UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

TESIS DOCTORAL

Aplicación de técnicas de RMN al análisis de quesos de oveja y películas comestibles. Evaluación de su potencial para la supervisión y predicción de características reológicas y estructurales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Karen Paola Cruz Díaz

Directores

María Isabel Cambero Rodríguez
Encarnación Fernández Valle
Olga Díaz Rubio

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

TESIS DOCTORAL

Aplicación de técnicas de RMN al análisis de quesos de oveja y películas comestibles. Evaluación de su potencial para la supervisión y predicción de características reológicas y estructurales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Karen Paola Cruz Díaz

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

TESIS DOCTORAL

Aplicación de técnicas de RMN al análisis de quesos de oveja y películas comestibles. Evaluación de su potencial para la supervisión y predicción de características reológicas y estructurales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Karen Paola Cruz Díaz

DIRECTORES

Mª Isabel Cambero Rodríguez
Mª Encarnación Fernández-Valle
Olga Díaz Rubio

Madrid, 2016

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta Tesis Doctoral ha sido financiado mediante el proyecto de investigación AGL2010-19158 del Ministerio de Educación y Ciencia y del Grupo UCM-BSCH Nº 920276 Ref. GR3/14. Durante su desarrollo la autora fue beneficiaria de una Beca F.P.I. (Formación de Personal Investigador) del Ministerio de Educación y Ciencia con referencia BES-2010-040550.

Dedicado

A mis amados padres, Margenis y Luis Ramón, por su amor y ejemplo de vida. A mis hermanos Hernán, Alfonso, María Luisa y María de los Ángeles por su alegría y ternura. A Enri por su apoyo y cariño.

¡Gracias!

No creáis en nada simplemente porque lo diga la tradición, ni siquiera aunque muchas generaciones de personas nacidas en muchos lugares hayan creído en ello durante muchos siglos. No creáis en nada por el simple hecho de que muchos lo crean o finjan que lo creen...

...Creed únicamente en lo que vosotros mismos habéis experimentado, verificado y aceptado después de someterlo al dictamen de la razón y a la voz de la conciencia...

Siddhartha Gautamá (Buda)

Agradecimientos

Al finalizar el desarrollo de esta Tesis Doctoral, la cual ha llevado un gran esfuerzo y trabajo, es necesario resaltar que este aporte ha sido posible gracias a la participación de personas e instituciones que han proporcionado las herramientas necesarias para llevar a cabo su conclusión. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresarles mis agradecimientos.

A mis directoras Isabel Cambero, Encarnación Fernández-Valle (Marién) y Olga Díaz. Isabel gracias por la oportunidad y comprensión brindada, la confianza depositada, el esfuerzo realizado y la ayuda que me has ofrecido. Esta tesis nunca hubiera sido posible sin tu orientación. Marién gracias por toda tu paciencia, esfuerzo, consejos y entrega en esta tesis.

A Olga y Ángel Cobos por permitirme realizar la estancia en el Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía de la Universidade de Santiago de Compostela. Gracias por vuestra ayuda e interés.

Al Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno Español por la concesión de una Ayuda para Formación de Personal Investigador (FPI).

A la profesora María Dolores Selgas, por su acogida en el Departamento de Nutrición, Bromatología, y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. A los profesores, Leónides Fernández, Juan Miguel Rodríguez, Manuela Fernández, Juan Antonio Ordóñez, Gonzalo García de Fernando, María Luisa García, Eva Hierro, Carmen San José, Belén Orgaz y Conchita Cabeza.

A mis compañeros de grupo, Ana Belén García, Lola Romero de Ávila y Rosa Escudero. Ana Belén, ha sido un placer conocerte y trabajar contigo. He aprendido mucho de ti, tanto en lo profesional como en lo personal. En mis recuerdos siempre estarán nuestras "anécdotas de investigación".

A mis compañeros de laboratorio, Carlos Santos, gracias por los cafés y conversaciones sobre temas varios. A Raquel Velasco, por tus palabras de ánimo. A Xavier Fernández y Carmencita Hernández, por vuestra amabilidad y disposición para ayudar.

Al personal laboral, Aurora Blanco, Alberto Álvarez, Santiago Ruiz y Andrés Guerrero, por vuestra amabilidad, cercanía y sonrisas.

A todo el equipo del CAI de Resonancia Magnética Nuclear y Espín Electrónico de la Universidad Complutense de Madrid, en especial a David Castejón y a Palmira Villa. David, gracias por tu atención, paciencia, interés, disposición y ayuda.

A las empresas de los quesos de elaboración tradicional que suministraron las muestras, SALETA y Quesos Alonso Bariego. Gracias por vuestra amabilidad y cooperación.

A Lorena Salcedo por compartir el principio y el final de este trabajo, por ser muchas cosas: mi compañera, amiga y hermana. Gracias por todos tus consejos, cariño y sonrisas.

A Katia Acevedo y Luz Stella Nerio, por vuestra amistad y buenas energías. Siempre las llevo conmigo.

A Elkin Tílvez y Nivis Torres por vuestro apoyo, alegría y afecto. Elkin gracias por hacerme ver siempre el vaso medio lleno.

A David Abbasi-Pérez por tu apoyo y amistad en estos últimos años.

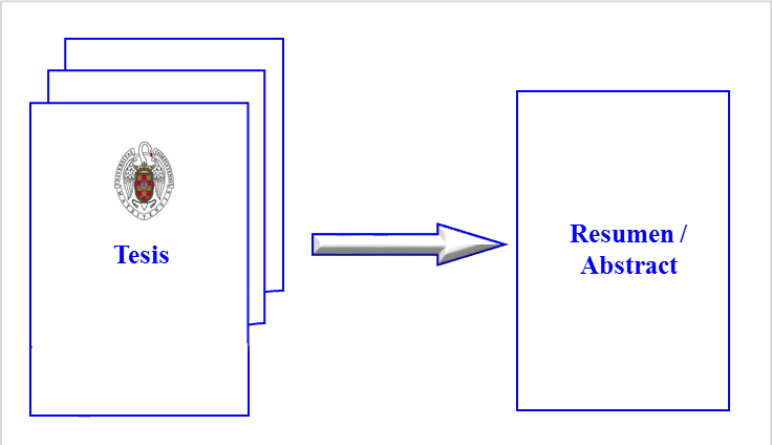
A Enrique Fernández García por tu paciencia, cariño y ayuda en estos últimos años. Sin ti todo hubiera sido un poco más difícil.

A mi familia: mis padres, hermanos, abuelos, tíos y primos, por todo su amor recibido desde la distancia.

... Y por último a todas aquellas personas que de alguna forma me apoyaron en esta etapa...

¡Gracias!

RESUMEN / ABSTRACT



Introducción

Se desarrollaron dos líneas de trabajo en las que se ha estudiado el potencial de técnicas de análisis no destructivo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para aportar información sobre distintas estructuras constituidas por proteínas de origen lácteo (quesos y películas de proteínas de lactosuero). Entre las técnicas de RMN, se han utilizado la Imagen de Resonancia Magnética (IRM), la relaxometría de RMN y la espectroscopía de ^{1}H-RMN con sonda HRMAS (*High Resolution Magnic Angle Spinning*) (^{1}H-RMN/HRMAS). Estas metodologías permiten el análisis de las matrices complejas sin necesidad de pasos previos de derivatización y/o separación. La espectroscopía de RMN posibilita además el estudio de diversos componentes en un mismo ensayo, a lo que debe la denominación de "detector universal".

Planteamiento del estudio

Por una parte, se han estudiado los quesos de leche de oveja de pasta prensada y coagulación enzimática de mayor producción y consumo en España, elaborados en la Comunidad de Castilla y León (CL) y Castilla-La Mancha (CLM). En este estudio se han incluido quesos de producción industrial (I) y tradicional (T), fabricados con leche pasteurizada (quesos I-CLM con Denominación de Origen Manchego) o con leche cruda (quesos I-CL, T-CL y T-CLM). Los quesos fueron analizados a lo largo del proceso de maduración (2-180 días). En todos ellos se han analizado las características de su macroestructura (mediante IRM), microestructura (mediante relaxometría de RMN) y su metaboloma (mediante ^{1}H-RMN/HRMAS), además de su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y diversos atributos fisicoquímicos y de textura.

Por otra parte, se han elaborado películas comestibles a partir de un concentrado comercial de proteínas de lactosuero de vacuno. Se analizó su comportamiento mecánico y características estructurales mediante relaxometría de RMN, mono (1D) y bidimensional (2D).

Objetivos

Se han abordado dos objetivos generales:

- *Evaluar el potencial de las técnicas no destructivas de RMN para monitorizar el proceso de maduración, como herramienta para la trazabilidad y para la caracterización dependiendo de la forma de procesado y zona geográfica de procedencia de quesos de oveja de pasta prensada.*

- *Obtener películas comestibles a partir de proteínas de lactosuero mediante la aplicación de calor y de ultrasonidos, con o sin adición de transglutaminasa de origen microbiano, como material alternativo de envasado.*

Resultados

Los resultados se desglosan en cinco trabajos en los que se han abordado distintos objetivos parciales.

Trabajo 1. Análisis de la macroestructura y comportamiento reológico de los quesos de pasta prensada.

Se estudiaron los cambios estructurales durante el periodo de maduración de los quesos I-CL, T-CL, I-CLM y T-CLM mediante IRM. Para ello se analizaron los mapas de T_1 (tiempo de relajación longitudinal), T_2 (tiempo de relajación transversal) y *CDA* (Coeficiente de Difusión Aparente). Estos mapas ofrecieron información complementaria y detallada sobre la macroestructura de los quesos y permitieron la caracterización e identificación dependiendo de su procedencia (CLM, CL), proceso de obtención (I, T) y tiempo de maduración. Se han obtenido modelos de regresión para la estimación del contenido acuoso, a_w y tiempo de maduración, así como de la dureza, cohesividad y elasticidad a partir de los valores medios de T_1 y T_2.

Trabajo 2. Análisis de la microestructura de los quesos de oveja de pasta prensada.

En todos los quesos de oveja estudiados, el tiempo de relajación transversal (T_2) presentó un comportamiento bimodal con dos componentes: uno de relajación más corta (T_{21}) asociado a los protones del agua fuertemente ligada a las macromoléculas y otro de relajación más larga (T_{22}) atribuido a los protones de la fase grasa. Los resultados de T_2 y MEB sugieren que el proceso de maduración en los quesos de CLM favorece la compactación de su estructura, en la que la grasa estaría restringida en pequeños poros o cavidades, mientras que en los quesos de CL hay una mayor tendencia a la coalescencia de las cavidades y a la aparición de estructuras abiertas con menor compartimentación de la grasa. Es posible establecer modelos de regresión lineal para la estimación de la a_w y el extracto seco de los quesos a partir del componente T_{21}, y del tiempo de maduración utilizando los dos componentes de T_2.

Trabajo 3. Optimización del análisis por espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS de quesos de oveja de pasta prensada.

En este trabajo se utilizó por primera vez la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS en el análisis de quesos de oveja de pasta prensada, ejemplarizados en los quesos Castellanos (I-CL y T-CL). Como primer paso, se optimizaron los principales parámetros para obtener espectros de alta calidad. La ^{1}H-RMN/HRMAS permitió obtener el perfil metabólico de la leche de oveja y del queso Castellano, así como monitorizar la proteólisis, lipólisis y glucólisis que caracterizan la maduración. En los espectros se han identificado 116 señales correspondientes a diversos metabolitos. Los principales cambios se apreciaron en las regiones espectrales asociadas a los aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos.

Trabajo 4. Potencial de la técnicas quimiométricas basadas en la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS para la clasificación de quesos de oveja de pasta prensada.

Se realizó un estudio metabolómico de los quesos elaborados en Castilla-La Mancha (T-CLM y I-CLM) durante su maduración. El estudio multivariante no supervisado, mediante el análisis de componentes principales, de los datos obtenidos en los trabajos 3 y 4 ha permitido clasificar los quesos dependiendo del tiempo de maduración, procedencia y forma de elaboración.

Trabajo 5. Obtención y caracterización de películas comestibles elaboradas con proteínas de lactosuero bovino (CPS).

Las películas de CPS obtenidas por tratamiento térmico presentaron los valores más bajos de solubilidad y la mayor resistencia mecánica. Se proponen como material alternativo en el envasado de los quesos para la separación de lonchas. La relaxometría de RMN 1D y 2D ha permitido obtener información detallada para la caracterización de las películas de CPS.

Se concluye que las técnicas de RMN permiten la estimación de parámetros fisicoquímicos y de textura así como la monitorización del proceso de maduración y la caracterización de los quesos de oveja de pasta prensada.

La relaxometría de RMN es una herramienta con elevado potencial para el análisis estructural de películas comestibles de lactosuero y estimar su comportamiento mecánico.

Introduction

Two different lines of work were developed in order to study the potential of non-destructive analytical Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based techniques to provide information on different structures consisting of proteins of dairy origin (cheese matrices and bovine whey protein films). Among NMR techniques, Magnetic Resonance Imaging (MRI), NMR relaxometry and ^{1}H-NMR spectroscopy with HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning) probe have been used. These methodologies allow to study complex matrices without the need of previous derivatization and / or separation. NMR spectroscopy also facilitates to identify several components in the same test, so it is called "universal detector".

Experimental Design

On the one hand, ewe`s pressed curd cheeses with enzymatic coagulation made in Castilla y León (CL) and Castilla-La Mancha (CLM) regions were studied, given their increased production and consumption in Spain. In this study, traditional-made (T) and industrial-made (I) cheeses, from pasteurized milk (Manchego cheese I-CLM, Protected Designation of Origin) or raw milk (I-CL, T-CL and T-CLM) were included. Cheeses were analyzed throughout the ripening process (2-180 days). In all cases, macrostructure (by means of MRI), microstructure (by NMR relaxometry), metabolome (by ^{1}H-NMR/HRMAS), morphology (by scanning electron microscopy, SEM)) and several physicochemical and textural features were analyzed.

On the other hand, edible films have been manufactured from a commercial bovine whey protein concentrate. Mechanical behaviour and structural characteristics were analyzed by means of mono-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) NMR relaxometry

Objectives

Two main objectives have been tackled:

- *To assess the potential of non-destructive NMR techniques to monitor the ripening process as a suitable tool for cheeses traceability and characterization depending on processing type and geographical origin of ewe`s milk.*

- *To obtain edible films from bovine whey protein, by applying heat and ultrasound treatments, with or without microbial transglutaminase addition, as an alternative packaging material.*

Results

Several stages were defined in which the following partial objectives were addressed:

Work 1. Analysis of the macrostructure and rheological performance of ewe's pressed curd cheeses.

Structural changes during the ripening period of I-CL, T-CL, I-CLM and T-CLM cheeses were studied by means of MRI. For this purpose, the T_1 (longitudinal relaxation time), T_2 (transverse

relaxation time) and ADC (Apparent Diffusion Coefficient) maps were analyzed. These maps offered additional detailed information about cheeses macrostructure and allow their characterization and identification depending on their origin (CLM, CL), processing type (I, T) and ripening time. Regression models from the mean values of T_1 and T_2 were obtained for estimating water content, a_w and ripening time, as well as hardness, cohesiveness and springiness.

Work 2. Analysis of the microstructure of ewe's pressed curd cheeses.

In all the studied cheeses, transverse relaxation time (T_2) showed a bimodal pattern behavior with two components: T_{21}, with fast relaxation time, associated with the water protons strongly linked to macromolecules, and another component, T_{22}, with slower relaxation time, attributed to the protons of the fat phase. The combined results of T_2 and SEM suggest that CLM ripening process promoted compactness of cheese structure, where fat would be restricted in small pores or cavities, while in CL cheeses a greater tendency to coalescence of the cavities and the development of an open structure with lower fat compartmentalization was observed. Linear regression models for estimating a_w and dry matter from T_{21} component were established, as well as models to estimate the ripening time using the two components of T_2.

Work 3. Optimization of the ^{1}H-NMR/HRMAS spectroscopic assay of ewe's pressed curd cheeses.

In this study, ^{1}H-NMR/HRMAS spectroscopy was used for the first time to analyze ewe's pressed curd cheeses, I-CL and T-CL. As a first step, the main parameters were optimized to obtain high-quality spectra. The ^{1}H-NMR/HRMAS allowed to obtain the metabolic profile of ewe’s milk and ewe's cheese as well as monitoring proteolysis, lipolysis and glycolysis processes during ripening. In the obtained spectra, 116 signals corresponding to several metabolites have been identified. The main changes were observed in the spectral regions related to amino acids, carbohydrates and organic acids.

Work 4. Chemometric techniques based on ^{1}H-NMR/HRMAS spectroscopy potential for the classification of ewe`s pressed curd cheeses.

A metabolomic study of cheeses made in Castilla-La Mancha (T-CLM and I-CLM) during ripening was performed. Unsupervised multivariate analysis by principal component analysis (PCA) of the obtained data in Work 3 and Work 4 allow to discriminate cheeses depending on the ripening time, origin, and processing type.

Work 5. Manufacture and characterization of edible films made from bovine whey protein concentrate (WPC).

WPC films obtained by heat treatment showed the lowest values of solubility and the highest mechanical strength. As a result, they could be proposed as an alternative packaging material, in

particular, as separating cover between cheese slices. 1D and 2D NMR relaxometry have reported detailed information for the characterization of WPC films.

Conclusion. NMR techniques allow for the estimation of physicochemical parameters and textural features, as well as the monitoring of the ripening process and the characterization of ewe's pressed curd cheeses.

NMR relaxometry is a useful tool with great potential for elucidating structural traits of bovine whey proteins edible films and estimating their mechanical performance.

Abreviaturas y acrónimos

*a**: Tendencia al rojo-verde. Parámetro obtenido en la evaluación instrumental del color por el método CIE*lab*

ACP: Análisis de componentes principales

Af: Factor de exactitud

a_w: Actividad de agua

*b**: Tendencia al amarillo-azul. Parámetro obtenido en la evaluación instrumental del color por el método CIE*lab*

BAL: Bacterias ácidolácticas

B_f: Factor de sesgo

*C**: Tendencia al croma o saturación

CDA: Coeficiente de Difusión Aparente

CL: Castilla y León

CLM: Castilla-La Mancha

COSY: COrrelated SpectroscopY

CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill

CPS: Concentrado de proteínas de suero lácteo bovino

D_2O: Agua deuterada, óxido de deuterio

MBC: Mozzarella di Búfala Campana

DOP: Denominación de Origen Protegida

ES: Extracto seco

FID: Free Induction Decay

H*: Tendencia al tono angular o matiz. Parámetro obtenido en la evaluación instrumental del color por el método CIE*lab*

HR: Humedad relativa

HRMAS: High Resolution Magic Angle Spinnig

I-CL: Quesos de elaboración industrial producidos en Castilla y León.

I-CLM: Quesos de elaboración industrial producidos en Castilla-La Mancha.

IRM: Imagen de Resonancia Magnética.

*L**: Tendencia a la luminosidad. Parámetro obtenido en la evaluación instrumental del color por el método CIE*lab*

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

MTGasa: Transglutaminasa de origen microbiano

NaCl: Cloruro de sodio

CP: Componentes principales

pH: Potencial de hidrógeno

P-IRM: Parámetros de Imagen de Resonancia Magnética

REF: Envases de referencia utilizando láminas comerciales (Cellophan de uso alimentario)

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMSE: Raíz del error cuadrático medio (*Root Mean Square Error*)

ROI: Región de interés

RTE: Ready-to-eat, productos listos para su consumo

T_1: Tiempo de relajación longitudinal o espín-red.

T_2: Tiempo relajación transversal o espín-espín

T-CL: Tradicional Castilla y León

T-CLM: Tradicional Castilla-La Mancha

TE: Tiempo de eco

TI: Tiempo de inversión

TM: Tiempo de maduración

TOCSY: TOtal Correlated SpectroscopY

TPA: Análisis del perfil de textura

T-QOPP: Tipo de queso de oveja de pasta prensada

TR: Tiempo de repetición

TSP: Trimetilsilil propionato de sodio

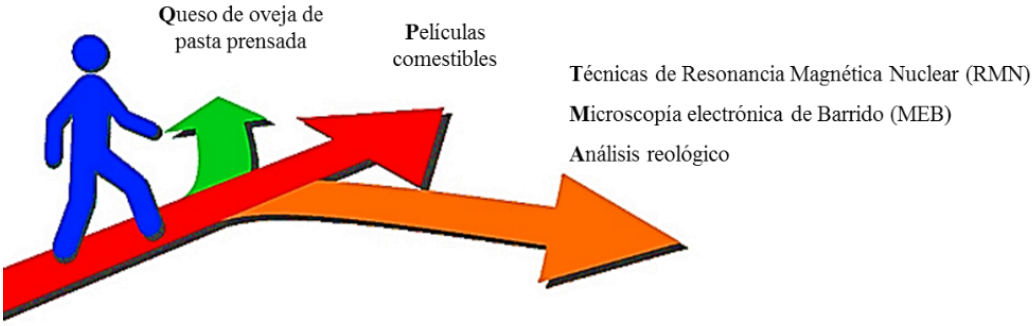
UDP-galactosa: Uridina difosfato galactosa

WVP: Permeabilidad al vapor de agua

WVT: Transmisión al vapor de agua

ΔE^*: Diferencias de color. Parámetro obtenido en la evaluación instrumental del color por el método CIE*lab*

I. INTRODUCCIÓN



I.1. El queso

En este apartado se tratan temas de distinta naturaleza que abarcan los diversos factores implicados en las investigaciones que convergen en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral. Se analizarán varios aspectos generales en la producción del queso, los tipos, denominación de origen, composición y técnicas. No obstante, aspectos concretos del estudio se detallaran en el preámbulo e introducción de los distintos trabajos en los que se desglosan las experiencias llevadas a cabo.

I.1.1. Aspectos históricos

Algunos historiadores afirman que la fabricación del queso se originó en el valle del Tigris-Éufrates, lo que hoy se conoce como Iraq, hace más de 8.000 años (Holsinger *et al*., 1995; Scott *et al*., 1998; Fox y McSweeney, 2004). Los habitantes de la zona, después de domesticar los animales y descubrir el ordeño, reconocieron el valor nutritivo de la leche. Inicialmente, el queso se obtuvo por la acidificación natural de la leche, debida a la producción de ácido láctico por microorganismos contaminantes; como resultado se obtuvo la formación de un gel o cuajada que, una vez rota, se filtraba para separar la fase liquida "el suero" de la semisólida, "la cuajada" (Holsinger *et al*., 1995). La fracción líquida se podía consumir inmediatamente, de hecho el suero fue considerado durante mucho tiempo como una medicina (Hoffmann, 1761). Por otra parte, observaron que la fase semisólida, "la cuajada", podía tener una larga vida útil mediante el salado, secado al aire o por presión, convirtiéndose así en uno de los primeros sistemas de conservación de la leche (Fox y McSweeney, 2004; Ahmad. *et al*., 2008). El ácido láctico parece haber sido el primer agente coagulante de la leche. Sin embargo, pronto descubrieron que con el almacenamiento de la leche en recipientes hechos a partir del estómago de animales coagulaba de forma más rápida la leche. De esta forma el cuajo se utilizó por primera vez en la elaboración del queso (Holsinger *et al*., 1995).

La elaboración de queso se extendió con la expansión de la civilización a través del Medio Oriente, Grecia y Roma. El queso se mencionaba en la literatura griega y se representaba en el arte de las antiguas tumbas egipcias (Fox y McSweeney, 2004). La leche y los productos lácteos formaban una parte importante de la dieta de los pueblos del Oriente Próximo durante los tiempos bíblicos; de hecho Palestina fue elogiada como "una tierra que mana leche y miel" (Éxodo 3,8). Con la extensión del imperio Romano, la tecnología de la elaboración del queso llegaría desde el Tigris-Éufrates hasta Europa (Hill

y Kethireddipalli, 2013). En España hay informes sobre el conocimiento del queso por las diferentes civilizaciones que habitaron la Península. De la época romana existen escritos del hispano Lucio Junio Moderato Columela en su obra "De re rustica", en la que se refiere al *caserum* (latín que significa "queso"), y en donde ofrece su testimonio de la actividad ganadera y la producción de quesos en la Península; estos últimos eran muy apreciados en las mesas romanas, principalmente los de la región de La Mancha. Por su lado, los árabes dieron más importancia a la ganadería caprina, quedando patente todavía esta cultura en Andalucía y Extremadura.

Las migraciones de los pueblos en Europa antes y después de la caída del Imperio Romano propagaron la fabricación de queso, al igual que los cruzados y otros peregrinos de la Edad Media. Probablemente los más importantes contribuyentes al desarrollo tecnológico de queso fueron los monasterios. Muchos tipos de queso desarrollados en monasterios hoy en día aún son populares, como el queso Wenslydale (Rievaulx Abbey, Reino Unido), Port du Salut o Saint Paulin (Notre Dame du Port du Salut, Francia), Maroilles (Abbey Moroilles, Francia), Fromage de Tamie (Abadía de Tamie, Ginebra) y trapense (Maria Stern, Bosnia). La movilidad geográfica de los monjes habría contribuido a la propagación de variedades de queso y probablemente al desarrollo de nuevos tipos (Fox y McSweeney, 2004). La extensión del queso en todo el mundo es el resultado de la colonización de América, Oceanía y África por colonos europeos que llevaron sus habilidades de fabricación de queso con ellos. Con el tiempo, el queso se convirtió en un producto importante para el desarrollo económico de los "nuevos" países, en particular los EE.UU, Canadá, Australia y Nueva Zelanda.

La producción de queso pasó de ser un arte a una ciencia en Europa y el Nuevo Mundo a partir de la década de 1930. La tardanza en el desarrollo científico en el campo de la producción quesera se debió al desconocimiento de la composición exacta de los ingredientes y las transformaciones físicas y químicas de las que dependería la calidad del producto resultante. Como consecuencia de los descubrimientos científicos de diversos investigadores, muchos tipos de queso fueron definidos por las normas nacionales de identidad, tales como el sistema de Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) en Francia, Denominazione di Origine Controllata (DOC) en Italia, y la designación internacional de la Comunidad Europea de Denominación de Origen Protegida (DOP). Las normas de identidad se fortalecieron a nivel internacional por el Convenio de Stresa en 1951, posteriormente actualizado por la normativa comunitaria europea.

Hoy en día existen unas 2.000 variedades de queso diferentes y a lo largo del tiempo el proceso se ha ido perfeccionado consiguiéndose diferentes tipos, con distintas técnicas de elaboración, y se ha convertido en un alimento con una imagen saludable y positiva (El-Bakry y Sheehan, 2014) y de alta cocina con cualidades exquisitas (Fox y McSweeney, 2004).

I.1.2. Definición de queso y proceso de fabricación

La legislación Española (Real Decreto 1113/2006) define el queso de la siguiente manera: "Se entiende por queso el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche".

La gran variedad de quesos existentes depende básicamente de su proceso de fabricación, el cual se puede dividir en dos periodos concretos: obtención de la cuajada y maduración. Mientras algunos tipos se consumen de forma fresca, sin ningún grado de maduración, la mayoría de las variedades de quesos experimentan complejas reacciones bioquímicas durante la etapa de maduración, produciendo sabores, olores y textura agradables que son característicos de los quesos madurados.

La fabricación de queso es esencialmente un proceso de deshidratación de la leche, en el que se concentra la grasa y la caseína entre 6 y 12 veces, dependiendo de la variedad (Fox y McSweeney, 2004). El protocolo de fabricación para las variedades de queso difiere en algunos detalles, pero los pasos básicos son comunes a la mayoría. Las etapas principales en la fabricación del queso son: acidificación, coagulación, desuerado o sinéresis, moldeado y prensado, salado y, en su caso, maduración. El grado de deshidratación de la cuajada se ve afectado por la extensión y la combinación de las seis operaciones anteriores, además de la composición química de la leche de partida. A su vez, los niveles de humedad, sal, coagulante utilizado, pH y microbiota regulan los fenómenos bioquímicos que se producen durante la maduración. Estos factores, por consiguiente, condicionan el sabor, el aroma y la textura del queso madurado (Fox y Stepaniak, 1993; Fox y McSweeney, 2004). La acción conjunta de la acidificación, la deshidratación y el salado de la cuajada, junto con la producción de sustancias inhibitorias por las bacterias

que forman parte del cultivo iniciador o *starter* y las condiciones anaeróbicas que tienen lugar en la cuajada durante la maduración, previenen el crecimiento de bacterias indeseables. De esta forma, el queso se mantiene en adecuadas condiciones a lo largo del proceso de maduración, que puede oscilar entre 2 - 3 semanas hasta 2 años o incluso más tiempo (Fox y Stepaniak, 1993).

