceas (VRBGA) del queso Zamorano elaborados con diferentes mezclas de leche de ovejas de la raza Churra y Assaf al cabo de 240 días de maduración.

Tabla C3.2. Recuentos de las poblaciones microbianas analizadas en el queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche a los 240 días de maduración.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
PCA	7,36 ± 0,08 ^b	5,63 ± 0,12 ^a	5,46 ± 0,11 ^a	5,55 ± 0,09 ^a	5,30 ± 0,05 ^a
MRS	7,33 ± 0,07 ^c	3,70 ± 0,13 ^a	3,63 ± 0,21 ^a	3,54 ± 0,08 ^a	4,40 ± 0,04 ^b
VRBGA	ND	ND	ND	ND	ND

Valores medios ± desviación estándar de los recuentos (expresados en log ufc/g). Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para un mismo parámetro fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza. ND: No detectado.

Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los recuentos obtenidos tanto en PCA (microorganismos aerobios mesófilos totales) como en MRS (bacterias lácticas, en general) entre los lotes de quesos elaborados con leche 100% Churra y el resto de lotes elaborados con diferentes mezclas de leche provenientes de las razas Churra y Assaf. Los recuentos en PCA y MRS fueron del orden de 2 y casi 4 log ufc/g, respectivamente, más altos en los quesos elaborados con leche 100% Churra que en aquellos que se incluía leche de la raza Assaf en diferentes proporciones. Teniendo en cuenta que en todos los lotes en estudio fue aplicado el mismo tratamiento de pasterización a la leche y que fueron adicionados con el mismo tipo y dosis de cultivo iniciador, estas diferencias en los recuentos han sido debidas a que han experimentado un curso de acidificación diferente, con valores de pH y acidez titulable significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) para el lote elaborado con leche 100% Churra, tal como fue reflejado en la tabla C3.1. Los quesos elaborados con leche 100% Churra presentaron valores más bajos de humedad durante toda la maduración y una menor relación sal/humedad (en torno a 6), lo que permitiría el desarrollo no solo de las bacterias del cultivo iniciador sino también de la flora contaminante incorporada y que básicamente estaba constituida por lactobacilos. Este hecho es de gran importancia porque la microbiota del queso actúa modificando las condiciones fisicoquímicas del mismo y, a su vez éstas seleccionan las poblaciones existentes, a favor de aquéllas capaces de adaptarse mejor. Es decir, el queso constituye un complejo ecosistema y sus características microbiológicas y fisicoquímicas están plenamente interrelacionadas influyendo en la calidad final del mismo.

Finalmente, señalar que en ninguno de los quesos estudiados fue detectada la presencia de enterobacterias. El tratamiento térmico de pasterización de la leche, que se llevó

a cabo con objeto de su higienización y, posteriormente, las condiciones adversas que se establecieron a medida que avanzaba la maduración de los quesos, contribuyeron a inhibir su desarrollo.

4.3.3 Análisis de los parámetros proteolíticos

4.3.3.1 Fracciones Nitrogenadas

Entre los principales eventos bioquímicos que contribuyen a la maduración del queso, la proteólisis es el más complejo de todos ellos y el más ampliamente estudiado por la mayoría de investigadores. La proteólisis afecta a la textura (dureza, elasticidad, cohesión, entre otros parámetros) y es responsable del aroma y sabor de los quesos, en algunos casos con contribución negativa al aportar sabores amargos debido a que se pueden generar ciertos péptidos hidrofóbicos y de pequeño tamaño (Fox et al., 2016).

En la tabla C3.3 se presentan los valores medios correspondientes a las diferentes fracciones nitrogenadas del queso Zamorano elaborados con diferentes mezclas de leche de ovejas de la raza Churra y Assaf al cabo de 240 días de maduración.

En todas las fracciones nitrogenadas fueron establecidas diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los diferentes quesos. En general, los quesos elaborados a partir de leche con mayor porcentaje de la raza Churra fueron los que presentaron contenidos más altos para todas las fracciones nitrogenadas, correspondiendo los valores más bajos a los quesos elaborados con el 100% de leche de la raza Assaf.

Tabla C3.3. Fracciones nitrogenadas del queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche al cabo de 240 días de maduración.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
NS-pH4,6	21,25 ± 0,41 ^b	20,83 ± 0,94 ^b	21,16 ± 0,36 ^b	19,52 ± 0,62 ^a	18,56 ± 1,46 ^a
NS-TCA12%	7,90 ± 0,06 ^b	8,16 ± 0,37 ^b	7,92 ± 0,06 ^b	7,18 ± 0,05 ^a	6,94 ± 0,32 ^a
NS-PTA5%	2,66 ± 0,45 ^b	1,98 ± 0,69 ^a	2,12 ± 0,82 ^a	2,02 ± 0,97 ^a	1,98 ± 0,94 ^a
Npp	13,47 ± 0,23 ^d	12,72 ± 0,77 ^{bc}	13,20 ± 0,15 ^{cd}	12,15 ± 0,20 ^{ab}	11,68 ± 0,60 ^a
Np	5,23 ± 0,40 ^{ab}	5,97 ± 0,57 ^b	5,88 ± 0,49 ^b	5,49 ± 0,56 ^{ab}	4,96 ± 0,63 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para un mismo parámetro fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza.

NS-pH4,6: nitrógeno soluble a pH 4,6; NS-TCA12%: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% NS-PTA5%: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%; Npp: nitrógeno polipeptídico; Np: nitrógeno peptídico.

Valores expresados como % de cada una de las fracciones/nitrógeno total.

Por tanto, podemos señalar que tanto la extensión como la profundidad de la proteólisis fueron más acusadas en los quesos donde la leche utilizada en su elaboración contenía una mayor proporción de la raza Churra. Durante las primeras etapas de la

maduración (datos no mostrados) que abarcaban los primeros 4-6 meses, los quesos donde la proporción de leche Churra era del 50% o superior, presentaban valores de A_w y sal/humedad más bajos que el resto, facilitando la acción de la enzima coagulante y de las proteinasas y peptidasas microbianas, lo que dio lugar a alcanzar mayores % de NS-pH_{4,6} y de NS-TCA_{12%}, los cuales posteriormente apenas sufrieron cambios destacables. Por otra parte, los elevados recuentos en MRS en los quesos elaborados con leche 100% Churra serían los responsables de la intensa actividad aminopeptidasa desarrollada en los mismos como demuestra que su contenido en NS-PTA_{5%} resultó ser entre un 60-80% más alto que el del resto de los quesos. En un trabajo realizado por (Hayaloglu et al., 2013) en queso elaborado con leche de dos razas distintas de cabra, observó, como en nuestro trabajo, que la raza ejercía diferencias significativas en los contenidos de Nitrógeno Soluble en Agua (equivalente al NS-pH_{4,6}) y NS-PTA_{5%}, pero no en el de NS-TCA_{12%}.

Estudios genéticos recientes (Suárez-Vega et al., 2016) señalan una mejor aptitud de la raza Churra sobre la Assaf para la elaboración de quesos madurados, la cual se asociaba, en parte, con la mayor expresión de genes de proteasas endógenas, y con ello, una mayor facilidad para el desarrollo de los distintos procesos proteolíticos, lo que podría corroborar la mayor extensión y profundidad de la proteólisis de los quesos de leche 100% Churra.

4.3.3.2 Caseínas y sus productos de degradación

La tabla C3.4 muestra los valores medios de cada una de las caseínas y productos de su hidrólisis del queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche de ovejas de la raza Churra y Assaf al cabo de 240 días de maduración.

Tabla C3.4. Caseínas y sus productos de hidrólisis, expresados como % de la densidad óptica total, en el queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche al cabo de 240 días de maduración

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
γ_1 -cn	5,53 ± 0,87	5,36 ± 0,32	4,18 ± 1,07	5,31 ± 0,19	3,88 ± 2,46
γ_2 -cn	7,55 ± 1,42 ^b	6,52 ± 1,60 ^{ab}	6,15 ± 2,20 ^{ab}	7,53 ± 0,33 ^b	5,26 ± 0,27 ^a
γ_3 -cn	4,08 ± 0,01 ^b	3,03 ± 0,75 ^a	2,94 ± 0,79 ^a	2,77 ± 0,41 ^a	2,91 ± 0,80 ^a
β -cn	29,21 ± 4,38	29,91 ± 5,23	33,25 ± 3,96	32,21 ± 2,12	32,82 ± 1,27
α_s -cn	28,51 ± 1,56 ^b	30,29 ± 2,40 ^b	30,50 ± 3,39 ^b	27,54 ± 2,69 ^{ab}	26,46 ± 0,69 ^a
pre α_s -cn	27,11 ± 2,97	26,66 ± 4,24	26,50 ± 2,55	25,44 ± 0,71	25,60 ± 1,06

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para cada caseína y sus productos de degradación fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza.

La figura C3.1 presenta un electroferograma típico del queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche de ovejas de la raza Churra y Assaf con un tiempo de maduración de 240 días.

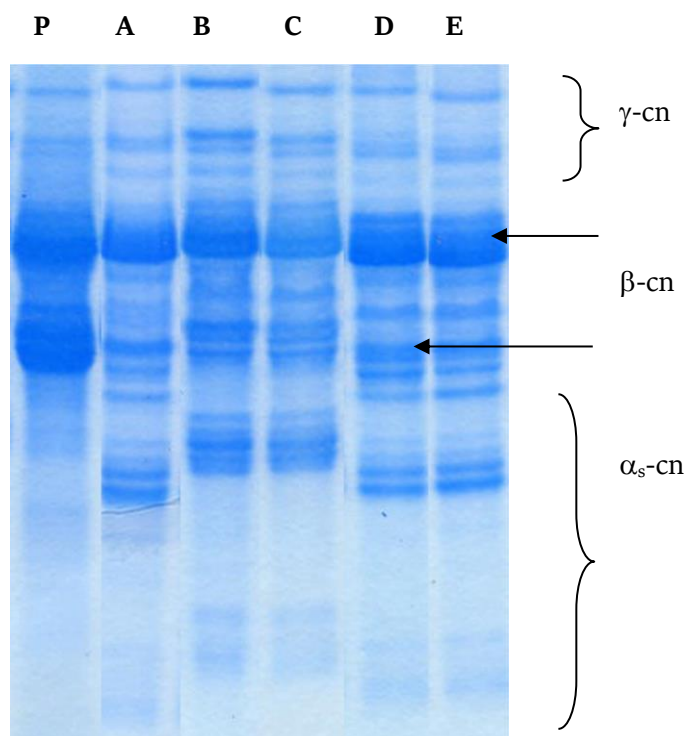


Figura 5. Electroferograma típico del queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche al cabo de 240 días de maduración. P: Patrón; A: 100% Churra; B: 75% Ch:25% A; C: 50% Ch:50% A; D: 25% Ch: 75% A; E: 100% A.

En general, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los quesos para la mayoría de fracciones de caseína estudiadas. Únicamente, se establecieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para las fracciones γ_2 -caseína, γ_3 -caseína y, también, para la α_s -caseína, obteniéndose los porcentajes mayores de las mismas en los quesos elaborados con un mayor porcentaje de leche de la raza Churra. Las fracciones de β -caseína y $\text{pre}\alpha_s$ -caseína, si bien no presentaron diferencias significativas, sus valores resultaron ser ligeramente superiores e inferiores, respectivamente, en los quesos elaborados con mayor proporción de leche Assaf en la mezcla. En los quesos de leche de oveja 100% Churra, la β -caseína sufrió una mayor degradación que se tradujo en un incremento de las fracciones de baja movilidad (γ_1 -caseína, γ_2 -caseína y γ_3 -caseína), resultando ser sus valores un 42% superiores a los obtenidos en los quesos elaborados con leche 100% Assaf; de igual manera, los quesos elaborados con leche 100% Churra presentaron unos valores medios para las fracciones de alta movilidad derivadas de la degradación de la α_s -caseína, que eran un 6% superiores a los obtenidos en los quesos con 100% de leche Assaf. Estos resultados corroboraron los obtenidos para las fracciones de

NS-pH_{4,6} y N polipeptídico y fueron indicativos de una mayor proteólisis primaria en los quesos elaborados con mayor proporción de leche Churra y que podría venir explicada por el establecimiento de unas condiciones ambientales más óptimas para la acción de la enzima coagulante y de las proteinasas microbianas. No obstante, la raza podría tener cierta influencia ya que estudios llevados a cabo por Perna et al. (2014) sobre la influencia de las razas de bovino Holstein y Parda italianas en la proteólisis, han mostrado patrones diferentes de degradación para la α_s -caseína y β -caseína.

4.3.3.3 Perfil de péptidos

En la tabla C3.5 se muestra el contenido en péptidos en tres zonas: hidrofílica, hidrofobicidad intermedia e hidrofóbica, así como también la relación de péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos en el queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche Churra y Assaf con 240 días de maduración.

Tabla C3.5. Áreas relativas de las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas de los cromatogramas a partir de los permeados del extracto soluble en el queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche a los 240 días de maduración.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
Zona 1	0,34 ± 0,01 ^c	0,27 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,01 ^a
Zona 2	0,38 ± 0,01 ^c	0,36 ± 0,01 ^b	0,35 ± 0,01 ^{ab}	0,33 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,01 ^{ab}
Zona 3	0,28 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,01 ^c	0,43 ± 0,01 ^d	0,41 ± 0,01 ^d
Hfob /Hfil	4,00 ± 0,11 ^a	5,35 ± 0,15 ^b	5,69 ± 0,16 ^{bc}	5,86 ± 0,16 ^c	6,69 ± 0,19 ^d

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para cada zona fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza.

Zona 1: péptidos hidrofílicos; Zona 2: péptidos de hidrofobicidad intermedia; Zona 3: péptidos hidrofóbicos; Hfob/Hfil: relación de péptidos hidrofóbicos respecto a hidrofílicos.

Los diferentes tipos de péptidos mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos tipos de quesos analizados. En los quesos elaborados con mayor proporción de leche de la raza Churra hubo un predominio muy marcado del grupo de péptidos hidrofílicos, a diferencia de lo observado en los quesos elaborados con un mayor porcentaje de leche de la raza Assaf, donde la fracción de péptidos hidrofóbicos fue la mayoritaria, representando más del 50% de los presentes en los quesos con mayor proporción en leche Churra. Estas tendencias fueron corroboradas por la relación hidrofóbicos/hidrofílicos, la cual resultó ser 1,7 veces superior en los quesos con mayor porcentaje de leche Assaf con respecto a aquellos en los que predominaba la leche Churra.

Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Hayaloglu et al. (2013), quienes apenas observaron influencia del efecto de la raza sobre el perfil de péptidos. No obstante, su estudio no tuvo en cuenta cómo eran afectados los diferentes tipos de péptidos en función de su hidrofobicidad o hidrofilia.

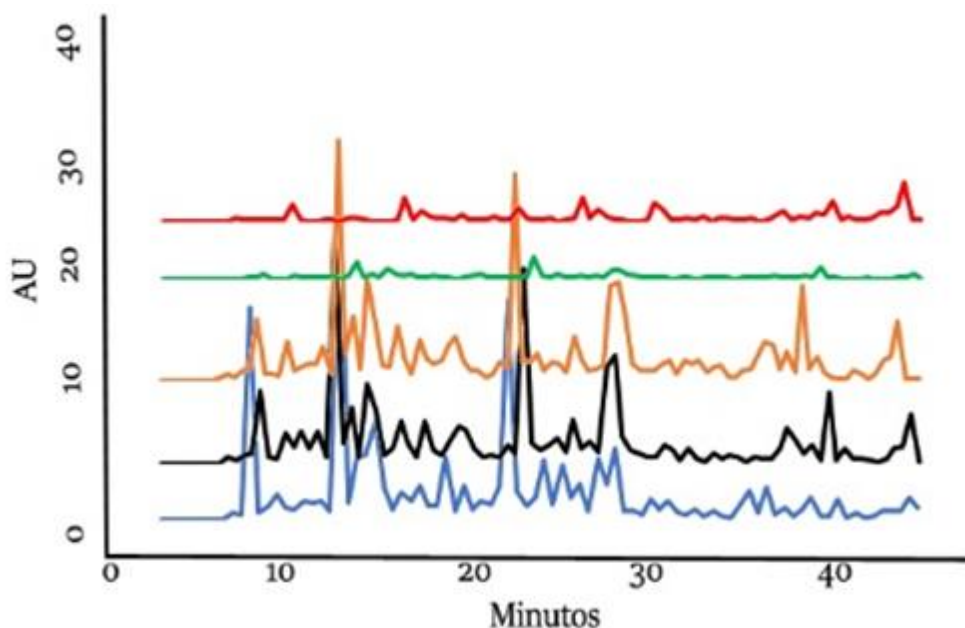


Figura C3.2. Evolución del perfil peptídico en función del tipo de leche. Líneas de color azul, negro, naranja, verde y rojo para 100% Churra, 75% Churra, 50% Churra, 25% Churra y 100% Assaf, respectivamente. Zona 1: 13-22 minutos; zona 2: 22-30 minutos; zona 3: 30-45 minutos.

4.3.3.4 Aminoácidos libres

La tabla C3.6 muestra los contenidos medios de los aminoácidos libres del queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche de ovejas de la raza Churra y Assaf con 240 días de maduración.

En todos los lotes de queso Zamorano se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el contenido total de aminoácidos libres, tanto a nivel global como individual. Los quesos Zamorano elaborados a partir de leche 100% Churra fueron los que presentaron el mayor contenido en aminoácidos (3085,50 mg/100 g de queso), mientras que los valores más bajos se correspondieron con los quesos elaborados con leche 100% Assaf (1515,69 mg/100 g de queso). El contenido total del resto de quesos analizados se mantuvo en valores intermedios, si bien aquellos donde predominó la presencia de leche de oveja Churra, mostraron niveles de aminoácidos libres ligeramente superiores. Estos resultados confirmaron el comportamiento descrito para la fracción de NS-PTA5%.

Nuestros datos fueron similares a los descritos por Poveda et al. (2004) para el queso Manchego elaborado con leche pasteurizada, donde obtuvieron valores medios totales de 2394 mg/100 g. Así mismo, también se encuentran dentro del rango descrito por Diana et al. (2014) para quesos de oveja y por Ferrazza (2002) y Renes et al. (2019) para queso Zamorano.

Tabla C3.6. Contenido medio de los aminoácidos libres en el queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche a los 240 días de maduración.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
Asp	40,55 ± 0,86 ^c	42,92 ± 0,93 ^d	39,85 ± 0,84 ^c	30,35 ± 0,58 ^b	25,05 ± 0,43 ^a
Glu	357,09 ± 9,82 ^b	120,90 ± 3,14 ^a	128,15 ± 3,34 ^a	119,89 ± 3,11 ^a	115,61 ± 2,99 ^a
Asn	193,64 ± 5,19 ^e	53,87 ± 1,52 ^c	66,49 ± 1,74 ^d	31,19 ± 0,60 ^a	40,21 ± 0,85 ^b
Ser	63,04 ± 1,50 ^d	46,63 ± 1,04 ^c	38,57 ± 0,81 ^{ab}	39,39 ± 0,97 ^b	36,32 ± 1,03 ^a
Gln+Gly	709,38 ± 19,78 ^d	323,38 ± 9,15 ^c	316,09 ± 8,80 ^c	217,29 ± 5,58 ^a	283,73 ± 7,46 ^b
His	32,41 ± 0,63 ^b	29,12 ± 0,68 ^a	29,29 ± 0,55 ^a	36,23 ± 0,74 ^c	33,32 ± 0,66 ^b
Cit	7,89 ± 0,34 ^a	38,24 ± 1,08 ^c	43,67 ± 0,95 ^d	20,30 ± 0,29 ^b	39,47 ± 0,83 ^c
Tau	121,44 ± 3,15 ^d	52,30 ± 1,20 ^c	41,48 ± 0,89 ^b	11,53 ± 0,04 ^a	12,31 ± 0,07 ^a
Gaba	26,08 ± 1,87 ^a	41,22 ± 0,88 ^b	47,92 ± 1,07 ^c	49,41 ± 0,41 ^c	78,76 ± 1,94 ^d
Arg+Thr	101,56 ± 2,59 ^c	67,61 ± 1,91 ^{ab}	71,54 ± 1,74 ^b	64,98 ± 1,56 ^a	64,70 ± 1,55 ^a
Ala	67,92 ± 1,64 ^c	39,63 ± 1,12 ^b	42,33 ± 0,91 ^b	34,55 ± 0,84 ^a	34,25 ± 0,69 ^a
Pro	26,63 ± 0,47 ^d	36,35 ± 1,03 ^e	23,70 ± 0,39 ^c	20,85 ± 0,31 ^b	18,37 ± 0,24 ^a
Tyr	68,02 ± 1,64 ^d	20,53 ± 0,58 ^c	21,87 ± 0,34 ^c	17,25 ± 0,35 ^b	15,04 ± 0,14 ^a
Val	220,99 ± 5,97 ^d	108,28 ± 2,78 ^{bc}	111,68 ± 2,88 ^c	91,23 ± 2,44 ^a	101,38 ± 2,58 ^b
Met	48,56 ± 1,09 ^d	19,64 ± 0,27 ^{bc}	20,55 ± 0,30 ^c	18,44 ± 0,38 ^b	16,29 ± 0,18 ^a
Cys	ND	23,71 ± 0,39 ^b	22,95 ± 0,37 ^b	18,80 ± 0,39 ^a	18,78 ± 0,25 ^a
Ile	42,67 ± 0,92 ^d	24,11 ± 0,68 ^b	29,33 ± 0,55 ^c	17,46 ± 0,35 ^a	17,64 ± 0,22 ^a
Leu	392,25 ± 10,81 ^d	274,20 ± 7,47 ^c	257,86 ± 7,01 ^c	212,19 ± 5,86 ^a	237,05 ± 6,42 ^a
Phe	95,49 ± 2,42 ^c	92,21 ± 2,61 ^c	57,98 ± 1,36 ^a	61,98 ± 1,47 ^a	83,76 ± 2,09 ^b
Trp	118,50 ± 3,07 ^c	79,77 ± 1,97 ^b	80,66 ± 2,00 ^b	68,35 ± 1,79 ^a	75,78 ± 1,86 ^b
Orn	99,33 ± 2,53 ^c	67,28 ± 1,62 ^b	68,07 ± 1,64 ^b	57,86 ± 1,50	63,99 ± 1,53 ^a
Lys	252,06 ± 6,85 ^d	138,54 ± 3,64 ^c	121,83 ± 3,16 ^b	108,12 ± 2,92 ^a	103,90 ± 2,94 ^a

Valores medios ± desviación estándar de los aminoácidos libres. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para cada aminoácido libre fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza. N.D. = no detectado.

El mayor contenido de cada uno de los aminoácidos libres analizados se obtuvo en los quesos con mayor porcentaje de leche de oveja Churra, a excepción de Cit, Gaba y Cys. Los aminoácidos mayoritarios en quesos de leche 100% Churra fueron la suma Gln+Gly, Leu, Glu, Lys, Val, Asn y Tau, representando casi el 73% del total de aminoácidos; mientras que para los quesos de leche 100% Assaf, los aminoácidos mayoritarios fueron la suma de Gln+Gly, Leu, Glu, Lys, Val, Phe y Gaba, los cuales representaron el 66% del total. Estos perfiles fueron muy similares a los descritos en otros estudios sobre queso Zamorano por Ferrazza (2002) y Renes et al. (2019), si bien en ellos incluían dentro del bloque de aminoácidos mayoritarios a la prolina. Como puede ser observado, los perfiles de los aminoácidos libres mayoritarios fueron prácticamente iguales en todos los quesos estudiados independientemente del tipo de raza utilizada en su elaboración, dado que la composición aminoacídica de las caseínas de la leche de oveja es invariable. Sin embargo, el contenido de los aminoácidos fue muy variable entre

los distintos tipos de queso debido a las diferencias observadas en cada uno de ellos a nivel fisicoquímico y microbiológico.

El análisis de componentes principales nos permitió agrupar nuestros datos (figura 3.3) con dos componentes principales (CP) se explicaban el 91,24% de la variación. Además, se observó de forma evidente una separación de los quesos en función del tipo de raza utilizado en su elaboración, estando los quesos elaborados con leche 100% Churra asociados con el CP1 en su zona negativa. Por su parte, los lotes que llevaban mezcla con Assaf mantuvieron en la componente positiva del CP1, y mientras que los quesos 75%Ch:25%A y 50%Ch:50%A fueron correlacionados negativamente con el CP2, los lotes 25%Ch:75%A y 100%A se correlacionaron con la componente positiva del CP2.

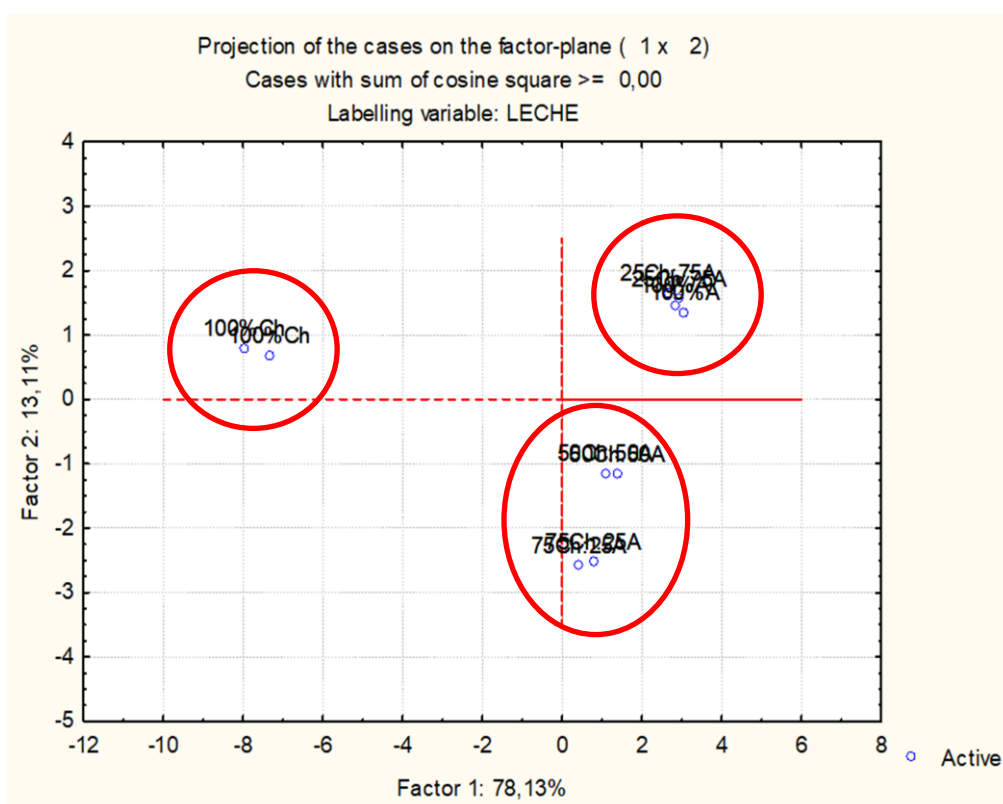


Figura C3.3. Análisis de componentes principales para el estudio de aminoácidos libres en el queso Zamorano con 240 días de maduración en función del tipo de raza.

Finalmente, y con respecto al estudio de la proyección de las variables (figura C3.4), se observó que todos los aminoácidos libres estaban fuertemente relacionados con el CP1 en su componente negativa (en la mayoría de los casos con correlaciones por encima del -0,95), coincidiendo con la agrupación de los quesos elaborados con leche 100% Churra. Los aminoácidos Asp, Pro, Cit e His se relacionaron mayoritariamente con los lotes 75%Ch:25%A y 50%Ch:50%A, y la His y el Gaba fueron asociados con los lotes 25%Ch:75%A y 100%A.

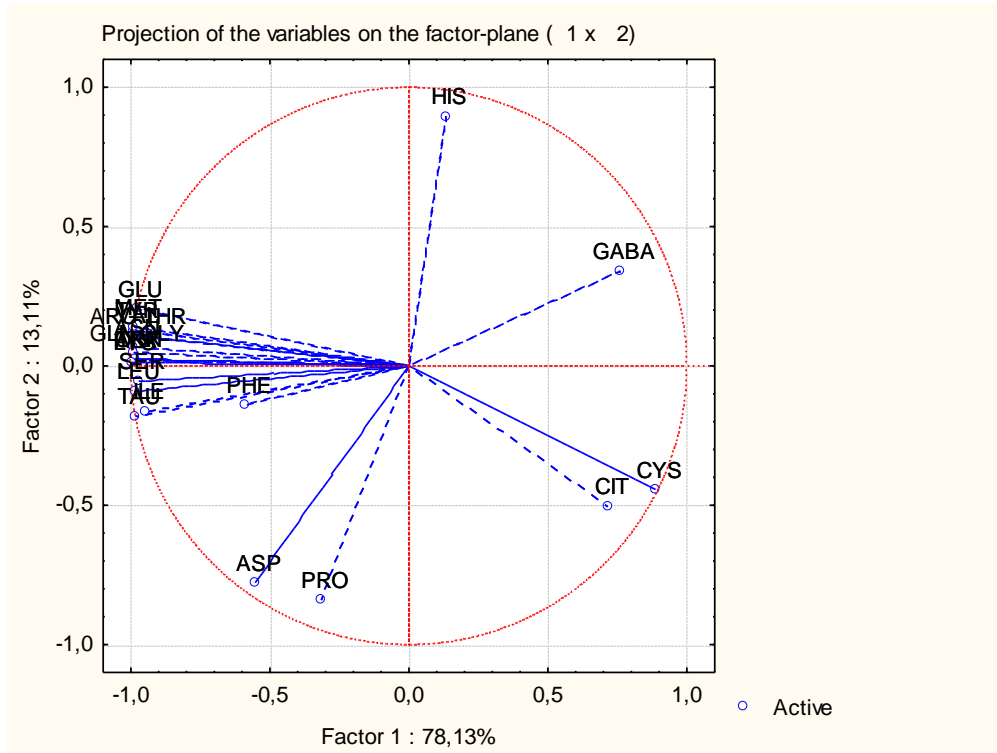


Figura C3.4. Análisis de componentes principales para el estudio de aminoácidos libres en el queso Zamorano con 240 días de maduración función del tipo de raza mediante la representación de las proyecciones.

Desde un punto de vista nutricional, cabe destacar la presencia de una gran cantidad de Gaba en los quesos 100%A, lo que les podría dar un valor añadido debido a sus propiedades bioactivas con cantidades similares a las descritas para otros quesos de oveja por Diana et al. (2014), aunque casi la mitad de las descritas por Renes et al. (2019). Finalmente, señalar que otro aminoácido con propiedades bioactivas como la Orn, fue detectada en mayor cantidad en los quesos de leche 100% Churra, con valores más de diez veces superiores a los obtenidos por Diana et al. (2014).

4.3.3.5 Aminas biógenas

En la tabla C3.7 se muestra la concentración media de las diferentes aminas biógenas analizadas en el queso Zamorano elaborado con diferentes proporciones de leche de oveja de las razas Churra y Assaf al cabo de 240 días de maduración.

Los contenidos de las aminas biógenas mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$), con excepción de la tiramina, entre los diferentes lotes de queso Zamorano, si bien, fueron más acusadas en el caso de la feniletilamina, putrescina, triptamina y espermidina.

La cantidad de aminas totales fue ligeramente superior en el queso elaborado con leche 100% Assaf (194,87 mg/kg de queso) respecto al queso elaborado con leche 100% Churra (160,05 mg/kg de queso).

No deja de ser llamativo que siendo superior la proteólisis de los quesos elaborados mayoritariamente con leche de oveja Churra, fuera en estos lotes donde se detectó una menor cantidad de aminas biógenas. Los lotes de queso elaborados con leche 100% A mostraron un contenido más alto de sal/humedad, lo cual ralentiza la proteólisis. Sin embargo, también presentaron valores más bajos de pH, lo cual podría favorecer la formación de aminas. Si bien no se puede descartar que exista una relación intrínseca entre la raza y la producción de estos compuestos, las diferencias observadas en el contenido en aminas biógenas entre los diferentes lotes de queso Zamorano estaría principalmente relacionada con el tipo y nivel de la microbiota, fundamentalmente aquella que no forma parte del cultivo iniciador y con las condiciones fisicoquímicas que se van estableciendo en el queso a lo largo de la maduración. El queso Zamorano elaborado con leche 100% Churra y 100% Assaf presentó los mayores recuentos en agar MRS, tras incubación a 30 °C durante 72 horas. Un estudio previo sobre queso Zamorano realizado por Ferrazza et al. (2004) determinó que la microbiota mayoritaria recontada en MRS estaba constituida fundamentalmente por lactobacilos, con valores de 2 a 4 log ufc/g superiores a los lactococos para un periodo de maduración similar al empleado en nuestro estudio. Se podrían considerar a éstos como los principales responsables de la formación de aminas biógenas en el queso Zamorano, más teniendo en cuenta que otros autores (Burdychova and Komprda, 2007; Espinosa-Pesqueira et al., 2018; Renes et al., 2019b) señalan una importante actividad decarboxilasa en cepas de lactobacilos.

Tabla C3.7.- Contenido medio en aminas biógenas en el queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche a los 240 días de maduración.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
Try	18,78 ± 1,31 ^b	11,98 ± 4,22 ^a	10,18 ± 1,43 ^a	15,12 ± 0,71 ^{ab}	20,35 ± 3,23 ^b
Phe	4,88 ± 1,18 ^a	16,66 ± 1,72 ^c	4,03 ± 0,59 ^a	5,02 ± 1,17 ^a	7,93 ± 0,82 ^b
Put	12,41 ± 0,13 ^a	12,50 ± 0,27 ^a	15,79 ± 0,58 ^b	15,05 ± 2,04 ^{ab}	24,95 ± 1,43 ^c
Cad	32,57 ± 0,16 ^{ab}	31,33 ± 0,67 ^a	32,15 ± 0,02 ^{ab}	33,16 ± 0,79 ^b	38,96 ± 0,70 ^c
Ht	10,31 ± 1,37 ^{ab}	8,27 ± 0,12 ^a	14,09 ± 0,56 ^b	20,75 ± 1,41 ^c	22,88 ± 3,57 ^c
Tyr	45,09 ± 9,17	40,34 ± 4,05	35,07 ± 2,26	33,50 ± 2,92	41,16 ± 1,30
Spd	3,34 ± 0,08 ^a	3,00 ± 1,10 ^a	0,98 ± 0,22 ^a	0,83 ± 0,08 ^a	7,97 ± 1,87 ^b
Sp	32,68 ± 5,55 ^b	25,70 ± 2,29 ^{ab}	26,47 ± 2,14 ^{ab}	22,93 ± 0,83 ^a	30,68 ± 0,08 ^b

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados.

Valores con distinto superíndice para cada amina biógena (mg/kg de queso) fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza.

Try: triptamina; Phe: feniletilamina; Put: putrescina; Cad: cadaverina; Ht: histamina; Tyr: tiramina; Spd: espermidina; Sp: espermina.

De igual manera, también debería considerarse el papel jugado por los enterococos, asociados con la formación de histamina, feniletilamina y tiramina por algunos autores (Khaled, 2014; Ladero et al., 2010). No obstante, aunque los enterococos podrían haber formado parte de los recuentos microbianos en agar MRS, su presencia en el queso Zamorano elaborado con leche pasteurizada es nula o muy baja como fue reseñado por (Ferrazza et al., 2004).

Finalmente, las excelentes condiciones higiénico-sanitarias aplicadas durante la elaboración de todos los lotes de queso Zamorano de nuestro estudio fueron puestas de manifiesto por los bajos recuentos de *Enterobacteriaceae* desde las primeras etapas de la maduración, no detectándose en ninguno de los lotes a partir de los 4 meses de maduración, como ya fue indicado en los resultados obtenidos cuando se abordó el efecto de la maduración (tabla C1.2). Por consiguiente, este grupo microbiano no contribuiría al establecimiento de diferencias significativas en el contenido en aminas biógenas en el queso Zamorano elaborado con distintas proporciones de leche de oveja de la raza Churra y Assaf.

4.3.4 Parámetros lipolíticos

Los valores medios del índice de acidez de la grasa y de los ácidos grasos libres (FFA) en los lotes de queso Zamorano elaborados con diferentes proporciones de leche de oveja Churra o Assaf a los 240 días de maduración se muestran en la tabla C3.8.

El índice de acidez de la grasa presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según la raza empleada, con valores ligeramente superiores en los quesos con mayor proporción de leche Churra respecto a los quesos elaborados a partir de leche con un 75% y 100% de raza Assaf.

Los resultados obtenidos para el contenido en FFA mostraron también diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los lotes, correspondiendo los valores más altos a los lotes de queso elaborados con leche con mayor proporción de leche Churra, exceptuando el C_{10:1} y el C_{16:1} que fueron detectados en cantidad más alta en los lotes elaborados fundamentalmente con la leche de la raza Assaf.

Los FFA contribuyen al perfil aromático y de sabor de gran variedad de quesos (Bovolenta et al., 2014), sobre todo los de cadena más corta (C_{4:0}, C_{6:0} y C_{8:0}), que presentan un bajo umbral de percepción. Su presencia en concentraciones muy altas, puede dar lugar a la aparición de defectos como el aroma y sabor rancio (Guarrasi et al., 2017). Por otra parte, el nivel de FFA también puede resultar una herramienta muy útil para la industria quesera como indicador de la maduración de los quesos (Ferreira et al., 2009).

La cantidad total de FFA de los lotes elaborados con leche 100% Churra fue 2,4 veces superior a los lotes 100% Assaf, indicando una mayor lipólisis. Los FFA mayoritarios fueron:

C_{14:0}, C_{16:0} y C_{18:1} en el caso de los lotes con porcentajes de leche de oveja Churra 100%, 75% Ch: 25% A y 50% Ch: 50% A; C_{6:0}, C_{16:0}, C_{18:0} (ligeramente superior a C_{14:0} y C_{6:0}) y C_{18:1}, en el caso del lote 25% Ch:75% A y, finalmente C_{6:0}, C_{16:0} y C_{18:1}, en el lote 100% A. Estos resultados fueron indicativos de diferencias cualitativas en función de la raza. Estudios llevados a cabo por otros autores (Soják et al., 2013; Yurchenko et al., 2018) han descrito diferencias en el perfil de ácidos grasos de la leche de partida en función del tipo de raza.

Tabla C3.8. Contenido en ácidos grasos libres (FFA) en el queso Zamorano con 240 días de maduración elaborados con diferentes mezclas de leche.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
IAG	2,61 ± 1,11 ^{ab}	2,50 ± 0,19 ^{ab}	3,66 ± 0,08 ^b	2,48 ± 1,16 ^{ab}	2,45 ± 0,70 ^a
C _{2:0}	2,71 ± 0,04 ^d	2,61 ± 0,04 ^c	2,58 ± 0,03 ^c	2,45 ± 0,03 ^b	2,31 ± 0,03 ^a
C _{4:0}	10,50 ± 0,26 ^{bc}	11,04 ± 0,27 ^c	10,02 ± 0,25 ^{bc}	9,59 ± 0,23 ^b	8,52 ± 0,20 ^a
C _{6:0}	28,16 ± 0,76 ^d	18,78 ± 0,49 ^{bc}	19,77 ± 0,52 ^c	17,42 ± 0,45 ^b	15,64 ± 0,40 ^a
C _{8:0}	10,23 ± 0,25 ^c	4,85 ± 0,10 ^b	4,89 ± 0,10 ^b	4,08 ± 0,08 ^a	3,75 ± 0,07 ^a
C _{10:0}	33,28 ± 0,90 ^d	18,25 ± 0,48 ^c	16,74 ± 0,44 ^b	15,56 ± 0,40 ^b	13,85 ± 0,35 ^a
C _{10:1}	0,50 ± 0,02 ^a	0,58 ± 0,02 ^c	0,53 ± 0,02 ^{bc}	0,97 ± 0,01 ^d	1,39 ± 0,00 ^e
C _{12:0}	20,11 ± 0,53 ^d	10,34 ± 0,25 ^c	8,20 ± 0,19 ^b	7,51 ± 0,17 ^b	5,49 ± 0,12 ^a
C _{14:0}	39,80 ± 1,09 ^d	20,10 ± 0,53 ^c	20,55 ± 0,54 ^c	17,54 ± 0,46 ^b	14,80 ± 0,38 ^a
C _{14:1}	0,77 ± 0,02 ^e	0,62 ± 0,02 ^d	0,53 ± 0,02 ^c	0,39 ± 0,03 ^b	0,00 ± 0,00 ^a
C _{15:0}	2,91 ± 0,04 ^d	1,47 ± 0,00 ^b	1,67 ± 0,01 ^c	1,45 ± 0,00 ^b	0,72 ± 0,02 ^a
C _{16:0}	59,07 ± 1,39 ^e	38,05 ± 1,04 ^d	32,29 ± 0,88 ^c	28,59 ± 0,77 ^b	21,24 ± 0,56 ^a
C _{16:1}	0,65 ± 0,02 ^a	0,89 ± 0,01 ^b	1,14 ± 0,01 ^d	1,05 ± 0,01 ^c	2,69 ± 0,04 ^e
C _{18:0}	25,74 ± 0,69 ^d	19,36 ± 0,51 ^c	16,72 ± 0,43 ^b	18,18 ± 0,48 ^c	11,98 ± 0,30 ^a
C _{18:1}	46,23 ± 1,27 ^d	24,66 ± 0,66 ^c	24,88 ± 0,67 ^c	19,28 ± 0,51 ^b	15,69 ± 0,41 ^a
C _{18:2}	8,22 ± 0,19 ^d	2,95 ± 0,05 ^b	2,57 ± 0,03 ^a	3,23 ± 0,05 ^c	3,33 ± 0,06 ^c
C _{18:3}	0,98 ± 0,01 ^d	0,31 ± 0,03 ^{bc}	0,16 ± 0,03 ^a	0,34 ± 0,03 ^c	0,25 ± 0,03 ^b
C _{18:2} CONJUGADO	0,82 ± 0,02 ^d	0,39 ± 0,03 ^{ab}	0,35 ± 0,03 ^a	0,43 ± 0,03 ^b	0,61 ± 0,02 ^c
SFA	232,50 ± 17,38 ^c	144,86 ± 10,65 ^b	133,42 ± 9,39 ^b	122,38 ± 8,45 ^b	98,29 ± 6,55 ^a
MUFA	48,16 ± 21,11 ^b	26,74 ± 11,10 ^a	27,08 ± 11,18 ^a	21,70 ± 8,56 ^a	19,76 ± 6,51 ^a
PUFA	10,02 ± 3,78 ^b	3,65 ± 1,35 ^a	3,08 ± 1,20 ^a	4,00 ± 1,47 ^a	4,19 ± 1,51 ^a

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para el índice de acidez de la grasa y los FFA fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza.

significativas ($p \leq 0,05$) en función del tipo de leche.

IAG: índice de acidez de la grasa (mg KOH/100 g de grasa); FFA (mg/100 g de queso siendo acético [C_{2:0}], butírico [C_{4:0}], caproico [C_{6:0}], caprílico [C_{8:0}], cáprico [C_{10:0}], decenoico [C_{10:1}], láurico [C_{12:0}], mirístico [C_{14:0}], miristoleico [C_{14:1}], pentadecanoico [C_{15:0}], palmítico [C_{16:0}], palmitoleico [C_{16:1}], esteárico [C_{18:0}], oleico [C_{18:1}], linoleico [C_{18:2}], linolénico [C_{18:3}], octadecadienoico conjugado [C_{18:2} conjugado]; ácidos grasos saturados [SFA]; ácidos grasos monoinsaturados [MUFA]; ácidos grasos poliinsaturados [PUFA]).

En los quesos elaborados con leche exclusivamente de raza Churra, el C_{18:1} fue detectado en una cantidad que prácticamente triplicó a la de los quesos elaborados con leche exclusivamente de raza Assaf. Estudios recientes (Suárez-Vega et al., 2016) han reseñado que el gen *FABP4* se expresaba en mayor medida en las ovejas de raza Churra que en las de raza Assaf. Si tenemos en cuenta que este gen codifica para un transportador proteico con elevada afinidad por el C_{18:1}, este hecho se podría relacionar con el mayor contenido en C_{18:1} observado

en los quesos elaborados con leche Churra respecto a los que fueron elaborados con leche Assaf.

Con respecto a las agrupaciones de los FFA en función del grado de insaturación, se observó que los valores medios de SFA, MUFA y PUFA fueron significativamente superiores ($p \leq 0,05$) en los quesos elaborados con leche 100% Churra, si bien las proporciones entre ellos fueron muy similares en los distintos tipos de quesos, correspondiendo aproximadamente el 25% del total a los ácidos grasos libres mono y poliinsaturados.

Otros estudios, como los efectuados por Signorelli et al. (2008), sobre el efecto que ejercen diferentes razas autóctonas italianas sobre el perfil de ácidos grasos o el realizado por (Soryal et al., 2005), acerca de la influencia de la raza de cabra en el perfil de ácidos grasos, describieron resultados muy similares a los nuestros, estableciendo diferencias a nivel de SFA y MUFA en alguno de los casos.

También se pudo observar que los valores del CLA, constituido por la mezcla de sus isómeros, fueron significativamente superiores en los lotes 100% Churra comparado con el lote 100% Assaf. Aunque algunos autores han encontrado diferencias de CLA en la leche de partida entre distintas razas, en ningún caso llegaron a ser significativas (Signorelli et al., 2008; Soják et al., 2013). Cabría preguntarse entonces, si habría existido un pequeño efecto debido a la raza o bien hubo otros factores que contribuirían al diferente contenido de CLA entre los lotes de queso como por ejemplo la microbiota láctica o el tipo de alimentación suministrada a las ovejas.

Mediante el estudio de componentes principales (figura C3.5) se pudo observar como sus dos componentes principales fueron capaces de explicar el 88% de la varianza. Todos los quesos fueron agrupados en 3 grupos en función del tipo de raza.

El queso elaborado con leche 100% Churra fue relacionado con la componente negativa del CP1, mientras que, por el contrario, el queso elaborado con leche 100% Assaf fue asociado con la componente positiva del CP1, estando el resto de quesos agrupados en mayor o menor medida en su parte central.

Si observamos la proyección de las variables (figura C3.6) podemos comprobar cómo, en general, la mayoría de FFA están altamente correlacionados con el componente negativo del CP1 (con valores por encima del -0.9) y, por lo tanto, con los quesos de elaborados con leche de oveja Churra, mientras que el C10:1 y C16:1 presentaban mayor correlación con los quesos elaborados con leche 100% Assaf.

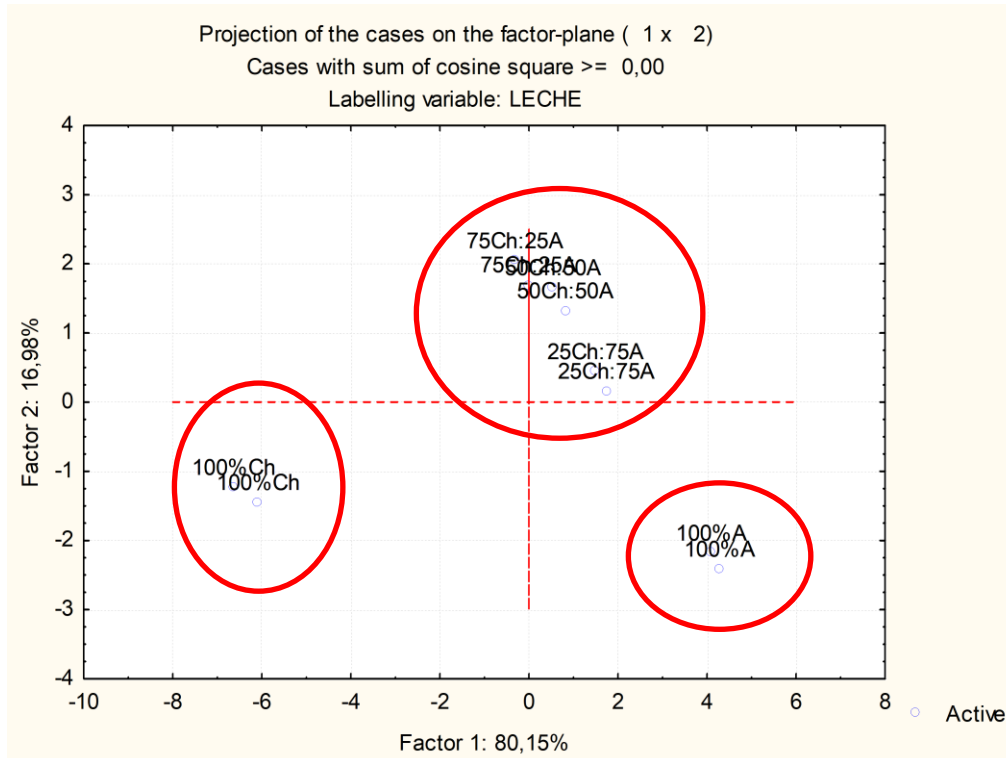


Figura C1.5. Análisis de componentes principales para el estudio de los ácidos grasos libres en el queso Zamorano en función del tipo de raza.

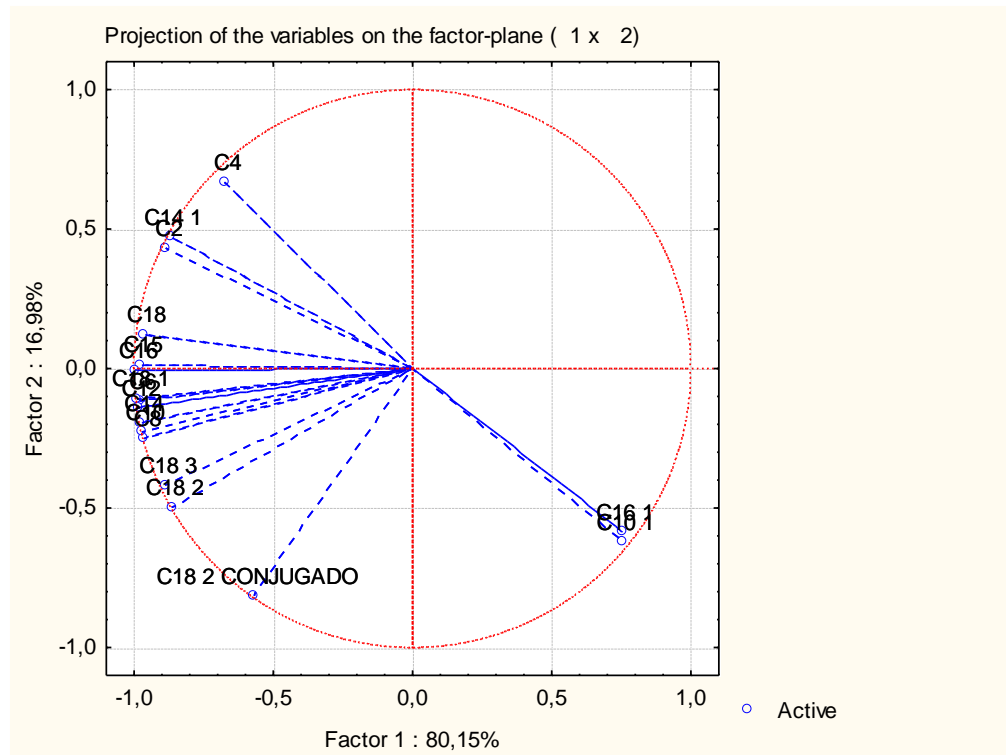


Figura C1.6. Análisis de componentes principales para el estudio de los ácidos grasos libres en el Queso Zamorano en función del tipo de raza mediante la representación de las proyecciones.