I.1.2.1. Selección y pretratamiento de la leche para la fabricación de queso

Se puede considerar que la elaboración del queso comienza con la selección de la leche, la cual en la producción industrial se almacena a 4 ºC. Algunas veces, si su empleo no va a ser más o menos inmediato, se realiza una termización para asegurar la reducción de la microbiota psicrotrofa. En la elaboración de algunos quesos, especialmente los destinados al consumo en fresco, la leche se pasteuriza a 72 ºC durante 15 s y para la producción de ciertas variedades se requiere estandarizar la composición de la leche. La pasteurización destruye en gran medida la microbiota natural de la leche, incluyendo las bacterias patógenas. Junto con la estandarización, la pasteurización permite la producción de un queso de calidad más uniforme (Fox y Stepaniak, 1993). La leche tratada térmicamente es la más utilizada para la fabricación de queso a escala industrial. Sin embargo, todavía se usa leche cruda para la producción de algunos quesos; tal es el caso de los elaborados de forma tradicional o artesanal. Los quesos elaborados con leche cruda maduran más rápidamente y desarrollar sabores más fuertes que los producidos con leche pasteurizada (Ballesteros *et al*., 2006).

I.1.2.2. Composición de la leche

Los principales componentes de la leche son: agua (86 - 88%), grasa (3 - 6%), proteína (3 - 4%), lactosa (5%) y minerales (1 - 0,7%) (Eskin y Goff, 2013). La composición de la leche se encuentra afectada por una gran variedad de factores, entre ellos cabe citar, en relación con el animal, la especie, la raza, la etapa de lactancia, la edad, el intervalo entre ordeños, el estado de salud (por ejemplo la presencia de mastitis) y otros relacionados con el medio ambiente, como el tipo de pasto, la temperatura y la forma de cría (Fox y McSweeney, 1998; McSweeney, 2007; Hill y Kethireddipalli, 2013). Cabe destacar la amplia oscilación en la formulación de la leche de distintas especies así, los lípidos pueden representar entre un 2 y un 50%, las proteínas entre un 1 y un 20%, y la lactosa entre un 0 y un 10% (Fox, 2009). La **Tabla** I.**1** muestra la composición típica de la leche de las principales especies productoras. Para la elaboración de los quesos es

necesario tener en cuenta la composición de la leche debido a su importante repercusión en el sabor y la textura del producto obtenido. Por ejemplo, la leche ovina contiene altos niveles de grasa y proteína, los principales constituyentes del queso, y con ella se obtiene un coágulo firme, con sinéresis rápida y de bajo contenido de humedad final (McSweeney, 2007). Por otra parte, la leche de cabra presenta altos niveles de ácidos grasos de cadena corta lo que produce un sabor característico en el queso. Además, la leche caprina tiene niveles muy bajos de α_{s1}-caseína, lo que da lugar a una sinéresis más intensa y una textura más quebradiza o débil (Moatsou *et al*., 2004; Hill y Kethireddipalli., 2013). La leche de búfala tiene una capacidad tampón mayor que la leche de vaca. De una forma genérica, puede decirse que los cambios producidos durante la elaboración de los quesos pueden ser cualitativamente similares pero cuantitativamente diferentes dependiendo de la leche de partida (Ahmad *et al*., 2008).

Tabla I.1. Composición de leche (%) de diferentes especies (McSweeney, 2007)

Componentes	Vaca	Cabra	Búfala	Oveja
Grasa	3,7	4,5	3,7	7,4
Proteína	3,4	2,9	6,9	4,5
Lactosa	4,8	4,1	5,2	4,8
Minerales	0,7	0,8	0,8	1,0
Solidos totales	12,7	12,3	16,0	19,3

I.1.2.2.1. Lactosa

La lactosa es el principal hidrato de carbono en la leche de todos los mamíferos, siendo la única fuente de azúcar, y es también el principal hidrato de carbono en el queso durante sus primeras etapas de maduración (Fox y McSweeney, 1998). En el queso juega un papel fundamental, ya que es esencial para el desarrollo de la fermentación, influyendo directamente sobre el desarrollo de los cultivos iniciadores y el pH. Esto repercute además en otras características como la textura o la formación de compuestos volátiles relacionados con el sabor (Fox, 2000; McSweeney y Fox, 2004).

La lactosa es un disacárido formado por una molécula de galactosa y otra de glucosa unidas por un enlace β-1,4-glicosídico. Se sintetiza en la pared del aparato de Golgi a partir de la glucosa, mediante un proceso de condensación de la uridina difosfato galactosa (UDP-galactosa) con la D-glucosa por medio de la reacción en la que la enzima lactosa-sintetasa, actúa como catalizador (Eskin y Goff, 2013). Esta es una enzima con dos componentes: (i) la galactosiltransferasa no específica, que transfiere la galactosa de la

UDP-galactosa a varios aceptores; (ii) la α-lactoalbúmina, una proteína del suero que hace que la transferasa llegue a ser altamente específica para la glucosa, lo que conduce a la síntesis de lactosa. Por lo tanto, la α-lactoalbúmina es un modificador enzimático y su concentración en la leche está directamente relacionada con la concentración de lactosa. La importancia de este mecanismo es que permite a los mamíferos interrumpir la síntesis de lactosa cuando sea necesario, es decir, puede regular y controlar la presión osmótica cuando hay una variación del contenido de NaCl, como ocurre durante la mamitis o en las últimas etapas de la lactación (Fox, 2009; Eskin y Goff, 2013).

En la leche, la lactosa aparece en dos formas isoméricas: α y β-lactosa, que difieren por sus distintas propiedades de solubilidad, cristalización y poder rotatorio (Ordóñez *et al.*, 1998). Los tratamientos tecnológicos alteran este equilibrio, y predominan distintas formas en función de la temperatura y la solubilidad. En la industria, la determinación de la lactosa en la leche y los productos lácteos es importante, ya que el contenido en lactosa es un indicador básico en la evaluación de calidad de la leche y la detección de leche anormal. Por otra parte, la lactosa es un azúcar higroscópico, tiene una fuerte tendencia a absorber los sabores y olores y causa muchos defectos en los alimentos refrigerados, tales como cristalización en los productos lácteos, el desarrollo de textura arenosa y la formación de depósitos (Panesar *et al.*, 2007). En el queso gran parte de la lactosa se pierde en el suero durante la elaboración. Por otra parte, la lactosa que queda retenida en la cuajada es fermentada por las bacterias ácidolácticas y se transforma en ácido láctico, lo que repercute en el valor del pH. En el queso tipo manchego no quedan restos de lactosa al cabo de tres meses de maduración.

I.1.2.2.2. Lípidos

Los lípidos son el componente de la leche que más variaciones presenta, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo (Fox, 2009; Hill y Kethireddipalli, 2013). En su mayor parte son lípidos neutros y polares (99,5%), mientras que el resto (0,5%) corresponde al colesterol, los carotenoides y las vitaminas liposolubles A, D, E y K (Fox, 2009). Alrededor del 99% de los lípidos de la leche se encuentra compartimentada en forma de glóbulos grasos emulsionados en el plasma acuoso (Hill y Kethireddipalli, 2013). La estabilidad de esta emulsión se debe a la existencia de una membrana envolvente lipídico-proteica cargada negativamente, que impide la salida de la grasa y asegura la repulsión electrostática entre los diferentes glóbulos. El tamaño de estos puede oscilar

entre 1,5 y 10 µm de diámetro dependiendo de la especie y de la raza de procedencia de la leche (Ordóñez *et al*., 1998).

Los principales constituyentes de los lípidos de la leche son los triglicéridos, que representan el 97 - 98% del total de la grasa. La composición de ácidos grasos de los triglicéridos se ve influenciada, entre otros factores, por la raza, la alimentación y la estación del año, siendo el contenido de ácidos grasos saturados menor en verano que en invierno (Eskin y Goff, 2013; Hill y Kethireddipalli, 2013). Como cabe suponer, en el queso, la grasa está, al igual que en la leche, constituida fundamentalmente por triglicéridos, aunque la proporción de ácidos grasos libres es en este caso muy superior. Esto se debe a los fenómenos de lipólisis que a lo largo del proceso de maduración liberan sobre todo ácidos grasos de cadena corta y media que contribuyen directamente al flavor del queso.

Tabla I.**2.** Ácidos grasos presentes en leche de vaca, cabra y oveja (% en peso de los ácidos grasos totales) (Adaptado de Alonso *et al*., 1999; Scott *et al*., 2002; Goudjil *et al*., 2004)

Ácido graso	**Nombre común**	**Vaca**	**Cabra**	**Oveja**
C4: 0	Butírico	3,1-4,4	2,0-2,4	3,1- 3,9
C6: 0	Caproico	1,8-2,7	2,0-2,7	2,7- 3,4
C8: 0	Caprílico	1,0-1,7	2,3-3,0	2,1- 3,3
C10: 0	Cáprico	2,2-3,8	8,9-11,0	5,5-9,7
C12: 0	Láurico	2,6-4,2	3,9-6,2	3,5-4,9
C14: 0	Mirístico	9,1-11,9	7,7-11,2	9,9-10,7
C14: 1	Miristoleico	0,5-1,1	0,17- 0,2	0,2-0,5
C15: 0	Pentadecílico	0,9-1,4	0,5-0,9	0,9-1,1
C16: 0	Palmítico	23,6-31,4	23,2-34,8	22,5-28,2
C16: 1	Palmitoleico	1,4-2,0	1,0-2,7	0,7-1,3
C18: 0	Esteárico	10,4-14,6	5,8-13,2	8,5-11,0
C18: 1	Oleico	14,9-22,0	17,5-18,4	17,38-18,2
C18: 2	Linoleico	1,2- 1,7	2,5-4,3	2,9-3,6
C18: 2 (CLA)	Linoleico conjugado	0,8-1,5	0,3-1,2	0,6-1,0
C18: 3	α-linolénico	0,9-1,2	0,2-0,9	0,5-1,0

En la **Tabla** I.**2** se muestra el contenido de ácidos grasos presentes en muestras de leche de vaca, cabra y oveja. La presencia de ácidos grasos con sabores y olores pronunciados, (por ejemplo, el ácido butírico), condiciona las características sensoriales finales del queso. La leche de cabra tiene cantidades significativas de los ácidos grasos caproico, caprílico y cáprico, que aportan a los quesos elaborados con esta leche, un flavor picante (similar al de la pimienta). La leche de oveja tiene mayor cantidad de ácido cáprico

que la de vaca, aunque el queso resultante tiene un aroma y un sabor menos intenso que los elaborados con leche de cabra (Scott *et al*., 2002).

I.1.2.2.3. Proteínas: Caseína y séricas

Las proteínas de la leche son una mezcla heterogénea que incluyen dos grupos principales: las caseínas y las proteínas séricas o del suero. Las primeras representan el 80 %, mientras que las segundas constituyen el 20 % del total de las proteínas de la leche (Hill y Kethireddipalli, 2013).

Las caseínas, principales proteínas de la leche, pertenecen a la familia de fosfoproteínas. Se clasifican en cuatro familias: α_{S1}-caseína, α_{S2}-caseína, β-caseína y κ-caseína. En la leche, un 95% de las caseínas forman partículas o micelas, que se encuentran mayoritariamente en dispersión coloidal, aunque una pequeña parte se ubica en la fracción soluble. El contenido de caseínas, el tamaño de las micelas y las proporciones relativas de las diversas caseínas difieren de una especie a otra (Hill y Kethireddipalli, 2013).

La micela de caseína es un complejo orgánico formado por las caseínas α, β y κ unidas a fosfato cálcico coloidal, con un diámetro de aproximadamente 30 a 300 nm. La micela está en suspensión coloidal debido a que la κ-caseína es hidrófila y estable en presencia de iones Ca^{2+}. Como se verá más adelante, durante la elaboración del queso las enzimas que se encuentran en el cuajo provocan la hidrólisis de la κ-caseína y la posterior agregación de las micelas, como génesis de la red proteica que conformará la cuajada.

Las proteínas del suero se consideran el principal co-producto de la industria quesera. Durante bastante tiempo, el suero era un producto de desecho para los fabricantes de queso y de caseínas. Sin embargo, en la actualidad se valora como un alimento funcional, debido a las propiedades bioactivas de sus proteínas. Se trata en un 70 - 80% de β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina, mientras que el resto son fundamentalmente seroalbúmina e inmunoglobulinas (Hill y Kethireddipalli, 2013). Las proteínas del suero están en solución y no forman dispersiones coloidales, como lo hacen las caseínas.

En la producción del queso las proteínas del suero quedan inicialmente atrapadas en la cuajada, pero al ser tan solubles la mayor parte es arrastrada con el suero y solamente un 1% del total queda retenido en la cuajada contribuyendo al cuerpo del queso, donde constituye un reservorio de aminoácidos para el desarrollo del flavor y del aroma.

I.1.2.3. Acidificación

La acidificación de la leche es uno de los primeros pasos en la elaboración de queso. En esta etapa la lactosa se fermenta produciendo ácido láctico. La acidificación puede ser provocada por las bacterias lácticas presentes en la leche cruda o por la adición de cultivos iniciadores o *starter*. Se trata de preparaciones de cultivos puros o mezclas de bacterias lácticas con características adecuadas que se utilizan para inocular un producto crudo o pasteurizado con el fin de iniciar la fermentación (Sandine, 1979). Pueden clasificarse en cultivos de cepa única, formados por una cepa de una determinada especie; cultivos de cepa múltiple, formados por varias cepas conocidas de una especie determinada; cultivos mixtos, constituidos por varias cepas conocidas de distintas especies y cultivos naturales o artesanos, que incluyen numerosas especies y cepas, total o parcialmente desconocidas (Scott *et al*., 2002; Eck, 1989). En cuanto a la temperatura óptima de crecimiento, pueden establecerse dos grupos de microorganismos: los mesófilos y los termófilos, cuyas temperaturas optimas están por debajo y por encima de los 35 ºC, respectivamente. Los cultivos iniciadores mesófilos más comúnmente utilizados en la industria son *Lactococcus lactis subsp. lactis y Lactococcus lactis subsp. cremoris*, mientras que los termófilos son *Streptococcus thermophilus y Lactobacillus helveticus* u otras especies de lactobacilos.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son muy utilizadas en casi todos los tipos de queso y juegan un importante papel a lo largo de todo el proceso de elaboración, desde las etapas iniciales hasta su maduración. El ácido láctico producido por dichas bacterias no sólo es capaz de coagular por sí mismo la leche, sino que también favorece la acción del cuajo en quesos de coagulación mixta. Además las BAL contribuyen significativamente al sabor, la textura, el valor nutritivo y la seguridad microbiológica de los quesos (Caplice y Fitzgerald, 1999; Settanni y Corsetti, 2008; Limsowtin *et al*., 2003; Burgain *et al*., 2014).

Además de las bacterias lácticas, en la producción de los quesos intervienen otros microorganismos que aportan las particularidades que caracterizan los distintos tipos de productos, como diversos mohos, por ejemplo *Penicillium camemberti* (en quesos madurados superficialmente), *Penicillium roqueforti* (en el queso roquefort) y *Penicillium glaucum* (en varios tipos de queso azul). Cabe también citar las bacterias propiónicas, productoras de ácido propiónico y CO_2, responsables de la formación de “ojos” en quesos como el Gruyère y el *Brevibacterium linens*, denominado fermento rojo por el color de sus

colonias y que aporta a la superficie de algunos quesos como Limburger o el Munster (Scott *et al*., 2002).

En conjunto, la acidificación inducida por el cultivo iniciador tiene un papel esencial en múltiples aspectos de la fabricación y maduración de los quesos. En este contexto, cabe destacar su función en la retracción de la cuajada (Cogan *et al*., 1997), la actividad del cuajo, el grado de retención de coagulante en la cuajada así como en la consistencia y en la sinéresis de esta última. Además, afecta al grado de solubilización del fosfato cálcico en la cuajada, modificando la susceptibilidad de las caseínas a la proteólisis, y su consiguiente degradación en péptidos y aminoácidos. Finalmente contribuye a la aparición de distintas propiedades reológicas del queso y a la inhibición de la microbiota ajena al cultivo iniciador, incluyendo patógenos y bacterias productoras de gas (Chamba *et al*., 1994). De forma global, puede decirse que las propiedades químicas y el pH final de la cuajada varían dependiendo del cultivo iniciador utilizado y del proceso seguido para la obtención de las distintas variedades de queso (Fox *et al*., 1990; Merrill *et al*., 1994; Metzger *et al*., 2001).

I.1.2.4. Coagulación

Un paso básico en la elaboración de cualquier tipo de queso es la coagulación de las caseínas de la leche, dando como resultado la formación de un gel que engloba la grasa presente en la misma. Existen dos tipos básicos de coagulación: ácida o láctica y enzimática.

La coagulación láctica se lleva a cabo bien añadiendo un cultivo iniciador o por medio de las bacterias lácticas presentes en la leche cruda. Las bacterias actúan sobre la lactosa y la transforman en ácido láctico, lo que provoca un descenso del pH. Este hecho, origina una migración del calcio y el fósforo hacia la fase acuosa, produciendo una desmineralización de las caseínas. Dado el importante papel del calcio y el fósforo en la estructura de las micelas, el desplazamiento de estos minerales provoca la desestabilización de las micelas de caseína y la consiguiente precipitación de las mismas.

La coagulación enzimática se basa en el empleo de enzimas proteolíticas (coagulantes) de origen animal, vegetal o microbioano capaces de coagular las caseínas de la leche. En la coagulación enzimática se pueden distinguir dos fases: la primaria y la segundaria. En la primera, o fase enzimática, la actividad enzimática afecta específicamente al enlace fenilalanina-metionina (Phe_{105}-Met_{106}) de la κ-caseína

produciéndose dos segmentos: el llamado para-κ-caseina (κ-caseína f1-105) y el caseinomacropéptido (κ-caseína f106-169). Esta hidrólisis se realiza a gran velocidad y puede producirse en condiciones amplias de temperatura y de pH. La para-κ-caseína permanece unido a la micela y tiene una naturaleza hidrófoba, mientras que el caseinomacropéptido posee un marcado carácter hidrófilo, por tener un triplete de azúcares ácidos y fósforo. Este último segmento, al separarse de las caseínas, y por tanto de la micela, pasa a la fase hídrica y se pierde en el suero.

La fase secundaria, también denominaría de agregación o de coagulación, empieza cuando el nivel de hidrólisis de la κ-caseína alcanza un 85 - 90% (Ordóñez *et al*., 1998). En esta etapa, se produce la desestabilización del segmento hidrofóbico para-κ-caseína restante (κ-caseína f1-105), causando la agregación de las caseínas. Esta fase más termodependiente que la primera y no se manifiesta a temperaturas inferiores a 15 ºC (Dalgleish, 1993; Fox y Stepaniak, 1993). La agregación de las micelas desestabilizadas y la sucesiva formación del gel es en parte debida a las fuerzas de Van der Waals, pero esta atracción resulta insuficiente. Se requiere la presencia de una concentración crítica de iones de calcio (superior a 80 mg/l). Estos iones producen la neutralización de las cargas negativas superficiales de la micela y la formación de puentes entre cargas negativas. El equilibrio entre los iones de calcio y el fosfato coloidal resulta determinante en la fase de formación del retículo caseínico. La disminución del pH incrementa considerablemente la actividad del calcio, ya que a pH más bajo el equilibrio se desplaza proporcionando más calcio iónico (Dalgleish, 1993; Fox y Stepaniak, 1993; Romero del Castillo y Mestres, 2004). En presencia de suficiente calcio, las micelas modificadas comienzan a unirse unas con otras en largas cadenas ramificadas, para dar lugar a una estructura tridimensional que caracteriza a la cuajada (Horne y Banks, 2004; Osintsev y Qvist., 2004).

La coagulación enzimática de la leche es la más empleada en la mayoría de las variedades de queso, aunque lo que habitualmente se realiza es una coagulación mixta, donde se usan cultivos iniciadores, comenzando una coagulación láctica y luego se agregan enzimas, para proseguir con una coagulación enzimática. Siempre suele existir un predominio, más o menos acusado, de uno de estos dos métodos de coagulación según la variedad de queso, lo cual al final determina las características de la cuajada obtenida.

La actividad proteolítica de los distintos coagulantes varía dependiendo de las condiciones del medio, y sobre todo se modifica por el pH y la temperatura, con valores óptimos entre 5,5 y 42 ºC, respectivamente. Por encima y por debajo de estos valores la

actividad enzimática disminuye drásticamente. Sin embargo, en la industria quesera, las condiciones se encuentran más o menos alejadas de los óptimos mencionados, con el fin de controlar los tiempos de coagulación y mantener las condiciones adecuadas para el crecimiento de la microbiota láctica.

Tabla I.3. Diversos coagulantes comerciales utilizados en la elaboración de quesos (Addis *et al*., 2008)

Tipo de cuajo	Enzima	Nomenclatura IUB	Denominación comercial	Origen
Animal (líquido)	Quimosina Pepsina A Gastricina	EC 3.4.23.4 EC 3.4.23.1 EC 3.4.23.3	Renina Pepsina II Pepsina I	Rumiante
Animal (polvo)	Quimosina Pepsina A Gastricina	EC 3.4.23.4 EC 3.4.23.1 EC 3.4.23.3	Renina Pepsina II Pepsina I	Rumiante
Animal (pastilla)	Quimosina Pepsina A Gastricina	EC 3.4.23.4 EC 3.4.23.1 EC 3.4.23.3	Renina Pepsina II Pepsina I	Rumiante
Animal	Pepsina A	EC 3.4.23.1	Pepsina II	Cerdo, pollo
Microbiano	Proteasa de *M. Miehei*	EC3.4.23.6	Rennilase (Novo) Hanilase (Chr. Hansen) Fromase (Wallerstein) Marzyme (Miles Emporase (Daityland) Meito (Meito Sangyo) Noury (Vitex)	*Mucor Miehei*
	Proteasa de *M. Pusillus*	EC 3.4.23.6		*Mucor pusillus Var.Lindt*
Recombinante	Proteasa de *E. parasítica*		Suparen cuajada Sure (Pfizer)	*Endothia parasítica*
	Quimosina	Variante genética A	Chy-Max (Pfizer)	*Escherichia coli K12*
	Quimosina	Variante genética B	Chymogen (Chr. Hansen)	*Aspergillus niger Var. Awamori*

IUB: International Unión of Biochemistry

Tradicionalmente se han utilizado coagulantes de origen animal, pero debido al fuerte incremento de la producción mundial de queso comenzaron a emplearse otras

fuentes de coagulación que incluyen enzimas vegetales, microbianas y recombinantes (Fox y McSweeney, 1997; Hayaloglu *et al*., 2002; Hayaloglu *et al*., 2014). En la actualidad, se comercializan distintos tipos de enzimas coagulantes (**Tabla** I.**3**) ya sea como preparados líquidos, en polvo o en pastilla (Addis *et al*., 2008).

I.1.2.4.1. Enzimas coagulantes de origen animal

El término "cuajo" se utiliza para referirse al extracto coagulante procedente del estómago (abomaso) de los animales rumiantes jóvenes sacrificados antes del destete. El cuajo bovino es el más utilizado de forma tradicional en las queserías para la coagulación de la leche. Contiene fundamentalmente dos fracciones activas: una mayoritaria, constituida por la quimosina (88 - 94%) y otra minoritaria, correspondiente a la pepsina (6 - 12%) (Scott *et al*., 2002). La secreción de la quimosina se interrumpe en el momento del destete, cuando los rumiantes comienzan a pastar, cambiando la dieta alimentaria. Sin embargo, a partir de ese momento, la secreción de pepsina se incrementa hasta representar un 90 - 94%, siendo la enzima predominante en los mamíferos adultos (Crabbe, 2004).

Además del cuajo, otras proteasas de origen animal han sido objeto de estudio en vista a su posible utilización en la industria quesera. En esta línea, pepsinas de origen porcino, bovino y otras especies de abasto han demostrado elevado potencial; por ejemplo las enzimas obtenidas de pollo se han utilizado con éxito en Israel para hacer queso (Alais, 1985). Estas proteasas tienen un carácter más ácido que la quimosina, por lo que son muy activas en medios ácidos. Sin embargo, su acción disminuye a pH superiores a 6,3 y se inactivan cuando la temperatura se eleva por encima de 44 ºC. No obstante, el empleo de pepsinas requiere tiempo de coagulación y maduración mayores que los obtenidos con el uso de cuajo. Por otra parte, generan proteólisis inespecífica, liberándose péptidos amargos, y disminución del rendimiento, por lo cual su utilización se limita a quesos de pasta blanda y pasta prensada no cocida (Eck, 1990; Scott, *et al*., 2002).

I.1.2.4.2. Enzimas coagulantes de origen vegetal

En la elaboración de algunos quesos se utilizan proteasas de origen vegetal de distintas fuentes (Shah *et al*., 2014), como hojas o ramas de higuera, frutas (como el kiwi o el melón), raíces (como el jengibre) y flores, como las cardosinas o cinarasas extraídas del cardo (*Cynara cardunculus*). Quesos producidos con coagulante vegetal se encuentran principalmente en países de la cuenca mediterránea, del sur de Europa y del África

Occidental (Roseiro *et al*., 2003). Los extractos acuosos de las flores secas de los cardos silvestres (*Cynara cardunculus* L.) se emplean para producir diversas variedades de quesos portugueses, como Serra y Serpa (Pino *et al*., 2009) y franceses e italianos (Sanjuán *et al*., 2002). En España, se elaboran quesos de leche de oveja, como el de los Pedroches, la Serena, la Torta del Casar y la Flor de Guía, y de cabra, como el queso Ibores (Sanjuán *et al*., 2002). Las cardosinas de las flores de cardo son proteinasas aspárticas que, al igual que la quimosina, hidrolizan el enlace Phe_{105}-Met_{106} de la k-caseína (Roseiro *et* al., 2003).

Las enzimas proteolíticas extraídas de diversas plantas, como *Lactuca sativa* (Lo Piero y Petrone, 1999; Lo Piero *et al*., 2002), *Solanum elaeagnifolium* (Gutiérrez-Méndez *et al*., 2012) y *Streblus asper* (Tripathi *et al*., 2011) pueden utilizarse para la elaboración de quesos, especialmente para colectivos sociales en los que el uso de cuajo animal está limitado por razones religiosas (por ejemplo, en el Judaísmo y el Islam), sociales (vegetarianismo), o para grupos con restricciones para los alimentos genéticamente modificados (por ejemplo, en Alemania, Países Bajos y Francia para el uso de cuajo de ternera recombinante).

I.1.2.4.3. Enzimas coagulantes de origen microbiano

Las enzimas coagulantes obtenidas de algunos microorganismos, como *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus* y *Cryphonectria parasitica*, presentan una acción proteolítica similar a la quimosina o a la pepsina durante la elaboración del queso. No obstante, difieren en la especificidad hacia las caseínas, en la estabilidad térmica y en la tasa residual en la masa de queso durante el drenaje del suero (Fox, 2000). Por ejemplo, la actividad proteolítica de la proteasa producida por *R. miehei* es mayor que la de cuajo de ternera. Este último, actúa principalmente sobre la α_{S1}-caseína, mientras que la proteasa *R. miehei* hidroliza la α_{S1}-caseína y β-caseína en un nivel similar (Awad *et al*., 1998). Las enzimas de origen microbiano son especialmente responsables de la proteólisis inicial y ocasionan ablandamiento del queso por hidrólisis de la α_{S1}-caseína (Creamer y Olson, 1982).

La actividad proteolítica de las enzimas utilizadas en la fabricación del queso está estrictamente relacionada con el pH, la humedad y la temperatura de la cuajada. Aunque la mayor parte de las enzimas coagulantes se pierden con el suero, la parte que queda retenido en la cuajada continúa con su actividad y puede hidrolizar la β-caseína y la α_{s1}-caseína. La α_{s2}-caseína y la para-κ-caseína parecen ser resistente a la acción de la quimiosina a pesar de tener enlaces adecuados para su actividad.