4.3.5 Análisis del Perfil de Textura

En la tabla C3.9 se muestran los valores medios obtenidos para los diferentes parámetros de textura en el queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche de las razas Churra o Assaf al cabo de 240 días de maduración.

Tabla C3.9. Valores medios de los parámetros de textura en el queso Zamorano con 240 días de maduración elaborados con diferentes mezclas de leche.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
Fracturabilidad	53,97 ± 4,91 ^a	68,64 ± 4,68 ^b	71,35 ± 3,04 ^b	76,65 ± 2,05 ^b	103,53 ± 9,21 ^c
Dureza	192,99 ± 6,21 ^a	205,71 ± 16,15 ^{ab}	220,49 ± 6,52 ^{bc}	239,54 ± 0,23 ^c	246,15 ± 6,17 ^c
Adhesividad	-6,53 ± 1,34	-6,25 ± 3,62	-3,73 ± 2,66	-4,99 ± 0,21	-4,83 ± 1,15
Cohesividad	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,02
Elasticidad	0,47 ± 0,01	0,42 ± 0,05	0,38 ± 0,07	0,40 ± 0,08	0,47 ± 0,00
Gomosidad	26,10 ± 0,14 ^{ab}	24,64 ± 1,98 ^a	27,98 ± 0,33 ^b	31,61 ± 1,68 ^c	28,99 ± 0,47 ^b
Masticabilidad	12,31 ± 0,33 ^{ab}	10,39 ± 2,04 ^a	10,69 ± 2,03 ^a	12,49 ± 2,01 ^{ab}	13,21 ± 0,32 ^b

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para cada parámetro de textura fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza.

Fracturabilidad (N); dureza (N), adhesividad (Nxs); Elasticidad (mm); el resto de parámetros son adimensionales.

Únicamente fueron observadas diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los parámetros de fracturabilidad, dureza, gomosidad y masticabilidad, presentando los mayores valores los quesos elaborados con mayor porcentaje de leche de la raza de oveja Assaf. Estos mayores valores pudieron estar asociados con el hecho de que dichos quesos fueron los que mostraron un mayor contenido en extracto seco, siendo este el parámetro químico que más influencia ejerce sobre ambos (Antoniou et al., 2000). Además, el mayor contenido en sal/humedad de esos quesos ha sido asociado al desarrollo de una pasta corta, friable, seca y dura (Guinee y Fox, 2017). Del mismo modo, se pudo observar que la proteólisis fue más elevada en los lotes elaborados con leche predominantemente Churra, lo que sin duda contribuirá a generar una textura más blanda al verse solubilizada en mayor medida la matriz de caseína (Nazari et al., 2019). Martin et al. (2009) relacionaron un menor grado de proteólisis con texturas más duras, así como una influencia de la raza sobre la textura final. Por eso, tanto el mayor contenido en humedad como los valores más bajos de sal y la mayor proteólisis, pudieron contribuir a generar una textura más blanda en los quesos elaborados con mayor proporción de leche Churra, lo cual a su vez estaría relacionado con unos mayores valores de adhesividad ($p > 0,05$).

Otros autores (Pizzillo et al., 2005) también han descrito la influencia de la raza sobre la textura, aunque en este caso sólo observaron diferencias significativas relacionadas con la adhesividad y no con la dureza, en parte también por el tipo de queso estudiado (Ricotta), cuya tecnología y contenido en humedad fue muy diferente al utilizado en nuestro trabajo.

4.3.6 Análisis sensorial

En la tabla C3.10 se presentan las puntuaciones medias otorgadas por el panel de cata para los atributos sensoriales relacionados con aspecto, olor, textura y sabor, además de una valoración global del queso Zamorano elaborado con diferentes mezclas de leche de la raza Churra y Assaf al cabo de 240 días de maduración.

Tabla C3.10. Valores medios de diferentes atributos sensoriales relacionados con el aspecto, olor, textura y sabor, así como la valoración global del producto en el queso Zamorano con 240 días de maduración elaborados con diferentes mezclas de leche y realizado mediante panel de cata.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
ASPECTO					
Intensidad de color	3,71 ± 0,68	3,38 ± 0,34	3,63 ± 0,65	3,63 ± 0,65	3,88 ± 0,51
Tamaño de ojos	3,71 ± 0,68	3,25 ± 0,61	3,00 ± 0,40	3,13 ± 0,78	4,13 ± 1,00
Nº de ojos	3,69 ± 0,47	3,47 ± 0,72	3,01 ± 0,57	3,23 ± 0,68	3,97 ± 0,89
OLOR					
Láctico	4,12 ± 0,64	4,36 ± 0,40	4,23 ± 0,37	4,01 ± 0,62	4,24 ± 0,01
Fresco, limpio	3,98 ± 0,54	4,23 ± 0,37	4,23 ± 0,37	3,88 ± 0,12	4,13 ± 0,12
Plantas aromáticas	4,12 ± 0,35	3,99 ± 0,13	3,87 ± 0,29	4,01 ± 0,62	4,13 ± 0,13
Aceitoso, graso	3,98 ± 0,54	4,13 ± 0,13	3,73 ± 0,40	3,74 ± 0,04	4,01 ± 0,62
Frutos secos	3,84 ± 0,36	4,01 ± 0,62	3,99 ± 0,13	4,01 ± 0,62	4,01 ± 0,62
Vainilla	4,14 ± 0,09	3,88 ± 0,12	3,99 ± 0,13	3,88 ± 0,12	4,01 ± 0,62
Cera	3,99 ± 0,20	4,01 ± 0,62	3,99 ± 0,13	4,01 ± 0,62	4,01 ± 0,62
TEXTURA					
Elasticidad	4,26 ± 0,78	3,62 ± 0,15	3,61 ± 0,40	3,61 ± 0,45	3,48 ± 0,58
Friabilidad	4,27 ± 0,48	3,88 ± 0,12	3,11 ± 0,43	3,23 ± 0,49	3,36 ± 0,59
Adhesividad	4,25 ± 1,19 ^b	4,12 ± 0,02 ^b	3,23 ± 0,02 ^a	3,37 ± 0,32 ^a	3,23 ± 0,42 ^a
Granulosidad	2,85 ± 0,74 ^a	2,87 ± 0,18 ^a	3,71 ± 0,07 ^{ab}	3,48 ± 0,41 ^{ab}	3,99 ± 0,28 ^b
Solubilidad	4,27 ± 0,44 ^c	3,98 ± 0,42 ^{bc}	3,23 ± 0,49 ^a	3,72 ± 0,69 ^{ab}	3,36 ± 0,49 ^a
Dureza	3,49 ± 0,06 ^a	3,62 ± 0,13 ^a	4,01 ± 0,62 ^{ab}	3,88 ± 0,12 ^a	4,13 ± 0,19 ^b
Mantecosidad	4,13 ± 0,12 ^c	3,88 ± 0,12 ^c	3,49 ± 0,14 ^b	3,50 ± 0,10 ^b	3,13 ± 0,08 ^a
Rugosidad	3,99 ± 0,20	3,98 ± 0,42	3,23 ± 0,42	3,60 ± 0,91	3,12 ± 0,08
Sequedad	3,41 ± 0,39	3,87 ± 0,12	3,22 ± 0,89	3,48 ± 0,45	3,12 ± 0,18
SABOR					
Salado	3,74 ± 0,14 ^a	3,74 ± 0,13 ^a	3,74 ± 0,13 ^a	4,12 ± 0,11 ^b	3,99 ± 0,07 ^{ab}
Leche fresca	4,11 ± 0,71	3,88 ± 0,12	3,37 ± 0,32	3,74 ± 0,04	3,61 ± 0,45
Ácido	3,27 ± 0,49	3,37 ± 0,32	2,99 ± 0,08	3,61 ± 0,45	3,48 ± 0,41
Picante	3,97 ± 0,95	4,11 ± 0,45	3,62 ± 0,30	3,99 ± 0,13	3,74 ± 0,30
Dulzón	3,54 ± 0,75	3,86 ± 0,43	3,62 ± 0,05	4,11 ± 0,37	3,87 ± 0,13
Amargo	2,98 ± 0,41	2,99 ± 0,34	2,74 ± 0,18	3,37 ± 0,16	3,23 ± 0,49
Regusto y persistencia	4,35 ± 0,16 ^b	4,14 ± 0,43 ^{ab}	3,74 ± 0,14 ^{ab}	3,36 ± 0,49 ^a	3,43 ± 0,51 ^a
VALORACIÓN GLOBAL					
Valoración global	7,16 ± 0,62	7,25 ± 0,48	7,04 ± 0,05	6,58 ± 0,33	6,50 ± 0,51

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para cada atributo del análisis sensorial fueron indicativos de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza.

Los atributos relacionados con los parámetros de aspecto, olor, textura y sabor se puntuaron entre 1 y 7.

La valoración global se evaluó entre 1 y 10.

Los atributos visuales y aquellos relacionados con el olor no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los quesos. Se podría destacar un olor láctico ligeramente superior en quesos elaborados con leche 100% Assaf que pudo ser debido al menor pH y mayores valores de acidez titulable que presentaron estos quesos. También el atributo de olor fresco/limpio mostró valores ligeramente inferiores de los quesos 100% Churra, lo que pudo estar relacionado con una mayor lipólisis y contenido en ácidos grasos de cadena corta, asociados con cierto sabor a grasa de origen animal (Pizzillo et al., 2005). Martin et al. (2009) también describieron la influencia de la raza sobre ciertos aromas ácidos, rancios o incluso a vainilla.

Los atributos relacionados con la textura que presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre quesos fueron la adhesividad, la granulosidad, la solubilidad, la dureza y la mantecosidad. Los valores de adhesividad, solubilidad y mantecosidad fueron superiores en los quesos elaborados con mayores porcentajes de leche Churra. Los quesos 100% Churra presentaron una mayor cantidad de SFA de cadena larga y de $C_{18:1}$, contribuyendo junto a la mayor proteólisis y contenido en humedad, a una mayor adhesividad, solubilidad y mantecosidad en los lotes con mayor porcentaje de leche de dicha raza, aspectos también relacionados en el estudio de Soryal et al. (2005). De igual manera, se observó una mayor granulosidad y dureza para los quesos de leche 100% Assaf, que pudo estar influido por la menor humedad que presentaron estos quesos, así como una menor solubilización de las caseínas (Martin et al., 2009; Pizzillo et al., 2005).

En cuanto a los atributos del sabor, casi todos los descriptores no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los quesos, excepto para el sabor salado y el regusto y la persistencia. Los quesos elaborados con mayor porcentaje de leche Assaf presentaron mayores niveles de sal, lo que explicaría las diferencias establecidas por los catadores. Los valores asociados a un mayor regusto y persistencia, así como la mejor valoración global ($p > 0,05$) obtenida en los lotes de queso elaborados con mayor predominio de leche Churra (7-7,25), en comparación con los lotes donde utilizaban mayor cantidad de leche Assaf (6,50), se podría relacionar con la mayor proteólisis y lipólisis observada en dichos quesos. De hecho, la mayor cantidad de fracciones nitrogenadas y de aminoácidos libres ha sido asociada con puntuaciones más elevadas para atributos olfativos y gustativos (Mendia et al., 2000). Este hecho explicaría también el menor grado de amargor de estos quesos.

En resumen, podemos indicar una tendencia de mejores puntuaciones para olor, sabor y valoración global en los lotes de queso elaborados con mayor porcentaje de leche Churra. Cipolat-Gotet et al. (2018) y otros autores en los últimos años están haciendo especial hincapié

en establecer de manera más firme la conexión de los atributos sensoriales del queso con la genética, con el fin de proporcionar una base para una futura mejora genética.

Tabla C3.11. Valores medios de diferentes atributos sensoriales relacionados con el aspecto, olor, textura y sabor, así como la valoración global del queso Zamorano con 240 días de maduración elaborado con diferentes mezclas de leche y realizado mediante panel de consumidores.

	Tipo de raza				
	100%Ch	75%Ch:25%A	50%Ch:50%A	25%Ch:75%A	100%A
Aspecto	5,45 ± 0,35 ^{ab}	5,20 ± 0,36 ^{ab}	5,58 ± 0,24 ^b	4,95 ± 0,57 ^a	5,25 ± 0,24 ^{ab}
Olor	6,03 ± 0,37	5,80 ± 0,16	6,03 ± 0,34	5,85 ± 0,24	5,65 ± 0,34
Sabor	7,20 ± 0,23	6,75 ± 0,51	6,85 ± 0,42	6,80 ± 0,48	6,60 ± 0,62
Textura/Trigeminales	5,33 ± 0,22 ^{ab}	5,00 ± 0,16 ^a	5,53 ± 0,38 ^b	5,38 ± 0,15 ^{ab}	5,40 ± 0,34 ^{ab}
Valoración global	6,33 ± 0,46	6,45 ± 0,62	6,00 ± 0,45	6,15 ± 0,47	6,03 ± 0,50

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. Ch: leche de oveja Churra; A: leche de oveja Assaf.

Valores con distinto superíndice para cada parámetro del análisis sensorial fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en función del tipo de raza.

Todos los parámetros evaluados se puntuaron entre 1 y 10.

4.4 Efecto del tipo de cultivo iniciador autóctono sobre las características del queso Zamorano

4.4.1 Análisis químicos y fisicoquímicos

En la tabla C4.1 se muestran los valores referentes a los principales parámetros químicos y fisicoquímicos en los lotes de queso Zamorano elaborados con distintos cultivos iniciadores a lo largo de la maduración.

Tabla C4.1. Cambios en los principales parámetros químicos y fisicoquímicos durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI	TM
ES	60	69,27 ± 0,23 ^{aA}	71,93 ± 0,23 ^{bA}	68,39 ± 0,07 ^{aA}	67,94 ± 0,08 ^{aA}	**	***
	100	71,83 ± 0,24 ^{abB}	73,09 ± 0,00 ^{cA}	70,67 ± 0,94 ^{aB}	72,09 ± 0,00 ^{bcB}		
Proteína	60	36,25 ± 0,26	36,79 ± 0,18	37,40 ± 0,65	37,32 ± 1,24	NS	NS
	100	38,43 ± 0,18	39,00 ± 0,33	38,40 ± 1,79	39,19 ± 2,29		
Grasa	60	52,69 ± 0,25 ^{bA}	50,40 ± 0,46 ^{aA}	53,01 ± 0,65 ^{bA}	53,72 ± 0,09 ^{bA}	**	***
	100	55,69 ± 0,26 ^{abB}	54,04 ± 1,37 ^{aB}	56,59 ± 1,76 ^{bbB}	56,18 ± 1,39 ^{abB}		
Lactosa	60	0,51 ± 0,01 ^{cB}	0,31 ± 0,03 ^{aB}	0,42 ± 0,02 ^{bA}	0,40 ± 0,02 ^{bbB}	***	***
	100	ND	ND	0,40 ± 0,01 ^A	ND		
Cloruros	60	1,92 ± 0,01 ^{aA}	2,26 ± 0,01 ^{bA}	2,05 ± 0,05 ^{aA}	1,99 ± 0,08 ^{aA}	*	**
	100	2,18 ± 0,04 ^{abB}	2,34 ± 0,14 ^{bA}	2,23 ± 0,04 ^{abA}	2,11 ± 0,05 ^{aA}		
S/H	60	6,24 ± 0,13 ^{aA}	8,07 ± 0,16 ^{bA}	6,47 ± 0,24 ^{aA}	6,21 ± 0,38 ^{aA}	**	***
	100	7,72 ± 0,30 ^{aB}	8,69 ± 0,72 ^{bA}	7,62 ± 0,54 ^{aB}	7,55 ± 0,28 ^{aB}		
pH	60	5,50 ± 0,00 ^{aA}	5,60 ± 0,04 ^{bA}	5,66 ± 0,02 ^{bA}	5,46 ± 0,03 ^{aA}	**	**
	100	5,69 ± 0,03 ^{bbB}	5,73 ± 0,04 ^{bbB}	5,68 ± 0,01 ^{bA}	5,46 ± 0,01 ^{aA}		
AT	60	1,75 ± 0,05 ^{aA}	1,84 ± 0,03 ^{abA}	1,73 ± 0,05 ^{aA}	1,92 ± 0,06 ^{bA}	*	**
	100	1,89 ± 0,03 ^{abB}	1,90 ± 0,04 ^{aA}	1,97 ± 0,04 ^{aB}	1,99 ± 0,11 ^{aA}		
A _w	60	0,940 ± 0,008 ^B	0,934 ± 0,002 ^B	0,936 ± 0,002 ^B	0,939 ± 0,002 ^A	*	***
	100	0,918 ± 0,003 ^{aA}	0,919 ± 0,001 ^{abA}	0,924 ± 0,004 ^{abA}	0,930 ± 0,003 ^{bA}		

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. DM: días de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador; TM: efecto del tiempo de maduración. NS: No hay diferencias significativas; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Valores con distinto superíndice (letras minúsculas) para parámetro presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Valores con distinto superíndice (letras mayúsculas) para cada parámetro y lote presentaron diferencias significativas en función del tiempo de maduración.

Extracto seco (g/100 g); grasa (g/100 g ES); proteína (g/100 g ES); cloruros (g NaCl/100 g); S/H: sal/humedad (%); Lactosa (g/100 g ES); pH; AT: Acidez titulable (g ac. láctico/100 g ES); A_w: actividad de agua.

Lote A: cultivo comercial (*Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*); Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

El contenido en extracto seco de los quesos se incrementó significativamente ($p \leq 0,001$) con el tiempo de maduración, alcanzando unos valores finales entre 68-70 g/100 g de queso a los 60 días de maduración y de 71-73 g/100 g a los 100 días. También se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) en el contenido en extracto seco entre los diferentes lotes tanto a los 60 como a los 100 días de maduración, siendo los quesos con mayores valores los correspondientes a los lotes B y C.

Con respecto al contenido en proteína, no se establecieron diferencias significativas ($p \geq 0,05$), pero, sin embargo, si se observó un ligero incremento de sus valores para todos los lotes a los 100 días de maduración con respecto a los resultados obtenidos a los 60 días. Por el contrario, el porcentaje de grasa fue incrementándose con el tiempo de maduración de forma significativa. Además, el tipo de cultivo iniciador también ejerció diferencias significativas ($p \leq 0,01$) para este parámetro, ya que tanto a los 60 como a los 100 días de maduración, el lote B fue el que presentó menores valores.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Cichoski et al., 2002; Farahani et al., 2014; Karami et al., 2009) en estudios de maduración de otras variedades de quesos. No obstante, el contenido en extracto seco en nuestro trabajo fue muy superior al descrito por otros autores (Fernández et al., 2016; Ferrazza et al., 2004; Renes et al., 2019b) para el queso Zamorano a esos mismos tiempos de maduración.

El contenido en lactosa difirió de unos lotes a otros estableciéndose diferencias significativas ($p \leq 0,001$) entre los mismos al cabo de 60 días de maduración. A los 100 días, no fue detectada lactosa en ninguno de los lotes, excepto en el C que presentaba valores muy similares a los quesos de 60 días. Este lote se caracterizó también por contener menores valores de acidez titulable a los dos meses de maduración, corroborando las diferencias fermentativas con respecto al resto de lotes. Los valores finales para el cociente sal/humedad oscilaron entre 7,55 y 8,69%, correspondiendo los más elevados al lote B (equivalentes a 2,34% de sal en el queso). Estos valores se encontraban fuera del rango descrito por otros autores (Ardö et al., 2014; Ayyash et al., 2013) como óptimos para el desarrollo adecuado de las bacterias lácticas como de la actividad de las diferentes enzimas que participan en la maduración del queso.

El tipo de cultivo iniciador ejerció un efecto significativo ($p \leq 0,01$) sobre el pH ya que se establecieron diferencias a los 60 días entre los lotes B y C, respecto a los lotes A y D; y a los 100 días entre los lotes A, B y C con respecto al lote D. Estos resultados también fueron indicativos de la influencia del tiempo de maduración, el cual determinó el establecimiento de diferencias significativas ($p \leq 0,01$) sobre este parámetro. El lote D (elaborado con el cultivo del lote B y *Enterococcus raffinosus*) mantuvo los valores bajos de pH (5,46) a los 60 y 100 días de la maduración. El lote C (elaborado con el cultivo del lote B y *Lactobacillus plantarum*), mostró valores superiores (5,66 aproximadamente) que también se mantuvieron estables entre los 60 y 100 días de maduración. En los lotes A y B, elaborados con cultivos acidificantes, comercial y cepas autóctonas, se observó un incremento del pH, de 0,1 a 0,2 unidades, alcanzando valores cercanos a 5,7 a los 100 días de maduración.

La acidez titulable (AT) presentó diferencias entre lotes, mostrando el lote D a los 60 días de maduración unos valores superiores al resto. Por otro lado, el tiempo de maduración influyó sobre la acidez titulable, que aumentó a medida que aumentaba el tiempo de

maduración, con diferencias significativas entre los lotes según el tipo de cultivo iniciador utilizado. Tanto en el lote A como el lote C aumentó en mayor medida, si bien los valores de AT de estos lotes a los 60 días fueron inferiores a los del resto. A los 100 días de maduración, la AT detectada en los quesos estuvo en torno a 1,90-2,00 g ácido láctico/100 g ES. Estos datos son similares a otros encontrados en estudios previos para queso Zamorano (Ferrazza et al., 2004). Los diferentes cultivos empleados intervinieron pues en el transcurso de la acidificación de los quesos, siendo más lenta en los quesos del lote C que fueron elaborados con una cepa autóctona de *Lactobacillus plantarum*. Resultó llamativa la elevada acidez observada en los quesos del lote D a los 60 días de maduración e incluso antes, a los 30 días (datos no presentados). En la elaboración de dicho lote se empleó un cultivo autóctono con una cepa de *Enterococcus raffinosus*. En este lote también se obtuvieron recuentos elevados en agar ROGOSA, por lo que es probable la influencia de la actividad metabólica de la cepa de enterococo sobre el asentamiento y desarrollo de los lactobacilos, con recuentos en este lote al cabo de 30 días de maduración (datos no mostrados) similares a los que mostró el lote C, pero superiores a los de los lotes A y B.

El incremento en la acidez titulable sin un descenso simultáneo del pH puede estar relacionado con una elevada capacidad tampón del queso, con un elevado contenido en proteínas y minerales. De hecho, situaciones similares fueron ya observadas en otros estudios (Herreros et al., 2007).

El tipo de cultivo iniciador no tuvo ningún efecto significativo ($p \geq 0,05$) sobre la actividad de agua, aunque sí lo hizo en gran medida el tiempo de maduración ($p \leq 0,001$). La disminución de la actividad de agua que experimentó el queso durante su maduración vino determinada por el contenido en extracto seco y la cantidad de sal añadida, así como por los componentes nitrogenados de bajo peso molecular que se iban generando durante el proceso de proteólisis que sufre el queso durante el proceso madurativo (Madrau et al., 2006; Prieto et al., 2002).

4.4.2 Perfil de ácidos grasos totales

En la tabla C4.2 se muestra el perfil de ácidos grasos totales, expresados como porcentaje del total de ácidos grasos, en función del tipo de cultivo iniciador y tiempo de maduración del queso Zamorano.

En dicha tabla podemos comprobar que, en general, ni el tipo de cultivo iniciador ni el tiempo de maduración permitieron el establecimiento de diferencias significativas reseñables para los diferentes ácidos grasos estudiados. Tales resultados eran esperables si tenemos en cuenta que los factores que más influyen en el perfil de los ácidos grasos totales están relacionados con la genética, etapa de lactación y tipo de alimentación de las ovejas (De La Fuente et al., 2009; Hanus et al., 2018) y que en nuestro estudio se utilizó leche de oveja de la

misma raza, etapa de lactación y alimentación. Nuestros resultados fueron similares a los descritos por (Poveda, 2001), que señalaron como ácidos grasos predominantes al ácido palmítico (C_{16:0}) y ácido oleico (C_{18:1}), representando en torno al 20% y 30%, respectivamente. El ácido mirístico (C_{14:0}) y el ácido esteárico (C_{18:0}) presentaron proporciones intermedias con valores que oscilaron entre el 10 y el 13%, respectivamente. El nivel de ácidos grasos de cadena corta, en general, fue bajo no superando en ninguno de los lotes el 10% del total, si bien hay que destacar que este tipo de ácidos grasos juegan un papel muy importante en el aroma del queso (Khattab et al., 2019).

El porcentaje de ácidos grasos saturados totales representó en torno a 2/3 partes del total de ácidos grasos analizados, estando el 1/3 restante integrado por ácidos grasos insaturados. Dentro de estos últimos, los ácidos grasos monoinsaturados representaron casi el 85%, estando el 15% restante integrado por los poliinsaturados. Estos valores son muy similares a los descritos por otros autores (Carafa et al., 2019; Gaglio et al., 2019) para quesos elaborados a partir de leche de oveja.

Finalmente, cabe destacar las mayores proporciones de los isómeros de ácido linoleico conjugado (9c11t y 10t12c) en los quesos del lote C. Este hecho podría estar relacionado con la presencia en el cultivo iniciador de cepas de lactobacilos. Estudios llevados a cabo por diferentes autores (Carafa et al., 2019; Mohan et al., 2013; Ogawa et al., 2005; Rodríguez-Alcalá et al., 2011) empleando determinados tipos de cultivos iniciadores, a base de *Bifidobacterium*, bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras, permitieron detectar un incremento de la concentración de ácido linoleico conjugado (CLA) a partir de sustratos de ácido linoleico, elevando, por tanto, el contenido en CLA del queso. Más recientemente, Renes et al. (2019a) describieron un incremento del CLA en el queso tipo Zamorano o Ares-Yebra et al. (2019) en otras variedades, incluyendo en el cultivo iniciador cepas de lactobacilos autóctonas. Este hecho podría contribuir a incrementar el valor añadido del queso Zamorano ya que los isómeros del CLA están asociados con diversas funciones beneficiosas para la salud humana, entre las cuales cabe citar su efecto antiobesidad, anticarcinogénico, antiaterogénico, inmunomodulador, antidiabético, etc. (Benjamin y Spener, 2009; Koba y Yanagita, 2014; Moreira et al., 2018).

Tabla 4.2. Cambios ocurridos en los metil ésteres de los ácidos grasos (FAMES) durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI	TM
C _{4:0}	60	4,29 ± 0,92 ^b	2,57 ± 0,08 ^a	2,84 ± 0,90 ^a	2,61 ± 0,10 ^a	*	NS
	100	3,10 ± 0,05 ^a	3,25 ± 0,43 ^a	2,69 ± 0,05 ^a	2,27 ± 0,07 ^a		
C _{6:0}	60	2,34 ± 0,11 ^b	1,74 ± 0,18 ^a	2,05 ± 0,32 ^{ab}	2,01 ± 0,07 ^{ab}	*	NS
	100	2,28 ± 0,12 ^b	2,13 ± 0,10 ^{ab}	2,09 ± 0,05 ^{ab}	1,89 ± 0,02 ^a		
C _{8:0}	60	2,85 ± 0,13	2,48 ± 0,26	2,80 ± 0,23	2,83 ± 0,02	NS	NS
	100	3,05 ± 0,06	2,81 ± 0,01	2,82 ± 0,04	2,74 ± 0,02		
C _{10:0}	60	7,39 ± 0,15 ^b	6,44 ± 0,26 ^a	6,76 ± 0,56 ^a	6,75 ± 0,05 ^a	*	NS
	100	6,84 ± 0,12 ^a	6,62 ± 0,07 ^a	6,39 ± 0,00 ^a	6,50 ± 0,02 ^a		
C _{12:0}	60	4,28 ± 0,01	4,07 ± 0,11	4,23 ± 0,14 ^A	4,25 ± 0,04	NS	NS
	100	4,15 ± 0,08	4,16 ± 0,03	4,10 ± 0,04	4,27 ± 0,01		
C _{14:0}	60	10,51 ± 0,09 ^{bb}	9,84 ± 0,03 ^{aa}	10,01 ± 0,42 ^{aa}	10,13 ± 0,04 ^{abA}	*	**
	100	9,73 ± 0,15 ^{aA}	9,81 ± 0,07 ^{aA}	9,64 ± 0,17 ^{aA}	10,00 ± 0,03 ^{aA}		
C _{14:1}	60	0,55 ± 0,13	0,65 ± 0,01	0,60 ± 0,17	0,47 ± 0,00	NS	NS
	100	0,57 ± 0,14	0,57 ± 0,15	0,48 ± 0,01	0,60 ± 0,16		
C _{16:0}	60	20,77 ± 0,24 ^{bb}	19,65 ± 0,02 ^{aa}	19,90 ± 0,70 ^{aa}	20,04 ± 0,11 ^{aa}	*	**
	100	19,50 ± 0,21 ^{aa}	19,39 ± 0,52 ^{aa}	19,19 ± 0,18 ^{aa}	19,45 ± 0,15 ^{aa}		
C _{16:1}	60	1,10 ± 0,01 ^{aa}	1,08 ± 0,05 ^{aa}	1,23 ± 0,08 ^{ba}	1,21 ± 0,00 ^{ba}	**	**
	100	1,18 ± 0,03 ^{aa}	1,13 ± 0,07 ^{aa}	1,31 ± 0,01 ^{ba}	1,29 ± 0,01 ^{ba}		
C _{18:0}	60	12,08 ± 0,11 ^{aa}	13,03 ± 0,56 ^{ba}	13,66 ± 0,59 ^{ba}	13,29 ± 0,27 ^{ba}	**	**
	100	13,07 ± 0,18 ^{ab}	13,36 ± 0,27 ^{abA}	14,15 ± 0,03 ^{ca}	13,93 ± 0,23 ^{bcA}		
C _{18:1}	60	27,97 ± 0,17	32,25 ± 1,71	29,45 ± 2,13	30,25 ± 0,43	NS	NS
	100	30,21 ± 0,17	30,47 ± 0,48	30,58 ± 0,02	30,53 ± 0,50		
C _{18:2}	60	3,63 ± 0,02 ^{aA}	3,76 ± 0,09 ^{abA}	3,90 ± 0,12 ^{ba}	3,75 ± 0,11 ^{abA}	*	*
	100	3,85 ± 0,07 ^{ab}	3,80 ± 0,12 ^{aA}	3,98 ± 0,02 ^{aA}	3,93 ± 0,05 ^{aA}		
C _{20:0}	60	0,31 ± 0,00 ^{aA}	0,33 ± 0,01 ^{abA}	0,37 ± 0,04 ^{ca}	0,35 ± 0,01 ^{bcA}	**	**
	100	0,34 ± 0,01 ^{aA}	0,35 ± 0,00 ^{aA}	0,40 ± 0,01 ^{ba}	0,40 ± 0,00 ^{bb}		
C _{18:3}	60	0,92 ± 0,01 ^A	0,96 ± 0,03 ^A	0,96 ± 0,03 ^A	0,95 ± 0,02 ^A	NS	**
	100	0,98 ± 0,01 ^B	0,97 ± 0,01 ^A	0,98 ± 0,01 ^A	1,02 ± 0,02 ^B		
CLA _{9c11t}	60	0,61 ± 0,00 ^a	0,69 ± 0,03 ^{bc}	0,74 ± 0,05 ^c	0,65 ± 0,03 ^{ab}	**	NS
	100	0,67 ± 0,01 ^a	0,70 ± 0,00 ^{ab}	0,73 ± 0,00 ^b	0,70 ± 0,01 ^{ab}		
CLA _{10t:12c}	60	0,11 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,05	0,14 ± 0,00	NS	NS
	100	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,01		
C _{20:4}	60	0,29 ± 0,00	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,02	NS	NS
	100	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,00	0,33 ± 0,01		
SFA	60	64,82 ± 0,28	60,15 ± 1,46	62,61 ± 2,64	62,25 ± 0,24	NS	NS
	100	62,06 ± 0,15	61,89 ± 0,86	61,45 ± 0,06	61,44 ± 0,55		
MUFA	60	29,62 ± 0,31	33,97 ± 1,65	31,28 ± 2,37	31,93 ± 0,42	NS	NS
	100	31,95 ± 0,06	32,17 ± 0,70	32,38 ± 0,02	32,42 ± 0,65		
PUFA	60	5,56 ± 0,02 ^{aA}	5,88 ± 0,19 ^{abA}	6,11 ± 0,26 ^{ba}	5,82 ± 0,19 ^{abA}	*	*
	100	5,99 ± 0,10 ^{ab}	5,94 ± 0,16 ^{aA}	6,17 ± 0,04 ^{aA}	6,14 ± 0,10 ^{aA}		

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados para FAMES (expresado como g de ácido graso/ 100 g de ácidos grasos). DM: días de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador; TM: efecto del tiempo de maduración. NS: No hay diferencias significativas; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Valores con distinto superíndice (letras minúsculas) para parámetro presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Valores con distinto superíndice (letras mayúsculas) para cada parámetro y lote presentaron diferencias significativas en función del tiempo de maduración.

Butírico [C_{4:0}], caproico [C_{6:0}], caprílico [C_{8:0}], cáprico [C_{10:0}], láurico [C_{12:0}], mirístico [C_{14:0}], miristoleico [C_{14:1}], palmítico [C_{16:0}], palmitoleico [C_{16:1}], esteárico [C_{18:0}], oleico [C_{18:1}], linoleico [C_{18:2}], araquídico [C_{20:0}]; linoléico [C_{18:3}], isómeros del ácido linoleico conjugado [CLA_{9c11t} y CLA_{10t:12c}]; araquídico [C_{20:4}]; ácidos grasos saturados [SFA]; ácidos grasos monoinsaturados [MUFA]; ácidos grasos poliinsaturados [PUFA]).

Lote A: cultivo comercial (*Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*); Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

4.4.3 Análisis microbiológicos

En la tabla C4.3 se muestra la evolución de los recuentos microbianos en función del tipo de cultivo iniciador y tiempo de maduración del queso Zamorano.

Tabla C4.3. Cambios en los recuentos de las poblaciones microbianas durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI	TM
PCA	60	9,06 ± 0,28 ^b	8,38 ± 0,34 ^a	8,47 ± 0,41 ^a	8,86 ± 0,29 ^{ab}	*	NS
	100	8,66 ± 0,31 ^b	8,24 ± 0,25 ^a	8,30 ± 0,18 ^a	8,85 ± 0,18 ^b		
MRS	60	8,71 ± 0,21 ^{bB}	8,36 ± 0,26 ^{aA}	8,50 ± 0,31 ^{abA}	8,75 ± 0,33 ^{bA}	*	*
	100	6,99 ± 0,17 ^{aA}	8,24 ± 0,21 ^{bA}	8,37 ± 0,22 ^{bA}	8,74 ± 0,18 ^{cB}		
M17	60	7,30 ± 0,19 ^{cB}	6,53 ± 0,14 ^{bB}	6,13 ± 0,24 ^{aA}	6,48 ±	*	**
	100	6,58 ± 0,23 ^{bA}	6,03 ± 0,17 ^{aA}	6,03 ± 0,31 ^{aA}	6,11 ± 0,11 ^{aA}		
ROGOSA	60	7,99 ± 0,40 ^{bB}	7,32 ± 0,24 ^{aB}	7,75 ± 0,31 ^{abA}	8,72 ± 0,36 ^{cA}	**	**
	100	5,19 ± 0,15 ^{aA}	6,18 ± 0,21 ^{bA}	7,57 ± 0,45 ^{cA}	8,62 ± 0,38 ^{dA}		
VRBGA	60	ND	ND	0,68 ± 0,04 ^a	1,18 ± 0,14 ^b	***	***
	100	ND	ND	ND	0,87 ± 0,03		

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados (expresados en log UFC/g). DM: días de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador; TM: efecto del tiempo de maduración. NS: No hay diferencias significativas; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Valores con distinto superíndice (letras minúsculas) para parámetro presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Valores con distinto superíndice (letras mayúsculas) para cada parámetro y lote presentaron diferencias significativas en función del tiempo de maduración.

Lote A: cultivo comercial (*Lc. lactis subsp. lactis* y *Lc. lactis subsp. cremoris*); Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis subsp. lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis subsp. cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis subsp. lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis subsp. cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis subsp. lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis subsp. cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

La evolución de los recuentos obtenidos para la microbiota aerobia mesófila durante la maduración del queso Zamorano fue similar en todos los lotes, a excepción del lote A, en el que se produjo un descenso más acusado, y del lote D, donde apenas hubo cambios. Al ser las bacterias lácticas la población dominante durante la maduración, estos recuentos vinieron a reflejar el curso de la evolución de este grupo microbiano.

El lote A mostró los recuentos más elevados en M17, aunque también fue el que sufrió un descenso más acusado, lo que puede estar relacionado con una rápida acidificación inicial que evitaría un incremento posterior de los recuentos y el incremento de la AT.

La evolución de los grupos microbianos en agar MRS fue similar en los lotes B, C y D. En el caso del lote A, si bien presentó los mayores valores a los 60 días y niveles muy similares al resto de lotes, fue el que sufrió el mayor descenso en sus recuentos (casi 2 unidades logarítmicas), mientras que en el resto de lotes sus valores apenas se vieron modificados.

El incremento de la acidez titulable y del contenido en sal/humedad de los quesos pudo influir en la evolución de las poblaciones microbianas y dentro de las BAL principalmente sobre los lactococos, ya que los recuentos en agar M17 se fueron reduciendo progresivamente con el transcurso de la maduración. El descenso en los recuentos de LAB y lactococos, en particular,

es un fenómeno corrientemente observado y descrito por varios autores (Czárán et al., 2018; Martley and Crow, 1993; Menéndez et al., 2000; Sant'Anna et al., 2019). Con el transcurso de la maduración, los recuentos de bacterias lácticas se asocian en mayor medida a microorganismos como los lactobacilos y los enterococos, más ácidotolerantes que los lactococos y *Leuconostoc*.

Los lactobacilos, han sido empleados en numerosas ocasiones como cultivos adjuntos para mejorar las características sensoriales de los quesos (Hannon et al., 2003; Kırmaç et al., 2014; Lemieux et al., 1989). En nuestro estudio, los recuentos de lactobacilos en agar ROGOSA mostraron una gran variabilidad entre los lotes. Los lotes A y B, que no incluyeron lactobacilos mostraron recuentos del orden de 7,3 a 8 (log ufc/g) a los 60 días, descendiendo hasta valores aproximadamente de 5 (log ufc/g) en el lote A y de 6 (log ufc/g) en el lote B. El lote C, que incluyó una cepa de *Lactobacillus plantarum*, mostró valores de 7,75 (log ufc/g) a los 60 días de maduración y de 7,57 (log ufc/g) a los 100 días. Finalmente, en el lote D, los recuentos de ROGOSA fueron de 8,72 (log ufc/g) a los 60 días, manteniéndose prácticamente constantes hasta el final de la maduración. Los recuentos de este lote fueron más altos que en el lote elaborado con el cultivo que incluyó la cepa de lactobacilo, lo cual nos ha llevado a pensar que el empleo de la cepa de enterococo en el cultivo iniciador podría favorecer la multiplicación y el asentamiento de los lactobacilos.

Finalmente, señalar que en los lotes A y B no se detectó la presencia de *Enterobacteriaceae* en ninguno de los tiempos de maduración en estudio. En los quesos elaborados con leche pasteurizada, el descenso en los recuentos de *Enterobacteriaceae* cuando están presentes tiene lugar en las primeras etapas de la maduración, en relación con el curso de acidificación del queso (Herreros et al., 2007). Por el contrario, en los lotes C y D las *Enterobacteriaceae* estuvieron presentes hasta los 60 días de maduración e incluso hasta los 100 días para el lote D, a pesar de que la acidez titulable detectada en los quesos de este lote fue la más elevada entre los lotes estudiados. Este hecho probablemente estará asociado a una contaminación después de la pasteurización de la leche como consecuencia de una incorrecta manipulación de la cuajada durante el desuerado y moldeado de los quesos.

4.4.4 Análisis de los parámetros proteolíticos y lipolíticos

4.4.4.1 Fracciones Nitrogenadas e índice de acidez de la grasa

La evolución de las principales fracciones nitrogenadas estudiadas y del índice de acidez de la grasa en los lotes de queso Zamorano elaborados con diferentes cultivos iniciadores a lo largo de la maduración se muestra en la tabla C4.4.

La proteólisis mostró un comportamiento similar en todos los lotes, aumentando de manera significativa ($p \leq 0,001$) todos los parámetros estudiados (NS-pH_{4,6}, NS-TCA_{12%}, NS-

PTA5%, Nitrógeno polipeptídico y Nitrógeno peptídico) con el tiempo de maduración tal y como ha sido señalado por otros autores (Kirmaçi et al., 2014).

Tabla C4.4 Cambios en las fracciones nitrogenadas y del índice de acidez de la grasa durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI	TM
NS-pH _{4,6}	60	13,74 ± 0,62 ^{cA}	10,89 ± 0,34 ^{aA}	12,72 ± 0,30 ^{bA}	13,98 ± 0,26 ^{cA}	**	***
	100	14,55 ± 0,41 ^{aA}	14,63 ± 0,11 ^{abB}	15,35 ± 0,47 ^{bB}	17,03 ± 0,66 ^{cB}		
NS-TCA _{12%}	60	8,04 ± 0,10 ^{bA}	6,65 ± 0,33 ^{aA}	6,60 ± 0,02 ^{aA}	8,10 ± 0,20 ^{bA}	*	***
	100	8,57 ± 0,09 ^{aB}	8,57 ± 0,04 ^{aB}	10,28 ± 0,28 ^{bB}	10,13 ± 0,06 ^{bB}		
NS-PTA _{5%}	60	2,11 ± 0,01 ^A	2,00 ± 0,01 ^A	2,09 ± 0,02 ^A	2,01 ± 0,03 ^A	NS	***
	100	2,41 ± 0,24 ^B	2,39 ± 0,01 ^B	2,38 ± 0,01 ^B	2,41 ± 0,05 ^B		
Np	60	5,70 ± 0,71 ^{bA}	4,25 ± 0,01 ^{aA}	6,12 ± 0,33 ^{bA}	5,89 ± 0,06 ^{bA}	**	***
	100	5,98 ± 0,49 ^{aA}	6,07 ± 0,08 ^{aB}	5,08 ± 0,20 ^{aB}	6,91 ± 0,60 ^{bB}		
Npp	60	5,94 ± 0,09 ^{abA}	4,65 ± 0,31 ^{abA}	4,51 ± 0,04 ^{aA}	6,09 ± 0,16 ^{bA}	*	***
	100	6,16 ± 0,32 ^{aA}	6,18 ± 0,04 ^{aB}	7,90 ± 0,28 ^{bB}	7,72 ± 0,11 ^{bB}		
IAG	60	0,93 ± 0,04 ^{bA}	0,83 ± 0,02 ^{aA}	0,88 ± 0,02 ^{bA}	0,79 ± 0,08 ^{aA}	*	***
	100	1,75 ± 0,20 ^{abB}	1,96 ± 0,08 ^{cB}	1,54 ± 0,04 ^{aB}	1,82 ± 0,08 ^{bB}		

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. DM: días de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador; TM: efecto del tiempo de maduración. NS: No hay diferencias significativas; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Valores con distinto superíndice (letras minúsculas) para parámetro presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Valores con distinto superíndice (letras mayúsculas) para cada parámetro y lote presentaron diferencias significativas en función del tiempo de maduración.

NS-pH_{4,6}: nitrógeno soluble a pH 4,6; NS-TCA_{12%}: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% NS-PTA_{5%}: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5%; Npp: nitrógeno polipeptídico; Np: nitrógeno peptídico (valores expresados como % de cada una de las fracciones/nitrógeno total). IAG: Índice acidez de la grasa (mg de KOH/100 g de grasa).

Lote A: cultivo comercial (*Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*); Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

El %NS-pH 4,6 sobre Nitrógeno Total (%NS-pH_{4,6}/NT), que es un indicador de la extensión de la proteólisis en el queso, difirió significativamente entre los lotes ($p \leq 0,01$), presentando al cabo de 60 días los valores mínimos para los quesos del lote B y los máximos para los pertenecientes al lote D. A los 100 días de maduración, los quesos del lote D fueron, de nuevo, los que mostraron la mayor extensión de la proteólisis, tal y como demuestran los altos valores del %NS-pH 4,6 obtenidos para estos quesos. La inclusión en el cultivo iniciador de lactobacilos o enterococos contribuyó a incrementar el grado de proteólisis del queso Zamorano de manera significativa. Este hecho podría ser interesante a la hora de utilizar estas cepas en la elaboración del queso de oveja de larga maduración con el fin de acortar dicho proceso, sin que sus características sensoriales se vayan a ver afectadas negativamente.

Resultados muy similares fueron observados al analizar la evolución del contenido de Nitrógeno Soluble en Ácido Tricloroacético al 12%, expresado como % del Nitrógeno Total (%NS-TCA 12%/NT), el cual es utilizado como índice del grado de profundidad de la

proteólisis. Las mayores diferencias entre lotes se establecieron a los 100 días de maduración, con valores significativamente ($p \leq 0,05$) más altos en los quesos de los lotes C y D.

Si al $\%NS-pH_{4,6}/NT$ le restamos el $\%NS-TCA_{12}\%/NT$ obtenemos un nuevo parámetro, el cual se corresponde con el Nitrógeno polipeptídico (Npp). Esta fracción nitrogenada, que engloba los péptidos de tamaño molecular grande e intermedio que se liberan a partir de las caseínas, presentó unos valores muy similares al cabo de dos meses de maduración en todos los lotes estudiados, excepto en el lote B, que presentó unos valores significativamente inferiores al resto. Por el contrario, al cabo de 100 días, todos los quesos elaborados presentaron valores muy similares excepto los del lote D, que alcanzaron valores significativamente superiores al resto ($p \leq 0,01$). Dado que el contenido de Npp viene determinado principalmente por la actividad de la enzima coagulante y la cantidad utilizada de la misma fue similar en todos los lotes elaborados, las pequeñas diferencias apreciadas entre lotes estarán asociadas al tipo de cultivo iniciador utilizado y a su potencialidad para liberar proteinasas que hidrolicen la caseína en péptidos de tamaño molecular alto o intermedio. No obstante, si expresamos el Npp como porcentaje del $NS-pH_{4,6}$, comprobamos que dicho porcentaje fue muy similar en todos los lotes, oscilando en torno al 66-70% en ambas etapas del proceso madurativo. Es cierto que se produjo un descenso en dicho porcentaje entre los 60 y 100 días, aunque el mismo debería ser más acusado a medida que progresa la maduración.

Dentro del estudio de los parámetros proteolíticos, el Nitrógeno peptídico (Np) y el Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% ($NS-PTA_{5}\%$), ambos expresados como porcentaje de Nitrógeno Total, forman parte del $NS-TCA_{12}\%$ y nos permitieron establecer diferencias en el grado de profundidad de la proteólisis de los quesos en función del tipo de cultivo iniciador. El contenido en Nitrógeno peptídico es un excelente indicador de la actividad peptidasa de los microorganismos, al estar integrado por péptidos de pequeño tamaño molecular y representó en todos los quesos la fracción mayoritaria del $NS-TCA_{12}\%$ con unos valores que oscilaron entre el 69-75% en ambas etapas de la maduración. De igual manera pudimos comprobar que entre los 60 y 100 días de maduración se produjo un ligero descenso en el $\%Np/NS-TCA_{12}\%$ con la excepción del lote C. De manera paralela, pero en sentido inverso, se produjo un aumento del $\%NS-PTA_{5}\%/NS-TCA_{12}\%$. El $\%NS-PTA_{5}\%/NT$ es un indicador de la actividad aminopeptidasa de los microorganismos durante la maduración del queso, al incluir los aminoácidos libres y algunos péptidos con tamaño molecular inferior a 600 D. En nuestro estudio, si bien observamos el establecimiento de diferencias significativas en función del tiempo de maduración ($p \leq 0,001$), éstas no fueron detectadas a nivel del tipo de cultivo iniciador empleado en la elaboración del queso Zamorano.

En resumen, podemos señalar que, en general, el lote D fue el que presentó una mayor extensión y profundidad de la proteólisis. Ello podría ser explicado por la presencia en el

cultivo iniciador de cepas del género *Enterococcus*, las cuales, en general, presentan una elevada actividad proteolítica, como ha sido descrito por (Kirmaçi et al., 2014). Así mismo, cabe destacar la importante actividad proteolítica en los lotes de queso elaborados con cepas de lactobacilos, la cual fue ligeramente inferior a la de los quesos del lote D. Sánchez et al. (2005) señalaron una baja capacidad proteolítica de las cepas de *Lactobacillus plantarum*, si bien otros estudios han demostrado que dicho carácter es dependiente de cepa y que presentan una elevada capacidad de adaptación a matrices complejas como los quesos elaborados con la leche de oveja, estableciéndose interacciones de tipo sinérgico entre lactococos y lactobacilos mesófilos (Mangia et al., 2008; Ortigosa et al., 2006; Parra et al., 2000), lo que explicaría nuestros datos. Así mismo, es preciso señalar que la cepa de lactobacilos utilizada en nuestro trabajo fue seleccionada por su capacidad aminopeptidasa.

Nuestros resultados de las fracciones nitrogenadas para todos los lotes de queso fueron ligeramente inferiores a los descritos por otros autores para queso Zamorano (Ferrazza, 2002), que podría estar asociado con unos valores más bajos de actividad del agua ($< 0,930$) y más altos para la relación sal/humedad ($> 7\%$) observados para los quesos de nuestro estudio, que actuarían inhibiendo en cierto grado la actividad de las proteinasas y peptidasas microbianas.

Por último, el índice de acidez de la grasa, que es un índice objetivo del grado de lipólisis del queso, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$), aunque pequeñas, entre los diferentes lotes de queso en ambos tiempos de maduración, corroborando la escasa influencia de las bacterias lácticas utilizadas en el cultivo iniciador. Sin embargo, el tiempo de maduración sí influyó de forma significativa ($p \leq 0,001$), viéndose duplicados los valores a los 100 días de maduración. Este bajo grado de lipólisis estaría relacionado con la inactivación de la lipasa nativa por la pasterización y por la escasa actividad lipasa/esterasa de la microbiota acidoláctica presente en el queso. Drouault et al. (2002) han señalado que, dentro de las bacterias lácticas, aquellas que contribuyen más a la lipólisis del queso eran algunas especies de lactobacilos o enterococos, si bien, y como hemos señalado previamente, a pesar de estar presentes en alguno de los cultivos iniciadores utilizados en nuestro estudio, su actividad estaría muy reducida debido a las adversas condiciones medioambientales instauradas en los quesos durante la maduración.

4.4.4.2 Contenido en aminoácidos libres

En la tabla C4.5 se muestra la evolución del contenido en aminoácidos libres en los lotes de queso Zamorano elaborados con diferentes cultivos iniciadores a lo largo de la maduración.

El contenido en aminoácidos libres se incrementó de forma significativa ($p \leq 0,001$) con el transcurso de la maduración, llegando a duplicar su valor a los 100 días de maduración, respecto a los valores encontrados a 60 días de maduración. Los aminoácidos libres

mayoritarios a los 100 días de maduración en todos los lotes fueron la suma de Gln+Gly, Gaba, Leu, Val y Lys, representando aproximadamente el 60% de la cantidad total de aminoácidos al final de la maduración, resultados concordantes con los de otros autores (Diana et al., 2014; Poveda et al., 2004).

Al cabo de 100 días, la cantidad media de aminoácidos libres totales osciló entre 1206 mg/100 g de queso en el lote B hasta los 1656 mg/100 g de queso en el lote C. Los lotes de quesos C y D fueron los que mayores concentraciones de aminoácidos libres presentaron. Estos datos fueron similares a los descritos por Poveda et al. (2004) para queso Manchego con un tiempo de tiempo de maduración similar, por (Diana et al. (2014) en un estudio realizado con 16 quesos de oveja, o en otro estudio reciente sobre queso Zamorano (Renes et al., 2019b).