I.1.2.4.4. Enzimas coagulantes de origen recombinante

Actualmente, con el diseño de técnicas de transferencia de genes, se consigue transferir la proquimosina de la mucosa del abomaso de ternero a una gama de microorganismos huéspedes, por ejemplo *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus niger*. El gen también ha sido sintetizado e insertado en *Escherichia coli* para la producción comercial de quimosina (McCaman *et al*., 1985). La estructura de la quimosina recombinante es virtualmente idéntica a la quimosina natural. Además, los quesos elaborados con ambos cuajos (recombinante y natural) presentan características muy similares (Fox y McSweeney, 1997).

En general, los coagulantes fabricados industrialmente (quimosina, pepsinas y gastricina relativamente puros) son los más utilizados en la industria quesera. El cuajo animal, obtenido directamente del procesado del estómago, se utiliza en la elaboración tradicional. Los quesos producidos con este cuajo artesanal presentan características distintas a los obtenidos con coagulantes industriales, debido, entre otros factores, a que además de presentar actividad proteolítica, el cuajo natural presenta enzimas lipolíticas que contribuyen al desarrollo de atributos sensoriales particulares (Moschopoulou, 2011). Esto hace que los quesos tradicionales desarrollen sabores intensos, descrito por muchos consumidores como picante, y un perfil aromático complejo.

I.1.2.5. Corte y sinéresis de la cuajada

Una vez formado el gel se procede al corte, utilizando liras (cuchillas de acero con múltiples hojas que pueden variar de tamaño entre 6 - 18 mm) (Scott *et al*., 2002). Ya cortada la cuajada en trozos comienza la expulsión rápida del suero y en muchos casos se realiza un recalentamiento de la cuajada para favorecer la expulsión del suero del coágulo.

La expulsión del suero del coágulo se conoce como sinéresis y es causada por la contracción espontánea de la cuajada debido a la reorganización de enlaces entre los agregados de proteínas (Unger *et al*., 2000; Ako, 2015). La sinéresis puede ocurrir espontáneamente, pero también se acelera por la presión externa sobre la cuajada (Dejmek y Walstra, 2004). La sinéresis puede verse afectada por factores indirectos, como el pretratamiento de la leche, condiciones de coagulación, propiedades reológicas del gel y microestruturales (Marshall, 1982; Lucey, 2001; Walstra *et al*., 2001), y por factores directos, como las condiciones de corte, por ejemplo tiempo, temperatura, agitación,

tamaño del corte de las partículas de la cuajada (Everard *et al*., 2009) y por la salazón de la cuajada (Lu y McMahon 2015).

I.1.2.6. Moldeado y prensado

El moldeado se realiza para dar forma al queso y ayuda a que los gránulos de cuajada se aglomeren. Existen distintos tipos y formas de moldes (redondos, cuadrados, cilíndricos o alargados).

El prensado tiene como finalidad endurecer la masa de queso e intensificar la eliminación de suero. Generalmente, el moldeado y el prensado se ejecutan utilizando el mismo equipo, dado que los moldes tienen dispositivos que permiten la aplicación de presión sobre el queso. La presión que se ejerce y el tiempo de aplicación dependen del tipo de queso. En la elaboración de quesos blandos o semiblandos no es necesario aplicar presión ya que es suficiente con la que provoca el propio peso del queso (autoprensado). Cuando se elaboran quesos de mayor consistencia suelen utilizarse prensas neumáticas. La presión aplicada debe ser suficiente como para logar la compactación y endurecimiento de la masa de queso pero no excesiva para evitar la rotura de los gránulos de la cuajada y la pérdida de grasa.

I.1.2.7. Salado

El salado o salazón es una operación del proceso de elaboración del queso con importante repercusión en la calidad sensorial y en la estabilidad del producto obtenido debido a las funciones del NaCl. En primer lugar, contribuye al desarrollo de las propiedades sensoriales, sobre todo del sabor, la textura y el color. El contenido de NaCl influye en la maduración del queso, debido a que ayuda al desuerado favoreciendo el drenaje de la fase acuosa libre. Además, la presencia de sal, modifica la hidratación de las proteínas y contribuye a la formación de la corteza del queso. El salado, de forma directa o a través de la reducción de la actividad de agua (Guinee y Fox, 2004; Santapaola *et al*., 2013), regula el desarrollo de microorganismos (tanto de las bacterias del cultivo iniciador como de las presentes en la leche) y la actividad enzimática (del coagulante y de las endógenas). Skeie *et al*. (1997) estudiaron las características del queso con distintos niveles de sal y observaron que los quesos con bajo contenido en NaCl presentaban menor porcentaje de materia seca, pH más alto, mayor grado de proteólisis, niveles más altos de los ácidos glutámico, pirúvico y úrico, así como menor firmeza y sabores amargos. Estas

características se han atribuido a que los niveles altos de sal pueden producir un efecto inhibidor sobre la proteólisis y la degradación de la lactosa (Upreti *et al*., 2006).

La etapa de salazón suele ser el último paso en la fabricación del queso y se puede realizar de varias formas: con sal cristalizada o salazón seca, en salmuera o salazón húmeda y salazón mixta.

La salazón con sal seca consiste en distribuir la sal por ambas caras del queso, de la manera más uniforme posible, tras el moldeado (por ejemplo, quesos azules madurados por mohos, como Gruyère de Comté, etc.). El salado por este método puede durar desde varias horas (10 - 24 h) hasta varios meses, volteándose las piezas diariamente para logar una mejor distribución de la sal. La salazón por salmuera consiste en la inmersión de la cuajada, una vez moldeada y prensada, en una salmuera. La concentración de NaCl debe oscilar entre el 14 y el 16 % (p/p) para quesos blandos y entre el 18 y el 22% (p/p) para quesos duros (por ejemplo, queso Manchego). La salazón mixta puede realizarse de varias formas. En algunos casos primero se utiliza una salmuera (por ejemplo durante 24 horas) y posteriormente las piezas se envuelven totalmente con sal seca (por ejemplo, en diversos quesos duros y semiduros tradicionales). En algunos tipos de queso, la sal seca se mezcla con la cuajada antes del moldeado o prensado (por ejemplo, quesos tipo Cheddar).

I.1.2.8. Maduración

Durante la maduración ocurren una serie de cambios en la cuajada que conducen al desarrollo de las propiedades sensoriales que caracterizan cada tipo de queso. En las transformaciones o cambios de los componentes de la cuajada intervienen los microorganismos presentes, y se encuentran implicadas múltiples reacciones químicas enzimáticas y no enzimáticas así como cambios físicos que dan lugar a una determinada textura, así como al desarrollo de diversos aromas y sabores. La bioquímica de la maduración del queso se analiza brevemente en el siguiente apartado.

I.1.3. Bioquímica de la maduración del queso

La maduración del queso es un proceso de transformaciones complejas que incluye tres procesos principales: la glucólisis, la lipólisis y la proteólisis. La importancia de estos procesos depende de la variedad de queso.

I.1.3.1. Glucólisis

La glucólisis es la transformación de la lactosa en ácido láctico (principalmente el isómero L) por acción de las bacterias lácticas presentes en el queso, ya sean del cultivo iniciador o por bacterias presentes en la leche. Como se ha mencionado, la producción de ácido láctico favorece la coagulación de la leche, inhibe el crecimiento de la microbiota patógena y estabiliza la cuajada favoreciendo el drenaje del suero (Cogan y Daly, 1987). El descenso de pH asociado a la producción de ácido láctico tiene gran influencia en la textura debido a la desmineralización de la micela de caseína. Por otra parte, condiciona la proteolísis dado que la miscela de caseína desmineralizada es más susceptible y además, a pH bajo la cuajada retiene más quimiosina. La glucólisis empieza en la fermentación, sigue en la coagulación, la sinéresis y continúa en la maduración, con una intensidad variable según el tipo de queso. La mayor parte de la lactosa (≈ 98%) se pierde en el desuerado del queso en forma de lactosa o de ácido láctico (Huffman y Kristoffersen, 1984). Sin embargo, la cuajada al final puede retener un 0,7 -1,5% de lactosa residual (Fox, 2000). Esta lactosa se metaboliza generalmente por las bacterias del cultivo iniciador.

I.1.3.1.1. El metabolismo de la lactosa

El metabolismo de la lactosa depende del cultivo iniciador. La lactosa puede metabolizarse mediante la fermentación homoláctica, por bacterias homofermentativas como *Streptococcus* (*S. mutans, S. thermophilus*), *Enterococcus* (*E. faecalis*), *Lactococcus* (*Lc. lactis subsp. lactis*), *Pediococcus* (*P. pentosaceus, P. halophilus*) y *Lactobacillus homofermentativos* (*Lb. casei, Lb. plantarum*) o mediante una fermentación heteroláctica, por bacterias heterofermentativas como *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides, Ln. dextranicum, Ln. cremoris*) y ciertos *Lactobacillus* (*Lb. brevis, Lb. fermentum*) (Larpent, 1995; Hill y Kethireddipalli, 2013).

En la fermentación homoláctica, la lactosa se separa en sus dos monosacáridos que siguen diferentes rutas metabólicas. Por una parte, la galactosa es metabolizada por la vía de la tagatosa, mientras que la glucosa sigue la ruta glicolítica o vía de Embden-Meyerhof-Parnas, para finalmente obtenerse exclusivamente ácido láctico (**Figura** I.**1**).

En la fermentación heteroláctica la lactosa también se separa en sus dos monosacáridos, glucosa y galactosa, a partir de los cuales se obtienen ácido láctico, etanol, CO_2 y acetato (Larpent, 1995; Marshall y Tamime, 1997), tras seguir distintas rutas metabólicas. La galactosa sigue la ruta de Leloir y la glucosa la ruta de la pentosa fosfato.

La degradación de lactosa es muy intensa al inicio de la maduración y va descendiendo gradualmente durante ella, lo que se debe a la actividad de las bacterias lácticas. En general, el ácido láctico producido influye en el sabor, el aroma y la textura del queso, especialmente en aquellos de coagulación ácida (Settanni y Moschetti, 2010). El etanol también puede contribuir directamente al sabor y al aroma del queso. Este alcohol puede además participar en la formación de ésteres con ácidos grasos (Fox *et al.*, 1990; Hill y Kethireddipalli, 2013).

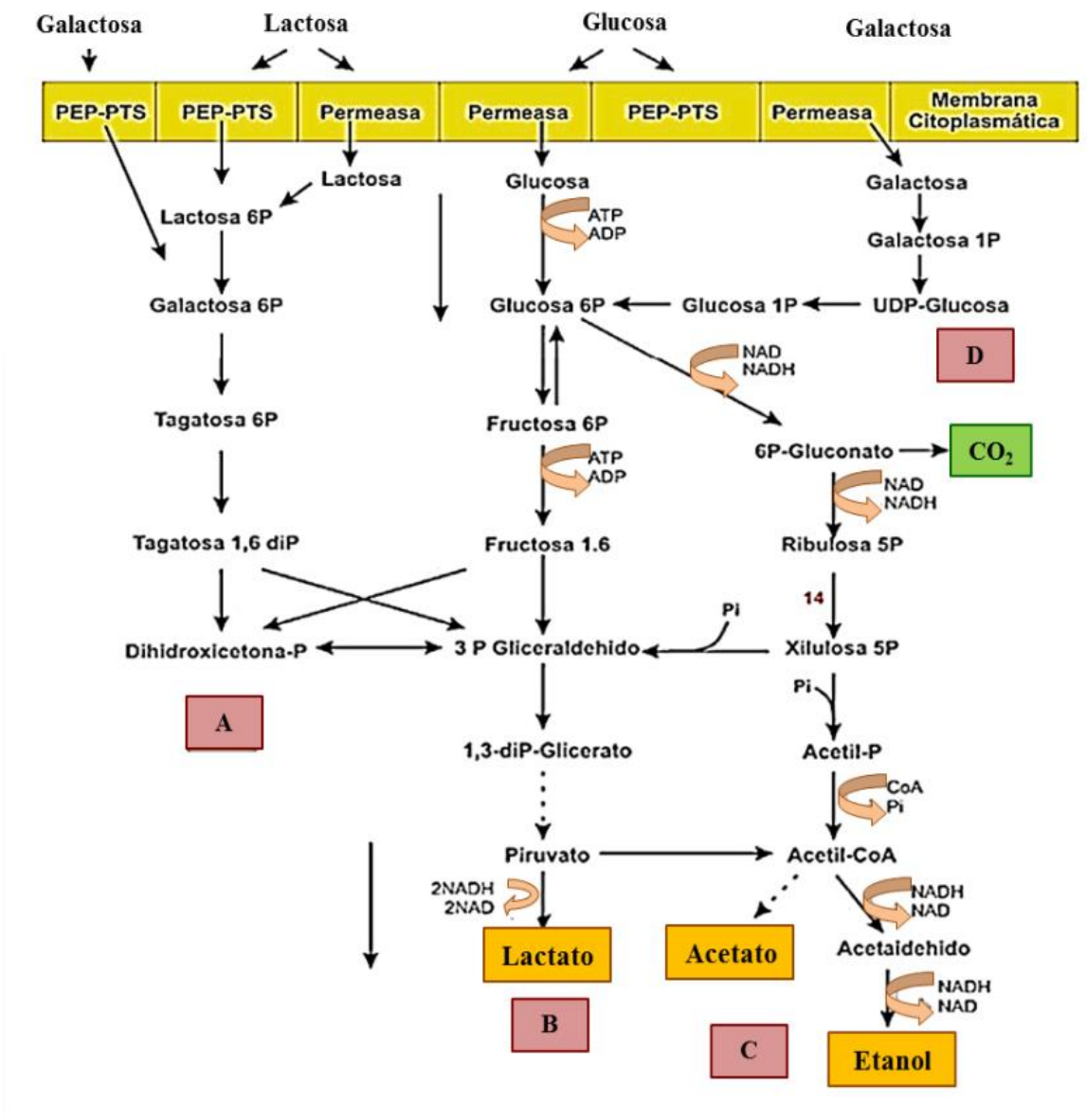


Figura I.**1.** Principales vías de transporte y metabolismo de los azúcares utilizados por bacterias lácticas. (A) Ruta de la tagatosa-6-fosfato. (B) Ruta glicolítica o vía de Embden-Meyerhof-Parnas. (C) Ruta del 6 fosfogluconato/fosfocetolasa. (D) Ruta de Leloir. (Adaptado de Nieto 2010)

I.1.3.1.2. Metabolismo del lactato

Dependiendo de la variedad de queso y de los microorganismos presentes, el ácido láctico formado puede metabolizarse a varios compuestos por diferentes vías (**Figura** I.**2**), las cuales favorecen al aroma típico de los quesos de cuajada ácida y probablemente al de las variedades de quesos madurados (McSweeney y Sousa, 2000). El lactato estar en forma de L-lactato, D-lactato o la mezcla racémica de ambos (Scott *et al*., 2002). Así las especies de *Leuconostoc* y *Lb. delbrueckii* producen sólo el isómero D-lactato, las especies de *Lactococcus* y *S. thermophilus* la forma L- lactato y los de *Lb. helveticus* producen una mezcla de ambos, al poseer las lactatodeshidrogenasas específicas para cada isómero.

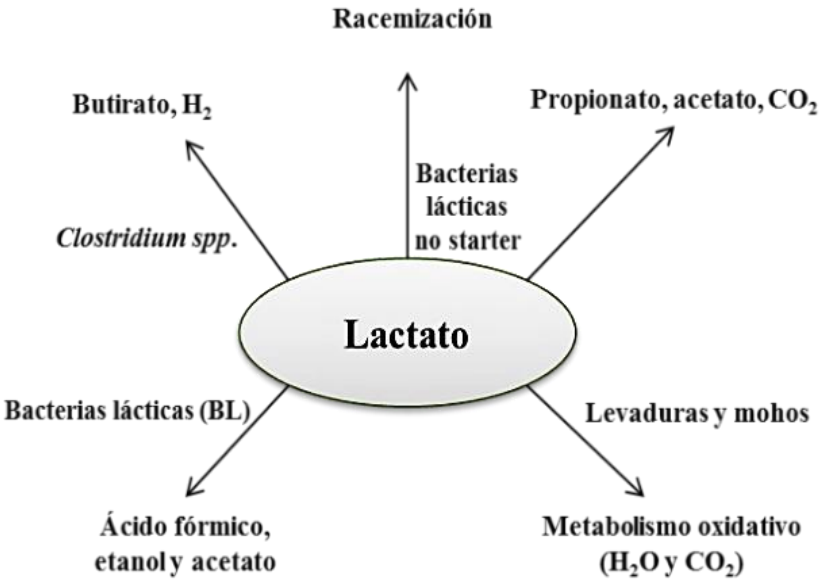


Figura I.**2.** Vías generales del metabolismo del lactato en el queso
(Adaptado de McSweeney y Sousa, 2000)

En los quesos de tipo suizo (Emmental), las bacterias de los cultivos iniciadores metabolizan completamente los azúcares fermentables en aproximadamente dos semanas. El cultivo iniciador secundario (bacterias propiónicas) crece rápidamente cuando se transfiere a una cámara templada (22 ºC) y metaboliza el lactato a propionato, acetato y dióxido de carbono (CO_2). La generación de este último es responsable de la formación de ojos, lo cual es característico de este tipo de queso, mientras que el acetato y, particularmente, el propionato contribuye a su aroma y sabor (McSweeney, 2004; Eck, 1990). La producción de gas y aromas desagradables en ciertos quesos duros se debe al metabolismos del lactato por *Clostridium spp*., que da lugar a la formación de ácido butírico, CO_2 e hidrógeno. Este defecto se puede evitar a través de una buena higiene y por

la eliminación de las esporas por bactofugación o microfiltración, aumento de los niveles de NaCl en el queso y con temperaturas de maduración más bajas (McSweeney, 2007).

I.1.3.1.3. Metabolismo del citrato

En la elaboración de quesos, la mayoría (≈ 94%) del ácido cítrico de la leche es soluble y se pierde en el suero (Hill y Kethireddipalli., 2013). El comportamiento de las bacterias lácticas puede diferir de una especie a otra, y no todas pueden metabolizar el citrato. Microorganismos como *L. lactis subsp.* subsp. *diacetylactis* y especies de *Leuconostoc* metabolizan el citrato a compuestos como el diacetilo y el CO_2 (**Figura** I.**3**) (Fox *et al*., 1990). El diacetilo contribuye al aroma y al sabor de los quesos y de muchos tipos de leches fermentadas. Debido a la producción de CO_2, el metabolismo del citrato está vinculado a la formación de los ojos característicos de los quesos holandeses y tambien a la textura abierta indeseable y a los defectos de flotación de la cuajada en los quesos Cheddar y Cottage, respectivamente (McSweeney y Fox, 2004; Hill y Kethireddipalli., 2013).

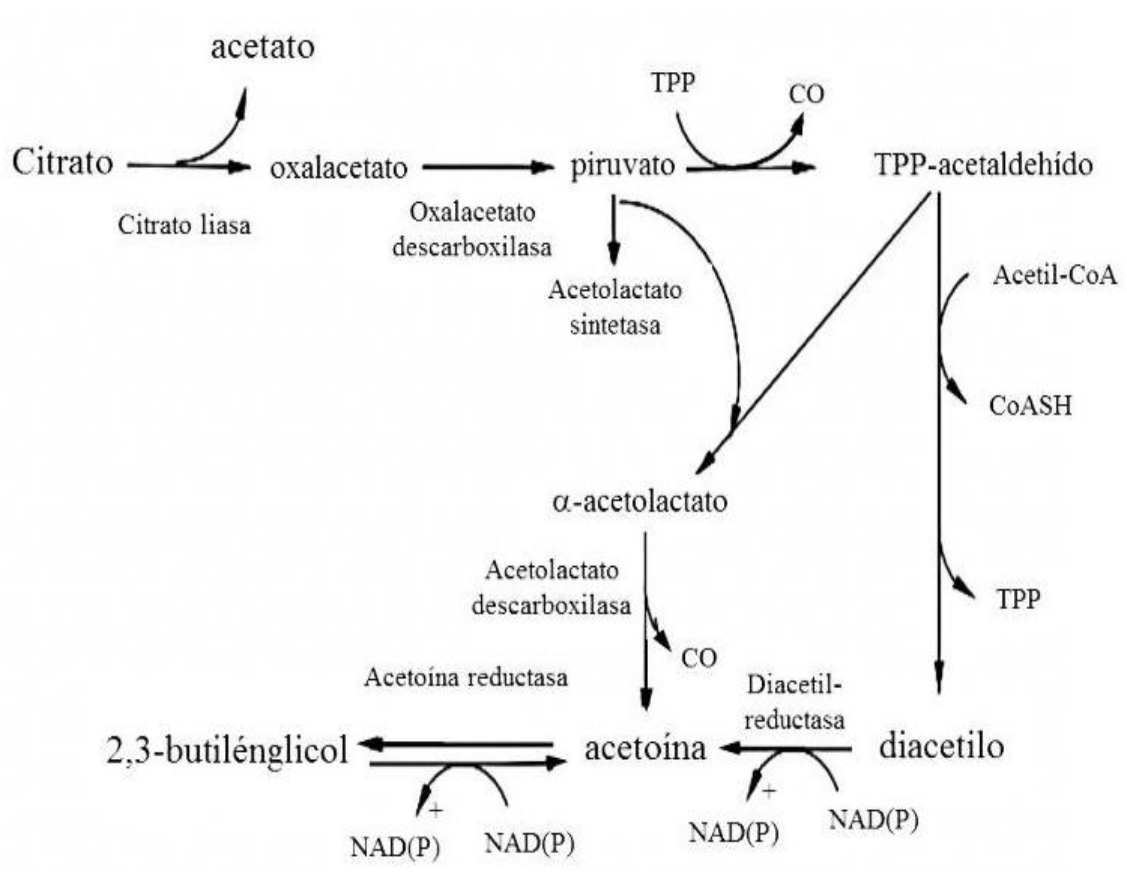


Figura I.**3**. Ruta del metabolismo del citrato en *Lactococcus lactis subsp*. *diacetylactis* y en *Leuconostoc* (Fox *et al*., 1990

I.1.3.2. Lipolisis y catabolismo de los ácidos grasos

La grasa de la leche es un componente esencial para el desarrollo del sabor y del aroma, así como para aportar las características reológicas y de textura y en conjunto para definir la calidad global de los quesos elaborados (Hill y Kethireddipalli., 2013). Como se mencionó en puntos anteriores, los principales lípidos del queso son los triglicéridos. La lipolisis consiste en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos dando lugar a ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos. Como es sabido, la grasa de la leche contiene altos niveles de ácidos grasos de cadena corta e intermedia, que cuando son liberados mediante la lipolisis contribuyen directamente al flavor del queso (McSweeny y Sousa, 2000). Por tal motivo, los quesos que se elaboran con leche desnatada no desarrollan un sabor apropiado; lo mismo ocurre cuando la grasa ha sido sustituida por otros constituyentes (Wijesundera *et al*., 1998).

Los lípidos en todos los alimentos pueden sufrir oxidación o degradación hidrolítica (McSweeney, 2004). No obstante, la oxidación de los lípidos no ocurre de manera significativa en los quesos, probablemente debido a su bajo potencial redox (Fox, 2000) y a la presencia en ellos de antioxidantes naturales (por ejemplo, la vitamina E), por lo que la contribución de esta vía de degradación al flavor del queso no es importante (Fox y McSweeny, 1998). Sin embargo, la hidrólisis enzimática de los triglicéridos es esencial (Fox, 2000; McSweeny y Sousa, 2000). En ella participan las enzimas lipolíticas, esterasas y lipasas, procedentes de la leche, el cuajo, del cultivo iniciador o de las bacterias propias de la leche (Fox y Wallace, 1997; Collins *et al*., 2004). La participación de las distintas enzimas depende de la variedad de queso (McSweeny y Sousa, 2000). Muchas de las bacterias lácticas, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus* spp., son en general consideradas débilmente lipolíticas en comparación con otras bacterias como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Fox y Stepaniak 1993). Sin embargo, debido a la elevada presencia de las bacterias lácticas en el queso a lo largo de su maduración, se considera que son responsables de la liberación de niveles significativos de ácidos grasos libres. De estos últimos derivan compuestos, como metilcetonas, lactonas, esteres, alcanos y alcoholes secundarios (**Figura** I.**4**), con un elevado potencial aromático y sápido (McSweeny y Sousa, 2000; McSweeny, 2004).

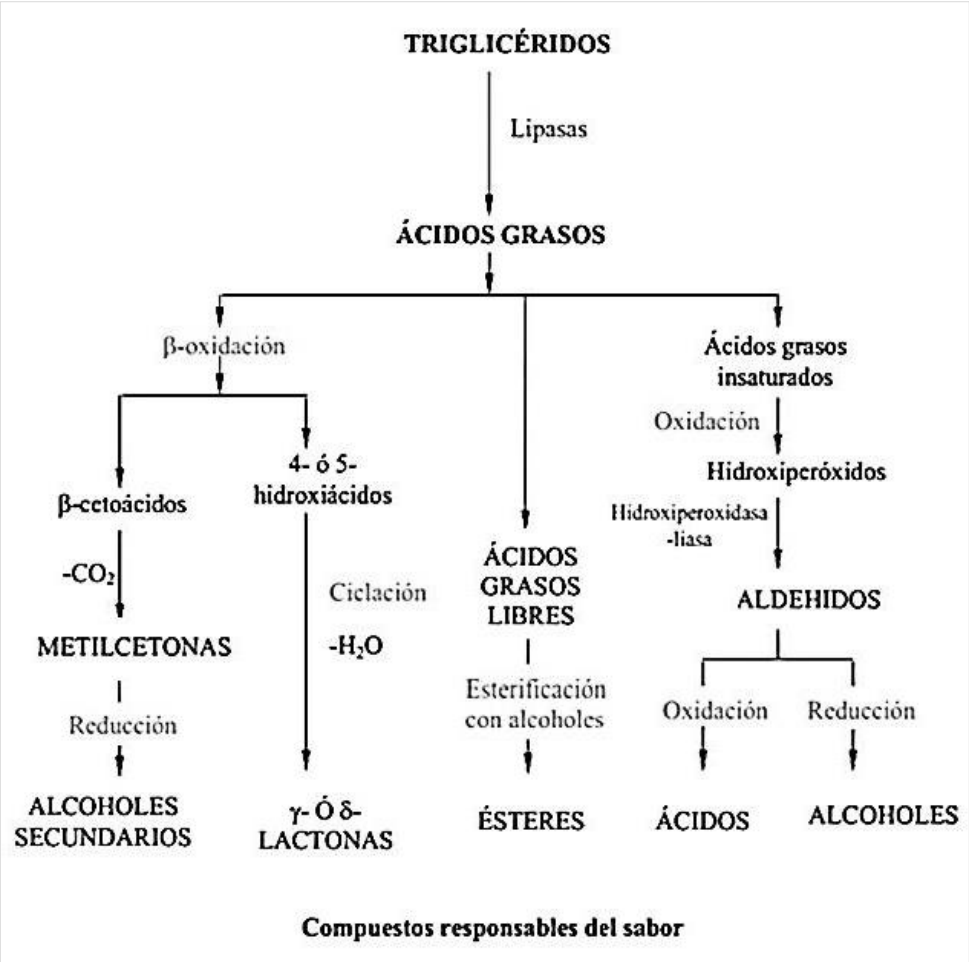


Figura I.**4.** Rutas generales del catabolismo de los ácidos grasos en el queso.
(Adaptado de Dumont y Adda, 1978)

I.1.3.3. Proteólisis

La proteólisis es el evento bioquímico más complejo que se produce durante la maduración y el más importante para el desarrollo de los atributos de textura y del sabor característicos de la mayoría de las variedades de queso (Juan *et al*., 2007). La velocidad y la extensión de la proteólisis están condicionadas por los tipos de enzimas proteolíticas presentes en la cuajada, que pueden proceder de la leche, del coagulante residual y de los microorganismos tanto del cultivo iniciador y como presentes en la leche (Hill y Kethireddipalli., 2013). En algunos casos, se añaden además enzimas exógenas para acelerar la proteólisis. Otros factores a considerar son la composición química (especialmente contenido de sal y humedad), el pH y en conjunto los factores que condicionan la accesibilidad de los diversos sitios de escisión de las caseínas (Wilkinson y Kilcawley, 2005).

Las proteínas del queso, por efecto de la proteólisis, son degradadas a productos primarios, polipéptidos y posteriormente a secundarios, como péptidos de medio y pequeño tamaño y finalmente a aminoácidos libres. En estos hechos participa una amplia gama de enzimas (proteasas y peptidasas), que contribuyen así al desarrollo de la textura y sabor (Hill y Kethireddipalli., 2013).