La agrupación de los datos mediante componentes principales (figura C4.1), nos permitió comprobar que un 83% de la variación venía explicada por dos de ellos. Por un lado, nos permitió discriminar las muestras de queso por el tiempo de maduración y, al mismo tiempo, por lotes. Así, a los 60 días de maduración, los lotes A y B se agruparon asociados a la componente positiva del CP2, mientras que los lotes C y D estuvieron ligados a la componente negativa del CP2. Sin embargo, a los 100 días de maduración, sólo el lote C quedó determinado por la componente negativa del CP2, agrupándose en la parte positiva de la misma, los lotes A y B fuertemente y un poco menos intensamente, el lote D.

Al estudiar la proyección de las variables (figura C4.2) se observó una alta correlación negativa (por encima de -0.88) de los aminoácidos con el CP1. Se pudo comprobar que se corresponde con los lotes que presentaron un mayor tiempo de maduración y dentro de estos, con los de mayor cantidad de aminoácidos (destacando el lote C y en menor medida el lote D).

Estos resultados confirmaron que los quesos elaborados con cultivos iniciadores acidificantes, ya sean comerciales (lote A) o autóctonos (lote B), se caracterizaron por una mayor presencia de histidina, mientras que aquellos en los que el cultivo iniciador incluía además de bacterias acidificantes, alguna cepa de lactobacilos o enterococos, presentaron mayores concentraciones de triptófano y prolina.

Tabla C4.5. Evolución del contenido en aminoácidos libres durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI	TM
Asp	60	10,19 ± 0,97 ^{aA}	12,02 ± 1,51 ^{aA}	15,89 ± 1,14 ^{bA}	16,90 ± 1,61 ^{bA}	**	***
	100	27,89 ± 3,51 ^{cB}	14,59 ± 1,89 ^{aA}	36,87 ± 2,66 ^{dB}	19,88 ± 1,39 ^{bA}		
Glu	60	11,77 ± 1,12 ^{aA}	29,47 ± 2,05 ^{cA}	21,54 ± 2,81 ^{bA}	21,40 ± 2,04 ^{bA}	**	***
	100	23,98 ± 2,28 ^{aA}	22,17 ± 2,11 ^{aB}	30,75 ± 1,93 ^{bB}	77,84 ± 7,41 ^{cB}		
Asn+Ser	60	17,51 ± 1,27 ^{aA}	27,42 ± 2,61 ^{bA}	41,18 ± 4,92 ^{cA}	28,41 ± 2,00 ^{bA}	**	***
	100	88,93 ± 6,47 ^{cB}	67,40 ± 6,42 ^{bB}	75,20 ± 8,16 ^{bB}	41,96 ± 3,99 ^{aB}		
Gln+Gly	60	43,33 ± 4,12 ^{aA}	87,75 ± 8,35 ^{bA}	130,86 ± 11,46 ^{cA}	75,17 ± 8,16 ^{bA}	**	***
	100	385,11 ± 18,40 ^{cB}	193,27 ±	336,30 ±	374,50 ±		
His	60	16,48 ± 1,57 ^{bA}	15,46 ± 1,47 ^{bA}	8,22 ± 0,98 ^{aA}	6,29 ± 0,30 ^{aA}	**	***
	100	16,62 ± 1,99 ^{bA}	20,85 ± 1,58 ^{cB}	6,17 ± 0,82 ^{aA}	8,63 ± 0,59 ^{aB}		
Cit	60	3,13 ± 0,30 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	5,55 ± 0,73 ^{bA}	3,61 ± 0,54 ^{aA}	***	***
	100	16,14 ± 1,24 ^{cB}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	6,11 ± 0,58 ^{bA}	6,48 ± 0,82 ^{bB}		
Tau	60	8,62 ± 0,82 ^a	16,93 ± 0,61 ^b	35,89 ± 3,42 ^c	18,55 ± 1,97 ^b	**	***
	100	50,17 ± 4,78 ^a	49,65 ± 4,73 ^a	62,87 ± 4,69 ^b	49,25 ± 5,99 ^a		
Gaba	60	70,78 ± 6,74 ^{abA}	53,11 ± 4,06 ^{aA}	102,07 ± 9,72 ^{cA}	80,57 ± 7,67 ^{bA}	**	***
	100	103,51 ± 12,12 ^{abB}	127,36 ± 9,85 ^{bbB}	156,77 ± 12,52 ^{cbB}	131,54 ± 14,93 ^{bbB}		
Arg+Thr	60	16,35 ± 1,26 ^{aA}	25,91 ± 1,47 ^{bA}	35,78 ± 3,41 ^{cA}	30,36 ± 2,89 ^{bcA}	**	***
	100	72,84 ± 7,33 ^{cB}	48,76 ± 5,11 ^{abB}	76,98 ± 6,93 ^{cbB}	64,17 ± 4,64 ^{bbB}		
Ala	60	9,52 ± 0,91 ^{aA}	12,91 ± 1,23 ^{aA}	45,52 ± 6,33 ^{cA}	20,39 ± 2,34 ^{bA}	***	***
	100	42,61 ± 5,19 ^{bB}	35,38 ± 3,37 ^{abB}	54,50 ± 4,06 ^{cbB}	55,82 ± 5,31 ^{cbB}		
Pro	60	36,76 ± 2,50 ^{bA}	27,55 ± 2,62 ^{aA}	37,72 ± 2,59 ^{bA}	49,63 ± 3,72 ^{cA}	***	NS
	100	37,35 ± 2,42 ^{bA}	25,43 ± 3,56 ^{aA}	61,80 ± 3,35 ^{cbB}	35,20 ± 4,18 ^{bbB}		
Tyr	60	12,86 ± 2,22 ^{aA}	16,65 ± 1,59 ^{aA}	14,27 ± 1,36 ^{aA}	21,93 ± 1,94 ^{bA}	**	***
	100	29,09 ± 2,46 ^{bbB}	25,82 ± 2,88 ^{abB}	30,28 ± 3,48 ^{bbB}	36,52 ± 2,46 ^{cbB}		
Val	60	17,85 ± 1,01 ^{aA}	32,91 ± 3,13 ^{bA}	53,77 ± 6,12 ^{cA}	41,03 ± 2,91 ^{bA}	**	***
	100	79,86 ± 6,60 ^{bbB}	56,92 ± 5,42 ^{abB}	88,66 ± 7,44 ^{bbB}	82,17 ± 7,82 ^{bbB}		
Met	60	7,14 ± 0,68 ^{aA}	8,83 ± 0,74 ^{aA}	23,26 ± 3,21 ^{bA}	7,79 ± 0,94 ^{aA}	**	***
	100	24,20 ± 2,30 ^{bbB}	16,29 ± 1,35 ^{abB}	33,70 ± 3,01 ^{cbB}	22,36 ± 2,13 ^{bbB}		
Ile	60	7,36 ± 0,70 ^{aA}	13,10 ± 1,45 ^{bA}	15,69 ± 1,29 ^{bA}	15,35 ± 1,46 ^{bA}	**	***
	100	34,80 ± 3,11 ^{bbB}	20,91 ± 1,99 ^{abB}	34,58 ± 2,89 ^{bbB}	32,86 ± 3,13 ^{bbB}		
Leu	60	60,05 ± 5,72 ^{aA}	90,40 ± 8,21 ^{bA}	161,21 ± 12,35 ^{dA}	126,30 ±	**	***
	100	198,66 ± 18,91 ^{bbB}	158,69 ± 17,11 ^{abB}	188,57 ±	210,27 ±		
Phe	60	17,60 ± 1,68 ^{aA}	21,87 ± 1,98 ^{bA}	32,13 ± 2,06 ^{cA}	32,63 ± 3,11 ^{cA}	**	***
	100	42,95 ± 4,01 ^{cB}	34,30 ± 3,27 ^{abB}	36,56 ± 3,18 ^{abA}	42,04 ± 4,00 ^{bcB}		
Trp	60	17,31 ± 1,65 ^{aA}	13,06 ± 1,24 ^{aA}	32,11 ± 2,06 ^{bA}	30,71 ± 2,92 ^{bA}	**	***
	100	20,65 ± 1,97 ^{aA}	21,67 ± 1,76 ^{abB}	40,68 ± 3,47 ^{cbB}	30,14 ± 2,87 ^{bA}		
Orn	60	9,10 ± 1,20 ^{aA}	12,59 ± 0,87 ^{abA}	21,30 ± 1,29 ^{cA}	13,55 ± 2,03 ^{bA}	**	***
	100	27,49 ± 2,04 ^{bbB}	21,46 ± 2,42 ^{abB}	34,19 ± 3,26 ^{cbB}	34,83 ± 3,32 ^{cbB}		
Lys	60	33,20 ± 5,47 ^{aA}	57,42 ± 3,16 ^{bA}	56,56 ± 5,38 ^{bA}	62,80 ± 5,98 ^{bA}	*	***
	100	162,54 ± 15,47 ^{abB}	144,89 ±	166,43 ±	172,62 ±		

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. para cada aminoácido (mg/100 g de queso). DM: días de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador; TM: efecto del tiempo de maduración. NS: No hay diferencias significativas; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Valores con distinto superíndice (letras minúsculas) para parámetro presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Valores con distinto superíndice (letras mayúsculas) para cada parámetro y lote presentaron diferencias significativas en función del tiempo de maduración.

Lote A: cultivo comercial [*Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*]; Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

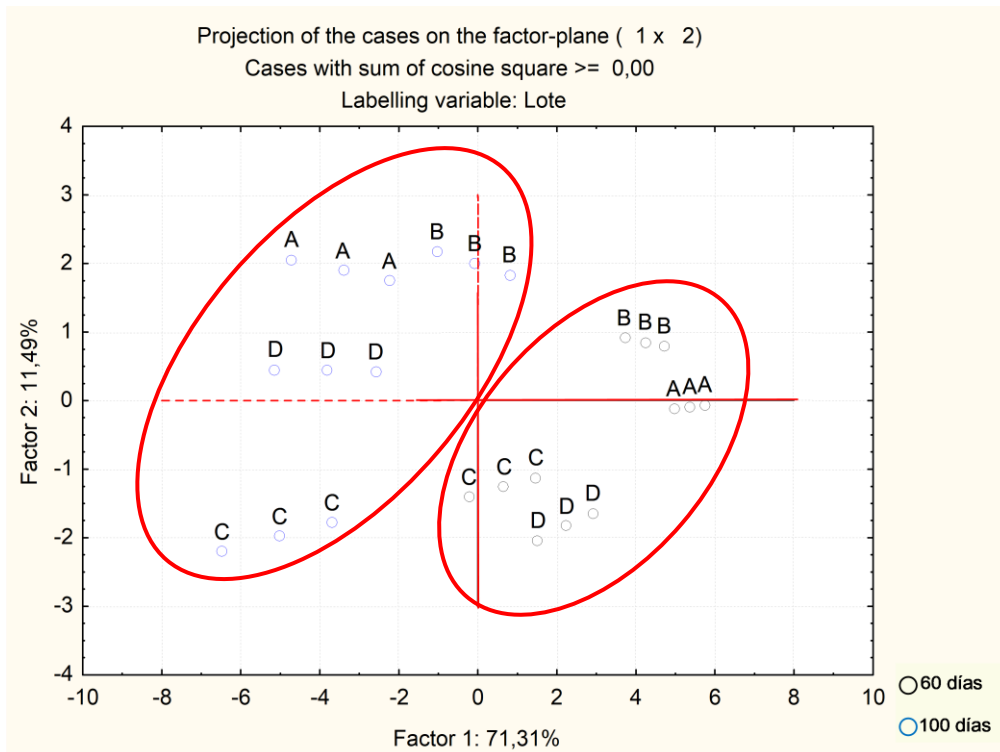


Figura C4.1 Análisis de componentes principales para el estudio de aminoácidos libres del queso Zamorano elaborado con distintos cultivos iniciadores a lo largo de la maduración.

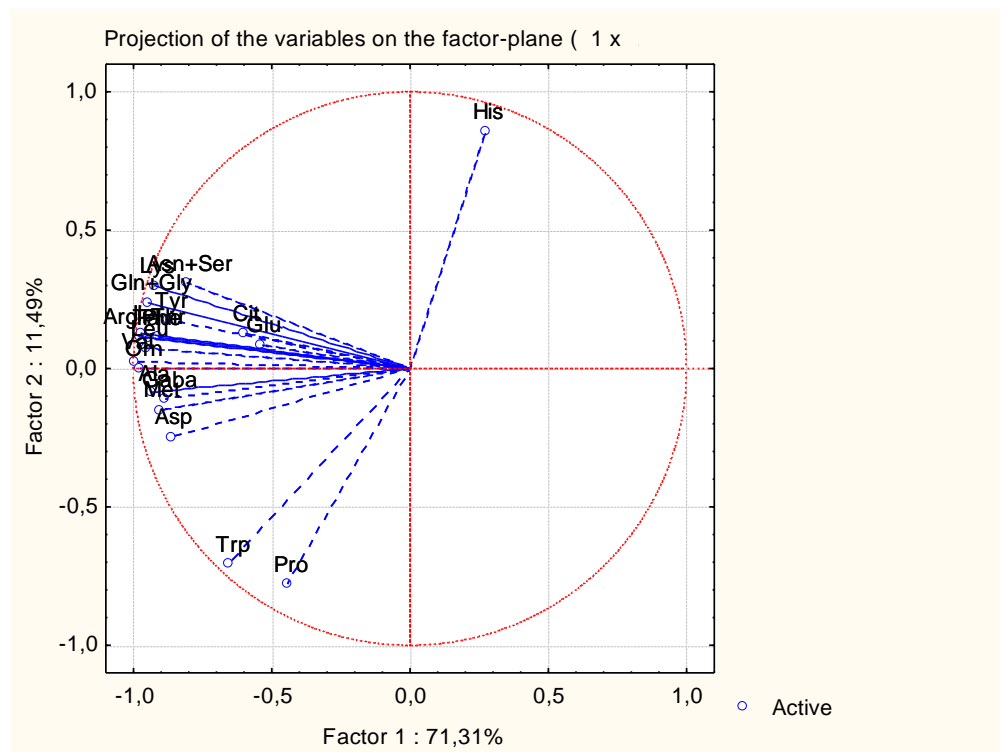


Figura C4.2. Análisis de componentes principales para el estudio de aminoácidos libres del queso Zamorano elaborado con distintos cultivos iniciadores a lo largo de la maduración. mediante la representación de las proyecciones.

4.4.4.3 Contenido en aminas biógenas

En la tabla C4.6 se muestra la evolución del contenido en aminas biógenas en los lotes de queso Zamorano elaborados con distintos tipos de cultivos iniciadores a lo largo de la maduración.

Tabla C4.6. Evolución del contenido en aminas biógenas durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI	TM
Try	60	113,76 ± 1,02 ^{dA}	65,55 ± 4,15 ^{aA}	91,84 ± 7,00 ^{bA}	108,98 ± 2,73 ^{cA}	***	NS
	100	115,60 ± 1,93 ^{dA}	81,13 ± 0,30 ^{aB}	94,01 ± 1,26 ^{bA}	109,69 ± 3,20 ^{cA}		
Phe	60	297,18 ± 0,37 ^{cA}	222,64 ± 1,72 ^{aA}	284,77 ± 0,99 ^{bA}	332,76 ± 0,59 ^{dA}	**	**
	100	390,54 ± 8,05 ^{bB}	288,99 ± 14,11 ^{aB}	362,29 ± 11,22 ^{bB}	357,88 ± 4,34 ^{bB}		
Put	60	2,51 ± 0,44 ^{bA}	1,11 ± 0,04 ^{aA}	0,56 ± 0,03 ^{aA}	1,23 ± 0,28 ^{aA}	*	**
	100	4,30 ± 0,11 ^{dB}	1,49 ± 0,13 ^{aA}	2,68 ± 0,19 ^{bB}	3,42 ± 0,04 ^{cB}		
Cad	60	4,73 ± 0,11 ^{cA}	1,22 ± 0,10 ^{aA}	1,08 ± 0,06 ^{aA}	2,32 ± 0,65 ^{bA}	**	NS
	100	5,09 ± 0,21 ^{dA}	1,31 ± 0,03 ^{aA}	2,41 ± 0,28 ^{bB}	3,72 ± 0,21 ^{cB}		
Ht	60	36,55 ± 0,86 ^{cA}	20,62 ± 0,27 ^{aA}	31,27 ± 0,61 ^{bA}	37,89 ± 0,89 ^{cA}	*	**
	100	65,73 ± 1,00 ^{dB}	35,12 ± 1,23 ^{aB}	46,63 ± 0,51 ^{bB}	51,70 ± 1,38 ^{cB}		
Tyr	60	15,23 ± 0,90 ^{aA}	16,48 ± 0,24 ^{bA}	15,86 ± 0,17 ^{aA}	18,33 ± 0,11 ^{cA}	*	**
	100	18,74 ± 2,27 ^{aB}	19,97 ± 1,22 ^{aB}	22,59 ± 0,19 ^{bB}	28,50 ± 0,06 ^{cB}		
Spd	60	0,73 ± 0,42 ^{aA}	1,11 ± 0,05 ^{aA}	3,05 ± 0,23 ^{bA}	2,85 ± 0,73 ^{bA}	*	NS
	100	1,38 ± 0,07 ^{aA}	1,44 ± 0,21 ^{aA}	4,20 ± 0,05 ^{bA}	4,31 ± 0,25 ^{bA}		
Sp	60	50,56 ± 0,63 ^{dA}	45,09 ± 0,54 ^{cA}	41,58 ± 0,37 ^{bA}	34,07 ± 0,72 ^{aA}	*	**
	100	104,30 ± 1,30 ^{cB}	65,84 ± 1,67 ^{bB}	63,17 ± 1,13 ^{bB}	51,50 ± 0,16 ^{aB}		

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados para cada amina biógena (mg/kg de queso). DM: días de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador; TM: efecto del tiempo de maduración. NS: No hay diferencias significativas; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Valores con distinto superíndice (letras minúsculas) para cada amina biógena presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Valores con distinto superíndice (letras mayúsculas) para cada amina biógena y lote presentaron diferencias significativas en función del tiempo de maduración.

Try: triptamina; Phe: feniletilamina; Put: putrescina; Cad: cadaverina; Ht: histamina; Tyr: tiramina; Spd: espermidina; Sp: espermina. Lote A: cultivo comercial (*Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*); Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

Los quesos presentaron un contenido total de aminas biógenas que osciló desde 373 mg/kg para el queso del lote B a los 60 días de maduración hasta valores de 705 mg/kg de queso del lote A con 100 días de maduración. Estos valores fueron similares a los descritos para el queso Idiazábal (Ordóñez et al., 1997) y para el queso Pecorino (Schirone et al., 2013), aunque más bajos que los descritos para otras variedades como Pecorino Abruzzese (Martuscelli et al., 2005). Así mismo, nuestros valores fueron inferiores a los reseñados por Renes et al. (2019) en un estudio reciente sobre queso Zamorano elaborado con cultivos iniciadores integrados por distintas cepas autóctonas, aunque pensamos que en este caso la actividad proteolítica superior de las cepas elegidas en su estudio y, pertenecientes a la misma colección, fue determinante en estos resultados (Herreros et al., 2003). El bajo contenido de aminas biógenas detectado en el queso de oveja Zamorano, en comparación con otros quesos

de características similares, fue un claro indicador de buenas prácticas de higiene durante el procesamiento y manejo del queso.

La feniletilamina, la espermina y la triptamina resultaron ser las aminas biógenas con mayor concentración en todos los lotes examinados, representando el 81% del total de las aminas biógenas analizadas. Estos resultados concuerdan con los descritos para el queso Pecorino Abruzzese (Martuscelli et al., 2005) o el queso Terrincho (Pintado et al., 2008), en los que la feniletilamina era una de las principales aminas. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Renes et al. (2019) en el queso Zamorano, la amina mayoritaria resultó ser la tiramina, la cadaverina también presentó unos valores superiores a los señalados en nuestro estudio, mientras que el uso de algunas cepas en el cultivo iniciador no permitía detectar la presencia de feniletilamina.

El lote de queso con la mayor concentración de aminas biógenas fue el D, seguido del A, C y, finalmente, el lote B. Estos resultados reflejaban las diferencias respecto a los microorganismos que constituyeron los cultivos iniciadores utilizados en la fabricación de quesos. Si bien no se observaron diferencias significativas en la extensión y profundidad de la proteólisis, el lote B mostró los niveles más bajos de nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (un indicador de actividad de aminopeptidasa en el queso). Los valores más altos de aminoácidos libres se obtuvieron en los lotes A y C y en el D a los 100 días de maduración, constituyendo los sustratos en la liberación de aminas biógenas por las BAL presentes en el queso.

La gran mayoría de los lotes presentaron diferencias significativas en las concentraciones de las diferentes aminas biógenas durante la maduración. En este sentido, Novella-Rodríguez et al. (2002) señalaron que los quesos elaborados con leche pasteurizada y diferentes cultivos iniciadores diferían en sus concentraciones de aminas biógenas, como se observó en el presente estudio. A los 100 días de maduración, los quesos de leche de oveja elaborados con el cultivo iniciador comercial (lote A) fueron los que mostraron las mayores concentraciones de cadaverina, espermidina, histamina y triptamina, mientras que los quesos elaborados con el cultivo iniciador autóctono similar (pertenecientes al lote B) fueron los que presentaron el menor contenido.

Es probable que estas diferencias fueran debidas al hecho de que las cepas comerciales se hubieran seleccionado en base a su capacidad proteolítica, con el objetivo de acelerar el tiempo de maduración, liberando una cantidad suficiente de aminoácidos libres que contribuyen a una mayor producción de aminas. Sin embargo, las cepas autóctonas utilizadas para el lote B se caracterizaron por tener una capacidad proteolítica menor y una baja actividad descarboxilasa (Herrerros et al., 2003), lo que pudo dar lugar a una menor concentración de aminas biógenas. Sin embargo, en el caso de la putrescina, la espermina y la feniletilamina, el lote D presentó también una alta concentración a los 100 días de maduración. El mayor

contenido de putrescina en los lotes A y D podría estar relacionado con mayores recuentos de *Enterobacteriaceae* (Sacristán et al., 2012), que han sido asociados con la producción de esta amina biógena por otros autores (Chaves-López et al., 2006). Por otro lado, la incorporación de una cepa del género *Enterococcus* en el cultivo iniciador utilizado en la elaboración de los quesos del lote D podría también asociarse con los niveles más altos de putrescina detectados en los quesos de dicho lote.

El contenido de tiramina fue diferente de otras aminas biógenas, mostrando las concentraciones más altas para el lote D a los 100 días de maduración. Sin embargo, la producción de tiramina depende más de la cepa que la especie, lo que explicaría las diferencias entre los lotes elaborados con el cultivo comercial y los elaborados con las cepas autóctonas.

4.4.5 Parámetros del color

Las modificaciones de los principales parámetros del color en los lotes de queso Zamorano elaborados con distintos cultivos iniciadores durante la maduración aparecen reflejados en la tabla C4.7. En los parámetros del color se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,001$) con el progreso del proceso madurativo, disminuyendo la luminosidad (L^*) y el color amarillo (b^*) y aumentando el verde (a^*). La luminosidad está correlacionada con la humedad de forma positiva (Alvarez et al., 2007); por lo tanto, es lógico que al avanzar la maduración disminuya el valor de L^* debido a que la pérdida de humedad conlleva la formación de una matriz más compacta.

Tabla C4.7. Cambios en los parámetros del color durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI	TM
$L^*(D65)$	60	77,58 ± 2,00 ^{abB}	74,99 ± 3,51 ^{abB}	80,46 ± 2,54 ^{bB}	78,58 ± 2,29 ^{bB}	*	***
	100	66,52 ± 4,81 ^{aA}	67,93 ± 3,32 ^{aA}	67,94 ± 6,04 ^{aA}	69,05 ± 4,05 ^{aA}		
$a^*(D65)$	60	-2,82 ± 0,10 ^{aA}	-2,16 ± 0,36 ^{bA}	-2,15 ± 0,18 ^{bA}	-1,73 ± 0,14 ^{CA}	***	***
	100	-2,92 ± 0,17 ^{aA}	-2,29 ± 0,12 ^{bA}	-2,81 ± 0,29 ^{aB}	-2,32 ± 0,28 ^{bB}		
$b^*(D65)$	60	17,34 ± 1,05 ^{CB}	14,97 ± 2,17 ^{abB}	15,98 ± 0,62 ^{bB}	14,02 ± 1,15 ^{aA}	**	***
	100	15,63 ± 0,73 ^{bA}	13,65 ± 1,15 ^{aA}	14,71 ± 1,71 ^{abA}	13,84 ± 1,42 ^{aA}		

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. DM: días de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador; TM: efecto del tiempo de maduración. NS: No hay diferencias significativas; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Valores con distinto superíndice (letras minúsculas) para parámetro presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Valores con distinto superíndice (letras mayúsculas) para cada parámetro y lote presentaron diferencias significativas en función del tiempo de maduración.

$L^*(65)$: Luminosidad; $a^*(65)$ rojo +/-verde -; $b^*(65)$: amarillo +/-azul -.

Lote A: cultivo comercial [*Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*]; Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

Del mismo modo, el lote también ejerció diferencias significativas principalmente para los parámetros a^* y b^* , donde los mayores valores se correspondieron con los lotes A y C y los

menores con los lotes B y D. Estos valores se correspondieron con lo esperado, ya que los carotenos son liposolubles acumulándose en la grasa, aportando un color amarillo-anaranjado al queso (Ramírez-Navas, 2010). Los menores contenidos en extracto seco y proteína de los lotes A y C también podrían modificar la estructura de la matriz del queso contribuyendo al establecimiento de diferencias en los parámetros del color entre los diferentes lotes de queso Zamorano estudiados.

4.4.6 Análisis del Perfil de Textura

En la tabla C4.8 se presenta la evolución de los parámetros de textura analizados en los lotes de queso Zamorano elaborados con diferentes cultivos iniciadores a lo largo de la maduración. La definición y cuantificación de cada uno de los parámetros obtenidos en el análisis del perfil de textura se llevó a cabo según describe (Bourne, 2002).

Tabla C4.8. Cambios en los parámetros de la textura durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI	TM
Fracturabilidad	60	53,77 ± 0,27 ^{bA}	79,06 ± 1,53 ^{cA}	42,13 ± 1,35 ^{aB}	44,89 ± 0,68 ^{aA}	***	***
	100	72,72 ± 2,53 ^{cB}	91,54 ± 8,99 ^{dB}	33,34 ± 0,92 ^{aA}	59,47 ± 0,62 ^{bB}		
Dureza	60	153,32 ± 6,79 ^{bA}	224,28 ± 6,44 ^{cA}	123,77 ± 2,18 ^{aA}	150,96 ± 2,06 ^{bA}	***	***
	100	237,07 ± 2,78 ^{cB}	253,03 ±	104,62 ± 2,40 ^{aA}	168,16 ± 2,92 ^{bA}		
Adhesividad	60	-2,94 ± 0,35 ^{cA}	-5,54 ± 0,48 ^{aA}	-2,36 ± 0,16 ^{cA}	-3,88 ± 0,013 ^{bB}	***	***
	100	-1,45 ± 0,02 ^{cB}	-1,47 ± 0,13 ^{cB}	-2,53 ± 0,23 ^{bA}	-5,23 ± 0,28 ^{aA}		
Cohesividad	60	0,12 ± 0,00 ^a	0,16 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,00 ^{ab}	**	NS
	100	0,14 ± 0,00 ^c	0,17 ± 0,02 ^b	0,12 ± 0,00 ^a	0,12 ± 0,00 ^a		
Elasticidad	60	0,86 ± 0,02 ^{ab}	0,85 ± 0,02 ^{ab}	0,88 ± 0,02 ^b	0,84 ± 0,03 ^a	*	NS
	100	0,85 ± 0,03 ^{ab}	0,87 ± 0,05 ^{ab}	0,88 ± 0,03 ^b	0,84 ± 0,06 ^a		
Gomosidad	60	18,41 ± 0,20 ^{aA}	35,24 ± 3,23 ^{bA}	17,69 ± 1,08 ^{aA}	20,99 ± 0,31 ^{aA}	**	*
	100	33,91 ± 1,46 ^{cB}	44,60 ± 8,60 ^{dB}	13,01 ± 0,46 ^{aA}	20,91 ± 0,24 ^{bA}		
Masticabilidad	60	6,73 ± 0,98 ^{aA}	13,90 ± 1,24 ^{bA}	5,48 ± 0,64 ^{aA}	5,64 ± 0,37 ^{aA}	***	***
	100	11,43 ± 1,07 ^{bB}	24,77 ± 1,47 ^{cB}	3,59 ± 0,32 ^{aA}	5,52 ± 0,15 ^{aA}		

Valores medios ± desviación estándar de todos los lotes analizados. DM: de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador; TM: efecto del tiempo de maduración. NS: No hay diferencias significativas; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Valores con distinto superíndice (letras minúsculas) para parámetro presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Valores con distinto superíndice (letras mayúsculas) para cada parámetro y lote presentaron diferencias significativas en función del tiempo de maduración.

Fracturabilidad (N); dureza (N); adhesividad (Nxs); Elasticidad (mm); el resto de parámetros son adimensionales.

Lote A: cultivo comercial (*Lc. lactis subsp. lactis* y *Lc. lactis subsp. cremoris*); Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis subsp. lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis subsp. cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis subsp. lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis subsp. cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis subsp. lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis subsp. cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

La fracturabilidad, expresada en Newtons (N), está directamente relacionada con la dureza del producto, estableciéndose diferencias muy significativas ($p \leq 0,001$) en función del lote de queso. Los lotes B y el C fueron los que mostraron las mayores diferencias con respecto al resto, al presentar los valores máximo y mínimo, respectivamente. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el contenido en agua de los quesos, ya que los lotes que mostraron mayores valores de fracturabilidad fueron los que presentaron un menor contenido en agua.

Este hecho implica que cuanto menor sea el contenido en agua en el queso, éste tendrá un comportamiento más similar a un sólido (Dimitreli and Thomareis, 2007; Farahani et al., 2014; García et al., 2016). De igual manera, la fracturabilidad se vio afectada significativamente por el tiempo de maduración aumentando a lo largo de la misma en todos los lotes, excepto en el C, en que disminuyó a los 100 días.

Los valores máximos de dureza, expresados como N, se alcanzaron en el lote A, mientras que los mínimos lo fueron en el lote C. Este comportamiento fue muy similar al descrito para la fracturabilidad, ya que ambos parámetros son afectados por el mismo tipo de factores. Así, se establecieron diferencias significativas entre los lotes de quesos ($p \leq 0,001$), fundamentalmente en lo que se refiere a los lotes B y C. Del mismo modo también hubo grandes diferencias significativas asociadas al tiempo de maduración con máximos valores alcanzados para los 100 días, excepto en el caso del lote C en el que los valores disminuyeron respecto a los 60 días. La mayor dureza de los quesos del lote B podría estar asociada con el mayor contenido de extracto seco y menor contenido en grasa de los mismos, así como a una relación más alta en sal/humedad, los cuales actuarán reforzando la matriz de caseínas que forma el queso, precisándose mayor fuerza para su destrucción durante la masticación. La inclusión de cepas de lactobacilos en el lote C contribuiría a hidrolizar la red de caseína reduciendo la dureza del queso.

La adhesividad, que mide la fuerza necesaria para separar el queso de la sonda y la base del texturómetro, se expresa en Newtons x segundo (N x s), siendo por lo general un resultado negativo; es decir, cuanto más cerca de cero, menor adhesividad. En nuestro estudio y al igual que ocurría en los dos parámetros anteriores, tanto el tipo de lote como el tiempo de maduración ejercieron diferencias muy significativas sobre este parámetro. Los lotes A y B tuvieron un comportamiento muy diferente de los lotes C y D. Así, mientras que, en los primeros, la adhesividad iba disminuyendo durante la maduración de manera significativa, en los lotes C y D se iba incrementando. Estas diferencias estarían relacionadas con el contenido en materia grasa y grado de proteólisis de los quesos. Los quesos Zamorano de los lotes C y D presentaron un mayor contenido graso y un mayor grado de proteólisis, contribuyendo a que la red de caseínas fuera más blanda y viscosa, precisando de mayor fuerza para separar la muestra de la sonda (Nazari et al., 2019), jugando un papel importante las cepas de lactobacilos y enterococos del cultivo iniciador, las cuales se caracterizan por su actividad proteolítica. Por otra parte, los lotes (A y B), con mayor contenido en ES y menor en grasa, presentaron una mayor dureza y una menor adhesividad (Černíková et al., 2017).

La cohesividad mide la resistencia del queso ante las fuerzas aplicadas para permanecer con su estructura íntegra. Al igual que ocurre con la dureza, fracturabilidad o elasticidad, sus valores varían en función del grado de compresión al que se somete la muestra de queso, siendo la cohesividad menor al aumentar el grado de compresión. En nuestro

estudio, todos los quesos presentaron valores semejantes, estableciéndose únicamente ligeras diferencias en función del tipo de lote, presentando los mayores valores los quesos pertenecientes al lote B. No obstante, la medida de este parámetro no nos permitirá obtener ninguna conclusión definitiva sobre la cohesividad de los quesos debido a las condiciones experimentales utilizadas, ya que conllevan la destrucción de la muestra durante el proceso de compresión.

Por lo que se refiere a la elasticidad, que permite medir el grado de recuperación de la forma inicial del queso tras sufrir una deformación y una vez que ha cesado la fuerza que se le ha aplicado, expresándose en mm, cabe señalar que no se observaron prácticamente diferencias en sus valores en función del lote y tiempo de maduración. Este hecho se explica por el grado de deformación aplicado a las muestras (80%), que conllevó la destrucción de la estructura del queso, sin posibilidad de recuperación entre los dos ciclos de compresión.

Tanto la gomosidad, que viene definida como el producto de dureza por cohesividad, como la masticabilidad, que mide la relación entre dureza, elasticidad y cohesividad, presentaron diferencias significativas en función del tipo de lote de queso Zamorano. Los quesos de los lotes A y B presentaron los mayores valores para ambos parámetros, mientras que los de los lotes C y D fueron los más bajos. Estas diferencias vienen explicadas fundamentalmente por las diferencias a nivel de dureza, al ser éste el principal parámetro que determina los valores finales de gomosidad y masticabilidad. Cuanto mayor dureza presenten los quesos, mayor gomosidad tendrán y, por tanto, mayor fuerza se requerirá para masticarlos. De igual manera, el tiempo de maduración también ejerció diferencias significativas sobre la gomosidad y masticabilidad, aumentando ambos parámetros a lo largo de la misma. No obstante, este aumento se correspondió principalmente con los lotes A y B, ya que en el lote C se produjo una ligera disminución y en el D se mantuvieron prácticamente constantes.

En resumen, podemos señalar que los quesos pertenecientes a los lotes C y D presentaron menores valores de dureza, fracturabilidad, gomosidad y masticabilidad, así como una mayor adherencia, los cuales estarían relacionados con un menor contenido en extracto seco, mayor proporción de materia grasa y un mayor grado de proteólisis debido a la inclusión en el cultivo iniciador de las cepas de lactobacilos y enterococos, respectivamente.

4.4.7 Análisis sensorial

La tabla C4.9 muestra los valores obtenidos por un panel de catadores en el análisis del olor, sabor y textura de los lotes de quesos Zamorano elaborados con distintos cultivos iniciadores durante la maduración.

Únicamente fueron observadas diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre lotes en el caso del olor a los 100 días y de la textura a los 60 días. Al cabo de 60 días, los quesos mejor evaluados por el panel fueron los correspondientes a los lotes A y B, en los que se utilizaron

cultivos iniciadores comerciales y autóctonos acidificantes, respectivamente. Sin embargo, a los 100 días, los quesos de los lotes A y D fueron los preferidos en olor y sabor, mientras que en textura lo fueron los pertenecientes a los lotes C y D, probablemente por el mayor grado de proteólisis de estos quesos en cuya elaboración fueron empleados cultivos iniciadores que incorporaron cepas de lactobacilos y enterococos. Existe una relación positiva entre los valores de textura obtenidos instrumentalmente y mediante catadores, ya que los lotes de queso preferidos por los catadores coincidieron con los que mostraron menor dureza, fracturabilidad y masticabilidad, así como mayor adhesividad, en el análisis del perfil de textura.

Tabla C4.9. Cambios en los atributos sensoriales del olor, textura y sabor durante la maduración del queso Zamorano elaborado con diferentes cultivos iniciadores.

	DM	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	CI
OLOR	60	42	54	65	59	NS
	100	36 ^a	61 ^{bc}	67 ^c	56 ^b	*
TEXTURA	60	50 ^a	56 ^{ab}	54 ^{ab}	62 ^b	*
	100	57	67	51	45	NS
SABOR	60	51	45	56	67	NS
	100	47	56	63	54	NS

NS: No hay diferencias significativas; *: $p \leq 0,05$. DM: días de maduración; CI: efecto del cultivo iniciador.

Valores con distinto superíndice para cada atributo sensorial presentaron diferencias significativas en función del cultivo iniciador para el mismo tiempo de maduración.

Lote A: cultivo comercial (*Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*); Lote B: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292) y *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239)]; Lote C: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *Lb. plantarum* (TAUL 1736)]; Lote D: cultivo iniciador autóctono [*Lc. lactis* subsp. *lactis* (TAUL 1292), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (TAUL 1239) y *E. raffinosus* (TAUL 1351)].

En otros estudios donde se emplearon como cultivos iniciadores bacterias lácticas acidificantes únicamente y bacterias lácticas combinadas con cepas de lactobacilos, en ambos casos aisladas de quesos tradicionales, también recibieron mejores puntuaciones para el aspecto, olor, sabor, consistencia y aceptación general respecto a quesos elaborados sin la adición de estos cultivos (Carafa et al., 2019).



5 Conclusiones

PRIMERA. Los parámetros fisicoquímicos, fundamentalmente el contenido en extracto seco y sal fueron aumentando a lo largo de la maduración. Esto afectó en gran medida tanto a la proteólisis como a la lipólisis. El estudio estadístico mediante componentes principales permitió diferenciar los lotes en rangos de maduración con mayores contenidos en aminoácidos libres y ácidos grasos libres al final de la maduración. Este hecho tuvo gran incidencia en la textura y en los resultados del análisis sensorial mediante panel de cata y panel de consumidores, obteniéndose las mejores puntuaciones del queso Zamorano entre los 180 y 240 días de maduración.

Los posibles beneficios en las características del queso Zamorano derivados de la prolongación del tiempo de maduración más allá de 240 días, no compensarían los costes de la inmovilización y mantenimiento de los quesos en las cámaras de maduración.

SEGUNDA. Los diferentes análisis estadísticos permitieron diferenciar los quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada. Estos resultados son debidos en gran medida a la heterogeneidad de la microbiota de los quesos elaborados con leche cruda, los cuales presentaron un mayor grado de proteólisis y lipólisis.

Todo ello se tradujo en la adquisición de un perfil sensorial más complejo en los quesos de leche cruda, que fue valorado muy positivamente por los catadores para todos los atributos sensoriales. Destacaron por un olor más intenso, mayor solubilidad y mantecosidad de la pasta, menor grado de amargor y por un regusto y persistencia en boca mucho más marcados, si bien los resultados para queso con leche pasteurizada fueron más homogéneos.

Si abordamos el estudio desde el punto de vista de las propiedades bioactivas el queso Zamorano elaborado con leche cruda presentó mayores contenidos en compuestos con propiedades bioactivas, como el Gaba.

TERCERA. Los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos, de la proteólisis y lipólisis permitieron establecer diferencias entre los quesos elaborados en función de la raza. Los quesos elaborados con mayor proporción de leche de oveja Churra presentaron los valores más altos para los parámetros en estudio. Asimismo, estos quesos se caracterizaron por presentar mayor elasticidad y adhesividad, en comparación con los quesos elaborados con predominancia de leche Assaf, así como una menor granulosis y dureza, recibiendo, también, las mejores valoraciones globales.

Esto proporcionaría un alto valor a las razas autóctonas permitiendo el mantenimiento de las mismas y la biodiversidad genética, además de una sostenibilidad medioambiental al ser razas más ligadas con el entorno.

CUARTA. El tipo de cultivo iniciador empleado ejerció una influencia sobre las características del queso Zamorano.

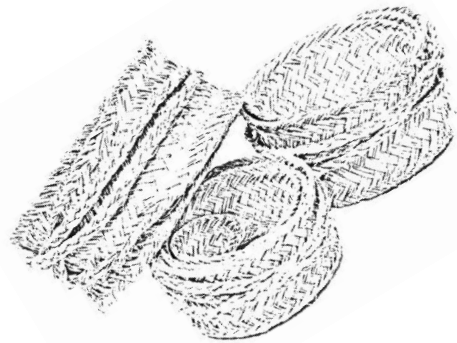
Los lotes elaborados con *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1736) y *Enterococcus raffinosus* (TAUL 1351) presentaron una mayor extensión y profundidad de la proteólisis. Ello contribuyó a la obtención de quesos con menor dureza, fracturabilidad, gomosidad y masticabilidad, correlacionándose, al final de la maduración, de forma positiva con la textura a nivel sensorial.

Además, el lote elaborado con *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1736) como cultivo adjunto, presentó mayores niveles de los isómeros 9c11t y 10t12c del ácido linoleico conjugado, lo que puede contribuir a incrementar su valor añadido ya que dicho compuesto está asociado con propiedades beneficiosas para la salud humana.

QUINTA. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en nuestro trabajo concluimos que las condiciones óptimas de elaboración de queso Zamorano comprenden el empleo de leche cruda de oveja de la raza Churra, la adición de cultivos iniciadores adjuntos autóctonos, y un periodo de maduración comprendido entre 180-240 días, obteniéndose así los mejores resultados tanto a nivel fisicoquímico, bioquímico y sensorial.

Por otro lado, el empleo de los cultivos autóctonos en la elaboración de quesos de oveja de larga maduración, permitiría acortar el periodo de maduración sin perjuicio de las características sensoriales.

Como perspectivas futuras se abre un horizonte en el que se puedan diseñar y ensayar cultivos iniciadores que contribuyan a mejorar las características de los quesos, acelerar el proceso madurativo o enriquecer los quesos en compuestos con carácter bioactivo.



6 Bibliografía

- AOAC 140.22, 1980a. Hydrogen-ion activity (pH). In W. Horwitz (Ed.), Official methods of analysis, 13th, 213. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC 162.47, 1980b. Acidity in cheese. In W. Horwitz (Ed.), Official methods of analysis, 13th, 266. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists
- AOAC 935.43, 2000 Salt determination, in Official Methods of Analysis of AOAC International.
- AOAC 984.15, 2005 Lactose in milk. Enzymatic method, in Official Methods of Analysis of AOAC International.
- Acero Adámez, P., 2009. Planificación y Manejo de la Explotación de Ovino de Leche. Ovino de Leche 1-111.
- AECOSAN, 2019. Listeria monocytogenes y enterotoxina estafilocócica en queso maduro elaborado con leche cruda de oveja procedente de España (Ref. 2018/103) [WWW Document]. Agencia Española Segur. Aliment. y Nutr. URL http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/Listeria.htm?_ga=2.119825803.288194973.1563963117-1259457260.1562750708 (accessed 8.23.19).
- AECOSAN, 2018. Intoxicación por Listeria monocytogenes atribuida a quesos de leche cruda de oveja procedentes de España [WWW Document]. Agencia Española Segur. Aliment. y Nutr. URL http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/quesos.htm (accessed 8.23.19).
- Alarcon Hernandez, E., 2005. Sensorial. Univ. Nac. Abierta Y Adistancia – Unad.
- Albenzio, M., Corbo, M. R., Rehman, S. U., Fox, P. F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A., Gobbetti, M., 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey, International Journal of Food Microbiology. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00533-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00533-X)
- Aldai, N., Murray, B.E., Nájera, A.I., Troy, D.J., Osoro, K., 2005. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. J. Sci. Food Agric. 85, 1073-1083. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2110>
- Aljewicz, M., Siemianowska, E., Cichosz, G., Tońska, E., 2014. The effect of probiotics (Lactobacillus rhamnosus HN001, Lactobacillus paracasei LPC-37, and Lactobacillus acidophilus NCFM) on the availability of minerals from Dutch-type cheese. J. Dairy Sci. 97, 4824-4831. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8240>
- Alonso, M.L., Alvarez, A.I., Zapico, J., 1994. Rapid Analysis of Free Amino Acids in Infant Foods. J. Liq. Chromatogr. 17, 4019-4030. <https://doi.org/10.1080/10826079408016170>
- Álvarez González, M.Á., Moreno-Arribas, M.V., Moreno-Arribas, M.V., 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. Trends Food Sci. Technol. 39, 146-155.
- Alvarez, S., Rodríguez Bernárdez, V., Ruiz, M., Fresno, M., 2007. Correlaciones de textura y color instrumental con la composición química de quesos de cabra canarios. Arch. Zootec. 56, 663-666.

- Andersen, L.T., Ardö, Y., Bredie, W.L.P., 2010. Study of taste-active compounds in the water-soluble extract of mature Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 20, 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.009>
- Andiç, S., Tunçtürk, Y., Boran, G., 2014. Changes in Volatile Compounds of Cheese, Processing and Impact on Active Components in Food. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00028-7>
- Andrews, A.T., 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50, 45–55. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0022029900032519>
- Antoniou, K.D., Petridis, D., Raphaelides, S., Ben Omar, Z., Kesteloot, R., 2000. Texture assessment of French cheeses. *J. Food Sci.* 65, 168–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15974.x>
- Ardö, Y., Skeie, S., Guinee, T., 2014. The importance of salt in the manufacture and ripening of cheese, in: *Special Issue of the International Dairy Federation S1-1401*. IDF, pp. 21–29.
- Ares-Yebra, A., Garabal, J.I., Carballo, J., Centeno, J.A., 2019. Formation of conjugated linoleic acid by a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from an artisanal cheese: Evaluation in miniature cheeses. *Int. Dairy J.* 90, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.11.007>
- Avelar Rodriguez, D., Peña Vélez, R., Toro Monjaraz, E.M., Ramirez Mayans, J., Ryan, P.M., 2019. The Gut Microbiota: A Clinically Impactful Factor in Patient Health and Disease. *SN Compr. Clin. Med.* 1, 188–199. <https://doi.org/10.1007/s42399-018-0036-1>
- Aydemir, O., 2018. Proteolysis and lipolysis of white-brined (Beyaz) cheese during storage: Effect of milk pasteurization temperature. *J. Food Process. Preserv.* 42, 6–11. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13612>
- Aydemir, O., Dervisoglu, M., 2010. The effect of heat treatment and starter culture on colour intensity and sensory properties of Kulek cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 569–574. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00610.x>
- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Hamed, F., Shaker, R., 2018. Rheological, textural, microstructural and sensory impact of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk on low-fat akawi cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* 87, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.023>
- Ayyash, M., Sherkat, F., Shah, N., 2013. Chapter 36. Sodium chloride substitution of cheese, in: *Handbook of Cheese in Health*. Wageningen Academic Publishers, pp. 545–566. https://doi.org/https://doi.org/10.3920/978-90-8686-766-0_36
- Bae, I., Park, J.H., Choi, H.Y., Jung, H.K., 2017. Emerging innovations to reduce the salt content in Cheese; Effects of Salt on Flavor, Texture, and Shelf Life of Cheese; And current salt usage: A review. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 37, 793–798. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.6.793>
- Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Viñas, M.A., Cabezas, L., 2006. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control* 17, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.008>
- Bapat, P.R., Dodkey, R.S., Shekhawat, S.D., Husain, A.A., Nayak, A.R., Kawle, A.P., Daginawala, H.F., Singh, L.K., Kashyap, R.S., 2017. Prevalence of zoonotic tuberculosis and associated

- risk factors in Central Indian populations. *J. Epidemiol. Glob. Health* 7, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.jegh.2017.08.007>
- Baptista, D.P., Galli, B.D., Cavaleiro, F.G., Negrão, F., Eberlin, M.N., Gigante, M.L., 2018. *Lactobacillus helveticus* LH-Bo2 favours the release of bioactive peptide during Prato cheese ripening. *Int. Dairy J.* 87, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.001>
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., Tabanelli, G., 2019. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods* 8, 1–27. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>
- Bardócz, S., 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 341–346. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89169-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89169-4)
- Bastian, E.D., Brown, R.J., 1996. Plasmin in milk and dairy products: An update. *Int. Dairy J.* 6, 435–457. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00021-6](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00021-6)
- Bautista-Gallego, J., Alessandria, V., Fontana, M., Bisotti, S., Taricco, S., Dolci, P., Cocolin, L., Rantsiou, K., 2014. Diversity and functional characterization of *Lactobacillus* spp. isolated throughout the ripening of a hard cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 181, 60–66. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.04.020>
- Benfeldt, C., Sorensen, J., 2001. Heat treatment of cheese milk: Effect on proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11, 567–574. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00078-4)
- Benjamin, S., Spener, F., 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: An insight into their health benefits. *Nutr. Metab.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-36>
- Benkerroum, N., 2016. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 801–826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>
- Bielecka, M.M., Cichosz, G., 2017. The influence of an adjunct culture of *Lactobacillus paracasei* LPC-37 on the physicochemical properties of Dutch-type cheese during ripening. *LWT - Food Sci. Technol.* 83, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.004>
- Blakesley, R.W., Boezi, J.A., 1977. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 82, 580–582. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90197-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90197-X)
- Bland, J.H., Grandison, A.S., Fagan, C.C., 2015. Effect of blending Jersey and Holstein-Friesian milk on Cheddar cheese processing, composition, and quality. *J. Dairy Sci.* 98, 1–8. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8433>
- Bollongino, R., Burger, J., Powell, A., Mashkour, M., Vigne, J.D., Thomas, M.G., 2012. Modern taurine cattle descended from small number of near-eastern founders. *Mol. Biol. Evol.* 29, 2101–2104. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss092>
- Bouma, A., Durham, C.A., Meunier-Goddik, L., 2014. Start-up and operating costs for artisan cheese companies. *J. Dairy Sci.* 97, 3964–3972. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7705>
- Bourne, M., 2002. *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*, Second. ed, Elsevier. Elsevier Science & Technology Books.