I.1.3.3.1. Catabolismo de los aminoácidos

Los aminoácidos son los productos finales de la proteólisis y junto con los pequeños péptidos, contribuyen directamente al sabor y aroma del queso. Los aminoácidos pueden ser dulces (serina, glicina, alanina, prolina, treonina), ácidos (histidina, acido glutámico, ácido aspártico) o amargos (arginina, metionina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina, triptófano) (McSweeney y Fox, 2004; Hill y Kethireddipalli, 2013). La aceleración de la proteólisis no necesariamente acelera el desarrollo del sabor (McSweeney y Fox, 2004; Upadhyay y McSweeney, 2003; McSweeney, 2004). Los aminoácidos en principio sirven como precursores para una serie compleja de reacciones que producen una amplia gama de sabores sápidos y compuestos aromáticos, tales como aminas, ácidos, carbonilos, amoníaco, y compuestos azufrados.

El catabolismo de los aminoácidos, que se resume en la **Figura** I.**5**, ha sido analizado por diversos autores (McSweeney, 2004; McSweeney y Sousa, 2000; Curtin y McSweeney, 2004) y se han considerado dos vías principales de desarrollo. En la primera, se encuentran implicadas reacciones de descarboxilación, desaminación, transaminación e hidrólisis de los aminoácidos. La segunda se inicia con la transformación de los compuestos resultantes de la primera vía, así como de los mismos aminoácidos, para dar lugar a aldehídos. Estos compuestos derivan fundamentalmente de la acción de las desaminasas sobre las aminas. El catabolismo de los aminoácidos concluye con la reducción de los aldehídos a alcoholes, o su oxidación a ácidos. En el caso de los aminoácidos azufrados, las vías de transformación pueden dar lugar a la formación de diversos compuestos, como metanotiol y otros derivados azufrados.

La concentración de aminoácidos libres, como resultado neto de la proteolísis, depende de la variedad de queso y ha sido utilizada como índice de maduración de los quesos, puesto que, en general, se incrementa con la progresión de ésta, con la sola excepción de la arginina, la cual disminuye en estados avanzados de maduración (Puchades *et al*., 1989).

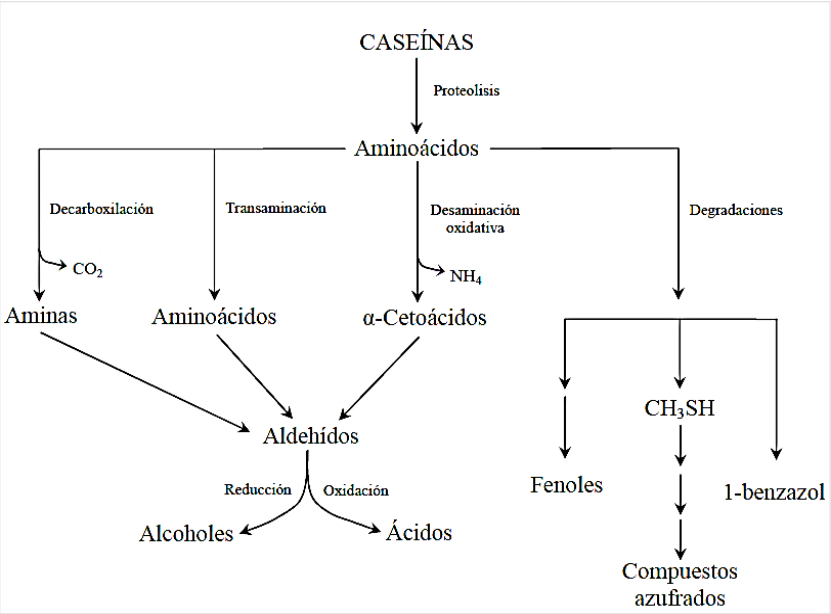


Figura I.5. Rutas generales del catabolismo de los aminoácidos (McSweeney y Sousa, 2000).

I.1.4. Aspectos nutricionales del queso

El queso es un lácteo nutritivo y versátil. En relación con su valor calórico, contiene una alta concentración de nutrientes esenciales. La composición nutricional varía dependiendo del tipo de leche utilizada, el modo de fabricación y, en menor medida, del grado de maduración. Su consumo se ha asociado a un incremento del riesgo de padecer ciertas enfermedades, como aterosclerosis, así como a la prevención de otras, como diversos tipos de cáncer, la hipertensión y la osteoporosis (O'Brien y O'Connor, 2004). La Tabla I.**4** muestra la composición de algunos de los quesos más conocidos y consumidos. Como puede observarse, el contenido de proteína oscila entre el 9 y el 40 %, dependiendo del tipo de queso. La digestibilidad de este componente es casi del 100%, a este hecho contribuye la progresiva proteolisis de las caseínas durante la maduración de los quesos (O'Brien y O'Connor, 2004).

El contenido de grasa, al igual que el de proteína, presenta sustanciales diferencias de unos quesos a otros. Desde un punto de vista nutricional, la digestibilidad de la grasa en las diferentes variedades de queso se sitúa entre el 88 y el 94% (Renner, 1987). La mayoría de los quesos presentan un alto contenido de grasa, por ejemplo, 50 g de Cheddar proporcionan 17 g de grasa (**Tabla** I.**4**). Por otra parte, la lactosa, el carbohidrato principal de la leche, se pierde mayoritariamente con el suero durante la fabricación de queso y la lactosa residual en la cuajada se transforma en ácido láctico por la acción de las bacterias

lácticas. Por tanto, los quesos pueden consumirse sin efectos nocivos por las personas intolerantes a la lactosa, dado que su presencia se reduce a cantidades traza o a concentraciones inferiores al 2 %.

Tabla I.**4.** Composición química de diversos quesos (cantidad expresada en 100 gr de queso) (Adaptado de O'Brien y O'Connor, 2004).

Tipo de queso	Agua (g)	Proteína (g)	Grasa (g)	Carbohidrato (g)	Colesterol (mg)
Brie	48,6	19,3	26,9	tr	100
Camembert	50,7	20,9	23,7	tr	75
Cheddar	36,0	25,5	34,4	0,1	100
Edam	43,8	26,1	25,4	tr	80
Emmental	35,7	28,7	29,7	tr	90
Feta	56,5	15,6	20,2	1,5	70
Gouda	40,1	21,0	31,0	tr	100
Mozzarella	49,8	25,1	21,0	tr	65
Parmesano	18,4	39,4	32,7	tr	100
Ricotta	72,1	9,4	11,0	2	50
Roquefort	41,3	19,7	31,9	tr	90

La **Tabla** I.**5** muestra el contenido de las vitaminas y minerales en algunos quesos comerciales. Se puede observar que el queso es una fuente importante de retinol (vitamina A) y de las vitaminas D, B_2, B_{12} y, en menor medida, de ácido fólico. En cuanto a los minerales, el queso es una fuente importante de calcio, fósforo y magnesio. Recker *et al.*, (1988) estimaron la absorción del calcio contenido en distintos productos lácteos como el queso crema (un 22,9 %), la leche entera (alrededor del 26,7%) y el yogur (el 25,4%).

Tabla I.**5.** Vitaminas y minerales de diversos quesos (cantidad expresada en 100 gr de queso) (Adaptado de O'Brien y O'Connor, 2004)

Tipo de queso	Vitaminas						Minerales		
	A (µg)	D (µg)	E (mg)	B2 (mg)	B12 (µg)	Ácido fólico (µg)	Ca (mg)	Mg (mg)	P (mg)
Brie	285	0,2	0,84	0,4	1,2	58	540	27	390
Camembert	230	0,2	0,65	0,5	1,1	102	350	21	310
Cheddar	325	0,3	0,53	0,4	1,1	33	720	25	490
Edam	175	0,2	0,48	0,4	2,1	40	770	39	530
Emmental	320	n.d	0,44	0,4	2,0	20	970	35	590
Feta	220	0,5	0,37	0,2	1,1	23	360	20	280
Gouda	245	0,2	0,53	0,3	1,7	43	740	38	490
Mozzarella	240	0,2	0,33	0,3	2,1	19	590	27	420
Parmesano	345	0,3	0,70	0,4	1,9	12	1200	45	810
Ricotta	185	n.d	0,03	0,2	0,3	n.d	240	13	170
Roquefort	295	n.d	0,55	0,7	0,4	45	530	33	400

n.d: no detectado.

I.1.5. Tipos de queso

Se estima que en el mundo existen más de mil variedades diferentes de queso, que se han intentado clasificar teniendo en cuenta distintos criterios, como sus características reológicas (dureza), su origen geográfico, tipo de leche con la que se elaboran y microorganismos que participan en su maduración, aunque ninguna de las clasificaciones propuestas hasta ahora ha logrado una aceptación general. La tabla I.**6** muestra una clasificación incluyendo distintos aspectos (Ordóñez *et al*., 1998).

Tabla I.6. Tipos de queso clasificados con distintos criterios (comportamiento reológico, contenido de humedad, microorganismos que participan en la maduración y procedencia) (Ordóñez *et al*., 1998).

Quesos muy duros (humedad < 25%) • Madurados por bacterias: Parmesano, Romano (Italiano).
Quesos duros (humedad 25 - 36%) • Con ojos. Madurados por bacterias: Emmental (Suiza); Gruyére (Francia) • Sin ojos. Madurados por bacterias: Cantal (Francia); Cheddar (Gran Bretaña); Manchego, Castellano, Mahón, Zamorano (España); Edam, Gouda (Holanda); Cacicavallo (Italia).
Quesos semiblandos (humedad 36 - 40%) • Madurados por bacterias: Gallegos, tipo manchego (España); St Paulin (Francia); Lancashire (Gran Bretaña). • Madurados por bacterias y otros microorganismos: Bacterias y levaduras superficiales: Limburger (Bélgica); Tilsit (Alemania); Bel Paese (Italia); Munster (Francia). • Madurados por mohos internos (azules): Roquefort (Frania); Cabrales (España); Gorgonzola (Italia); Stilton (Gran Bretaña); Danablu (Dinamarca).
Quesos blandos (humdad > 40%) • Madurados por mohos superficiales: Camembert, Brie (Francia). • No madurados: Mozzarella (Italia); Cottage (Gran Bretaña); Burgos, Villalón (España); Petit Suisse (Francia).

I.1.6. Quesos elaborados con leche de oveja

Los principales fabricantes mundiales de queso de oveja son los países Mediterráneos (Turquía, Grecia, Italia, Francia, España, Argelia, Egipto y Portugal) en los que tradicionalmente se concentra la mayor producción de leche de este origen. De hecho, en muchos casos casi toda la leche de oveja obtenida se destina a la elaboración de queso.

Forman parte de esta tradición quesos tan famosos como los italianos tipo "Pecorino" (Pecorino Romano, Pecorino Sardo, Fiore Sardo), los quesos Feta o Graviera de Grecia, el Roquefort de Francia, Serra da Estrela en Portugal, Ras en Egipto, y Manchego en España.

En España la producción de leche de vaca, oveja y cabra durante el año 2014 fue de 6.652.000 toneladas, de los cuales 5.966.800 toneladas (89,70% del total) fueron de leche de vaca, 368.700 toneladas (5,54% del total) de leche de oveja, y 316.500 toneladas (4,46% del total) de leche de cabra, según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2014). En cuanto a la producción de queso durante el año 2013 fue de 361.900 toneladas, de las cuales 126.900 toneladas fueron quesos de vaca (el 35,06% del total), 51.300 toneladas fueron de queso de oveja puro (14,18% del total), 24.600 toneladas fueron de quesos de cabra puro (6,79% del total) y 159.100 toneladas fueron de quesos de mezcla (43,96% del total). Del total de la producción de quesos en España, 63.700 toneladas fueron quesos de pasta dura (17,60% del total) (MAGRAMA, 2014).

I.1.6.1. Principales tipos

Los quesos elaborados a partir de leche de oveja presentan un gusto y aroma característicos y diferenciados de los que proceden de otro tipo de leche. Estas particularidades sensoriales se han atribuido a las diferencias en la composición de la leche (**Tabla** I.7) utilizada en la elaboración del queso, especialmente en relación con el contenido graso. Como puede observarse en la **Tabla** I.7 existen diferencias sustanciales al comparar el contenido de grasa y proteína de la leche de oveja de distintas razas. Como se muestra en la mencionada tabla, la leche de oveja de raza manchega presenta, en relación con la de otros tipos de oveja, el mayor contenido en grasa, proteína y lactosa.

Tabla I.7. Composición media (% en peso) de leche de vaca (McSweeney, 2007) y de distintas razas de oveja (Yanes, 2008)

Componentes	Vaca	Oveja Manchega	Oveja Churra	Oveja Castellana	Oveja Assaf
Grasa	3,7	7,50	6,50	6,60	5,75
Proteína	3,4	6,50	5,00	5,60	5,10
Lactosa	4,8	4,80	4,70	4,60	4,60
Extracto seco	12,60	18,00	18,70	17,92	17,80

Se han descrito al menos seis familias de quesos de oveja (Medina y Núñez, 2004): (i) blanco o fresco, (ii) de salmuera o de vinagre, (iii) duro y semiduro, (iv) de veta azul,

(v) de cuajada extendida y (vi) quesos de suero (requesón). La estacionalidad de la producción de la leche de oveja conduce a grandes variaciones en la obtención de queso de este origen. Su elaboración en los países europeos de la cuenca mediterránea se produce especialmente entre diciembre y junio, a partir de una producción de leche que aumenta considerablemente en la primavera y disminuye de julio a noviembre (Medina y Núñez, 2004).

Los productores de queso de oveja utilizan diferentes procedimientos para homogenizar la composición de la materia prima, entre los que se incluyen la congelación de la leche, la concentración de la leche mediante la ultrafiltración o la congelación de la cuajada (Voutsinas *et al*., 1995; Sendra *et al*., 1999; Tejada *et al*., 2002; Medina y Núñez, 2004).

Entre los quesos más conocidos elaborados con leche de oveja producidos en diferentes países europeos es encuentran el Feta en Grecia. Se trata de un queso de pasta blanda, madurado y mantenido en salmuera (10 - 12 % NaCl) durante al menos dos meses. En Francia, se elaboran un amplio abanico de quesos de leche de oveja con distintas técnicas y muy diversas características. Entre ellos cabe mencionar el queso Roquefort, producido en la región de Causses del Aveyron, obtuvo la Denominación de Origen Protegida (DOP) en 1925. Se elabora con leche cruda de oveja de la raza Lacaune. Se trata de un queso azul obtenido con un *starter* láctico mesofílico y la incorporación de esporas de *Penicillium roqueforti*. La maduración se realiza en cuevas. El queso Ossuau-Iraty (DOP) se producen a partir de leche de oveja de las razas Manech y Vasco-Bearnesa, cruda o pasteurizada. Es otro queso de relevancia, en este caso de pasta prensada no cocida que se elabora en el suroeste de Francia. Los quesos maduran durante al menos 3 meses y tienen un peso entre los 2 - 5 kg. Otros quesos franceses de oveja a destacar son el A filetta Abbaye de Bellocq, Brin d'amour, Brique, Etorki, P'tit Basque o el Tricorne de Marans.

En Italia pueden encontrar diferentes quesos elaborados con leche de oveja, destacando por su importancia los tipos Pecorino (Romano, Sardo, Toscano, Siciliano), con distintas características, en los que suele utilizarse cultivos iniciadores y cuajo animal con distintas temperaturas de elaboración y tiempos de maduración. En Portugal, la mayoría de los quesos de oveja se fabrican siguiendo métodos tradicionales, en los que predomina el uso de coagulante de origen vegetal, lo que les confiere una textura blanda o semiblanda. Los quesos de este origen más conocidos son Serra da Estrela, Serpa, Azeitao,

Évora o Nisa y Castelo Branco, generalmente amparados bajo la correspondiente DOP (Freitas *et al*., 2000; Medina y Núñez, 2004; Sousa y Malcata, 1997).

I.1.6.1.1. Quesos de oveja elaborados en España

En España se elaboran una amplia gama de quesos con leche de oveja, de los cuales solo seis poseen DOP, se trata de los quesos de pasta prensada: Manchego, Roncal, Idiazábal y Zamorano y de pasta blanda: Queso de la Serena y Torta del Casar. En estos últimos se utiliza cuajo vegetal obtenido mediante la maceración de de flores secas de C. *cardunculus* y se elaboran con leche cruda de oveja Merina. El queso de la Serena se produce en el sureste de Extremadura. La maduración se produce durante al menos 60 días. Su corteza es de color marrón, y la pasta toma la textura blanda debido a la proteólisis que ejerce el cuajo vegetal. La Torta del Casar se produce en la zona centro de Extremadura, alrededor de Cáceres, se trata de un queso de pasta semi-blanda (Medina y Núñez, 2004).

Idiazábal es un queso de textura semidura o dura, producido en el País Vasco y Navarra, a partir de leche de ovejas Lachas. Su producción industrial está basada en los métodos tradicionales, fundamentado en el uso de cultivos homofermentativos previamente a la coagulación de la leche mediante cuajo animal a 30 ºC. La cuajada se corta en gránulos de 5 - 10 mm y se calienta a 37 ºC. Se coloca en moldes, se prensa durante 6 horas y se sala durante 24 - 48 horas mediante inmersión en salmuera, o con sal seca. Los quesos maduran durante 2 - 12 meses. El proceso de ahumado, que se aplica a los tercer mes de maduración, es opcional. En la provincia de Zamora se produce el queso Zamorano, de pasta dura, elaborado a partir de leche cruda de ovejas Churra y Castellana. La leche se coagula, con cuajo animal a 28 - 32 ºC durante 30-45 minutos. La cuajada se corta en piezas de 5 - 10 mm, y se calienta a 38-40º C antes del moldeado y prensado. Los quesos se salan, bien con sal seca o por inmersión en salmuera durante 36 h, y se maduran al menos durante 100 días. El queso Roncal es de pasta dura, elaborado en Navarra, con leche cruda de oveja. Su procesado es similar a los anteriores, excepto en que la temperatura de coagulación es más alta (32 - 37 ºC). El tiempo de maduración es de 4 meses.

De las DOP mencionadas, el queso Manchego es quizás el más conocido y difundido, tanto a nivel nacional como internacional. Este queso ha sido uno de los estudiados en la presente Tesis Doctoral, por lo que es analizado más en detalle a continuación.

El reglamento de la Denominación de Origen "Queso Manchego" fue aprobado el 21 de diciembre de 1984 por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y fue ratificado el 23 de noviembre de 1995. En Octubre de 2007, se publicó la modificación del pliego de condiciones de esta DOP (Real Decreto 1069/2007, publicado en el BOE de 13 de Noviembre de 2007) y en el Reglamento CE nº 561/2009, de 26 de junio de 2009 (DOUE L 166/36, 2009) se aprobaron las modificaciones del pliego de condiciones.

Según el mencionado Reglamento (BOE, 13 de Noviembre 2007) y de su Consejo Regulador, se considera queso Manchego al elaborado exclusivamente con leche de oveja de la raza Manchega, con una maduración mínima de 30 días para quesos con peso igual o inferior a 1,5 Kg y de 60 días para el resto de formatos, y máxima de dos años, pudiendo ser artesanal o industrial, según haya sido elaborado con leche cruda o pasteurizada. Es un queso madurado, de semicurado a curado, de coagulación enzimática y de pasta prensada, no cocida y extragraso. El queso Manchego tiene forma cilíndrica, con caras sensiblemente planas (altura y diámetro máximos, 12 y 22 cm, respectivamente) y un peso entre 0,4 y 4 kg. Respecto a sus características químicas, el pH puede oscilar en el intervalo 4,8 - 5,8, el extracto seco mínimo considerado es 55%, el contenido mínimo de grasa y proteína (sobre extracto seco) es del 50 y 30 % respectivamente.

La leche para la elaboración del queso Manchego, debe proceder exclusivamente de oveja de la raza Manchega, siendo el producto natural obtenido del ordeño de animales sanos. Debe estar exenta de calostros y productos medicamentosos que puedan incidir negativamente en la elaboración, maduración y conservación del queso, así como en las condiciones higiénicas y sanitarias del mismo. Las características que debe presentar son: contenidos mínimos de materia grasa del 6,5%, de lactosa del 4%, de proteínas del 4,5% y de extracto seco del 11%. El contenido máximo de cenizas se limita al 0,8% y la ácidez a 25 ºDornic.

La zona de producción de la leche apta para la elaboración del queso Manchego, así como la de producción y maduración de los mismos, se extiende por las provincias de Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo.

Para la comercialización de quesos Manchegos, se coloca durante el prensado en una de las caras del queso una placa de caseína con el número de serie y la leyenda de "Manchego". Además, adherida a la etiqueta comercial se encontrará una contra etiqueta distintiva del Consejo Regulador de la Denominación de Origen Queso Manchego, con su

logotipo, numerada y seriada, que garantiza que la pieza ha superado los controles de calidad (**Figura** I.**6**). En la etiqueta comercial debe figurar que se ha elaborado íntegramente con leche de oveja manchega.

Figura I.**6.** Placa de caseína y contra etiqueta obligatorias que deben presentar los quesos acogidos a la D.O. "Manchego"

En el proceso de elaboración del queso Manchego si se utiliza leche cruda no se añade cultivo estárter, mientras que si se emplea leche pasteurizada, se añade un cultivo starter láctico y mesofílico. La coagulación se lleva a cabo con cuajo animal a 30 - 32 ºC en 30 - 40 minutos. La cuajada se corta en cubos de 4 - 6 mm y se escalda a 36 - 38 ºC durante 15 minutos mientras se remueve. Los quesos se presionan durante 6 - 18 horas y se salan en salmuera durante 24 - 48 horas. Los quesos maduran durante al menos 2 meses, a una temperatura comprendida entre 3 ºC y 16 ºC y una HR entre el 75% y el 90%.

Además de las mencionadas DOP, en España existe una amplia producción de quesos de oveja, generalmente de pasta dura o semidura, elaborados especialmente en Castilla-La Mancha y Castilla y León siguiendo un procedimiento similar al utilizado para la elaboración del queso Manchego (tipo manchego). Mucha de esa elaboración se realiza siguiendo procedimientos artesanales o tradicionales en pequeñas empresas, utilizando leche cruda y cuajo animal. Quesos artesanales de esta naturaleza elaborados en Castilla-La Mancha han sido también considerados en la realización de esta Tesis. Por otra parte, se han analizado los quesos de leche de oveja más representativos de la producción de Castilla y León en la actualidad. Estos quesos se comercializan amparados bajo la denominación de queso Castellano y proceden tanto de la elaboración industrial como artesanal.

El "Queso Castellano" es una marca colectica (OHIM, 2009; BOCyL, 2010; Federación Castellano-Leonesa de Industrias Lácteas, 2012) que ha surgido para la

promoción de los quesos elaborados en Castilla y León que no gozaban de distintivos de calidad, como la Denominación de Origen o la Indicación Geográfica Protegida. La marca "Queso Castellano" (**Figura** I.7) pretende regular la gran producción quesera existente en Castilla y León. Para ubicar la importancia comercial de esta producción, cabe indicar que esta Comunidad produjo el 65% de la leche de oveja en España en el año 2014, según el Fondo Español de Garantía Agraria (FEGA). Se estima que el 57% del queso elaborado en Castilla y León se comercializarán amparado por esta marca. Bajo el control de la Federación Castellano-Leonesa de Industrias Lácteas, este queso pretende situarse entre los más reconocidos y vendidos, tanto a nivel nacional como internacional.

De acuerdo con lo mencionado, se conoce como queso Castellano al elaborado en empresas situadas en Castilla y León e inscritas en la Federación Castellano-Leonesa de Industrias Lácteas (2012). Este queso se produce con leche de oveja, cruda o pasteurizada, obtenida de las razas Churra y Castellana. Además de los quesos de oveja, también se incluyen quesos de mezcla elaborados con leche de vaca y oveja (< 15%) o de vaca, oveja (< 15%) y cabra (< 10%). Se trata de un queso de pasta prensada, coagulación enzimática, semiduro, semigraso o graso, con forma cilíndrica (altura < 14 cm y diámetro < 26 cm) y un peso inferior a 4 kg. Como características químicas cabe mencionar: pH entre 4,5-5,8, extracto seco mínimo del 45 %, grasa (sobre extracto seco) entre 46,5 y 58,5 % en quesos grasos y entre 26,5 y 43,5 en quesos semigrasos y un contenido en proteína (sobre extracto seco) mínimo del 25 %.

Entre estos quesos el más conocido comercialmente es el queso castellano elaborado con leche de oveja (100 %) que tiene un tiempo de maduración mínimo de dos meses, aunque generalmente se comercializan entre los tres y los seis meses. (Fernández-García *et al.*, 2004). Particularidades de los quesos de oveja al amparo de esta marca se incluyen en la introducción de los trabajos realizados en el **Apartado IV** de esta memoria.

Figura I.7. Imagen corporativa de queso *Castellano*

I.2. Envases comestibles

Los envases comestibles pueden definirse como cualquier tipo de material que sirva para recubrir o envolver un alimento, que incremente su vida útil y que pueda ser ingerido junto con él. Las películas y cubiertas comestibles están constituidas por polímeros naturales obtenidos de productos y subproductos agrícolas y ganaderos, como proteínas vegetales y animales, polisacáridos y lípidos, lo cuales son completamente biodegradables, no tóxicos para el consumo humano y seguros para el medioambiente. Precisamente por estas razones y por la carencia de riesgo de transferencia de componentes no deseables, algo que podría suceder con los materiales sintéticos de envasado, en los últimos años se ha incrementado el interés por su empleo y se han intensificado las investigaciones sobre sus propiedades.

I.2.1. Aspectos generales de las películas y cubiertas comestibles

Los envases comestibles tiene una participación activa en la conservación y propiedades de los alimentos: (i) sirven de barrera, a veces selectiva, a la migración de humedad, gases, aromas y lípidos, (ii) incrementan la resistencia mecánica de los alimentos y (iii) son capaces de vehicular componentes del aroma encapsulados, antioxidantes, conservantes, pigmentos o compuestos nutritivos, como las vitaminas. Se pueden distinguir dos tipos de envases comestibles: las envolturas o cubiertas, las cuales se aplican y se forman directamente sobre la superficie del alimento, y las películas, con estructura estable, que se forman previamente y se colocan sobre o entre los alimentos, tal y como se haría con una películas plástico (Debeaufort *et al*., 1998; Gennadios, 2004; Pavlath y Orts, 2009). Aunque el coste de los envases comestibles en general es bastante más elevado que el de los envases plásticos tradicionales, es necesario tener en cuenta que, al valor de estos últimos, hay que añadir los gastos en gestión y eliminación de residuos, los cuales no existen en los envases comestibles (Gennadios, 2004). En relación con esto, la Unión Europea ha emitido en la Directiva 94/62/EC con el objetivo de reducir el impacto de los residuos de envases en el ambiente mediante la reducción de su producción y el incremento de su recuperación. Parte de estos residuos pueden evitarse con el empleo de envases comestibles, ya sea por sustitución parcial o total de los convencionales.

En la actualidad, las aplicaciones comerciales de los envases comestibles se desarrollan principalmente en productos de origen vegetal, como frutas, hortalizas, frutos secos, derivados de cereales y tubérculos, así como en productos de confitería y chocolates.

En cambio, las aplicaciones son escasas en los alimentos de origen animal y en general no se encuentran en fase de explotación industrial, aunque en productos compuestos, como los helados de cucurucho sí que se emplean envueltas comestibles para proteger el cono de la humedad (Pavlath y Orts, 2009). También algunos autores consideran a las tripas de colágeno, utilizadas en los embutidos, como un envase comestible (Han, 2014).

Como se mencionó anteriormente, los materiales principales para formar envases comestibles son hidrocoloides (proteínas y polisacáridos) y lípidos, los cuales pueden emplearse por separado o combinados. Sus propiedades químicas y físicas determinan las características de los envases que generan. Con frecuencia es necesario formar disoluciones o dispersiones con ellos antes de formar el envase y dado que su atributo principal es su carácter comestible, los disolventes quedan restringidos al agua y el etanol (Han, 2014).