<https://doi.org/10.4337/9781781956076.00006>

- Bovolenta, S., Romanzin, A., Corazzin, M., Spanghero, M., Aprea, E., Gasperi, F., Piasentier, E., 2014. Volatile compounds and sensory properties of montasio cheese made from the milk of simmental cows grazing on alpine pastures. *J. Dairy Sci.* 97, 7373–7385. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8396>
- Buňková, L., Buňka, F., Mantlová, G., Čablová, A., Sedláček, I., Švec, P., Pachlová, V., Kráčmar, S., 2010. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiol.* 27, 880–888. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.014>
- Burdychova, R., Komprda, T., 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 149–155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x>
- Bütikofer, U., Rüegg, M., Ardö, Y., 1993. Determination of nitrogen fractions in cheese: Evaluation of a collaborative study. *LWT - Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1056>
- Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S., Palop, M.L., 2007. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control* 18, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.07.010>
- Calvo, M. V., Fontecha, J., 2004. Purification and characterization of a pregastric esterase from a hygienized kid rennet paste. *J. Dairy Sci.* 87, 1132–1142. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73261-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73261-0)
- Campagnollo, F.B., Margalho, L.P., Kamimura, B.A., Feliciano, M.D., Freire, L., Lopes, L.S., Alvarenga, V.O., Cadavez, V.A.P., Gonzales-Barron, U., Schaffner, D.W., Sant'Ana, A.S., 2018. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. *Food Microbiol.* 73, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.006>
- Campbell, J.R., Marshall, R.T., 2016. Chapter 30. Cheeses, in: *Dairy Production and Processing: The Science of Milk and Milk Products*. Waveland Press, pp. 435–460.
- Carafa, I., Stocco, G., Franceschi, P., Summer, A., Tuohy, K.M., Bittante, G., Franciosi, E., 2019. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter and non-starter cultures for the production of Traditional Mountain cheese. *Food Res. Int.* 115, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.069>
- Caro, I., Mateo, J., Sandoval, M.H., Soto, S., García-Armesto, M.R., Castro, J.M., 2013. Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Sci.* 96, 3461–3470. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-6103>
- Carpio, C.E., Lange, K.Y., 2015. Trends in e-commerce for the food marketing system. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 10. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201510023>
- Carreras, C., 2004. Aprovisionamiento del soldado romano en campaña: la figura del praefectus vehiculorum. *Habis* 35, 291–311.
- Carter, C., 1985. Hittite *lašš*. *J. Near East. Stud.* 44, 139–141. <https://doi.org/10.1086/373116>

- Celik, S., Turkoglu, H., 2007. Ripening of traditional Örgü cheese manufactured with raw or pasteurized milk: Composition and biochemical properties. *Int. J. Dairy Technol.* 60, 253–258. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00344.x>
- Centi, V., Matteucci, F., Lepidi, A., Gallo, M. Del, Ercole, C., 2017. Microbiological and biochemical aspects of inland Pecorino Abruzzese cheese. *Heliyon* 3. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00258>
- Černíková, M., Nebesářová, J., Salek, R.N., Řiháčková, L., Buňka, F., 2017. Microstructure and textural and viscoelastic properties of model processed cheese with different dry matter and fat in dry matter content. *J. Dairy Sci.* 100, 4300–4307. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-12120>
- Cervantes Saavedra, M., 2015. *Don Quijote de la Mancha*. Lemir.
- César, J., 1986. *La guerra de las galias (con notas de Napoleón)*.
- Chambers, D.H., Esteve, E., Retiveau, A., 2010. Effect of milk pasteurization on flavor properties of seven commercially available French cheese types. *J. Sens. Stud.* 25, 494–511. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2010.00282.x>
- Charlton, S., Ramsøe, A., Collins, M., Craig, O.E., Fischer, R., Alexander, M., Speller, C.F., 2019. New insights into Neolithic milk consumption through proteomic analysis of dental calculus. *Archaeol. Anthropol. Sci.* <https://doi.org/10.1007/s12520-019-00911-7>
- Chávarri, F., Bustamante, M.A., Santisteban, A., Virto, M., Albisu, M., Barrón, L.J.R., De Renobales, M., 2000. Effect of milk pasteurization on lipolysis during ripening of ovine cheese manufactured at different times of the year. *Lait* 80, 433–444. <https://doi.org/10.1051/lait:2000136>
- Chaves-López, C., De Angelis, M., Martuscelli, M., Serio, A., Paparella, A., Suzzi, G., 2006. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *J. Appl. Microbiol.* 101, 353–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02941.x>
- Choi, L.H., Were, L.M., Nielsen, S.S., 2006. Effects of incubation temperature and salt concentration on plasminogen activators in cheese curd. *Int. Dairy J.* 16, 609–618. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.019>
- Cichoski, A.J., Valduga, E., Valduga, A.T., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., 2002. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Control* 13, 329–336. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00039-7](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00039-7)
- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Drake, M.A., Marangon, A., Martin, B., Bittante, G., 2018. From cow to cheese: Novel phenotypes related to the sensory profile of model cheeses from individual cows. *J. Dairy Sci.* 101, 5865–5877. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-14342>
- Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D., 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid

- catabolism in cheese: A review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13, 841–866. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2)
- Conolly, J., Manning, K., Colledge, S., Dobney, K., Shennan, S., 2012. Species distribution modelling of ancient cattle from early Neolithic sites in SW Asia and Europe. *Holocene* 22, 997–1010. <https://doi.org/10.1177/0959683612437871>
- Copley, M.S., Berstan, R., Dudd, S.N., Aillaud, S., Mukherjee, A.J., Straker, V., Payne, S., Evershed, R.P., 2005. Processing of milk products in pottery vessels through British prehistory. *Antiquity* 79, 895–908. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0003598X00115029>
- Copley, M.S., Berstan, R., Dudd, S.N., Docherty, G., Mukherjee, A.J., Straker, V., Payne, S., Evershed, R.P., 2003. Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1524–1529. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335955100>
- Cramp, L.J.E., Evershed, R.P., Lavento, M., Halinen, P., Mannermaa, K., Oinonen, M., Kettunen, J., Perola, M., Onkamo, P., Heyd, V., 2014. Neolithic dairy farming at the extreme of agriculture in northern Europe. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0819>
- Czárán, T., Rattray, F.P., Møller, C.O. d. A., Christensen, B.B., 2018. Modelling the influence of metabolite diffusion on non-starter lactic acid bacteria growth in ripening Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 80, 35–45. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2017.12.010>
- D’Incecco, P., Gatti, M., Hogenboom, J.A., Bottari, B., Rosi, V., Neviani, E., Pellegrino, L., 2016. Lysozyme affects the microbial catabolism of free arginine in raw-milk hard cheeses. *Food Microbiol.* 57, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.020>
- Daly, D.F.M., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., 2010. Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses - A review. *Dairy Sci. Technol.* 90, 3–26. <https://doi.org/10.1051/dst/2009036>
- de Jong, C., Badings, H.T., 1990. Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resolut. Chromatogr.* 13, 94–98.
- De La Fuente, L.F., Barbosa, E., Carriedo, J.A., Gonzalo, C., Arenas, R., Fresno, J.M., San Primitivo, F., 2009. Factors influencing variation of fatty acid content in ovine milk. *J. Dairy Sci.* 92, 3791–3799. <https://doi.org/10.3168/JDS.2009-2151>
- De la Fuente, L.F., Gabiña, D., Carolino, N., Ugarte, E., 2006. The Awassi and Assaf breeds in Spain and Portugal. *Agriculture* 2, 17–20.
- De Marchi, M., Bittante, G., Dal Zotto, R., Dalvit, C., Cassandro, M., 2008. Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on quality of milk and cheese. *J. Dairy Sci.* 91, 4092–4102. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0788>
- de Moraes, G.M.D., dos Santos, K.M.O., de Barcelos, S.C., Lopes, S.A., do Egito, A.S., 2018. Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: Microbiological, physicochemical and sensory attributes. *Lwt* 94, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.028>
- De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2019. Use of
-

- autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making Pecorino Crotonese cheese: Effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. *Food Res. Int.* 116, 1344–1356. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.10.024>
- Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., Gobbetti, M., 2006. Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *Int. Dairy J.* 16, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.012>
- Di Gregorio, P., Di Grigoli, A., Di Trana, A., Alabiso, M., Maniaci, G., Rando, A., Valluzzi, C., Finizio, D., Bonanno, A., 2017. Effects of different genotypes at the CSN3 and LGB loci on milk and cheese-making characteristics of the bovine Cinisara breed. *Int. Dairy J.* 71, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.001>
- Diana, M., Rafecas, M., Arco, C., Quílez, J., 2014. Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. *J. Food Compos. Anal.* 35, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.06.007>
- Diezhandino, I., Fernández, D., Sacristán, N., Combarros-Fuertes, P., Prieto, B., Fresno, J.M., 2016. Rheological, textural, colour and sensory characteristics of a Spanish blue cheese (Valdeón cheese). *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 1118–1125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.003>
- Dillon, P., Buckley, F., O'Connor, P., Hegarty, D., 2003. A comparison of different dairy cow breeds on a seasonal grass-based system of milk production: 1. Milk production, live weight, body condition score and DM intake. *Livest. Prod. Sci.* 83, 21–33. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00041-1)
- Dimitreli, G., Thomareis, A.S., 2007. Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. *J. Food Eng.* 79, 1364–1373. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.043>
- Donnelly, C.W., 2014. Cheese and Microbes, *Cheese and Microbes*. <https://doi.org/10.1128/9781555818593>
- Drouault, S., Anba, J., Bonneau, S., Bolotin, A., Ehrlich, S.D., Renault, P., 2002. PPIase 68, 3932–3942. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3932>
- EFSA, 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.* 9, 2393–2486. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- El-Bakry, M., 2012. Salt in Cheese: A Review. *Curr. Res. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3923/crds.2012.1.5>
- Elghannam, A., Mesías, F.J., 2018. Social networks as a new marketing channel for animal food products: a qualitative study in Spain. *Arch. Zootec.* 67, 260–268.
- Espinosa-Pesqueira, D., Roig-Sagués, A.X., Manuela Hernández-Herrero, M., 2018. Screening method to evaluate amino acid-decarboxylase activity of bacteria present in Spanish artisanal ripened cheeses. *Foods* 7. <https://doi.org/10.3390/foods7110182>
- Etayo, I., Pérez Elortondo, F.J., Gil, P.F., Albisu, M., Virto, M., Conde, S., Rodríguez Barron, L.J., Nájera, A.I., Gómez-Hidalgo, M.E., Delgado, C., Guerra, A., De Renobales, M., 2006. Hygienic quality, lipolysis and sensory properties of Spanish Protected Designation of

- Origin ewe's milk cheeses manufactured with lamb rennet paste. *Lait* 86, 415-434. <https://doi.org/10.1051/lait:2006021>
- European Commission, 2019. EU Milk Market Observatory. Agriculture and rural development.
- European Commission, 2015. REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2015/625 DE LA COMISIÓN de 20 de abril de 2015 2081.
- EUROSTAT, 2018. <https://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&init=1&language=en&pcode=ta00017&plugin=1> [WWW Document]. URL <https://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&init=1&language=en&pcode=ta00017&plugin=1>
- Exterkate, F.A., Alting, A.C., Slangen, C.J., 1995. Conversion of α 1-Casein-(24-199)-Fragment and β -Casein under Cheese Conditions by Chymosin and Starter Peptidases. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 7-12. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80442-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80442-X)
- Exterkate, F.A., Lagerwerf, F.M., Haverkamp, J., Van Schalkwijk, S., 1997. The selectivity of chymosin action on α (s1)- and β -caseins in solution is modulated in cheese. *Int. Dairy J.* 7, 47-54. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(96\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(96)00047-7)
- FAO, 2019. The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture.
- FAO, 2018. <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/productiondairy-animals/productiondairy-animals-small-ruminants/es/> [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/productiondairy-animals/productiondairy-animals-small-ruminants/es/>
- Farahani, G., Ezzatpanah, H., Abbasi, S., 2014. Characterization of Siahmazgi cheese, an Iranian ewe's milk variety: Assessment of physico-chemical, textural and rheological specifications during ripening. *LWT - Food Sci. Technol.* 58, 335-342. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.002>
- Farkye, N.Y., Kiely, L.J., Allshouse, R.D., Kindstedt, P.S., 1991. Proteolysis in Mozzarella Cheese During Refrigerated Storage. *J. Dairy Sci.* 74, 1433-1438. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78300-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78300-8)
- FEGA, 2018. Declaraciones de leche [WWW Document]. URL https://www.fega.es/es/PwfGcp/es/regulacion_mercados/declaraciones-de-leche/index.jsp
- Felius, M., Beerling, M.L., Buchanan, D.S., Theunissen, B., Koolmees, P.A., Lenstra, J.A., 2014. On the history of cattle genetic resources. *Diversity* 6, 705-750. <https://doi.org/10.3390/d6040705>
- Fernández-García, E., Carbonell, M., Gaya, P., Nuñez, M., 2004. Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation. *Int. Dairy J.* 14, 701-711. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.12.011>
- Fernandez-Garcia, E., Tomillo, J., Nunez, M., 2000. Formation of biogenic amines in raw milk Hispanico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J. Food Prot.* 63, 1551-1555. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.11.1551>

- Fernández, D., Arenas, R., Ferrazza, R.E., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., 2016. Chapter 24. Zamorano Cheese, in: Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology. CRC Press, pp. 397–416.
- Ferrazza, R.E., 2002. CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO ZAMORANO DOP SOB CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO ACELERADA POR MODIFICAÇÕES NA TEMPERATURA. Universidade Federal de Viçosa.
- Ferrazza, R.E., Fresno, J.M., Ribeiro, J.I., Tornadijo, M.E., Furtado, M.M., 2004. Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. Food Res. Int. 37, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.08.010>
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O., Sampaio, P., 2009. Volatile fraction of DOP “Castelo Branco” cheese: Influence of breed. Food Chem. 112, 1053–1059. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.048>
- Feutry, F., Torre, P., Arana, I., Garcia, S., Desmasures, N., Casalta, E., 2012. Lactococcus lactis strains from raw ewe’s milk samples from the PDO Ossau-Iraty cheese area: Levels, genotypic and technological diversity. Dairy Sci. Technol. 92, 655–670. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0084-3>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2016. Fundamentals of Cheese Science. Springer US.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening. Food Rev. Int. 12, 457–509. <https://doi.org/10.1080/87559129609541091>
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O’Mahony, J.A., 2015. Chapter 12. Chemistry and Biochemistry of Cheese, in: Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer, pp. 499–546. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- Fröhlich-Wyder, M.T., Bisig, W., Guggisberg, D., Irmeler, S., Jakob, E., Wechsler, D., 2015. Influence of low pH on the metabolic activity of Lactobacillus buchneri and Lactobacillus parabuchneri strains in Tilsit-type model cheese. Dairy Sci. Technol. 95, 569–585. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0238-1>
- Gaglio, R., Todaro, M., Scatassa, M.L., Franciosi, E., Corona, O., Mancuso, I., Di Gerlando, R., Cardamone, C., Settanni, L., 2019. Transformation of raw ewes’ milk applying “Grana” type pressed cheese technology: Development of extra-hard “Gran Ovino” cheese. Int. J. Food Microbiol. 307, 108277. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108277>
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C.E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M., 2014. Antibacterial activity produced by Enterococcus spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. Leb. + [i.e. und] Technol. v. 59, 26–34–2014 v.59 no.1. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.059>
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., Ferrandini, E., López, M.B., 2016. Physicochemical, microbiological, textural and sensory changes during the ripening of pasteurised goat milk cheese made with plant coagulant (Cynara scolymus). Int. J. Dairy Technol. 69, 96–102. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12225>
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M., 2011. Occurrence of Clostridium spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: Identification and characterization of

- isolates. *Int. Dairy J.* 21, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.003>
- Gaya, P., Medina, M., Rodriguez-Marin, M.A., Nuñez, M., 1990. Accelerated Ripening of Ewes' Milk Manchego Cheese: The Effect of Elevated Ripening Temperatures. *J. Dairy Sci.* 73, 26–32. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78641-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78641-9)
- Gaya, P., Sánchez, C., Nuñez, M., Fernández-García, E., 2005. Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. Seasonal variation. *J. Dairy Res.* 72, 287–295. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0022029905001019>
- Gennaro, M.C., Gianotti, V., Marengo, E., Pattono, D., Turi, R.M., 2003. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chem.* 82, 545–551. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00009-8)
- Giraffa, G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00094-3)
- Gobbetti, Marco, Neviani, E., Fox, P., 2018. *The Cheeses of Italy: Science and Technology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-89854-4>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., 2007. The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. *Improv. Flavour Cheese* 121–156. <https://doi.org/10.1533/9781845693053.1.121>
- Gómez, M.J., Garde, S., Gaya, P., Medina, M., Núñez, M., 1997. Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk. *J. Dairy Res.* 64, 289–297. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0022029996002129>
- González, L., Cuadrillero, A.F., Castro, J.M., Bernardo, A., Tornadijo, M.E., 2015. Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from San Simón da Costa Cheese (PDO) in Order to Develop an Autochthonous Starter Culture. *Adv. Microbiol.* 05, 748–759. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.511079>
- González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M., Eugenia Tornadijo, M., 2010. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiol.* 27, 592–597. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.01.004>
- Goot, H., 1986. Development of Assaf, a synthetic breed of dairy sheep in Israel. *Proc. 37th Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod.* 1–29.
- Gorostiza, A., Cichoscki, A.J., Valduga, A.T., Valduga, E., Bernardo, A., Fresno, J.M., 2004. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; A Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chem.* 85, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.018>
- Grappin, R., Beuvier, E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int. Dairy J.* 7, 751–761. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00006-5)
- Guarrasi, V., Sannino, C., Moschetti, M., Bonanno, A., Di Grigoli, A., Settanni, L., 2017. The individual contribution of starter and non-starter lactic acid bacteria to the volatile organic compound composition of Caciocavallo Palermitano cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 259, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.022>

- Guinee, T.P., Fox, P.F., 2017. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. *Cheese* 317–375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>
- Gürsoy, A., Türkmen, N., 2018. Adjunct cultures in cheese technology. *Microb. Cult. Enzym. Dairy Technol.* 234–256. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-5363-2.ch013>
- Guzman-Hernandez, R., Contreras-Rodriguez, A., Hernandez-Velez, R., Perez-Martinez, I., Lopez-Merino, A., Zaidi, M.B., Estrada-Garcia, T., 2016. Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. *Int. J. Food Microbiol.* 237, 10–16. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.08.018>
- Hannon, J.A., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Wallace, J.M., Morrissey, P.A., Beresford, T.P., 2003. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 13, 313–323. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00178-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00178-4)
- Hanus, O., Samkova, E., Křížová, L., Hasoňová, L., Kala, R., 2018. Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability—a review. *Molecules* 23, 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules23071636>
- Harris, N.B., Payeur, J., Bravo, D., Osorio, R., Stuber, T., Farrell, D., Paulson, D., Treviso, S., Mikolon, A., Rodriguez-Lainz, A., Cernek-Hoskins, S., Rast, R., Ginsberg, M., Kinde, H., 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1025–1028. <https://doi.org/10.1128/AEM.01956-06>
- Haw, K., 2012. Conservation grazing in woodland management. *Woodwise* 16.
- Hayaloglu, A.A., Tolu, C., Yasar, K., 2013. Influence of goat breeds and starter culture systems on gross composition and proteolysis in Gokceada goat cheese during ripening. *Small Rumin. Res.* 113, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.03.001>
- Herreros, M.A., Arenas, R., Sandoval, M.H., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., 2007. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. *Int. Dairy J.* 17, 328–335. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2006.04.005>
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González Prieto, M.J., Tornadijo, M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Int. Dairy J.* 13, 469–479. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00054-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00054-2)
- Herreros, M.A., JM, F., Sandoval, H., Castro, J., Tornadijo, M.E., 2004. Esterolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat milk cheese). *Milchwissenschaft* 59, 526–529.
- Herreros, M.A., Sandoval, H., González, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol.* 22, 455–459. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.11.007>
- Hickey, D.K., Kilcawley, K.N., Beresford, T.P., Wilkinson, M.G., 2007. Lipolysis in Cheddar cheese made from raw, thermized, and pasteurized milks. *J. Dairy Sci.* 90, 47–56. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72607-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72607-3)

- Hoffner, H.A., 1998. Hittite Myths. MPublishing, University of Michigan Library.
- Homero, 2006. La Odisea. CATEDRA.
- Huppertz, T., Fox, P.F., Kelly, A.L., 2017. The caseins: Structure, stability, and functionality, in: *Proteins in Food Processing: Second Edition*. Elsevier Inc., pp. 49-92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8>
- Hurley, M.J., Larsen, L.B., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H., 2000. The milk acid proteinase cathepsin D: A review. *Int. Dairy J.* 10, 673-681. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00100-X)
- Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B., Dubois, J.J., Daube, G., 2013. Microbial characterization of probiotics-Advisory report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1479-1504. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300065>
- INLAC, 2016a. El Sector Lácteo en España.
- INLAC, 2016b. Avance del Proyecto : Análisis de la Transformación- Comercialización , en los sectores de Leche de Cabra y Oveja.
- Ismail, B., Nielsen, S.S., 2010. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3122>
- ISO 1740:2004 [IDF 6:2004] Milkfat products and butter – Determination of fat acidity (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 5534:2004 [IDF 4:2004] Cheese and processed cheese - Determination of the total solids content (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 707:2008 [IDF 50:2008] Milk and milk products - Guidance on sampling. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 3432:2008 [IDF 221:2008] Cheese - Determination of fat content - Butyrometer for Van Gulik method. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 1211:2010 [IDF 1:2010] Milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 6731:2010 [IDF 21:2010] Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method). International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 6887-5:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 27871:2011 [IDF 224:2011] Cheese and processed cheese - Determination of the nitrogenous fractions. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 8586:2012 Sensory analysis - General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. International Organization for Standardization, Geneva.

- ISO 8968-1:2014 [IDF 20-1:2014] Milk and milk products – Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. International Organization for Standardization, Geneva.
- Jansen, W., Linard, C., Noll, M., Nöckler, K., Al Dahouk, S., 2019. Brucella-positive raw milk cheese sold on the inner European market: A public health threat due to illegal import? *Food Control* 100, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.022>
- Jaros, D., Rohm, H., 2017. Rennets: Applied Aspects, in: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition*. pp. 53–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00003-X>
- Jones, G., Lefèvre, S., Donguy, M.P., Nisavanh, A., Terpant, G., Fougère, E., Vaissière, E., Guinard, A., Mailles, A., de Valk, H., Fila, M., Tanné, C., Le Borgne, C., Weill, F.X., Bonacorsi, S., Jourdan-Da Silva, N., Mariani-Kurkdjian, P., 2019. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses, France, March to May 2019. *Euro Surveill.* 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1900305>
- Josephson, Å., 1956. Lucius Iunius Moderatus Columella, *On Agriculture*. With a recension of the text and an English translation by† E. S. Forster and Edward H. Heffner. Vol. II: *Res rustica, V–IX*, pp. XII + 503. Vol. III: *Res rustica, X–XII*, and *De arboribus*, pp. VIII + 435. *J. Rom. Stud.* 46, 222–223. <https://doi.org/DOI:10.2307/298014>
- Juan, B., Trujillo, A.J., Guamis, V., Buffa, M., Ferragut, V., 2007. Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewes' milk cheese. *Int. Dairy J.* 17, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.009>
- Kamber, U., 2007. The Traditional Cheeses of Turkey: Cheeses Common to All Regions. *Food Rev. Int.* 24, 1–38. <https://doi.org/10.1080/87559120701761833>
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K., Safari, M., 2009. Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening. *Food Chem.* 112, 539–544. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.06.003>
- Khaled, M.E.-Z., 2014. Biogenic amines and microbiological profile of Egyptian cheeses. *African J. Food Sci.* 8, 130–139. <https://doi.org/10.5897/ajfs2013.1125>
- Khalid, K., 2011. An overview of lactic acid bacteria *International Journal of Biosciences (IJB)*. *J. Biosci. IJB* 1, 1–13.
- Khatab, A.R., Guirguis, H.A., Tawfik, S.M., Farag, M.A., 2019. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends Food Sci. Technol.* 88, 343–360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
- Kindstedt, P., 2012. *Cheese and Culture: A History of Cheese and its Place in Western Civilization*. Chelsea Green Publishing.
- Kindstedt, P.S., 2014. The Basics of Cheesemaking. *Cheese and Microbes* 17–38. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.cm-0002-12>
- Kinsey, J.D., Buhr, B.L., 2003. E-Commerce: a New Business Model for the Food Supply/Demand Chain 31.