I.2.2. Envases comestibles constituidos por proteínas del lactosuero

Las proteínas tienen un considerable interés como materiales formadores de envases activos comestibles, tanto en forma de películas como de cubiertas. Las películas proteicas presentan generalmente propiedades mecánicas y de barrera más interesantes que las de los envases formados por polisacáridos, siendo a menudo más estables y con una vida más larga (Khwaldia *et al*., 2004; Dangaran y Tomasula, 2009). Las propiedades más específicas de las proteínas, que las diferencian de otros materiales capaces de formar películas, son los cambios conformacionales que sufren en la desnaturalización, y que modifican sus cargas electrostáticas y su naturaleza anfifílica (Han, 2014). Las características de los envases de origen proteico vienen determinadas por la naturaleza de las interacciones proteína-proteína (Gennadios, 2004), que se ven afectadas por numerosos factores, como la composición, la presencia de enlaces iónicos, la capacidad para formar enlaces de hidrógeno y disulfuro intra- e intermoleculares (Gennadios, 2004). La estructura proteica puede modificarse mediante tratamientos térmicos, alta presión, irradiación, tratamientos mecánicos, adición de ácidos o bases, sales, hidrólisis química o empleo de enzimas; con ellos se consigue controlar y cambiar las propiedades físicas y mecánicas de los envases comestibles (Han, 2014).

Las proteínas del suero lácteo son interesantes para formar envases comestibles, los cuales muestran mejores propiedades mecánicas y de barrera que los formados con otras proteínas. Las películas que forman son transparentes o translúcidas y flexibles, y

presentan buenas características de barrera frente al oxígeno, el aceite y los aromas. Sin embargo, muestran limitaciones si se les compara con películas de polímeros sintéticos en lo que se refiere a las características mecánicas y a sus propiedades de barrera frente al vapor de agua (Pérez-Gago, 2012; Ramos *et al*., 2012). No obstante, sus propiedades de barrera frente a los gases, principalmente el oxígeno, son comparables a las de las películas plásticos (Khwaldia *et al*., 2004). Estas proteínas proceden mayoritariamente del suero de quesería, un subproducto de la elaboración de queso. Son una mezcla de varios tipos de proteínas, siendo las más abundantes la β-lactoglobulina y la α-lactalbúmina, seguidas de la seroalbúmina bovina y las inmunoglobulinas. Se caracterizan por tener los restos aminoacídicos hidrofílicos, polares y cargados, distribuidos uniformemente en la cadena proteica, estando los grupos hidrofóbicos situados en el interior de la estructura globular (Dangaran *et al*., 2009). Son comercializadas como concentrados o aislados de proteína y empleadas en muchos alimentos por sus propiedades nutritivas y funcionales. Estos productos se obtienen aplicando tecnología de membranas (ultrafiltración y diafiltración) en el caso de los concentrados y aislados, o cromatografía de intercambio iónico para su aislamiento y posterior concentración mediante deshidratación. Con estas metodologías, se alcanzan concentraciones proteicas elevadas, de hasta el 80% para los concentrados y del 90% o más para los aislados (Khwaldia *et al*., 2004).

Como ya se indicó previamente, las proteínas del lactosuero poseen grupos hidrofóbicos y sulfhidrilo ocultos en su estructura globular. Esto hace necesario desnaturalizarlas (usualmente por calor) para que expongan estos grupos, de tal forma que sea viable el establecimiento durante el secado de enlaces disulfuro intermoleculares y de interacciones hidrofóbicas (McHugh y Krochta, 1994; Pérez-Gago y Krochta, 2001). La formación de películas se consigue habitualmente aplicando un tratamiento térmico a temperaturas de 75 – 100 ºC durante unos 20 - 30 minutos a las dispersiones proteicas (con concentraciones de entre el 8 y el 12% de proteína), tras lo cual se vierten sobre superficies planas y se secan; este último paso puede hacerse a temperatura ambiente o mediante corrientes de aire caliente de hasta unos 50 ºC (Khwaldia *et al*., 2004; Ramos *et al*., 2012). No obstante, se están aplicando otros métodos como la extrusión con el fin de hacer más viable la producción industrial de películas de estas proteínas (Dangaran *et al*., 2009).

Aunque para obtener envases comestibles a partir de proteínas del lactosuero puede ser suficiente aplicar calor y secado, es necesaria la adición de plastificantes para mejorar las propiedades de las películas, ya que de no hacerlo resultan quebradizas y frágiles

debido a las fuertes interacciones entre las moléculas del polímero (McHugh y Krochta, 1994; Krochta, 2002). Los plastificantes son compuestos de bajo peso molecular, necesarios para hacer las películas menos frágiles y más flexibles, aumentando su termoplasticidad, sobre todo en situaciones de baja temperatura y/o baja HR. Los plastificantes son capaces de situarse entre las moléculas proteicas, interfiriendo con las interacciones polímero-polímero, incrementando el volumen libre de las estructuras poliméricas o la movilidad molecular (Sothornvit y Krochta, 2000; Krochta, 2002). Tanto el tipo como la concentración de plastificante añadidos durante la formación de las películas de proteínas de lactosuero pueden afectar a sus propiedades mecánicas y a su permeabilidad, tal y como sucede con los plastificantes más frecuentemente utilizados, glicerol y sorbitol (Ramos *et al.*, 2012). Los cambios inducidos por tratamientos desnaturalizantes pueden verse modificados por el plastificante utilizado.

I.2.3. Métodos no térmicos de desnaturalización proteica para la formación de películas comestibles

Como se mencionó anteriormente, para obtener envases comestibles a partir de proteínas del lactosuero es habitual modificarlas mediante la aplicación de tratamientos térmicos que originen su desnaturalización, junto con componentes que actúen como plastificantes para mejorar las propiedades de las películas. Las proteínas séricas nativas pueden formar películas, aunque poseen, frente a las desnaturalizadas, peores propiedades de barrera frente al oxígeno, inferiores características mecánicas y mayor solubilidad (Pérez-Gago, 2012). Sin embargo, el uso de otros métodos de modificación de la estructura de las proteínas puede ser una opción útil en la obtención de películas comestibles, mejorando incluso las propiedades de aquellos preparados de forma convencional mediante la aplicación de calor. Los tratamientos que se han investigado incluyen métodos químicos, físicos y enzimáticos, los cuales se han aplicado a las proteínas y a las dispersiones proteicas de películas preformadas (Wihodo y Moraru, 2013).

A. Tratamientos químicos: entre los métodos químicos, se encuentra la modificación del pH mediante la adición de una base (NaOH) para desnaturalizar proteína de soja (Brandenburg *et al.*, 1993), o la adición a la dispersión proteica de diversos compuestos químicos inductores de entrecruzamiento (formaldehído, glutaraldehído, carbonylimidazol, etc.) con el fin de modificar las propiedades de las películas de proteínas de suero. En este último caso, se observó un incremento de la fuerza de tracción y de la

permeabilidad al vapor de agua, así como un descenso del porcentaje de elongación y de la solubilidad en agua respecto al control (Ustunol y Mert, 2004). El formaldehído tiene un efecto semejante sobre las propiedades mecánicas cuando se aplica a las películas de gluten preformados (Micard *et al*., 2000). Sin embargo, las películas tratados de esta manera dejan de ser comestibles debido a la toxicidad de los compuestos utilizados (Dangaran *et al*., 2009).

B. Tratamientos físicos: entre los procedimientos aplicados de esta naturaleza se encuentra la aplicación de radiaciones ionizantes. Estas son capaces de modificar la conformación de las proteínas, romper enlaces covalentes, liberar radicales libres y producir reacciones de polimerización en las que parecen estar implicados enlaces bitirosina entre las cadenas proteicas (Brault *et al*., 1997; Wihodo y Moraru, 2013). Este tratamiento se ha aplicado en la obtención de películas comestibles a partir de caseinatos, zeína, gelatina y proteínas de lactosuero, huevo, soja y trigo. La irradiación mejora algunas de las propiedades mecánicas de las películas proteicas, como la fuerza de tracción y la resistencia a la punción, reduce la solubilidad y, en algunos casos, disminuye la permeabilidad al vapor de agua e incrementa la densidad de las películas. No obstante, estos efectos dependen de diversos factores, entre ellos la dosis aplicada y la presencia de plastificantes (Pérez-Gago, 2012; Kuan *et al*., 2013).

Aunque de menor energía que las radiaciones ionizantes, la radiación ultravioleta es capaz de modificar las proteínas induciendo entrecruzamientos. El uso más extendido hasta el momento de este espectro de radiaciones electromagnética ha sido la reducción de la carga microbiana de los alimentos, empleandose longitudes de onda entre 220 y 300 nm. También se ha estudiado su capacidad para producir enlaces cruzados en las películas de colágeno y gelatina en investigación médica y farmacéutica. La radiación ultravioleta se ha aplicado a las películas de proteínas de cacahuete, caseinatos, de soja y ovoalbúmina, observándose aumentos en la fuerza de tracción y la elongación y modificación de la permeabilidad al vapor de agua (Gennadios *et al*., 1998; Rhim *et al*., 1999; Liu *et al*., 2004). También se han empleado tratamientos de luz pulsada para mejorar las propiedades de películas proteicas, en concreto de caseinatos, con incremento de su resistencia a la tracción y de la elongación así como de la homogeneidad de su superficie (Wihodo y Moraru, 2013).

Otra de las técnicas útiles para causar modificaciones en la estructura de las moléculas es la aplicación de ultrasonidos de alta energía, con intensidades superiores a 1

W/cm^2 y frecuencias entre 18 y 100 kHz. Cuando la energía sonora pasa a través de un medio líquido genera ondas longitudinales continuas, creando una compresión y rarefacción alternativas de las partículas del medio. En estas zonas en las que hay cambios de presión son en las que se produce el fenómeno de cavitación, formándose burbujas en el medio, las cuales tienen mayor superficie durante la fase de expansión, en la que se incrementa la difusión de gas y hace que las burbujas se expandan. Cuando la energía proporcionada por los ultrasonidos no es suficiente para retener la fase de vapor en las burbujas se produce una condensación muy rápida. Las moléculas condensadas colisionan y las burbujas se colapsan (implosionan) violentamente creando ondas de choque. Estas ondas producen zonas con temperaturas y presiones muy elevadas, las cuales alcanzan valores de hasta 5500 ºC y 50 MPa. Estos efectos inducen la mayoría de los efectos acústicos (Knorr *et al*., 2004; Dolatowski *et al*., 2007).

Con independencia de la frecuencia y de la amplitud de la onda aplicadas, se han observado una serie de efectos físicos, químicos y bioquímicos de los ultrasonidos de alta intensidad que han dado lugar a una gran variedad de aplicaciones: limpieza de superficies, procesos de extracción, cristalización, emulsificación, filtración, homogeneización, congelación, desgasificación de líquidos, aceleración de reacciones, extracción de proteínas y enzimas o inactivación de las mismas, entre otras (Knorr *et al*., 2004). Asimismo, se han realizado diversos estudios sobre el efecto de los ultrasonidos sobre diversas propiedades funcionales de las proteínas presentes en el lactosuero (Gülseren *et al*., 2007; Jambrak *et al*., 2010), así como en sus concentrados, aislados e hidrolizados (Jambrak *et al*., 2008; Kresic *et al*., 2008) y sobre estas proteínas en la leche (Villamiel y De Jong, 2000). También se ha estudiado la desnaturalización de las mencionadas proteínas mediante la aplicación de ultrasonidos.

La información acerca del efecto de la aplicación de ultrasonidos durante la obtención de películas proteicas no es muy abundante. Se ha descrito (Banerjee *et al*., 1996) que el tratamiento con ultrasonidos (168 y 520 kHz) incrementa la resistencia a la fuerza de tracción y a la punción de las películas de concentrados de proteína de suero y de caseinato sódico, aunque no afecta a la permeabilidad al vapor de agua y a la capacidad de elongación. La microestructura de estas películas mostró una matriz más tupida y fuertemente enlazada, lo cual se ha atribuido a la reducción del tamaño de partícula y de las gotas de grasa en la disolución proteica, lo que provoca una mayor interacción molecular. El incremento de algunas de las propiedades mecánicas, más marcada en las

películas de caseinato que en las de proteínas de suero, se ha relacionado también con la mayor influencia de los ultrasonidos en la formación de interacciones no covalentes, como los enlaces de hidrógeno, hidrofóbicos e interacciones electrostáticas.

El efecto de los ultrasonidos parece por lo tanto depender en parte del tipo de proteína tratada, como se ha observado en los resultados obtenidos en películas elaboradas con distintas proteínas. Se han estudiado las características de las películas de proteína de cacahuete tratada con ultrasonidos (Liu *et al*., 2004) en un baño durante tiempos variables, observándose que modificaban las características mecánicas, las cuales mejoraron con un tratamiento de 10 minutos y empeoraron con un tratamiento más prolongado. También incrementaron la solubilidad, lo cual podría deberse a la disociación de la estructura cuaternaria de la proteína y a la liberación de péptidos de menor tamaño. El gluten, sin embargo, parece ser bastante tolerante a los ultrasonidos, ya que no se han observado modificaciones proteicas importantes (Marcuzzo *et al*., 2010). A lo que sí contribuyó el tratamiento fue a mejorar la dispersión de la proteína y a la apariencia de las películas, incrementando además las características hidrofílicas de la superficie de las mismas.

C. Tratamientos enzimáticos: existen diversas enzimas capaces de producir entrecruzamiento entre las moléculas proteicas como la transglutaminasa, la polifenoloxidasa y la peroxidasa. Esta última, extraída de rábano picante, se ha estudiado con este fin en películas de aislado de soja. Esta enzima cataliza la oxidación de los residuos de tirosina y la formación de di-, tri- y terta-tirosina, los cuales dan lugar a entrecruzamientos. Sin embargo, también ocasiona cierta degradación de las cadenas proteicas y produce películas quebradizas y sin propiedades de barrera adecuadas, por lo que esta enzima no resulta adecuada para la mejora de los envases comestibles elaborados con proteína de soja (Stuchell y Krochta, 1994). La enzima más utilizada y estudiada hasta el momento en la mejora de películas comestibles es la transglutaminasa o protein-glutamina γ–glutamil transferasa. Esta enzima cataliza la formación de enlaces cruzados ε-(γ-glutamil)-lisina en las proteínas a través de una reacción de transferencia de acilos, en la que el grupo γ-carboxiamida de la glutamina sirve como donante de acilos y el grupo ε-amino de la lisina actúa con receptor. Esto da lugar a la formación de entrecruzamientos covalentes intra- e intermoleculares en las cadenas proteicas (Motoki y Seguro, 1998). Las transglutaminasas (TGasa) están muy extendidas en la naturaleza, encontrándose en tejidos animales, vegetales y en células microbianas. Inicialmente estas enzimas se extraían de tejidos animales, pero dado el elevado coste y la limitada cantidad que podía obtenerse, en

la actualidad se extraen de distintos microorganismos, sobre todo diversas especies del género *Streptomyces*, pero también de *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Providencia*, *Enterobacter*, entre otros. Los preparados comercializados contienen, en su mayoría, enzima producida por *Streptomyces mobaraense*. La transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa) es un péptido sencillo de bajo peso molecular (38 kDa), su actividad no depende de la presencia de iones calcio y sus condiciones óptimas de actuación son 40 ºC y pH 5,5, aunque es activa a temperaturas cercanas a 0 ºC y pHs entre 4,5 y 8,0. Se inactiva a temperaturas superiores a 50 ºC. Se emplean en la fabricación de productos de diversa naturaleza, como cárnicos, pesqueros, lácteos y de panadería (Kieliszek y Misiewicz, 2014). La MTGasa se ha utilizado en la obtención de películas de muchos tipos de proteínas, como de lactosuero, de soja, caseínas, gelatina y zeína, a menudo mezcladas entre sí o con otros compuestos, como pectina o quitosano (Oh *et al*., 2004; Di Pierro *et al*., 2005, 2006; Chambi y Grosso, 2006; Tang *et al*., 2006). Respecto a las películas de proteínas del lactosuero, también se han efectuado estudios con TGasa de origen animal (Mahmoud y Savello, 1992; Yildirim y Hettiarachchy, 1998). La incorporación de esta enzima mejora las propiedades mecánicas de las películas proteicas y disminuye su solubilidad, mientras que los efectos sobre la permeabilidad al vapor de agua son variables, observándose en algunos casos un incremento, mientras que en otros no se ve afectada.

Las proteínas del lactosuero presentan grupos susceptibles para la acción de la TGasa ocultos, dentro de su estructura globular, por lo que para que respondan adecuadamente a la actividad de la enzima es necesario desplegarlas, ya sea por la aplicación de tratamientos químicos, como modificando el pH, o mediante la aplicación de calor (Jaros *et al*., 2006). Hasta ahora no se ha encontrado información científica sobre el uso de ultrasonidos para modificar las proteínas del lactosuero para la obtención de películas comestibles, con o sin incorporación de transglutaminasa de origen microbiano.

I.2.4. Envases comestibles para quesos

Los dos principales parámetros que contribuyen a la estabilidad de los quesos son el pH y la actividad de agua, pero ninguno de los dos son suficientemente bajos como para asegurar la completa estabilización del producto. De estos dos factores, la actividad de agua es el que puede verse afectado por la permeabilidad al vapor de agua del material de envasado. Otro factor importante a considerar en el envasado del queso es su permeabilidad al oxígeno, ya que puede favorecer la oxidación de las grasas. Por otro lado,

hay que tener en cuenta que no es un alimento "inerte", sino que los microorganismos que contiene, la mayoría responsables de la fermentación, consumen oxígeno y producen dióxido de carbono, los cuales afectan al ambiente que rodea al queso y modifican las condiciones en el interior del envase, ocasionando cambios en su microbiología y en sus propiedades organolépticas si el envase no es adecuado para este intercambio de gases (Robertson, 2013). La superficie externa de los quesos enteros se contamina fácilmente con microorganismos indeseables muy diversos; entre ellos hay microorganismos alterantes, que modifican su apariencia y disminuyen su valor comercial, pero también pueden encontrarse algunos patógenos. Mucha de esta microbiota es psicrótrofa, por lo que su número se incrementa incluso durante la conservación en refrigeración. En algunas ocasiones, los quesos se protegen de esta contaminación mediante películas sintéticas, sobre todo basadas en polivinil acetato o polivinil alcohol, a las cuales se suele añadir un compuesto antifúngico, como la natamicina o pimaricina (Pintado *et al*., 2010), haciendo desaconsejable consumir la corteza junto con el resto del queso.

En los últimos años, el interés por el desarrollo y aplicación de envases comestibles ha crecido enormemente, dado que pueden ser una opción para la sustitución, total o parcial, de los envases plásticos, con indudables ventajas especialmente por ser muy respetuosos con el medio ambiente, a la vez que pueden contribuir a prolongar la vida útil y a la seguridad de los alimentos. Hasta el momento no se han desarrollado envases comestibles comerciales para quesos, aunque existen diversas experiencias descritas en la bibliografía relacionada con este alimento, referente al uso de recubrimiento externo de piezas completas, o de trozos grandes, para el control de la alteración microbiológica. Para la obtención de estas películas se han utilizado sobre todo carbohidratos como material de base, por ejemplo galactomanano y agar, combinados con lípidos (Cerqueira *et al*., 2009, 2010) o quitosano junto con proteínas de lactosuero (Di Pierro *et al*., 2011), con resultados muy satisfactorios en queso Regional y Ricotta. El quitosano presenta propiedades antimicrobianas muy interesantes, además de buenas propiedades de barrera frente a los gases y la pérdida de humedad, pero de momento no está permitido legalmente su uso en la elaboración de alimentos en la mayoría de los países del mundo.

También existe la posibilidad de elaborar envases comestibles a partir de proteínas, los cuales presentan unas buenas propiedades de barrera frente a los gases. Las proteínas del lactosuero son muy interesantes para la elaboración de envases comestibles para quesos, ya que se encuentran naturalmente en la leche y permiten el aprovechamiento de

un subproducto altamente contaminante de la elaboración de queso (Ramos *et al*., 2011). Además no suponen la adición de una proteína extraña al producto lácteo, como ocurriría con el empleo de proteínas de otro origen, como de soja o huevo, las cuales son alergénicas e impedirían el consumo de queso a las personas sensibilizadas. Además, hay que tener en cuenta que las películas y los recubrimientos comestibles pueden emplearse como soporte para aditivos conservantes que prolonguen la vida útil de los alimentos. Entre ellos se encuentran ácidos orgánicos (acético, propiónico, láctico, benzoico, sórbico), ácidos grasos y monoglicéridos, nisina, aceites esenciales, entre otros (Cagri *et al*., 2004). Respecto a la aplicación de películas comestibles de proteínas de lactosuero con conservantes añadidos en la conservación del queso, Ramos *et al*. (2011) estudiaron las características y el comportamiento de las películas de estas proteínas adicionados de diversos antimicrobianos, como ácidos láctico y propiónico, quitooligosacáridos y natamicina, frente a microorganismos que se encuentran a menudo entre los contaminantes de la superficie de los quesos, obteniendo el mejor resultado con las películas con ácido láctico+natamicina. Pintado *et al*. (2010) también observaron un buen efecto antimicrobiano con mezclas de ácido málico, nisina y natamicina.

Los quesos en lonchas suelen envasarse a vacío o en atmósferas modificadas con el fin de evitar el desarrollo microbiano, la desecación excesiva y la oxidación lipídica. La separación de las lonchas puede ser en bastantes casos difícil sin que se rompan, por lo que los fabricantes suelen colocar láminas plásticas o papel entre ellas. Estos materiales pueden cumplir adecuadamente su función, pero son un elemento extraño al propio producto y por ello pueden alterar su imagen de cara al consumidor. Respecto al uso de envases comestibles para conservar lonchas de queso procesado sólo se ha encontrado un trabajo relativo al envasado de las mismas en bolsitas individuales basadas en zeína de maíz con la adición de otros compuestos como polietilenglicol, glicerol, ácido oleico y las películas de almidón de maíz recubierto con zeína. Desde el punto de vista fisicoquímico y microbiológico, la mejor combinación fue la de zeína con ácido oleico. El comportamiento y conservación de las lonchas envasadas en estas bolsitas y luego introducidas en bolsas plásticas, no fue significativamente diferente del observado en las incluidas en materiales plásticos (Ryu *et al*., 2005). Hasta el momento no se ha encontrado información sobre el uso de películas comestibles de proteínas de lactosuero aplicadas al envasado de queso en lonchas.

I.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los fundamentos de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron descritos por Bloch y Purcell, quienes fueron galardonados en 1952 con el Premio Nobel de Física por el desarrollo de nuevos métodos en la medición precisa de efectos magnéticos nucleares. A pesar de haber sido inicialmente descubierta en un ámbito físico, la tecnología de RMN fue ampliamente utilizada para la elucidación estructural de moléculas en química orgánica y pronto se confirmó su potencial para el análisis de tejidos biológicos. Sin embargo, su aplicación en alimentos se retrasó debido a la escasez de expertos en la materia, el alto coste de los equipos y la ausencia de un marco de RMN específicamente diseñado para matrices alimentarias.

En los últimos años, el desarrollo de instrumentación adecuada y la mejora de herramientas informáticas para recoger y analizar bases de datos, ha facilitado su aplicación en el área de la Ciencia y la Tecnología de los Alimentos. Aunque la sensibilidad y los límites de detección necesitan ser mejorados, se ha visto que esta tecnología tiene importantes ventajas sobre otras técnicas de análisis, ya que es rápida, no invasiva y no destructiva, es apta para el análisis de matrices sólidas y líquidas y su aplicación en alimentos no supone riesgo para la salud humana, por lo que podría integrarse en las líneas de producción como sistema de control. Las áreas de aplicación en alimentos son muy diversas. Se han realizado estudios para conocer su composición (Belton *et al*., 1996; Hu *et al*., 2007; Castejón *et al*., 2010, Chen *et al*., 2010), aspectos nutricionales (Lee *et al*., 2010), autenticidad de origen (Alonso-Salces *et al*., 2010), análisis de materiales de envasado (Pentimalli *et al*., 2000), características estructurales de miosistemas (Cernadas *et al*., 2005; Herrero *et al*., 2007; Herrero *et al*., 2009), seguimiento de procesos (Nott *et al*., 1999; Antequera *et al*., 2007), entre otros usos.

I.3.1. Fundamento de las técnicas de RMN

La RMN es un fenómeno físico por el cual los núcleos atómicos con número de espín nuclear no nulo pueden absorber selectivamente energía de radiofrecuencia al ser colocados bajo la acción de un campo magnético (**Figura** I.**8**). Una vez los núcleos han absorbido la energía de radiofrecuencia determinada (resonancia), devuelven el exceso energético mediante una liberación de ondas de radiofrecuencia (relajación). Esta liberación energética induce una señal eléctrica en una antena receptora con la que se puede obtener una imagen o hacer un análisis espectrométrico. En base a estos principios,

se distinguen distintas técnicas de RMN que aportan información amplia y variada sobre la estructura de distintas matrices y compuestos.

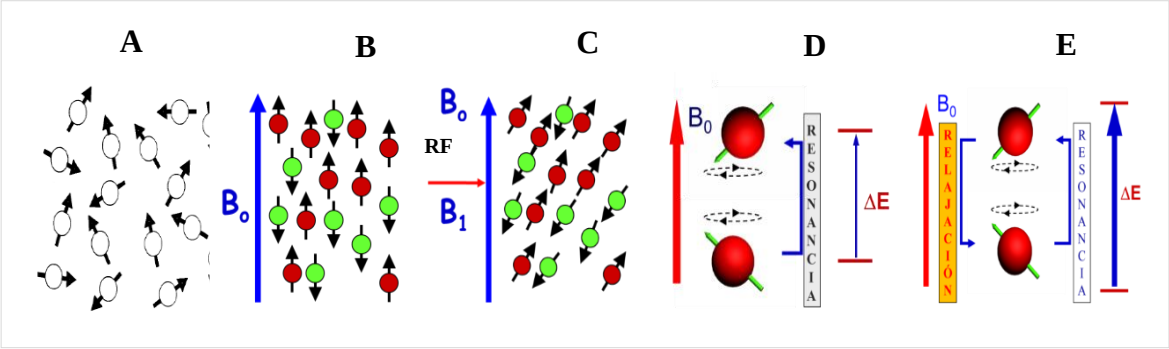


Figura I.**8**. Secuencia de un proceso de RMN. A: orientación al azar de espines. B: aplicación de un campo magnético B_0 y orientación de espines. C: aplicación de un pulso de radiofrecuencia B_1. D: absorción de energía. E: relajación nuclear (Herrera *et al*., 2006).

Por una parte, la espectroscopía de RMN permite la identificación de moléculas concretas, y la observación de sus cinéticas, a través de los cambios en intensidades de sus líneas espectrales. A través del uso de gradientes de campo magnético pueden obtenerse imágenes de los tejidos biológicos y así conocer la distribución espacial de las moléculas de agua en la muestra (Bertram *et al*., 2002). La relaxometría RMN aporta además información sobre la naturaleza físicoquímica de ciertos núcleos en términos de movilidad y compartimentalización. Entre los núcleos que presentan el fenómeno de resonancia magnética, como ^{13}C, ^{23}Na, ^{31}P, ^{15}N, el más importante por su abundancia en los tejidos biológicos es el ^{1}H (protón). Los equipos de RMN constan básicamente de un imán, con sus dos polos magnéticos, polo Norte [N] y polo Sur [S], un emisor y un detector de radiofrecuencia. La secuencia de la **Figura** I.**8** es repetitiva, de manera que un experimento de RMN consiste en la aplicación sucesiva de pulsos de radiofrecuencia que conducen a la obtención de la señal final que se procesará para su análisis.

Cuando los núcleos se introducen en el campo magnético (B_0) aparece un vector de magnetización (M) orientado según la dirección del campo magnético, cuyo valor depende de la densidad de núcleos. Cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia (B_1) el vector M se desplaza del estado de equilibrio en la dirección del campo magnético. El vector M tiene dos componentes: magnetización longitudinal (Mz) y magnetización transversal (Mx,y) (**Figura** I.**9**).

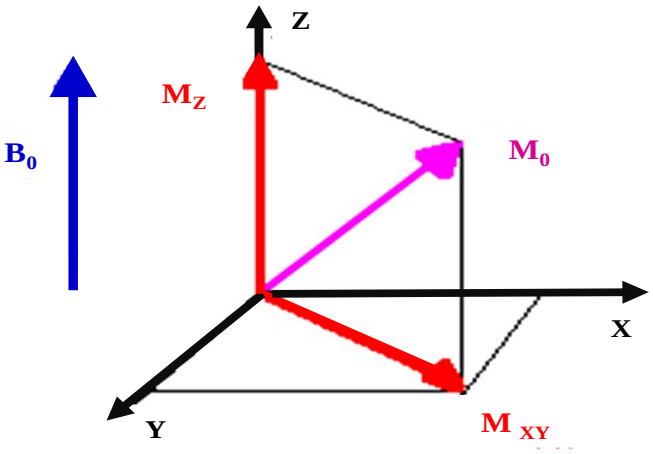


Figura I.**9.** Representación de la magnetización en el plano x, y, z (Herrera *et al*., 2006).