- Kirmaçi, H.A., Hayaloğlu, A.A., Özer, H.B., Atasoy, A., Türkoğlu, H., 2014. Changes in volatile composition, proteolysis and textural and sensory properties of white-brined cheese: Effects of ripening temperature and adjunct culture. *Dairy Sci. Technol.* 94, 603–623. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0185-2>
- Koba, K., Yanagita, T., 2014. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obes. Res. Clin. Pract.* 8, e525–e532. <https://doi.org/10.1016/J.ORCP.2013.10.001>
- Komprda, T., Burdychová, R., Dohnal, V., Cwiková, O., Sládková, P., Dvořáčková, H., 2008. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiol.* 25, 219–227. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2007.11.006>
- Kondyli, E., Svarnas, C., Samelis, J., Katsiari, M.C., 2012. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. *Small Rumin. Res.* 103, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.043>
- Krause, I., Bockhardt, A., Klostermeyer, H., 1997. Characterization of cheese ripening by free amino acids and biogenic amines and influence of bactofugation and heat-treatment of milk. *Lait* 77, 101–108. <https://doi.org/10.1051/lait:199716>
- Kumar, Sanjeev, Kanawjia, S.K., Kumar, Suryamani, 2015. Incorporation of *Lactobacillus* adjuncts culture to improve the quality of Feta-type cheese made using buffalo milk. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5021–5029. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1560-y>
- Ladero, V., Fernández, M., Cuesta, I., Alvarez, M.A., 2010. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiol.* 27, 933–939. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.026>
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Guerzoni, M.E., Suzzi, G., Belletti, N., Gardini, F., 2007. Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chem.* 104, 693–701. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.12.017>
- Law, B.A., Tamime, A.Y., 2011. *Technology of Cheesemaking*, Society of Dairy Technology. Wiley.
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J., 1987. Texture Development During Cheese Ripening. *J. Dairy Sci.* 70, 1748–1760. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80207-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80207-2)
- Lemieux, L., Puchades, R., Simard, R., 1989. Size-Exclusion HPLC Separation of Bitter and Astringent Fractions from Cheddar Cheese Made with Added *Lactobacillus* Strains to Accelerate Ripening. *J. Food Sci.* 54, 1234–1237.
- Lemieux, L., Simard, R.E., 1992. Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait* 72, 335–385. <https://doi.org/10.1051/lait:1992426>
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Lianou, A., Kakouri, A., Pappa, E.C., Samelis, J., 2017. Growth interactions and antilisterial effects of the bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* M104 and *Enterococcus faecium* KE82 strains in thermized milk in the presence or absence of a

- commercial starter culture. *Food Microbiol.* 64, 145–154.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.019>
- Liu, L., Qu, X., Xia, Q., Wang, H., Chen, P., Li, X., Wang, L., Yang, W., 2018. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the antioxidant activity of Cheddar cheese during ripening and under simulated gastrointestinal digestion. *Lwt* 95, 99–106.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.053>
- Livescience, 2018. [WWW Document]. URL <https://www.livescience.com/63356-oldest-mummy-cheese.html>
- López del Paso, R., Becerra Benítez, F., Cebrino Casquero, F., Delgado Reina, C., Morilla García, F., Muñoz López, J.A., Nieto Lobo, E., Díaz Montañez, M.R., Román Jobacho, M.L., Cardoso García, A., Pérez Guirado, J.A., 2018. El sector agrario en Castilla y León, Boletín económico de ICE, Información Comercial Española.
- Lurueña-Martínez, M.A., Revilla, I., Severiano-Pérez, P., Vivar-Quintana, A.M., 2010. The influence of breed on the organoleptic characteristics of Zamorano sheep's raw milk cheese and its assessment by instrumental analysis. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 216–223.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00565.x>
- Lynch, K.M., Pawlowska, A.M., Brosnan, B., Coffey, A., Zannini, E., Furey, A., McSweeney, P.L.H., Waters, D.M., Arendt, E.K., 2014. Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 34, 167–173.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.017>
- Madrau, M.A., Mangia, N.P., Murgia, M.A., Sanna, M.G., Garau, G., Leccis, L., Caredda, M., Deiana, P., 2006. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *Int. Dairy J.* 16, 876–885. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2005.08.005>
- Mallatou, H., Pappa, E.C., Boumba, V.A., 2004. Proteolysis in Teleme cheese made from ewes', goats' or a mixture of ewes' and goats' milk. *Int. Dairy J.* 14, 977–987.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.03.009>
- Mangia, N.P., Murgia, M.A., Garau, G., Sanna, M.G., Deiana, P., 2008. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiol.* 25, 366–377.
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2007.09.009>
- MAPA, 2019. Marketing y alimentos ecológicos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- MAPA, 2018a. Estadística láctea anual. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. [WWW Document]. URL <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/estadistica-industrias-lacteas/estadistica-lactea-anual/>
- MAPA, 2018b. Sistemas de explotación de ovino de leche. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. [WWW Document]. URL <https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias-probadas/sistemas-prodnut-animal/ovino-leche.aspx>
- MAPA, 2018c. Últimos datos de consumo alimentario. Ministerio de Agricultura Pesca y
-

- Alimentación. [WWW Document]. URL <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/>
- MAPA, 2018d. Indicadores económicos del sector ovino y caprino. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- MAPA, 2018e. Informe anual de comercio exterior agroalimentario. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- MAPA, 2018f. Información de razas. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación [WWW Document]. URL <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/informacion/>
- MAPA, 2018g. Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. [WWW Document]. URL <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/htm/cifrasydatos.aspx>
- Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E.J., Hutkins, R., 2017. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Martin, B., Pomiès, D., Pradel, P., Verdier-Metz, L., Rémond, B., 2009. Yield and sensory properties of cheese made with milk from Holstein or montbéliarde cows milked twice or once daily. *J. Dairy Sci.* 92, 4730–4737. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1914>
- Martley, F.G., Crow, V.L., 1993. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and reopening. *Int. Dairy J.* 3, 461–483. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(93\)90027-W](https://doi.org/10.1016/0958-6946(93)90027-W)
- Martuscelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-López, C., Schirone, M., Suzzi, G., 2005. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *Int. Dairy J.* 15, 571–578. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2004.11.008>
- Mays, S., Roberts, D., Marshall, P., Pike, A.W.G., van Heekeren, V., Bronk Ramsey, C., Dunbar, E., Reimer, P., Linscott, B., Radini, A., Lowe, A., Dowle, A., Speller, C., Vallender, J., Bedford, J., 2018. Lives before and after Stonehenge: An osteobiographical study of four prehistoric burials recently excavated from the Stonehenge World Heritage Site. *J. Archaeol. Sci. Reports* 20, 692–710. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.06.008>
- McCormick, F., 2012. Cows, milk and religion: the use of dairy produce in early societies. *Anthropozoologica* 47, 101–113. <https://doi.org/10.5252/az2012n2a7>
- McSweeney, P.L.H., 2017. Chapter 14 - Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W.B.T.-C. (Fourth E. (Eds.), *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 379–387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00014-4>
- McSweeney, P.L.H., 2007. Salt in cheese, in: McSweeney, P.L.H.B.T.-C.P.S. (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. Woodhead Publishing, pp. 80–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845693534.80>

- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80, 293-324. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
- Mendía, C., Ibañez, F.C., Torre, P., Barcina, Y., 2000. Influence of the season on proteolysis and sensory characteristics of Idiazabal cheese. *J. Dairy Sci.* 83, 1899-1904. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75064-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75064-8)
- Mendia, C., Ibañez, F.C., Torre, P., Barcina, Y., 1999. Effect of pasteurization on the sensory characteristics of a ewe's-milk cheese. *J. Sens. Stud.* 14, 415-424. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1999.tb00125.x>
- Menéndez Argüín, A., 2002. Consideraciones sobre la dieta de los legionarios romanos en las provincias fronterizas del N.O. del Imperio. *Habis* 2, 447-457.
- Menéndez, S., Centeno, J., Godínez, R., Rodríguez-Otero, J., 2000. Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 37-46. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00286-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00286-5)
- Meng, Z., Zhang, L., Xin, L., Lin, K., Yi, H.X., Han, X., 2018. Technological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 101, 2887-2896. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14003>
- Migeotte, L., Lloyd, J., 2009. Craft Industries and Business Ventures, in: *The Economy of the Greek Cities, From the Archaic Period to the Early Roman Empire*. University of California Press, pp. 92-116.
- Mohan, M.S., Anand, S., Kalscheur, K.F., Hassan, A.N., Hippen, A.R., 2013. Starter cultures and cattle feed manipulation enhance conjugated linoleic acid concentrations in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 96, 2081-2094. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-6101>
- Montanari, M., BROMBERT, B.A., 2012. From Milk to Cheeses, in: *Medieval Tastes, Food, Cooking, and the Table*. Columbia University Press, pp. 79-88.
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 136-154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Moreira, T.G., Gomes-Santos, A.C., Horta, L.S., Goncalves, M.C., Santiago, A.F., Lauar, J.G., dos Reis, D.S., Castro-Junior, A.B., Lemos, L., Guimarães, M., Aguilar, E.C., Pap, A., Amaral, J.F., Alvarez-Leite, J.I., Cara, D.C., Rezende, R.M., Nagy, L., Faria, A.M.C., Maioli, T.U., 2018. Consumption of conjugated linoleic acid (CLA)-supplemented diet during colitis development ameliorates gut inflammation without causing steatosis in mice. *J. Nutr. Biochem.* 57, 238-245. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2018.04.003>
- Moret, S., Smela, D., Populin, T., Conte, L.S., 2005. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chem.* 89, 355-361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.050>
- Morris, J., 2016. Re-Discovering the Germ Theory of Disease: A Major Role for Proteomics. *J. Proteomics Bioinform.* 09. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000393>
- Nazari, S.M., Mortazavi, A., Hesari, J., Tabatabaei Yazdi, F., 2019. Proteolysis and textural

- properties of low-fat ultrafiltered Feta cheese as influenced by maltodextrin. *Int. J. Dairy Technol.* <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12642>
- Niblett, R., Manning, W., Saunders, C., 2006. Verulamium: Excavations within the Roman Town 1986–88. *Britannia* 37, 53–188. <https://doi.org/DOI:10.3815/000000006784016639>
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogues, M.T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2003. Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in Cheese. *J. Food Sci.* 68, 750–756. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x>
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T., Trujillo-Mesa, A.J., Vidal-Carou, M.C., 2002. Profile of biogenic amines in goat cheese made from pasteurized and pressurized milks. *J. Food Sci.* 67, 2940–2944. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08842.x>
- O'Brien, E., Mills, S., Dobson, A., Serrano, L.M., Hannon, J., Ryan, S.P., Kilcawley, K.N., Brandsma, J.B., Meijer, W.C., Hill, C., Ross, R.P., 2017. Contribution of the novel sulfur-producing adjunct *Lactobacillus nodensis* to flavor development in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* 100, 4322–4334. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11726>
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., Shimizu, S., 2005. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 355–364. <https://doi.org/10.1263/JBB.100.355>
- Oneca, M., Irigoyen, A., Ortigosa, M., Torre, P., 2003. PCR and RAPD identification of *L. plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 227, 271–277. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00691-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00691-8)
- Ordóñez, A.N.A.I., Ibáñez, F.C., Torre, P., Barcina, Y., 1997. Formation of Biogenic Amines in Idiazábal Ewe's-Milk Cheese: Effect of Ripening, Pasteurization, and Starter. *J. Food Prot.* 60, 1371–1375. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.11.1371>
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Irigoyen, A., Oneca, M., Torre, P., 2006. Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewes'-milk cheese. *Food Microbiol.* 23, 591–598. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2005.09.005>
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Torre, P., Izco, J.M., 2005. Use of wild *Lactobacillus* strains in an adjunct culture for a Roncal-type cheese. *J. Dairy Res.* 72, 168–178. <https://doi.org/DOI:10.1017/S002202990400069X>
- Ostyn, A., de Buyser, M.L., Guillier, F., Groult, J., Félix, B., Salah, S., Delmas, G., Hennekinne, J.A., 2010. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Eurosurveillance* 15, 10–13.
- Otte, J., Costales, A., Dijkman, J., Pica-Ciamarra, U., Robinson, T., Ahuja, V., Ly, C., Roland-Holst, D., 2012. Livestock sector development for poverty reduction: an economic and policy perspective – Livestock's many virtues. . . Published in 2102, pp. 161. ISBN 978-92-5-107242-4. Available at <http://www.fao.org/docrep/015/i2744e/i2744e00.pdf>. *Anim. Genet. Resour. FAO* 51, 161. <https://doi.org/DOI:10.1017/S2078633612000665>
- Öztürk, H.İ., Akin, N., 2018. Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk tulum cheeses during ripening. *Food Sci.*

- Technol. 38, 674–682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Pachlová, V., Buňková, L., Flasarová, R., Salek, R.N., Dlabajová, A., Butor, I., Buňka, F., 2018. Biogenic amine production by nonstarter strains of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus paracasei* in the model system of Dutch-type cheese. *Lwt* 97, 730–735. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.045>
- Papadopoulou, O.S., Argyri, A.A., Varzakis, E.E., Tassou, C.C., Chorianopoulos, N.G., 2018. Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. *Food Microbiol.* 74, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.005>
- Pappa, E.C., Bontinis, T.G., Tasioula-Margari, M., Samelis, J., 2017. Microbial quality of and biochemical changes in fresh soft, acid-curd Xinotyri cheese made from raw or pasteurized goat's milk. *Food Technol. Biotechnol.* 55, 496–510. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.04.17.5338>
- Parra, L., Casal, V., Gómez, R., 2000. Contribution of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IFPL 359 and *Lactobacillus casei* subsp *casei* IFPL 731 to the proteolysis of caprine curd slurries. *J. Food Sci.* 65, 711–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16077.x>
- Pavia, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., Ferragut, V., 2000. Proteolysis in Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *J. Dairy Sci.* 83, 1441–1447. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75014-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75014-4)
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Gambacorta, E., 2014. Effects of genetic type, stage of lactation, and ripening time on Caciocavallo cheese proteolysis. *J. Dairy Sci.* 97, 1909–1917. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7288>
- Picon, A., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M., 1994. The Effect of Liposome Encapsulation of Chymosin Derived by Fermentation on Manchego Cheese Ripening. *J. Dairy Sci.* 77, 16–23. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)76923-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)76923-X)
- Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V., Mendes, E., Oliveira, B.M., Ferreira, M., 2001. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chem.* 75, 287–291. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00109-1)
- Pintado, A.I.E., Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pintado, M.M.E., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 2008. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *Int. Dairy J.* 18, 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.021>
- Pizzillo, M., Claps, S., Cifuni, G.F., Fedele, V., Rubino, R., 2005. Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. *Livest. Prod. Sci.* 94, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.11.024>
- Plessas, S., Nouska, C., Karapetsas, A., Kazakos, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., Chondrou, P., Fournomiti, M., Galanis, A., Bezirtzoglou, E., 2017. Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. *Food Chem.* 226, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.052>
- Pouliot-Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Vuilleumard, J.C., 2013. Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing

- lactic acid bacteria on blood pressure in men. *PharmaNutrition* 1, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2013.06.003>
- Poveda, J.M., 2001. Efecto de la utilización de distintos cultivos iniciadores en la proteólisis del queso manchego. Ediciones la Univ. Castilla La Mancha.
- Poveda, J.M., Cabezas, L., McSweeney, P.L.H., 2004. Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chem.* 84, 213–218. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00204-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00204-8)
- Poveda, J.M., Chicón, R., Cabezas, L., 2015. Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. *Int. Dairy J.* 47, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.03.004>
- Poveda, J.M., Sousa, M.J., Cabezas, L., McSweeney, P.L.H., 2003. Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *Int. Dairy J.* 13, 169–178. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00150-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00150-4)
- Powell, I.B., Broome, M.C., Limsowtin, G.K.Y., 2011. Cheese | Starter Cultures: General Aspects, in: Fuquay, J.W.B.T.-E. of D.S. (Second E. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, San Diego, pp. 552–558. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00066-2>
- Prieto, B., Franco, I., Prieto, J.G., Bernardo, A., Carballo, J., 2002. Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of León raw cow's milk cheese, a Spanish traditional variety. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 661–671.
- Ramírez-Navas, J.S., 2010. Espectrocolorimetría en caracterización de leche y quesos. *Tecnol. Láctea Latinoam.* 61, 52–58.
- Rattray, F.P., Fox, P.F., 1997. Purification and characterisation of an intracellular arninopeptidase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Lait* 77, 169–180. <https://doi.org/10.1051/lait:1997111>
- Reale, A., Ianniello, R.G., Ciocia, F., Di Renzo, T., Boscaino, F., Ricciardi, A., Coppola, R., Parente, E., Zotta, T., McSweeney, P.L.H., 2016. Effect of respirative and catalase-positive *Lactobacillus casei* adjuncts on the production and quality of Cheddar-type cheese. *Int. Dairy J.* 63, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.005>
- Renes, E., Diezhandino, I., Fernández, D., Ferrazza, R.E., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., 2014. Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine content of ewe's milk cheese throughout ripening. *Food Microbiol.* 44, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.001>
- Renes, E., Gómez-Cortés, P., de la Fuente, M.A., Linares, D.M., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., 2019a. CLA-producing adjunct cultures improve the nutritional value of sheep cheese fat. *Food Res. Int.* 116, 819–826. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.09.016>
- Renes, E., Ladero, V., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., 2019b. Production of sheep milk cheese with high γ -aminobutyric acid and ornithine concentration and with reduced biogenic amines level using autochthonous lactic acid bacteria strains. *Food Microbiol.* 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.003>

- Renes, E., Linares, D.M., González, L., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Stanton, C., 2017a. Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. *J. Funct. Foods* 34, 340–346. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.05.014>
- Renes, E., Linares, D.M., González, L., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Stanton, C., 2017b. Study of the conjugated linoleic acid synthesis by *Lactobacillus* strains and by different co-cultures designed for this ability. *J. Funct. Foods* 35, 74–80. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.05.015>
- Rezac, S., Kok, C.R., Heermann, M., Hutkins, R., 2018. Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Ribeiro, S.C., Stanton, C., Yang, B., Ross, R.P., Silva, C.C.G., 2018. Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* 90, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.065>
- Rodríguez-Alcalá, L.M., Braga, T., Xavier Malcata, F., Gomes, A., Fontecha, J., 2011. Quantitative and qualitative determination of CLA produced by *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag⁺-HPLC techniques. *Food Chem.* 125, 1373–1378. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.10.008>
- Sacristán, N., González, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., 2012. Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. *Food Microbiol.* 30, 260–266. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2011.10.003>
- Salque, M., Radi, G., Tagliacozzo, A., Uria, B.P., Wolfram, S., Hohle, I., Stäuble, H., Hofmann, D., Whittle, A., Pechtl, J., Schade-Lindig, S., Eisenhauer, U., Evershed, R.P., 2012. New insights into the Early Neolithic economy and management of animals in Southern and Central Europe revealed using lipid residue analyses of pottery vessels. *Anthropozoologica* 47, 45–62. <https://doi.org/10.5252/az2012n2a4>
- Sant'Anna, F.M., Wetzels, S.U., Cicco, S.H.S., Figueiredo, R.C., Sales, G.A., Figueiredo, N.C., Nunes, C.A., Schmitz-Esser, S., Mann, E., Wagner, M., Souza, M.R., 2019. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. *Food Microbiol.* 82, 349–362. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.02.016>
- Schirone, M., Tofalo, R., Fasoli, G., Perpetuini, G., Corsetti, A., Manetta, A.C., Ciarrocchi, A., Suzzi, G., 2013. High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. *Food Microbiol.* 34, 137–144. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2012.11.022>
- Schirone, M., Tofalo, R., Mazzone, G., Corsetti, A., Suzzi, G., 2011. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. *Food Microbiol.* 28, 128–136. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.09.005>
- Schneller, R., Good, P., Jenny, M., 1997. Influence of pasteurised milk, raw milk and different ripening cultures on biogenic amine concentrations in semi-soft cheeses during ripening. *Eur. Food Res. Technol.* 204, 265–272.
- Sert, D., Akin, N., Aktumsek, A., 2014. Lipolysis in Tulum cheese produced from raw and pasteurized goats' milk during ripening. *Small Rumin. Res.* 121, 351–360.

- <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.06.006>
- Settanni, L., Moschetti, G., 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27, 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
- Sforza, S., Cavatorta, V., Lambertini, F., Galaverna, G., Dossena, A., Marchelli, R., 2012. Cheese peptidomics: A detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. *J. Dairy Sci.* 95, 3514–3526. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5046>
- Shah, M.A., Mir, S.A., Paray, M.A., 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Sci. Technol.* 94, 5–16. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3>
- Sherratt, S., 2004. Feasting in Homeric epic. *Hesperia* 73, 301–337. <https://doi.org/10.2972/hesp.2004.73.2.301>
- Signorelli, F., Contarini, G., Annicchiarico, G., Napolitano, F., Orrù, L., Catillo, G., Haenlein, G.F.W., Moioli, B., 2008. Breed differences in sheep milk fatty acid profiles: Opportunities for sustainable use of animal genetic resources. *Small Rumin. Res.* 78, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.04.003>
- Silva, M.R., Rocha, A. da S., Araújo, F.R., Fonseca-Júnior, A.A., de Alencar, A.P., Suffys, P.N., da Costa, R.R., Moreira, M.A.S., Guimarães, M.D.C., 2018. Risk factors for human mycobacterium bovis infections in an urban area of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, 1–6. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170445>
- Soják, L., Blaško, J., Kubinec, R., Górová, R., Addová, G., Ostrovský, I., Margetín, M., 2013. Variation among individuals, breeds, parities and milk fatty acid profile and milk yield of ewes grazed on pasture. *Small Rumin. Res.* 109, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.017>
- Somers, J.M., Kelly, A.L., 2002. Contribution of plasmin to primary proteolysis during ripening of cheese: effect of milk heat treatment and cheese cooking temperature. *Lait* 82, 181–191. <https://doi.org/10.1051/lait>
- Songisepp, E., Hütt, P., Rätsep, M., Shkut, E., Kõljalg, S., Truusalu, K., Stsepetova, J., Smidt, I., Kolk, H., Zagura, M., Mikelsaar, M., 2012. Safety of a probiotic cheese containing *Lactobacillus plantarum* Tensia according to a variety of health indices in different age groups. *J. Dairy Sci.* 95, 5495–5509. <https://doi.org/10.3168/JDS.2011-4756>
- Soryal, K., Beyene, F.A., Zeng, S., Bah, B., Tesfai, K., 2005. Effect of goat breed and milk composition on yield, sensory quality, fatty acid concentration of soft cheese during lactation. *Small Rumin. Res.* 58, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.11.003>
- Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11, 327–345. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00062-0)
- Stocco, G., Cipolat-Gotet, C., Bobbo, T., Cecchinato, A., Bittante, G., 2017. Breed of cow and herd productivity affect milk composition and modeling of coagulation, curd firming, and syneresis. *J. Dairy Sci.* 100, 129–145. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11662>

- Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B., Arranz, J.J., 2016. Transcriptome expression analysis of candidate milk genes affecting cheese-related traits in 2 sheep breeds. *J. Dairy Sci.* 99, 6381–6390. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11048>
- Taborda, G., Gómez-Ruiz, J.A., Martínez-Castro, I., Amigo, L., Ramos, M., Molina, E., 2008. Taste and flavor of artisan and industrial Manchego cheese as influenced by the water-soluble extract compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 323–330. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0769-7>
- Tamang, J.P., Shin, D.H., Jung, S.J., Chae, S.W., 2016. Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Front. Microbiol.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>
- Taylor, S.L., Safety, W.H.O.F., n.d. Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods / by Steve L. Taylor. World Heal. Organ.
- Tekin, A., Güler, Z., 2019. Glycolysis, lipolysis and proteolysis in raw sheep milk Tulum cheese during production and ripening: Effect of ripening materials. *Food Chem.* 286, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.190>
- Thierry, A., Collins, Y.F., Abeijón Mukdsi, M.C., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., Spinnler, H.E., 2017. Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W.B.T.-C. (Fourth E. (Eds.), *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 423–444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00017-X>
- Thissen, L., Ozbal, H., Biyik, A.T., Gerritsen, F., 2010. thissen et al 2010 The land of milk. Approaching dietary preferences of Late Neolithic communities in NW Anatolia. *Leiden J. Pottery Stud.* 26, 157–172.
- Tittarelli, F., Perpetuini, G., Di Gianvito, P., Tofalo, R., 2019. Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *Lwt* 101, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.030>
- Topçu, A., Saldamli, I., 2006. Proteolytical, chemical, textural and sensorial changes during the ripening of Turkish white cheese made of pasteurized cows' milk. *Int. J. Food Prop.* 9, 665–678. <https://doi.org/10.1080/10942910500542238>
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 1989. Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. *Microbiol.-Aliments-Nutr.* 7, 73–80.
- Ung, A., Baidjoe, A.Y., Van Cauteren, D., Fawal, N., Fabre, L., Guerrisi, C., Danis, K., Morand, A., Donguy, M.P., Lucas, E., Rossignol, L., Lefèvre, S., Vignaud, M.L., Cadel-Six, S., Lailier, R., Jourdan-Da Silva, N., Le Hello, S., 2019. Disentangling a complex nationwide Salmonella dublin outbreak associated with raw-milk cheese consumption, France, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1700703>
- Uniacke-Lowe, T., Fox, P.F., 2017. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W.B.T.-C. (Fourth E. (Eds.), *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 69–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1>
- Vacca, G.M., Stocco, G., Dettori, M.L., Pira, E., Bittante, G., Pazzola, M., 2018. Milk yield, quality, and coagulation properties of 6 breeds of goats: Environmental and individual

- variability. *J. Dairy Sci.* 101, 7236–7247. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14111>
- Valdes, A.M., Walter, J., Segal, E., Spector, T.D., 2018. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 361, 36–44. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
- Vanbergue, E., Delaby, L., Peyraud, J.L., Colette, S., Gallard, Y., Hurtaud, C., 2017. Effects of breed, feeding system, and lactation stage on milk fat characteristics and spontaneous lipolysis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100, 4623–4636. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12094>
- Vandera, E., Kakouri, A., Koukkou, A.I., Samelis, J., 2019. Major ecological shifts within the dominant nonstarter lactic acid bacteria in mature Greek Graviera cheese as affected by the starter culture type. *Int. J. Food Microbiol.* 290, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.014>
- Vigne, J.D., 2011. The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. *Comptes Rendus - Biol.* 334, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.009>
- Vigne, J.D., Carrère, I., Briois, F., Guilaine, J., 2011. The early process of mammal domestication in the Near East: New evidence from the Pre-Neolithic and Pre-Pottery Neolithic in Cyprus. *Curr. Anthropol.* 52. <https://doi.org/10.1086/659306>
- Viñas, M.A.G., Ballesteros, C., Martín-Alvarez, P.J., Cabezas, L., 2007. Relationship between sensory and instrumental measurements of texture for artisanal and industrial Manchego cheeses. *J. Sens. Stud.* 22, 462–476. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2007.00120.x>
- Wang, J., Fang, X., Wu, T., Min, W., Yang, Z., 2018. Exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 as adjunct culture in Cheddar cheese production. *Lwt* 97, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.011>
- Wang, Q., Thompson, E., Parsons, R., 2015. Preferences for farmstead, artisan, and other cheese attributes: Evidence from a conjoint study in the Northeast United States. *Int. Food Agribus. Manag. Rev.* 18, 17–36.
- Westling, M., Danielsson-Tham, M.-L., Jass, J., Nilsen, A., Öström, Å., Tham, W., 2016. Contribution of Enterobacteriaceae to Sensory Characteristics in Soft Cheeses Made from Raw Milk. *Procedia Food Sci.* 7, 17–20. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.075>
- Yoon, Y., Lee, S., Choi, K.H., 2016. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control* 63, 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>
- Yurchenko, S., Sats, A., Tatar, V., Kaart, T., Mootse, H., Jõudu, I., 2018. Fatty acid profile of milk from Saanen and Swedish Landrace goats. *Food Chem.* 254, 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.041>
- Zabaleta, L., Albisu, M., Ojeda, M., Gil, P.F., Etaio, I., Perez-Elortondo, F.J., de Renobales, M., Barron, L.J.R., 2016. Occurrence of sensory defects in semi-hard ewe's raw milk cheeses. *Dairy Sci. Technol.* 96, 53–65. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0237-2>
- Zeder, M.A., 2012. Pathways to animal domestication. *Biodivers. Agric. Domest. Evol. Sustain.* 227–259. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139019514.013>

Zengin, G., Cakmak, Y.S., Guler, G.O., Oguz, E., Aktumsek, A., Akin, M., 2011. The effect of pasteurisation temperature on the CLA content and fatty acid composition of white pickled cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 64, 509–516. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00697.x>