Durante el pulso de radiofrecuencia (B_1) todos los espines están en fase. Sin embargo, al retirar la energía, con el tiempo, se va perdiendo la coherencia, desfasándose progresivamente debido a las diferencias en los campos magnéticos que perciben los núcleos (**Figura** I.**10**). Los cambios físicos generados por el pulso vuelven a su estado inicial, mediante el proceso de relajación, que se verá muy influenciado por el entorno bioquímico en el que se encuentran los núcleos. La recuperación de la magnetización ocurre a nivel longitudinal y a nivel transversal.

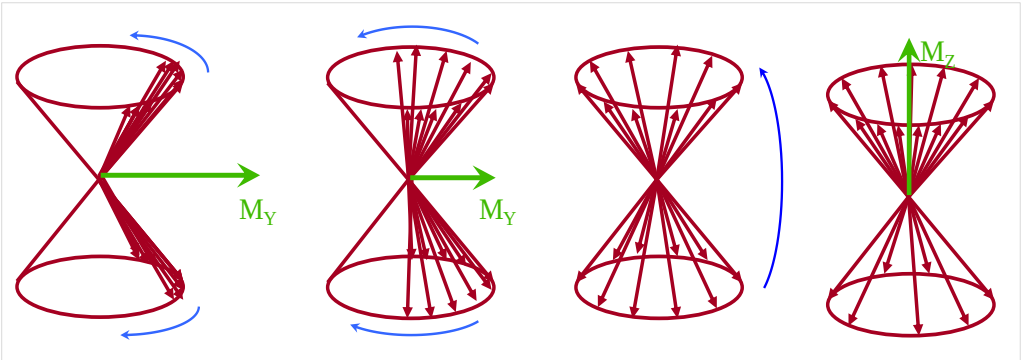


Figura I.**10**. Evolución de la proyección de los espines sobre el plano transversal después de un pulso de radiofrecuencia (Herrera *et al*., 2006).

a) *Relajación longitudinal:* los protones liberan progresivamente su exceso energético. Cuando el valor de la proyección sobre el eje longitudinal (M_z) sea idéntico al valor inicial de M, la relajación habrá terminado (**Figura** I.**11**). El estudio de la relajación longitudinal, M_z, informa acerca de la rapidez con la que se alcanza de nuevo el estado inicial. La relajación longitudinal tiene la forma de una exponencial creciente regulada por una constante de tiempo, que se suele expresar en milisegundos (ms), denominada

constante de relajación longitudinal T_1 (**Figura** I.**11**). Cuanto menor es el valor de T_1, más rápido se alcanza el estado de equilibrio, es decir, más rápida es la relajación.

b) *Relajación transversal*: las variaciones respecto al tiempo de la componente sobre el plano transversal x,y de la magnetización durante la relajación o relajación transversal ($M_{x,y}$) aportan información relacionada con la estructura bioquímica del medio (**Figura** I.**12**). La variación de la relajación transversal se representa por una exponencial decreciente regulada por la constante de relajación T_2 que se suele expresar en ms.

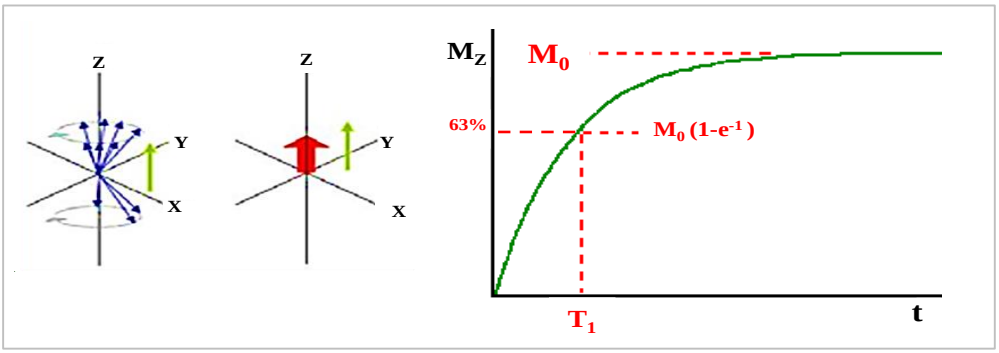


Figura I.11. Representación de la relajación longitudinal T_1 (Herrera *et al*., 2006).

A partir de diferentes secuencias de pulsos de radiofrecuencia, podemos obtener información acerca de la estructura de moléculas, biomoléculas o de la composición de tejidos.

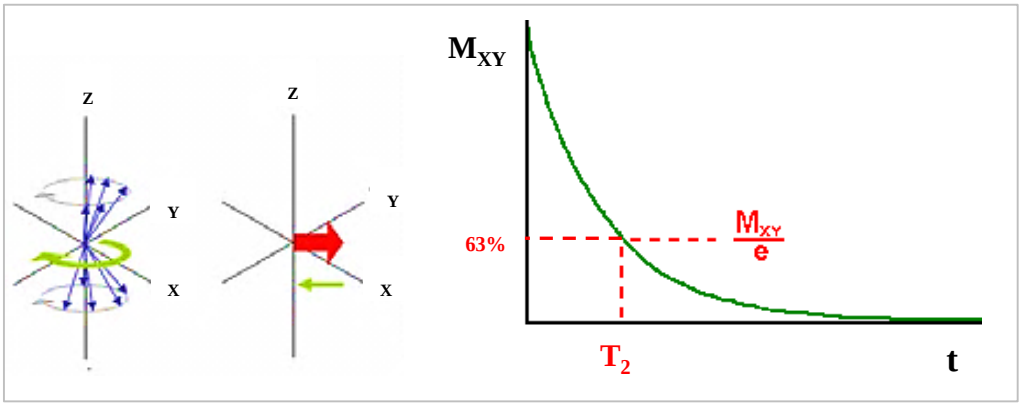


Figura I.**12**. Representación de la relajación transversal T_2 (Herrera *et al*., 2006).

I.3.2. Imagen de Resonancia Magnética (IRM)

La imagen por resonancia magnética (IRM o en inglés MRI por *Magnetic Resonance Imaging*) es una técnica no invasiva y no destructiva que proporciona información estructural del tejido biológico (Herrero *et al*., 2007). El uso de la RM permite la cuantificación de los parámetros de resonancia magnética como los tiempos de

relajación espín-red (T_1) y spín-spín (T_2), relación de transferencia magnética (MTR), y el coeficiente de difusión aparente (*CDA*). Estos parámetros son potencialmente sensibles a las variaciones locales de la movilidad del agua resultantes de la modificación de las interacciones de macromoléculas-agua y los cambios en la estructura del tejido.

En ciencia de los alimentos, la IRM permite obtener imágenes del interior de los alimentos. Además con estas imágenes se pueden cuantificar los parámetros de T_1, T_2 y *CDA* para obtener información acerca de varios procesos y propiedades del material, tales como la transferencia de calor, el contenido en grasa, la cristalización del hielo, la gelificación y la movilidad del agua. De esta manera, se han desarrollado varias aplicaciones de la IRM en los alimentos que permiten determinar la composición química, la estructura interna y distintas estimaciones de la calidad (McCarthy y Kauten, 1990; Schmidt *et al*., 1996; Altan *et al*., 2011). Como se ha comentado en el apartado anterior, la IRM se basa en los principios de resonancia magnética nuclear (RMN), en donde la relajación nuclear retorna al detector como una señal sinusoidal amortiguada o FID (*Free Induction Decay*). El uso de gradiente permite la localización espacial de la señal de RMN y por tanto la obtención de una imagen de RMN. En imagen de RMN la señal que se detecta se denomina ECO (**Figura** I.**13**).

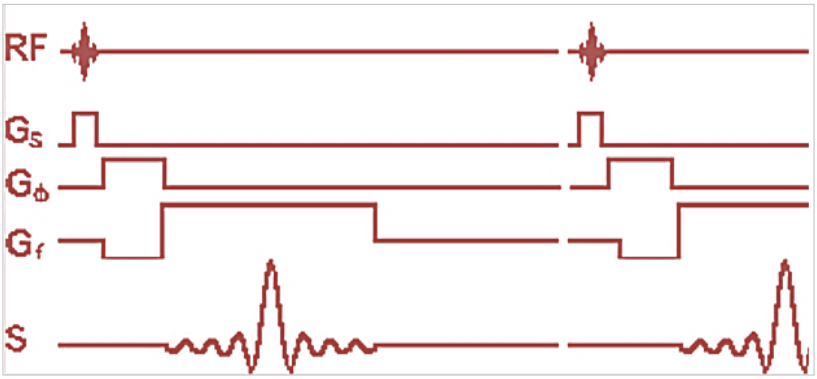


Figura I.**13.** Secuencia básica para la obtención de imágenes de RMN. RF: Pulso de radiofrecuencia, Gs: Gradiente de selección de corte o de slice, Gφ: Gradiente de fase, Gf: Gradiente de lectura o de frecuencia, S: señal (Herrera *et al*., 2006).

El conjunto de ECOs obtenidos durante el experimento se conoce como espacio K. A partir de los datos del espacio K, mediante un proceso matemático denominado transformada de Fourier, sensible a la amplitud, frecuencia y fase, se reconstruye sobre una escala de grises el valor de la señal en el píxel correspondiente (**Figura** I.**14**). El valor numérico de cada píxel se obtiene de la señal de la unidad de volumen elemental, vóxel (3D) (Fantazzini *et al*., 2009). La intensidad de la señal procedente de cada vóxel depende

de la concentración de núcleos de ^{1}H (densidad protónica), tiempos de relajación de las componentes longitudinal (constante de tiempo T_1) y transversal (constante de tiempo T_2) del vector de magnetización, así como del tipo de secuencia de pulsos y los parámetros utilizados (Mitchell *et al.*, 2001). De cada vóxel se puede obtener información sobre los parámetros ligados a la estructura y movilidad molecular (T_1 y T_2) y acerca de la velocidad aparente de difusión del agua [coeficiente de difusión aparente (CDA) o *ADC* por *Apparent Diffusion Coefficient*].

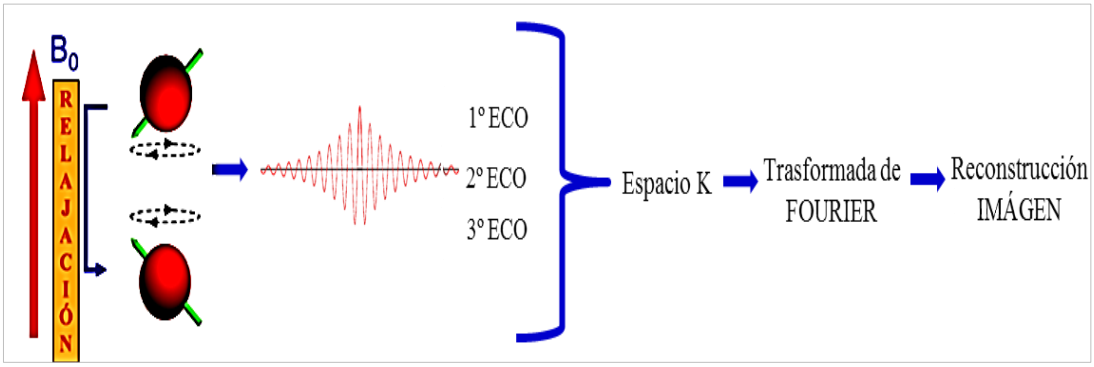


Figura I.**14**. Representación esquemática del proceso de obtención de una imagen de RMN (Herrera *et al.*, 2006).

I.3.3. Relaxometría de RMN

Los datos de la relajación nuclear se interpretan mediante la relaxometría de RMN. Esta técnica complementa a la IRM ya que se obtienen datos de los tiempos de relajación no descritos con los datos de imagen. Los valores de dichos tiempos se obtienen mediante el adecuado ajuste de la señal de resonancia a una curva exponencial, creciente en T_1 y decreciente en T_2. Mediante el ajuste puede obtenerse un valor medio de dichos tiempos cuando el ajuste se realiza a una función monoexpenencial, lo que, en combinación con la información espacial de la IRM, permite construir mapas de tiempos de relajación. Sin embargo, si el ajuste se realiza a una serie multiexponencial es posible la obtención de curvas de distribución de los tiempos de relajación T_1 y T_2 (Lopez-Arce *et al.*, 2010), lo cual aporta una información más exacta de dichos tiempos de relajación.

La **Figura** I.**15** muestra un ejemplo de la información del tiempo de relajación T_2 proporcionada por la IRM mediante el ajuste monoexponencial y por la relaxometría mediante un ajuste multiexponencial.

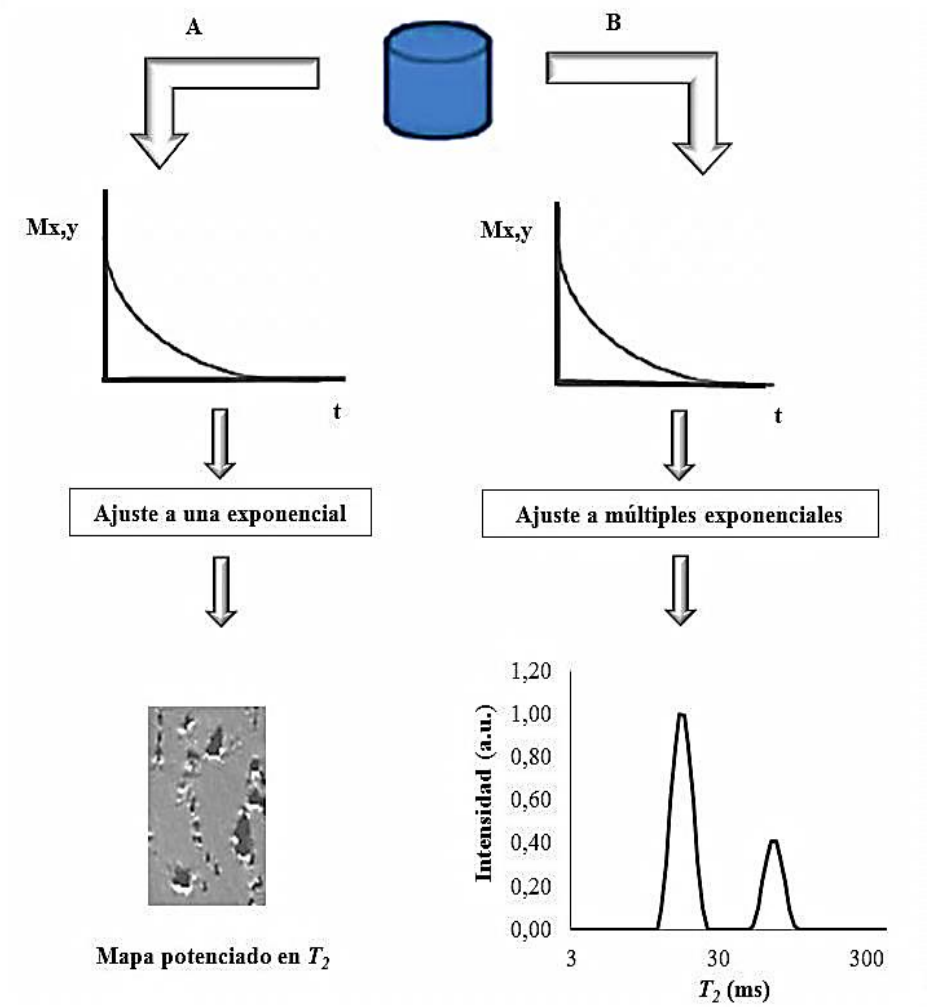


Figura I.**15.** Representación de la relajación de la magnetización transversal T_2. A: Mapa potenciada en T_2 proporcionada por la IRM. B: Distribución de los tiempos de relajación T_2 proporcionada por la relaxometría.

I.3.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón de alta resolución en ángulo mágico, *High- Resolution Magic Angle Spinning* (^{1}H-RMN/HRMAS)

La espectroscopía con ángulo mágico, *High-Resolution Magic Angle Spinning* (HRMAS), es una técnica utilizada para estudiar los compuestos móviles de muestras heterogéneas en estado semisólido (Keifer, 1997; Lippens *et al*., 1999; Elbayed *et al*., 2005; Ziarelli *et al*., 2012). Esta técnica posee un alto grado de reproductibilidad y su naturaleza no destructiva permitiría el estudio por microscopía de las muestras analizadas previamente por HRMAS y, por tanto, la comparación de datos espectroscópicos y morfológicos (Moestue *et al*., 2011).

La técnica HRMAS se basa en el método ángulo mágico *Magic Angle Spinning* (MAS) introducida por los autores Andrew y Newing (1958) y Lowe (1959) de manera independiente. Estos autores mostraron que si una muestra gira suficientemente rápido

(entre 4 y 6 kHz) alrededor en un ángulo de 54,7º con la dirección principal del campo magnético principal (B_0), se reduce la anchura de las señales detectadas en el espectro. Ello evita la pérdida de información causada por las interacciones dipolares, que son originadas por la heterogeneidad de las muestras y parámetros residuales anisotrópicos, que no pueden ser promediadas por el movimiento Browniano en una muestra sólida tal como se observarían en una muestra líquida.

El espectro de RMN depende fuertemente del entorno microscópico de los núcleos investigados. Así, en las diferentes moléculas estudiadas podemos tener interacciones dipolares (entre dos núcleos con momento magnético), anisotropía de desplazamiento químico (entre núcleo y nube electrónica) y, en caso de sólidos y semisólidos, interacciones quadrupolares. Si una muestra gira sobre su propio eje a altas velocidades manteniendo el ángulo mágico con B_0 (**Figura** I.**16**), las interacciones dipolo-dipolo se promedian resultando un valor cero, es decir, se anulan. Esto, desde un punto de vista práctico, lleva a la reducción de la anchura de banda efectiva de las resonancias a valores comparables a los obtenidos con muestra líquidas.

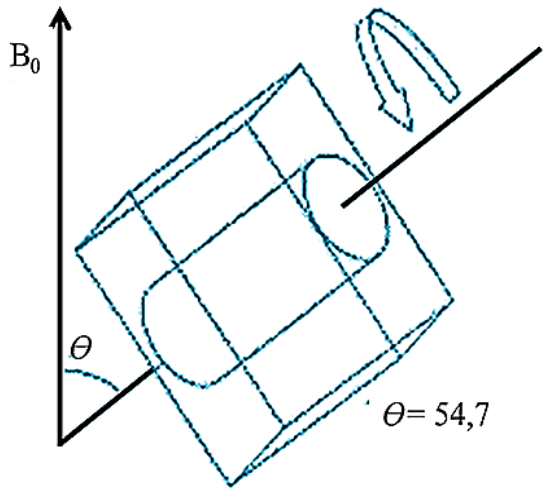


Figura I.**16.** Representación esquemática de la técnica de MAS. El eje de giro de la muestra está en un ángulo de 54,7 ºC (ángulo mágico) con respecto al campo magnético estático B_0

La espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS, por tanto, consiste en hacer girar una muestra a altas velocidades en un ángulo mágico de 54,7º con respecto al campo magnético externo (B_0) (**Figura** I.**16**). Las sondas de HRMAS (**Figura** I.**17**) han sido diseñadas para realizar experimentos mientras gira la muestra en el mencionado "ángulo mágico" y están ya doblemente (^{1}H y ^{13}C) o triplemente (^{1}H, ^{13}C y ^{15}N) sintonizadas a los rangos de

frecuencias de interés. Estas frecuencias de excitación / detección operan a través de una bobina solenoidal de transmisión / recepción localizada dentro de la turbina de giro del ángulo mágico.

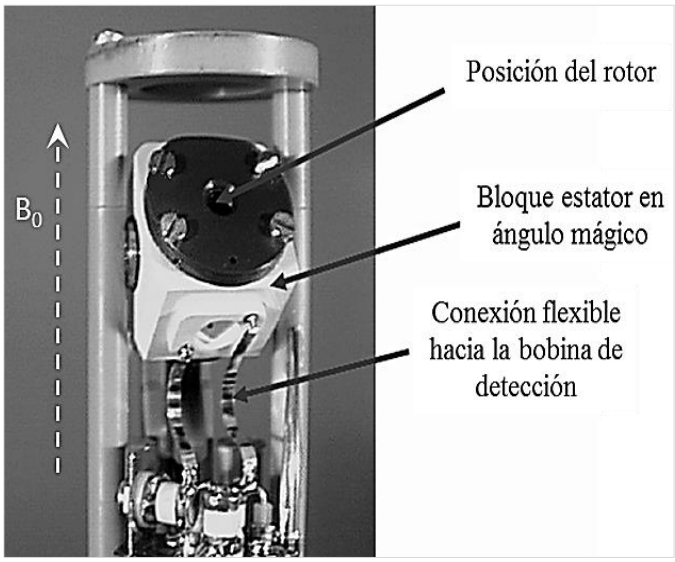


Figura I.**17.** Sonda HRMAS que se utiliza dentro del espectrómetro de RMN. El motor que contiene la muestra se encuentra en el bloque estátor inclinado en ángulo mágico de 54,7º con respecto a B_0 (Beckonert *et al*., 2010)

La técnica de HRMAS se lleva a cabo con una preparación mínima o sin preparación previa de la muestra evitando el paso de extracción de los metabolitos con agua o distintos disolventes orgánicos (Griffin *et al*., 200; Beckonert *et al*., 2010), siendo una técnica no destructiva (Andronesi *et al*., 2008). En comparación con las técnicas IMR y relaxometría que detectan la mayoría de los cambios estructurales o morfológicos, la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS es sensible a la química de las muestras y se puede utilizar para diferenciar los metabolitos, además aporta información de varios componentes en un mismo análisis. Debido a su alta resolución, ^{1}H-RMN/HRMAS es una herramienta útil en la explicación y la asignación del espectros *ex-vivo* (Andronesi *et al*., 2008). Ha sido utilizada en diferentes campos, pero en el de los alimentos apenas está siendo empleada. No obstante, existen algunos trabajos en matrices alimentarias como vegetales, frutas, pescado o carne (Castejón *et al*., 2010; Sánchez *et al*., 2010; Marcone *et al*., 2013).

I.4. Análisis metabolómico

Desde principios de la década de los noventa, ha ido emergiendo con fuerza la metabolómica. Esta ciencia estudia el conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico, por lo que la convierte en una herramienta fundamental en diferentes campos

tales como la fisiología vegetal, el estudio de enfermedades humanas, el descubrimiento de nuevos fármacos, la nutrición y la ciencia y tecnología de los alimentos (Schmidt, 2004).

El estudio de los alimentos y su bioactividad mediante técnicas masivas de análisis (genómica, proteómica y metabolómica) se ha definido recientemente como *foodómica* o *alimentómica* (García-Cañas *et al*., 2012). Esta disciplina pretende profundizar en cómo los alimentos repercuten en la prevención o la evolución de las enfermedades. La metabolómica permite abordar de forma global estudios acerca de los aspectos esenciales de los alimentos como su seguridad, calidad y trazabilidad. La detección de nuevos contaminantes, la determinación de modificaciones en alimentos transgénicos y la definición de nuevos biomarcadores de la calidad de los alimentos (Cifuentes, 2013).

Los metabolitos son definidos como aquellas moléculas de bajo y medio peso molecular (< 1.500 Dalton) que intervienen en los procesos celulares y revelan cómo está funcionando el metabolismo de un ser vivo, de un órgano determinado u otro sistema biológico. Cuando se hace referencia a los metabolitos se incluyen azúcares, aminoácidos, lípidos, etc.

Las ómicas son ciencias holísticas, es decir, consideran el mayor número de variables posibles, para posteriormente extraer la información verdaderamente útil de ellas y trabajar en su conjunto. En el caso de la metabolómica, el objetivo inicial es analizar el máximo número de metabolitos posible y seleccionar los que verdaderamente aportan información, a partir de algoritmos del procesado de las señales adquiridas.

Antes de empezar un estudio metabólico, en función del conocimiento previo disponible acerca del problema biológico/bioquímico y de la información que se quiera obtener del estudio, se seleccionará el tipo de análisis metabolómico más apropiado. En aquellos casos en los que se conozca el número y tipo de metabolitos de interés, se puede realizar una aproximación dirigida. Por el contrario, en los casos en los que no se tenga información previa de los metabolitos que puedan estar implicados en el proceso biológico/bioquímico estudiado, se llevaran a cabo aproximaciones no-dirigidas. En función del enfoque analítico utilizado, los estudios metabolómicos se pueden clasificar en análisis dirigidos (*Target*) o no dirigidos (*Untarget*) (Fiehn, 2002; Laghi *et al*., 2014).El primero de ellos, Se trata de un tipo de análisis diana restringido al estudio de un número limitado de metabolitos seleccionados en función de conocimientos previos a la realización del estudio metabolómico y constituye una de las aproximación analítica más empleadas en

metabolómica. Por tanto, en este tipo de análisis se puede particularizar el tratamiento de una muestra y utilizar la técnica de medida más conveniente para identificar y cuantificar los compuestos seleccionados en el estudio (Mannina *et al*., 2009). En el análisis no dirigido, se pretende determinar simultáneamente tantos metabolitos como sea posible para obtener una visión global del problema de interés. En este caso no se parte de ninguna información previa sobre qué metabolitos pueden estar alterados, lo cual implica que para obtener la información necesaria se procede de manera completamente diferente a los estudios dirigidos de metabolómica. Dado que para la aproximación no dirigida no se posee información de antemano del problema que se plantea, en este caso es particularmente importante desarrollar un estudio experimental muy detallado para poder detectar el máximo número posible de metabolitos sin introducir ningún sesgo debido ya sea a condiciones experimentales o de medida de las muestras (Tautenhahn et al., 2012).

Algunas particularidades de cada una de las técnicas de RMN utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, así como el análisis metabolómico aplicado, se concretan en los trabajos que constituyen el Apartado IV.

I.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La posibilidad de observar la imagen de la microestructura de muestras íntegras en sus tres dimensiones se hizo posible con la aparición del microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM, por *Scanning Electron Microscope*) en el año 1965, aunque los conceptos básicos para este tipo de microscopía ya habían sido establecidos por Knoll en 1935. Desde entonces, la MEB ha avanzado vertiginosamente convirtiéndose en una poderosa herramienta que permite la caracterización estructural de diversos tipos de materiales. Actualmente, se utiliza con frecuencia en Ciencia y Tecnología de Alimentos para observar, analizar y explicar fenómenos que ocurren a nanoescala. Las imágenes obtenidas permiten la visualización directa de la estructura de la muestra, aportando información acerca de las características morfológicas y topográficas detalladas de las superficies. Por ello, es muy útil para estudiar los cambios de la microestructura en la matriz del queso durante la maduración. En este sentido, se han hecho estudios relacionados con la influencia de la microestructura en el comportamiento reológico y la calidad sensorial del queso (Everett y Auty, 2008), así como de los cambios morfológicos asociados a la actividad proteolítica (Fallico *et al*., 2006) o a la fusión de la matriz durante su calentamiento (Lee *et al*., 2003).

I.5.1. Bases del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido y detectores utilizados

La MEB se basa en la emisión de un haz de electrones por un cátodo de tungsteno y en su paso a través de una cámara en la que previamente se ha hecho el vacío (entre 10^{-2} y 10^{-5} Pa). En ella, el haz inicial se concentra merced a una serie de lentes electromagnéticas de forma que su diámetro va disminuyendo (**Figura** I.**18**).

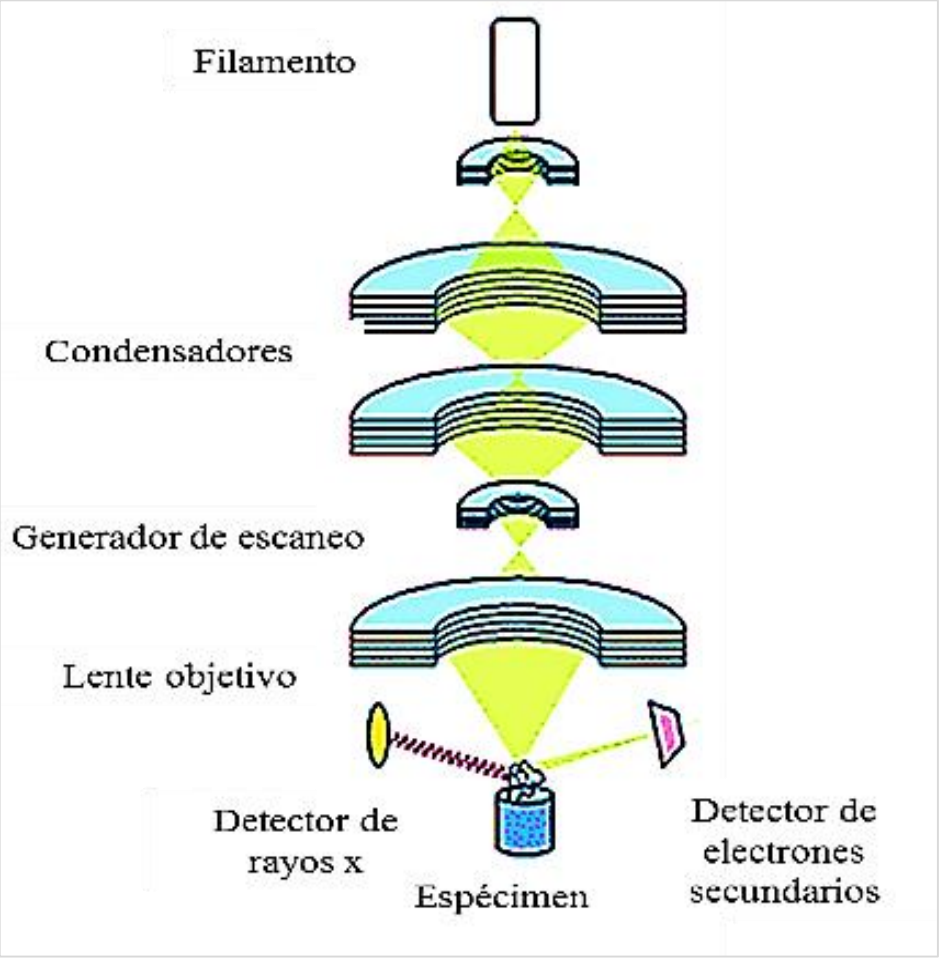


Figura I.**18**. Esquema de un microscopio electrónico de barrido.
(Adaptado de Skoog *et al*., 2001).

Este haz electrónico concentrado (con energías desde unos cientos de eV hasta 50 KeV) se desplaza sobre la superficie de la muestra a analizar con continuas idas y venidas. Este movimiento de barrido del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas. En la interacción del haz electrónico con la superficie se producen electrones secundarios y electrones retrodispersados que contribuyen a la amplificación de la corriente. Estos electrones, finalmente, son conducidos a un detector que permite la posterior representación gráfica en forma de imagen. Existe una correspondencia biunívoca (punto a

punto) entre la muestra a examinar y la imagen formada, la cual informa sobre la apariencia tridimensional del material en estudio. La técnica requiere la preparación previa de la muestra. Para ello, primero es necesaria su deshidratación, después puede recubrirse con una fina capa de carbono (en el caso de realizarse un análisis por rayos X) y finalmente, para hacerla conductora, con un metal pesado, como el oro.

Para la obtención de imágenes de MEB pueden utilizarse tres tipos de detectores: de electrones secundarios, de electrones retrodispersados y de energía dispersiva.

El primero de ellos, permite obtener imágenes de alta resolución (Secundary Electron Image, SEI) que se producen por choques inelásticos de los electrones cuando uno de ellos pasa muy cerca del núcleo de un átomo de la muestra, proporcionando la suficiente energía a uno o varios de los electrones interiores para desplazarse fuera de la muestra. Estos electrones son de muy baja energía (por debajo de 50 eV), por lo que deben encontrarse muy cerca de la superficie para poder liberarse. La imagen que se obtiene es tridimensional y aporta amplia información topográfica de la muestra, por lo que es el tipo de imagen de microscopía más utilizada.

El detector de electrones retrodispersados permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie (*Backscattered Electron Image*, BEI). Los electrones retrodispersados se producen cuando un electrón del haz colisiona con el núcleo de un átomo de la muestra, siendo repelido (reflejado) en sentido contrario, es decir, hacia fuera de la muestra. Se trata de una respuesta a colisiones elásticas. La intensidad de dicho efecto varía proporcionalmente con el número atómico de la muestra, así los átomos más pesados producen mayor cantidad de electrones retrodispersados. Por esta razón, se utilizan para obtener información sobre la composición superficial de la muestra. La intensidad de ambas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir, depende de la topografía de la muestra.

Finalmente, el detector de energía dispersiva (Energy Dispersive Spectrometer, EDS) analiza los rayos X emitidos por pequeñas áreas (1 mm^2) de la muestra cuando el haz de electrones incide sobre ellas. Este detector permite realizar diversos análisis cualitativos de los constituyentes mayoritarios y minoritarios, y aporta información de la distribución de elementos. La precisión de un análisis cuantitativo, normalmente, es mayor del ± 2% y los límites de detección están alrededor de las 100 ppm en análisis rutinarios, llegando a ser de 10 ppm en circunstancias excepcionales.

I.6. Análisis reológico

La *reología* es la ciencia que estudia la deformación de los materiales sometidos a la acción de fuerzas externas (Bird, 1998). Robert Hooke en 1678 fue el primero en utilizar este término en su obra "Verdadera teoría de la elasticidad". De una forma genérica, puede decirse que la reología se ocupa de estudiar el flujo de los líquidos y la deformación de los sólidos.

I.6.1. Características reológicas, mecánicas y de textura

Durante décadas, los estudios reológicos se reducían a aplicar las leyes de Newton para líquidos y la de Hooke para sólidos. Ambas leyes definen dos modelos ideales de comportamiento: el sólido elástico de Hooke y el fluido viscoso newtoniano, a los cuales se acercan, en mayor o menor grado, muchos materiales. Sin embargo, en el ámbito tecnológico, y en la industria alimentaria en particular, la mayoría de las matrices presentan un comportamiento que no puede discriminarse de una forma tan definida.

Las principales características reológicas son la elasticidad (propiedad de un material por la que recupera parcial o totalmente su forma y dimensiones originales, al cesar la acción de una fuerza externa), la viscosidad (resistencia a fluir de un material) y la plasticidad (facultad de un material de ser moldeado por encima del esfuerzo que produce la fluencia pudiendo retener la forma bajo fuerzas finitas). La mayor parte de los comportamientos de los materiales pueden expresarse en función de estas tres características. La viscosidad es el principal componente del comportamiento de los fluidos. En los sólidos intervienen sistemáticamente fenómenos elásticos y plásticos (comprendiendo la ductibilidad y la maleabilidad), siendo la viscosidad el carácter más difícil de observar (Rao y Steffe, 1992; Rosenthal, 1999; Bourne, 2002).

El estudio del comportamiento reológico es esencial en numerosos campos, incluido el de los alimentos. Su análisis comprende las propiedades mecánicas y está íntimamente relacionado con la textura del alimento. De forma general, podría decirse para un material dado al que se aplica una determinada fuerza, que las propiedades mecánicas se limitan a su respuesta ante dicha fuerza, la reología explica su deformación y flujo, y la textura se ciñe a las impresiones sensoriales percibidas en la boca. Por tanto, las propiedades mecánicas, entre las que se encuentran la tenacidad, la dureza y la fragilidad, dependen de la resistencia de un material frente a la aplicación de distintas fuerzas (tracción, compresión, impacto, etc.), y la textura es una sensación subjetiva provocada por

el comportamiento mecánico y reológico del alimento durante la masticación y la deglución. En conjunto, el comportamiento reológico está condicionado por las características físicas del material, que en último lugar dependen de la estructura del mismo.

Los alimentos, debido a la complejidad estructural que presentan, responden de forma muy diferente frente a una determinada fuerza externa. En líneas generales, los alimentos sólidos se deforman irreversiblemente e incluso pueden llegar a quebrarse, como el turrón o las patatas fritas, los cuales rompen bruscamente ante la aplicación de fuerzas más o menos elevadas. Sin embargo, la mayoría de los alimentos sólidos sólo se deforman en mayor o menor grado antes de quebrarse (sólidos elásticos). Respecto a los alimentos fluidos, de forma habitual (Muller, 1973) se clasifican básicamente en alimentos newtonianos (ejemplo: agua, leche, aceite vegetal, etc.) y no newtonianos (como margarinas, puré de frutas, etc.), según se ajusten o no a la ley de la viscosidad de Newton [fluidos no newtonianos independientes del tiempo (pseudoplásticos, dilatantes, plásticos de Bingham y generales o de Herschel-Bulkley) y dependientes del tiempo (fluidos reopécticos y tixotrópicos)].

Algunos materiales, primero se deforman y luego fluyen (Muller, 1973). Se habla entonces de viscoelásticos, con un comportamiento reológico inicial de sólidos elásticos y final de cualquiera de los fluidos indicados. Existen varios alimentos que presentan propiedades viscoelásticas; en general, son geles o productos semisólidos, como el almidón, la gelatina, algunos derivados lácteos y los quesos blandos, crema de leche, helados, fideos cocidos, masa de harina de trigo, espumas de proteína, entre otros productos.

I.6.2. Comportamiento reológico de los alimentos sólidos

Un alimento sólido, al igual que cualquier otro material, por la acción de fuerzas externas experimenta una deformación que se verá controlada por el esfuerzo de éste para retener las condiciones iniciales. Las fuerzas exteriores (cargas), por tanto, originan fuerzas interiores (esfuerzos) en el material en el que se aplican. Resumidamente, puede decirse que la resistencia a la deformación depende de la cohesión molecular y de la estructura interna del material. Toda carga modifica las distancias intermoleculares de un cuerpo sólido. Por ello, la deformación se define como todo cambio en el estado de agregación molecular de un cuerpo motivada por la acción de una fuerza capaz de modificar las

fuerzas de cohesión propias. La deformación de un material se expresa como cambios de forma, volumen o de ambos, resultantes de las modificaciones de las distancias relativas entre puntos del mismo.

En los sólidos, las posiciones relativas de las moléculas entre sí se mantienen en virtud de ciertas fuerzas interiores que se oponen a los cambios de posición de las partículas que los componen, conservando así su forma. La tensión (σ) es el esfuerzo específico que tiende a equilibrar una fuerza externa (F) referido a la unidad de área o sección (S) y puede expresarse como σ = F/S. El proceso se recoge en las denominadas curvas de tensión - deformación.

Como se ha mencionado, los sólidos responden a las fuerzas externas con deformaciones elásticas (reversibles), inelásticas (permanentes) o con fracturas. Se dice que un material elástico es isótropico cuando presenta iguales respuestas reológicas en todas direcciones. La mayor parte de los alimentos no entran en esta categoría sino que son anisótropicos, ya que las condiciones de elasticidad varían según la dirección en que se producen las deformaciones. En general, el comportamiento reológico y mecánico de las materias primas y de los productos derivados ha de considerarse en todas las etapas vinculadas al control de calidad, procesado y comercialización de los alimentos, lo que implica la necesidad de conocer aspectos tan diversos como el adecuado diseño de los equipos, la elección de distintos sistemas operativos o la selección de un material de envase.

I.6.3. Métodos de estimación de propiedades reológicas y de textura

Dada la relación entre las propiedades reológicas y de textura, existe una fuerte cercanía entre los métodos instrumentales utilizados para su estimación. Para conocer el comportamiento de un material, éste se somete a ensayos en los que se aplican distintas fuerzas externas de modo que pueda estudiarse su respuesta bajo diferentes condiciones. Según la dirección de las fuerzas aplicadas, se producen diferentes casos de solicitación. Así se habla de solicitaciones normales (uniaxiales) cuando la fuerza actúa perpendicularmente a la sección del material y se denominan tangenciales cuando la fuerza actúa en un plano tangente a la sección. El estado de solicitación puede ser simple, producido por una fuerza (de tracción, compresión o corte), por pares de fuerzas (flexión, torsión) o compuesto por combinación de solicitaciones simples (flexión-corte, tracción-compresión, etc.). El uso de la tracción y/o compresión son habitualmente

utilizadas en el análisis de materiales. En estos ensayos, las fuerzas normales exteriores, de igual magnitud, dirección y sentido contrario, tienden a estirar (tracción) o a prensar (compresión) el material según el eje en el que actúan. En ambos casos, se presenta un esfuerzo uniaxial, es decir, perpendicular al plano sobre el que se aplica la fuerza de tracción o compresión. En la tracción, la carga tiende a separar dos secciones próximas y, por tanto, la deformación característica es el alargamiento en la dirección de la carga ($\varepsilon = \Delta l/l$, siendo l la longitud inicial y Δl la deformación absoluta) y la reducción de la sección.

En la compresión, sin embargo, la carga tiende a acercar dos secciones próximas, disminuyendo la distancia intermolecular. La deformación característica es el acortamiento longitudinal del cuerpo, aumentando la sección transversal. Los resultados suelen recogerse en curvas de tensión-deformación (σ- ε). Además, en el estudio de los materiales puede registrarse su comportamiento ante ciertas cargas y su recuperación (carga-descarga) y su posterior solicitación (curvas de carga-descarga-recarga), así como la evolución de la deformación o la tensión en el tiempo (t) de aplicación de una cierta carga (ε- t y σ-t).

La realización de ensayos para determinar el comportamiento mecánico o reológico de alimentos requiere considerar el carácter heterogéneo de muchos de ellos y la posible anisotropía del producto ensayado, lo que obliga a que, en la mayoría de los casos, el estudio tenga que realizarse con un elevado número de muestras y haya que cuidar la elección y preparación de las mismas. Muchos materiales se caracterizan por su resistencia a la tracción (alargamiento) mientras que otros son más resistentes a la compresión (acortamiento). Por otra parte, en las muestras a ensayar deben fijarse la geometría y dimensiones para que los resultados obtenidos puedan compararse y puedan repetirse el estado de solicitación y las condiciones de deformaciones y tensiones generales (Honikel, 1998).

Se ha desarrollado un considerable número de métodos instrumentales para la determinación de las propiedades reológicas y mecánicas de materiales sólidos. En relación con la forma de solicitación, se distinguen los siguientes ensayos mecánicos: (1) de tracción, que aportan información de la tenacidad (resistencia a la rotura, es decir, capacidad de absorción de energía antes de la fractura) y de la elasticidad de un material, (2) de dureza, que permiten conocer el grado de dureza del material (resistencia que un material sólido opone a la penetración o en general a la deformación), (3) de impacto o choque, cuya práctica permite conocer la fragilidad (falta de tenacidad y de plasticidad) y

(4) tecnológicos, que ponen de manifiesto las características de plasticidad que posee un material para poder moldearlo, doblarlo, embutirlo, etc.

La textura de un alimento se define como el conjunto de atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto, perceptibles mediante receptores mecánicos, táctiles y, si es apropiado, visuales y auditivos (ISO 5492-1992). La textura es una de las características sensoriales más valoradas por el consumidor (Bourne, 2002) y juega un importante papel en el establecimiento de preferencias individuales por determinados alimentos. En este sentido, pequeñas diferencias de textura entre productos similares pueden ser determinantes en el grado de aceptación del alimento por el consumidor.

En un sentido estricto, la textura debería determinarse mediante técnicas sensoriales por catadores entrenados o no. No obstante, también puede evaluarse mediante técnicas instrumentales (Bourne, 2002; Kilcast, 2004) basadas en el comportamiento mecánico. Sin embargo, puesto que se trata de métodos indirectos, sus resultados tienen sentido sólo si se puede demostrar su relación conceptual y estadística con los obtenidos mediante análisis sensoriales. Se han desarrollado distintos métodos de esta naturaleza, que pueden agruparse en tres categorías: fundamentales (miden propiedades mecánicas concretas y están poco relacionados con características sensoriales), empíricos (miden parámetros no bien definidos por penetración, cizalla, compresión, extrusión, corte, flujo, mezcla, etc.) e imitativos (simulan las fuerzas y las deformaciones que se producen durante la manipulación del producto). La textura también se ha evaluado, con mayor o menor éxito, por métodos químicos (Lewis, 1993), microscópicos (estudiando la estructura del producto) y fisiológicos (por evaluación, durante la masticación, de la actividad muscular, sonido producido, etc.) (Varela *et al*., 2008) y por ultrasonidos (Llull *et al*., 2002).

I.6.3.1. Análisis del perfil de textura (TPA)

Entre los métodos instrumentales empleados para la determinación de la textura, el más extendido es, sin duda, el ensayo de imitación de doble compresión denominado Análisis del Perfil de Textura o TPA (*Texture Profile Analysis*). Diversos estudios (Bourne 1982; Honikel, 1998) recogen su empleo en una amplia gama de alimentos, junto con las condiciones de ensayo. El éxito de este método se debe a que proporciona datos del comportamiento mecánico (dureza, cohesividad, viscosidad, elasticidad, adhesividad, fracturabilidad, masticabilidad y gomosidad) que pueden relacionarse de forma razonablemente precisa con el proceso de masticación (Bourne, 1978, 1982, 2002) y con la

percepción sensorial. En la boca, el alimento se somete fundamentalmente a fuerzas de compresión (entre los dientes y lengua y paladar), penetración y corte (dientes). A este respecto, analizadores de textura, como el texturómetro de General Foods o de ensayo universal Instron, se diseñaron para simular el proceso de masticación (Szczesniak, 1963; Bourne, 1978, 1982). En la actualidad, con esta concepción, se encuentran distintos equipos o texturómetros. Estos equipos permiten un estudio amplio del comportamiento de los materiales ante distintas solicitaciones. En el TPA, la masticación se imita sometiendo las muestras generalmente a dos ciclos de compresión-descompresión sucesivos. El comportamiento de la muestra se recoge en gráficas en las que se relaciona la fuerza aplicada y el tiempo de ensayo (**Figura** I.**19**).

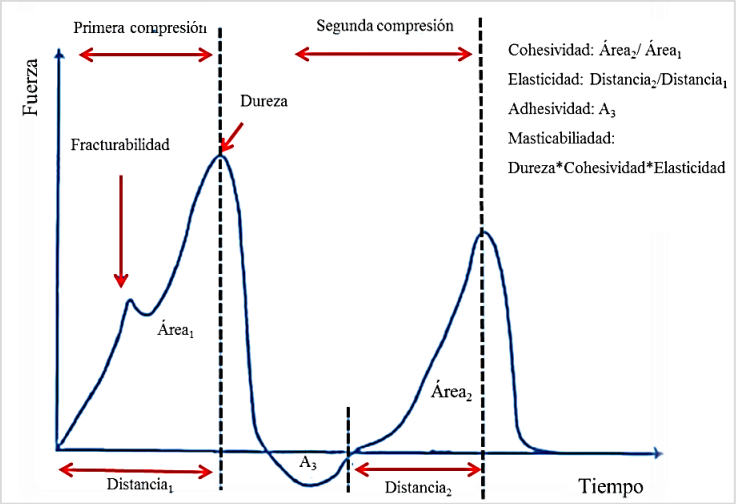


Figura I.19. Gráfica característica del análisis de perfil de textura (TPA) y principales parámetros que se obtienen.

Los parámetros de compresión obtenidos mediante la realización del ensayo de TPA se han utilizado ampliamente en diversos alimentos (quesos, cárnicos, ovoproductos, etc.) como indicadores de la calidad del producto final, así como para la selección de ingredientes, mejora de formulaciones o establecimiento de condiciones de procesado (Bruna *et al*., 2000; Gimeno *et al*., 2000; de la Hoz *et al*., 2004).

En la presente Tesis Doctoral se ha recurrido a la aplicación de fuerzas de tracción y de penetración para determinar el comportamiento mecánico de películas comestibles. En el caso del análisis de la textura de los quesos, se utilizó el método de imitación de la masticación basado en la aplicación de fuerzas de compresión denominado TPA. En ambas matrices se estudiaron las características estructurales mediante relaxometría de RMN (en películas), MEB e IRM (en quesos) y su relación con el comportamiento reológico.

I.6. Bibliografía

Addis, M., Piredda, G., and Pirisi, A. (2008). The use of lamb rennet paste in traditional sheep milk cheese production. *Small Ruminant Research*, 79:2-10.

Ahmad, S., Gaucher, I., Rousseau, F., Beaucher, E., Piot, M., and Grongnet, J.F. (2008). Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. *Food Chemistry*, 106:11-17.

Ako, K. (2015). Influence of elasticity on the syneresis properties of -carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*,115:408-414.

Alais, Ch. 1985. Ciencia de la leche. Reverté, S.A. Barcelona, España. p. 873.

Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M.J., and Juarez, M., 1999. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched chain, and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 82:878-884.

Alonso-Salces, R.M., Holland, M.V., Moreno-Rojas, J.M., Mariani, C., Bellan, G., and Reniero, F. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, 118:956-965.

Altan, A., Oztop, M.H., McCarthy, K.L., and McCarthy, M.J. (2011). Monitoring changes in feta cheese during brining by magnetic resonance imaging and NMR relaxometry. *Journal of Food Engineering*, 107:200-207.

Andrew, E.R., and Newing, R.A. (1958). The Narrowing of Nuclear Magnetic Resonance Spectra by Molecular Rotation in Solids. *Proceedings of the Physical Society*, 72:6.

Andronesi, O.C., Mintzopoulos, D., Struppe, J., Black, P.M., and Tzika, A.A .(2008). Solid-state NMR adiabatic TOBSY sequences provide enhanced sensitivity for multidimensional high-resolution magic-angle-spinning ^{1}H MR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 193:251-258.

Antequera, T., Caro, A., Rodriguez, P.G., and Pérez-Palacios, T. (2007). Monitoring the ripening process of Iberian Ham by computer vision on magnetic resonance imaging. *Meat Science*, 76:561-567.

Awad, S., Lüthi-Peng, Q., and Puhan, Z. (1998). Proteolytic activities of chymosin and porcine pepsin on buffalo, cow, and goat whole and β-casein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:4997-5007.

Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Vinás, L., and Cabezas, L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17:249-255.

Banerjee, R., Chen, H., and Wu, J. (1996). Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. *Journal of Food Science*, 61:824-828.

Beckonert, O., Coen, M., Keun, H. C., wang, Y., Ebbels, T.M.D., Holmes, E., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (2010). High-resolution magic–angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols*, 5:1019-1032.

Belton, P.S., Delgadillo, I., Holmes, E., Nicholls, A., Nicholson, J.K., and Spraul, M. (1996). Use of high-field ^{1}H NMR spectroscopy for the analysis of liquid foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:1483-1487.

Bertram, H.C., Purslow, P.P., and Andersen, H.J. (2002). Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:824-9.

Bird, R.B., Stewart, W.E., and Lightfoot, E.N. (1998). Fenómenos de transporte.(Ed): Reverté, Barcelona-España, pp.1-10.

Boletín Oficial de Castilla y León (BOCyL). 2010, número 70. Orden AYG/473/2010, pp. 32379.

Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32:62-72.

Bourne, M.C. (1982). Effect of temperatura on firmnessof raw fuits and vegetables. *Journal of Food Science*, 47:440-444.

Bourne, M.C. (2002). Principles of objective texture measurement. In: *Food texture and viscosity: Concept and measurement*. (Ed): Elsevier, San Diego-USA, pp. 107-188.

Brandenburg, A.H., Weller, C.L., and Testin, R.F. (1993). Edible films and coatings from soy protein. *Journal of Food Science*, 58:1086-1089.

Brault, D., D'Aprano, G., and Lacroix, M. (1997). Formation of free-standing sterilized edible films from irradiated caseinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:2964-2969.

Bruna, J.M., Fernández, M., Hierro, E.M., Ordoñez, J.A., and de la Hoz, L. (2000). Combined use of pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science*, 54:135-145.

Burgain, J., Scher, J., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Cailliez-Grimal,C., Corgneau, M., Francius, M., and Gaiani, C. (2014). Significance of bacterial surface molecules interactions with milk proteins to enhance microencapsulation of Lactobacillus rhamnosus GG. *Food Hydrocolloids*, 41:60-70.

Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E.T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67:833-848.

Caplice, E., and Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50:131-149.

Castejón, D., Villa, P., Calvo, M., Santa-María, G., Herraiz, M., and Herrera, A. (2010). ^{1}H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (Salmo salar). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48:693-703.

Cernadas, E., Rodriguez, P.G., Muriel, E., and Antequera, T. (2005). Analyzing Magnetic Resonance images of Iberian Loin to predict its sensorial characteristics. *Computer Vision and Image Understanding*, 98:345-361.

Cerqueira, M.A., Lima, A.M., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Moreira, R.A., and Vicente, A.A. (2009). Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:1456-1462.

Cerqueira, M.A., Sousa-Gallagher, M.J., Macedo, I., Rodriguez-Aguilera, R., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., and Vicente, A.A. (2010).Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of «Regional» cheese. *Journal of Food Engineering*, 97:87-94.

Chamba, J.F., Duong, C., Fazel, A., and Prost, F. (1994). Sélection des souches de bactéries actiques. In: De Roissart, H. and Luquet, F.M. Bactéries lactiques. (Ed): Lorica-France, pp. 499-521.

Chambi, H., and Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39:458-466.

Chen, F.L., Wei, Y.M., and Zhang, B. (2010). Characterization of water state and distribution in textured soybean protein using DSC and NMR. *Journal of Food Engineering*, 100:522-526.

Cifuentes, A. (2013). Foodomics: Advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition Vol.52.. (Ed):John Wiley and Sons, Nueva York-USA.

Cogan, T.M. and Daly, C. (1987). Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. General aspects: Cheese: chemistry, physics and microbiology, Vol. 1. (Ed): Elsevier Applied Science Publishers. Essex-Inglaterra, pp. 179-249.

Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., and Fernandes, I. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64:409-421.

Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., and Rodríguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64:409-421.

Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., and Wilkinson, M.G. (2004). Lipolysis and Catabolism of Fatty Acids in Cheese. In: Fox, P.,. McSweeney, P., Cogan, T., y Guinee, T. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp. 373-389.

Crabbe, M.J.C. (2004). Rennets: General and Molecular Aspects. In: Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., and Guinee, T. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp. 19-45.

Creamer, L.K, and Olson N.F (1982). Rheological Evaluation of Maturing Cheddar Cheese. *Journal of Food Science*, 47:631-638.

Curtin A.C., and McSweeney, P.L.H. (2004). Catabolism of Amino Acids in Cheese during Ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, General Aspects,3rd. (Ed.): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp. 435-454.

Dalgleish, D. G. (1993). The enzimatic coagulationof milk, In: Fox, P.F. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, 2nd. (Ed.): Chapman y Hall, London-UK, pp. 69-140.

Dangaran, K., and Tomasula, P.M., Qi, P. (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. In: Embuscado, M.E., Huber, K.C. Edible films and coatings for food applications.(Ed): Springer, New York-USA, pp. 25-56.

de la Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, M.I., and Ordoñez, J.A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and α-tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67:485-495.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A., and Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38:299-313.

Dejmek, P and Walstra, P. (2004). The syneresis of rennet-coagulated curd. In: Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., and Guinee, T. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp: 71-103.

Di Pierro, P., Chico, B., villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A.E., Masi, P., and Porta, R. (2006). Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7:744-749.

Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L., and Porta, R. (2011). Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 44:2324-2327.

Di Pierro., P., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L., Masi, P., and Porta, R. (2005). Solubility and permeability properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Food Biotechnology* 19:37-49.

Directive 94 /62/ CE. (2002). On packaging and packaging waste:Consultation paper on proposed Directive targets from 2006. http://www.gov.scot/Publications/2002/04/14516/2720

Dolatowski, Z.J., Stanik, J., and Stasiak, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum-Tecnologia Alimentaria*, 6:89-99.

Dumont, J.P., and Adda, J. (1978). Flavour formation in dairy products. In: Land, D.G. and Nursten, H.E. Progress in Flavour Research. (Ed): Applied Science Publ. Ltd, Londres-Inglaterra, pp. 254-255.

Eck, A. (1989). El queso. (Ed): mega S.A, Barcelona-España, pp: 499-521.

Eck, A. (1990). El queso. (Ed): Acribia, Zaragoza-España.

El-Bakry, M., and Sheehan, J. (2014). Analysing cheese microstructure: A review of recent developments. *Journal of Food Engineering*, 125:84-96.

Elbayed, K., Dillmann, B., Raya, J., Piotto, M., and Engelkec, F. (2005). Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 174:2-26.

Eskin, N.A., and Goff, H.D. (2013). Milk. In: Eskin, N.A., and Shahidi, F. Biochemistry of Foods 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam- Netherlands, pp 187-214.

Everard, C.D., O'Callaghan, D.J., Mateo, M.J., Castillo, M., Payne, F.A., and O'Donnel, C.P. (2009). The use of colour parameters derived from an online fibre-optic sensor to monitor curd syneresis during cheese making. *Journal of Food Engineering*, 94:1-6.

Everett, D.W., and Auty, M.A.E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*. 18:759-773.

Fallico, V., Tuminello, L., Pediliggieri, C., Horne, J., Carpino, S., and Licitra, G. (2006). Proteolysis and Microstructure of Piacentinu Ennese Cheese MadeUs ing Different Farm Technologies. *Journal of Dairy Science*, 89:37-48.

Fantazzini, P., Gombia, M., Schembri, P., Simoncini, N., and Virgili, R. (2009). Use of magnetic resonance imaging for monitoring parma dry-cured ham processing. *Meat Science*, 82:219-27.

Federación Castellano Leonesa de Industrias Lácteas. (2012). Regalmento de uso de la marca colectiva "Queso Castellano". Disponible en: *www.quesocastellano.es/documentos/docu-3_2012-06-15.pdf*

Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., and Nuñez, M. (2004). Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14:39-46.

Fiehn, O. (2002). Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48:155-171.

Fox, P.F. (2000). Fundamentals of cheese science. (Ed.): Springer Science-Business Media, Gaithersburg-USA, pp. 3-587.

Fox, P.F. (2009). Milk: an overview. In: Boland, M., Singh, H., and Thompson, A. Milk proteins: From expression to food. (Ed): Academic Press. London-UK, pp. 1-54.

Fox, P.F. and Wallace, J. M. (1997). Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45:17-85.

Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. (1997). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: Law, B.A. Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. (Ed): Blackie Academic & Professional. London-UK, pp. 1-49.

Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. (1998). Dairy chemistry and biochemistry: Springer Science and Business Media.

Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. (2004). Cheese: an overview. In: Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., and Guinee, T. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp. 1-18.

Fox, P.F., and Stepaniak, P.L.H. (1993). Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journa*l, 3:509-530.

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

Freitas, A.C., Macedo, A.C. and Malcata, EX. (2000). Review: Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International*, 6:351-370.

García-Cañas,V., Simó, C., Herrero, M., Ibáñez, E., and Cifuentes, A. (2012). Present and future challenges in food analysis: Foodomics. *Analytical Chemistry*, 84:10150-10159.

Gennadios, A. (2004). Edible films and coatings from proteins. En R.Y. Yada (ed.), Proteins in food processing (Ed): Boca Ratón: CRC Press; Cambridge: Woodhead Pub, pp. 442-467.

Gennadios, A. (2004). Edible films and coatings from proteins. In Yada, R.Y. (Ed.). Proteins in food processing (Ed): Boca Ratón: CRC Press, Cambridge-UK, pp. 442-467.

Gennadios, A., Rhim, J.W., Handa, A., Weller, C.L., and Hanna, M.A. (1998). Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. *Journal of Food Science*, 63:225-228.

Gimeno, O., Ansorena, D., Astiasarán, I.,and Bello, J. (2000). Characterization of chorizo de Pamplona: Instrumental measurements of colour and texture. *Food Chemistry*, 69:195-200.

Goudjil, H., Fontecha, J., Luna, P., de la Fuente, M.A., Alonso, L., and Juarez, M., 2004. Quantitative characterization of unsaturated and trans fatty acids in ewe's milk fat. *Le Lait*, 84:473-482.

Griffin, J.L., Williams, H.J., Sang, E., Nicholson, J.K. (2001). Abnormal lipid profile of dystrophic cardiac tissue as demonstrated by one- and two dimensional magic-angle spinning ^{1}H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 46:249-255.

Guinee, T.P., and Fox, P.F. (2004). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., and Guinee, T. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1. General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 207-259.

Gülseren, I., Güzey, D., Bruce, B.D., and Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14:173-183.

Gutiérrez-Méndez, N., Chávez-Garay, D.R., and Jiménez-Campos, H. (2012). Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium*var. Cavanilles. *Journal of Food Science*, 77:89-94.

Han, J.H. (2014). Edible films and coatings: A review. In: J.H. Han. Innovations in food packaging, 2nd. (Ed): Elsevier-Academic Press London, UK, pp. 213-255.

Hayaloglu, A.A., Guvena, M., and Fox, P.F. (2002). Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir. *International Dairy Journal*, 12:635-648.

Hayaloglu, A.A., Karatekin, B., and Gurkan H. (2014) .Thermal stability of chymosin or microbial coagulant in the manufacture of Malatya, a Halloumi type cheese: Proteolysis, microstructure and functional properties. *International Dairy Journal*, 38:136-144.

Herrera, A., Fernández-Valle, E., Villa, P., Castejón, D., Molero-Vílchez, M., Sáez-Barajas, E., Sánchez, A., and Valhondo, M. (2006). Resonancia Magnética Nuclear, Imagen de Resonancia Magnética y EPR". Unidad de Formación de Personal de Administración y Servicio de la UCM.

Herrera, A., Fernández-Valle, E., Villa, P., Castejón, D., Molero-Vílchez, M., Sáez-Barajas, E., Sánchez, A., and Valhondo, M. (2006). Resonancia Magnética Nuclear, Imagen de Resonancia Magnética y EPR". Unidad de Formación de Personal de Administración y Servicio de la UCM.

Herrero, A.M., Cambero, M.I., Ordonez, J.A., Castejon, D., Romero de Avila, M.D., and de la Hoz, L. (2007). Magnetic resonance imaging, rheological properties, and physicochemical characteristics of meat systems with fibrinogen and thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:9357-9364.

Herrero, A.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero de Ávila, M.D., and Cambero, M.I. (2009). Magnetic resonance imaging studies of the cold-set gelation on plasma powder and meat systems. *Food Research International*, 42(9):1362-1372.

Hill, A.R and Kethireddipalli, P. (2013). Dairy Products: Cheese and Yogurt. In Eskin N.A.M., and Shahidi, F. Biochemistry of Foods.(Ed.): Elsevier, London-UK, pp. 319-362.

Hoffmann, F. (1761). A Treatise on the Virtues and Uses of Whey.

Holsinger, V.H., Smith, P., and Tunick, M. (1995). Overview: Cheese Chemistry and Rheology. In. Malin, E and Tunick, M. Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese Vol. 367. (Ed): Springer, New York- EE.UU, pp. 1-6

Honikel, K.O. (1998). Reference methods for the assesment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49:447-457.

Horne, D.S. and Banks, J.M. (2004). Rennet-induced coagulation of milk. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. (Ed): Academic Press. London-UK, pp.47-70.

Hu, F., Furihata, K., Kato, Y., and Tanokura, M. (2007). Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:4307-4311.

Huffman, L.M., and Kristoffersen, T. (1984). Role of lactose in Cheddar cheese manufacturing and ripening. *Dairy Science & Technology*, 19:151-62.

Jambrak, A.R, Mason, T.J., Lelas, V., and Kresic, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α-lactalbumin. *LWT-Food Science and Technology*, 43:254-262.

Jambrak, A.R., Mason, T.J., Lelas, V., Herceg, Z., and Herceg, I.L.J. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86:281-287.

Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., and Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37:113-155.

Juan, B., Ferragut., V., Buffa, M., Guamis, B., and Trujillo, A.J. (2007).Effects of High Pressure on Proteolytic Enzymes in Cheese: Relationship with the Proteolysis of Ewe Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90:2113-2125.

Keifer, P.A. (1997). High-Resolution NMR Techniques for Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Drug Discovery Today*, 2:468-478.

Khwaldia, K., Pérez, C., Banon, S., Desobry, S., and Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44:239-251.

Kieliszek, M., and Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59:241-250.

Kilcast D. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture. En: Texture in food. Ed. Abington, Cambridge UK, Woodhead Publishing Ltd. Vol. 2, pp. 109–145.

Kilcast, D. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture. In: Texture in food Vol. 2. (Ed): Woodhead Publishing Ltd., Abington Cambridge-UK, pp. 109-145.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., and Lee, D.U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15:261-266.

Kresic, G., Lelas, V., Jambrak, A.R., Herceg, Z., and Brncic, S.R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 87:64-73.

Krochta, J.M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: Gennadios A. Protein-based films and coatings. (Ed): Ratón: CRC Press, Cambridge-UK, pp. 1-41.

Kuan, Y.-H., Bhat, R., Patras, A., and Karim, A.A. (2013). Radiation processing of food proteins-A review on the recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 30:105-120.

Laghi, L., Picone, G., and Capozzi, F. (2014). Nuclear magnetic resonance for foodomics beyond. Food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 59:93-102.

Larpent, J.P. (1995). Las bacterias lácticas. In: Microbiología alimentaria Vol. 2. (Ed): Acribia. S.A, Zaragoza-España, pp. 3-17.

Lee, J.E., Lee, B.J., Chung, J.O., Hwang, J.A., Lee, S.J., and Lee, C.H. (2010). Geographical and climatic dependencies of green tea (Camellia sinensis) metabolites: A ^{1}H NMR-based metabolomics study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:10582-10589.

Lee, S.K., Buwalda, R.J., Euston, S.R., Foegeding, E.A., and McKenna, A.B. (2003). Changes in the rheologyand microstructure of processed cheese during cooking. *LWT - Food Science and Technology*, 36:339-345.

Lewis, M.J. (1993). Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza-España.

Limsowtin, G.K.Y., Broome, M.C., and Powell, I.B. (2003). Lactic Acid Bacteria, taxonomy. In: Roginski, H., Fuguay, J.X., and Fox PF (Eds). Encyclopedia of Dairy Sciences Vol 3. (Ed): Academic Press, New York-USA, pp.1470-1478.

Lippens, G., Bourdonneau, M., Dhalluin, C., Warrass, R., Richert, T., Seetharaman, C., Boutillon, C., and Piotto, M. (1999). Study of Compounds Attached to Solid Supports Using High Resolution Magic Angle Spinning NMR. *Current Organic Chemistry*, 3:147

Liu, C-C., Tellez-Garay, A.M., and Castell-Pérez, M.E. (2004). Physical and mechanical properties of peatnut protein films. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37:731-738.

Llull, P.; Simal, S.; Benedito, J.; Roselló, C. (2002). Evaluation of textural properties of a meat-based product (sobrassada) using ultrasonic techniques. *Journal of Food Engineering*, 53:279-285.

Lo Piero, A.R., and Petrone., G. (1999). Purification and partial characterization of an ATP-hydrolyzing serine protease from lettuce leaves. *Phytochemistry*, 51:349-356.

Lo Piero, A.R., Puglisi, I., and Petrone, G. (2002). Characterization of "Lettucine", a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:2439-2443.

Lopez-Arce, P., Gomez-Villalba, L.S., Pinho, L., Fernandez-Valle, M.E., Álvarez de Buergo, M., and Fort, R. (2010). Influence of porosity and relative humidity on consolidation of dolostone with calcium hydroxide nanoparticles: effectiveness assesment with non-destructive techniques. *Materials Characterization*, 61:168-184.

Lowe, I.J. (1959). Free Induction Decays of Rotating Solids. *Physical Review Letters*, 2:285.

Lu, Y., and McMahon, D.J. (2015). Effects of sodium chloride salting and substitution with potassium chloride on whey expulsion of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 98:78-88.

Lucey, J.A. (2001). The relation between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, 15:603-608.

Lucey, J.A., Johnson, M.E., and Horne, D.S. (2003). Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *Journal of Dairy Science*, 86:2725-2743.

Mahmoud, R., and Savello, P. (1992). Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein films. *Journal of Dairy Science*, 75:942-946.

Mannina, L., D'Imperio, M., Capitani, D., Rezzi, S., Guillou, C., Mavromoustakos, T., Vilchez, M.D., Fernandez, A.H., Thomas, F., and Aparicio, R. (2009).^{1}H NMR based protocol. For the detection of adulterations of refined olive oil with refined hazelnut oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:11550-11556.

Marcone, M.F., Waye, S., Albabish, W., Nie, S., Somnarain, D., and Hill, A. (2013). Diverse food-based applicationes of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Research International*, 51:719-747.

Marcuzzo, E., Perssini, D., Debeaufort, F., Sensidoni, A. (2010). Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11:451-457.

Marshall, R.. (1982). An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *Journal of Dairy Research*, 49:329-336.

Marshall, V.M.E. and Tamime, A.Y. (1997) Physiology and biochemistry of fermented milks. In: Law, B.A. (ed.). Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. 2ª Ed. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall. Londres-Inglaterra, pp. 153-189.

McCaman, M.T., Andrews,W.H., and Files, J.G. (1985). Enzymatic properties and processing of bovine prochymosin synthesized in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology*, 2:177-190.

McCarthy, M.J., and Kauten, R.J. (1990). Magnetic resonance imaging applications in food research. *Trends in Food Science and Technology*, 1:134-139.

McHugh, T.H., and Krochta, J.M. (1994). Sorbitol- versus glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42:841-845.

McSweeney, P.L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T., and Guinee, T. (Eds). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp. 347-360.

McSweeney, P.L.H. (2007). Cheese problems solved. (Ed): Elsevier, University College Cork-Ireland, pp: 5-406

McSweeney, P.L.H., and Fox, P.F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T., and Guinee, T.(Eds). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp. 361-371.

McSweeney, P.L.H., and Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds. In: cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80:293-324.

Medina, M., and Nuñez, M. (2004). Cheeses made from ewes' and goats' milk. In: Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., y Guinee, T. (Ed). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp. 279-299.

Merrill, R.K., Oberg, C. J., and McMahon, D. (1994). A Method for Manufacturing Reduced Fat Mozzarella Cheese1. *Journal of Dairy Science*, 77:1783-1789.

Metzger, L.E., Barbano, D.M., Kindstedt, P.S., and Guo, M.R. (2001). Effect of Milk Preacidification on Low Fat Mozzarella Cheese: II. Chemical and Functional Properties During Storage. *Journal of Dairy Science*, 84:1348-1356.

Micard, V., Belamri, R., Morel, M.H., Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:2948-2953.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA.). (2014). Producción anual y destinos de la leche (todas las clases de leches) en las industrias lácteas: *http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuadro_b_2014_tcm7-405076.pdf*

Mitchell, A.D., Scholz, A.M., Wang, P.C., and Song, H. (2001). Body composition analysis of the pig Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Animal Science*, 79:1800-1813.

Moatsou, G., Samolada, M., Panagiotou, P., and Anifantakis, E. (2004). Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds. *Food Chemistry*, 87:75-81.

Moestue, s., Sitter, B., Bathen, T.F., Tessem, M.B., and Gribbesta, I.S. (2011). HR MAS MR spectroscopy in metabolic characterization of cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 11:2-26.

Moschopoulou, E. (2011).Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research*, 101:88-195.

Motoki, M., and Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9:204-210.

Muller, H.G. (1973). An introduction to food Rheology. (Ed): Heinemann, London-UK.

Nieto-Arribas,P. (2010). Diversidad genética y caracterización tecnológica de cepas autóctonas aisladas de queso de D.O. "Manchego", para su selección como cultivo iniciador. Alimentos. Universidad de Castilla-La Mancha.

Nott, K.P., Evans, S.D., and Hall, L.D. (1999). Quantitative magnetic resonance imaging of fresh and frozen-thawed trout. *Magnetic Resonance Imaging*, 17:445-455.

O'Brien, N.M., and O'Connor, T.P. (2004). Nutritional Aspects of Cheese. In: Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., y Guinee, T. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp. 435-454.

Office for harmonization in the internal market in the European Union (OHIM). (2009). Queso Castellano Trade mark number: 007454994, https://oami.europa.eu/eSearch/#basic/1+1+1+1/queso%20castellano

Oh, J-H., Wang, B., Field, P.D., and Aglan, H.A. (2004). Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *International Journal of Food Science and Technology*, 39:287-294.

Ordoñez, J.A., Cambero, I.M., Fernandez, L., Garcia, M.L., Garcia de Fernando, G., De la Hoz, L., and Selgas, M.D. (1998). Tecnología de los alimentos. Vol. II: Alimentos de origen animal. (Ed). Sintesis, S.A.Madrid-España, pp. 18-45.

Osintsev, A. M., and Qvist, K. B. (2004). Study of the mechanism of the proteolytic stage of enzymatic coagulation of milk casein. *Colloid Journal*, 66:192-196.

Panesar, P., Panesar, P.S., Singh, R.S., Kennedy, J.F., and Bera, B. (2007). Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells. *Food Chemistry*, 101:786-790.

Pavlath, A.E., and Orts, W. (2009). Edible films and coatings: Why, what, and how. In: Embuscado, M.E., and Huber, K.C. Edible films and coatings for food applications. (Ed): Springer, New York-USA, pp.1-23.

Pavlath, A.E., and Orts, W. (2009). Edible films and coatings: Why, what, and how. In: Embuscado, M.E., Huber, K.C. Edible films and coatings for food applications, Springer. New York, pp.1-23.

Pentimalli, M., Capitani, D., Ferrando, A., Ferri, D., Ragni, P., and Segre, A.L. (2000). Gamma irradiation of food packaging materials: An NMR study. *Polymer*, 41:2871-2881.

Pérez-Gago, M.B. (2012). Protein-based films and coatings. In: Baldwin, E.A., Hagenmaier, R.,. and Bai, J, (eds.). Edible coatings and films to improve food quality, 2º (Ed): Boca Ratón: CRC Press, Cambridge-UK, pp. 13-77.

Pérez-Gago, M.B., and Krochta, J.M. (2001). Denaturation time and temperature effectos on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, 66:705-710.

Pino,A., Prados, F.,Elena Galán, E., and McSweeney, P.L.H. (2009) .Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 2:324-330.

Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., and Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21:240-246.

Puchades, R., Lemieux, L., and Simard, R.E. (1989). Evolution of Free Amino Acids during the Ripening of Cheddar Cheese Containing Added Lactobacilli Strains. *Journal of Food Science*, 54:885-888.

Ramos, O.L., Fernandes, J.C., Silva, S.I., Pintado, M.E., and Malcata, F.X. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: A review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:533-552.

Ramos, O.L., Silva, S.I., Soares, J.C., Fernandes, J.C., Poças, M.F., Pintado, M.E., and Malcata, F.X. (2011). Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International*, 45:351-361.

Rao, M.A., and Steffe, J.F. (1992). *Viscoelastic properties of foods*. Ed. Elsevier, New York-USA.

Real Decreto 1069/2007. (2007). BOE núm. 272, de 13 de noviembre. pp. 46516-46520.

Real Decreto 1113/2006. BOE núm. 239, de 6 de octubre de 2006, pp. 34717-34720.

Recker, R.R., Bammi, A., Barger-Lux, M.J., and Heaney, R.P. (1988). Calcium absorbability from milk products, an imitation milk, and calcium carbonate. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 47:93-95.

Reglamento (CE) no 561/2009 de la comisiónde. (2009). Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) L 166/36.

Renner, E. (1987). Nutritional aspects of cheese. In, Fox, R.E. (Ed), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, General Aspects. (Ed): Elsevier Applied Science, London-UK, pp. 345-363.

Rhim, J.W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C.L., and Hanna, M.A. (1999). Properties of ultraviolet irradiated protein films. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32:129-133.

Robertson, G.L. (2013). Food packaging. Principles and practice. 3ª (Ed): Boca Ratón: CRC Press, Cambridge-UK.

Romero del Castillo, R., and Mestres, J.L. (2004). Productos lácteos. Tecnología. (Ed): Ediciones UPC, Cataluña-España. pp. 143-144.

Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M., and Wilbey, R.A. (2003), Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56:76-85.

Rosenthal, A.J. (1999). Food Texture: Measurement and Perception. (Ed): Aspen Publishing, New York-USA.

Ryu, S., Koh, K., Son, S., Oh, M., Yoon, J., Lee, W., and Kim, S. (2005). Physical and microbiological changes of sliced process cheese packaged in edible pouches during storage. *Food Science and Biotechnology*, 14:694-697.

Sánchez, E., Iglesias, M., López, F., Sánchez, I., and Martínez, M. (2010). Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chemestry*, 122(3):877-887.

Sandine, W.E. (1979). Lactic starter culture technology Pfizer Cheese Monographs (Vol. VI). New York: Pfizer Inc.

Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gómez, R., and Fernández-Salguero, J. (2002). Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of *Los Pedroches* cheese during ripening. *Food Chemistry*, 78:281-289.

Santapaola, J., Maldonado, S., and Medina, J.L. (2013). NaCl diffusion kinetics in dry salting of goat cheese. *Journal of Food Engineering*, 118:172-177.

Schmidt, S. J., Sun, X. Z., and Litchfield, J. B. (1996). Applications of magnetic resonance imaging in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36:357-385.

Scott, R., Robinson, R.K., and Wilbey, R. A. (2002). Fabricación de queso. (Ed): Acribia. Zaragoza.

Scott, R., Robinson, R.K., and Wilbey, R.A. (1998). Cheesemaking practice. (Ed):Resources: Jon Walmsley, New York.

Sendra, E., Mor-Mur, M., Pla, R. and Guamis, B. (1999). Evaluation of freezing pressed curd for delayed ripening of semi-hard ovine cheese. *Milchwissenschaft. Milk Science International*, 54:550-553.

Settanni, L., and Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121:123-138.

Settanni, L., and Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27:691-697.

Shah, M. A., Mir, S. A., and Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review: *Dairy Science and Technology*, 94:5-16.

Skeie, S., Narvhus, J.A., Ardö, Y., Thorvaldsen, K. and Abrahamsen, R.K. (1997). The effect of reduced salt content on the function of liposomeencapsulated neutrase and heat-treated lactobacilli in rindless low-fat cheese. *Le Lait*, 77:575-585.

Skoog, D., James, H., Thomoty, N. (2001). Principios de análisis instrumental. (Ed): McGraw-Hill/Interamericana, Madrid-España.

Sothornvit, R., and Krochta, J.M. (2000). Plasticizer effect on oxygen permeability of □-lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:6298-6302.

Sousa, M.J. and Malcata, EX. (1997). Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical, and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:74-81.

Stuchell, Y.M., and Krochta, J.M. (1994). Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. *Journal of Food Science*, 59:1332-1337.

Tabilo-Munizaga, G., and Barbosa-Cánovas, G.V. (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Functional Foods*, 67:147-156.

Tang, C.H., Wu, H., Chen, Z., and Yang, X.Q. (2006). Formation and properties of glycinin-rich and β-conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase. *Food Research International*, 39:87-97.

Tautenhahn, R., Cho, K., Uritboonthai, W., Zhu, Z., Patti, G.J., Siuzdak, G. (2012). An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database, 30:826-828.

Tejada, L., Sanchez, E., Gomez, R., Vioque, M. and Fernandez-Salguero, J. (2002). Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. *Journal of Food Science*, 67:126-129.

Tripathi, P., Tomar, R., and Jagannadham, M.V. (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, 125:1005-1012.

Unger, A.G., Lodaite, K., ÖGstergren, K., Paulsson, M., and Dejmek, P. (2000). Syneresis of submerged single curd grains and curd rheology. *International Dairy Journal*, 10:489-496.

Upadhyay, V.K., and McSweeney, P.L.H. (2003). Acceleration of cheese ripening. In: Smit, G. (Ed). Dairy Processing: Improving Quality. (Ed): Woodhead Publishing Limited, Cambridge-UK, pp. 419-447.

Upreti, P., Metzger, L.E., and Hayes, K.D. (2006). Influence of Calcium and Phosphorus, Lactose, and Salt-to-Moisture Ratio on Cheddar Cheese Quality: Proteolysis During Ripening. *Journal of Dairy Science*, 89: 444-53.

Ustunol, Z., and Mert, B. (2004). Water solubility, mechanical, barrier, and thermal properties of cross-linked whey protein isolate-based films. *Journal of Food Science*, 69:129-133.

Van Vliet, T. (1999). Factors determining small-deformation behavior of gels. In Dickinson, E. and Rodriguez-Patino, J. M.(eds). Food Emulsions and Foams; Interfaces, Interactions and Stability. (Ed): Royal Society of Chemistry, Cambridge-UK, pp. 307-317.

Varela, P.; Salvador, A.; Gámbaro, A. (2008). Texture concepts for consumers: a better undestanding of crispy-crunchy sensory perception. *European Food Research and Technology*, 226: 1081-1090.

Villamiel, M., and De Jong, P. (2000). Influence of high-intensity utrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins ad native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:472-478.

Voutsinas, L.P., Katsiari, M.C., Pappas, C.P. and Mallatou, H. (1995). Production of brined soft cheese from frozen ultrafiltered sheep's milk. Part 2: Compositional, physicochemical, microbiological and organoleptic properties of cheese. *Food Chemistry*, 52:235-247.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., and van Boekel, M.A.J.S. (2001). Ciencia de la leche y tecnologia de los productos lacteos. (Ed):Acribia, S.A., Zaragoza-España.

Wihodo, M., and Moraru, C.I. (2013). Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of proteins films: A review. *Journal of Food Engineering*, 114:292-302.

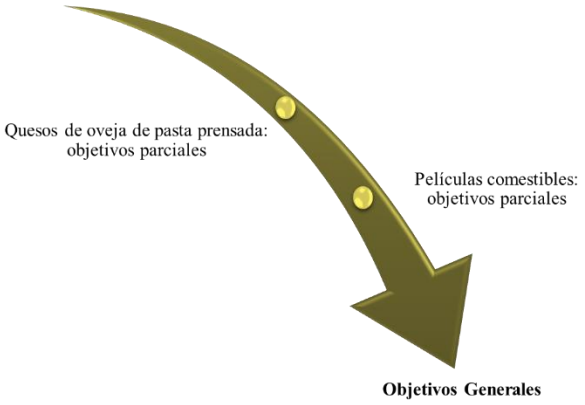
Wijesundera, C., Drury, L., Muthuku-Marappan, K., Gunasekaran, S. and Everett, D.W. (1998). Flavour development and distribution of fat globule size and shape in Cheddar-type cheeses made from skim milk homogeneised with AMF or its fractions. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53:107.

Wilkinson, M. G., and Kilcawley, K. N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15:817-830.

Yanes, J.E. (2008). La Churra y la Castellana, dos razas emblemáticas y todo un proceso. En: Vivar-Quintana, A.M. (ed.). Influencia de la leche de oveja en la elaboración de queso Zamorano. (Ed): Fundación científica Caja Rural, Zamora-España, pp. 53-94.

Yildirim, M., and Hettiarachchy, N.S. (1998). Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63:248-252.Ziarelli, F., Peng, L., Zhang, C.C., and Viel, S. (2012). High resolution magic angle spinning NMR to investigate ligand-receptor binding events for mass-limited samples in liquids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59:13-17.

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS



En la presente Tesis Doctoral se abordan dos líneas de trabajo. Por una parte, (1) se han estudiado quesos de oveja de coagulación enzimática y pasta prensada elaborados en Castilla y León, bajo la marca "queso de oveja Castellano", y en Castilla-La Mancha, con Denominación de Origen Protegida "Manchego" y con el sello de calidad "queso tradicional puro de oveja". Se trata de los quesos de oveja producidos en España con los mayores niveles de producción, consumo y exportación. Por otra parte, (2) se han elaborado y estudiado películas comestibles obtenidas a partir de concentrados comerciales de proteínas de lactosuero para la elaboración de películas comestibles.

El queso Manchego ha sido objeto de diversos estudios en los que se han tratado distintos aspectos de su producción, particularidades y propiedades. Sin embargo, el conocimiento sobre otros quesos de leche de oveja, como el Castellano, es todavía bastante limitado. En este marco, se ha realizado un análisis integral, incluyendo el estudio de la macro y micro-estructura y del metaboloma, de los mencionados quesos de oveja mediante Imagen de Resonancia Magnética (IRM), relaxometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectroscopía de ^{1}H-RMN. Estas metodologías permiten el análisis de muestras íntegras, sin preparación previa.

El objetivo principal de esta primera parte de la Tesis Doctoral fue evaluar el potencial de las técnicas no destructivas de RMN para monitorizar el proceso de maduración y como herramienta para la trazabilidad y caracterización dependiendo de la forma de procesado y zona geográfica de procedencia de quesos de oveja de pasta prensada.

Para abordar este objetivo general de esta parte de la Tesis Doctoral se han considerado los siguientes objetivos parciales:

- *Determinar el potencial de la Imagen de Resonancia Magnética (IRM) como herramienta predictiva para la estimación de parámetros fisicoquímicos y características de textura.*

- *Evaluar el poder de la IRM para la caracterización y discriminación de quesos de oveja de pasta prensada procedentes de distintos procesos de fabricación.*

- *Determinar el potencial de la relaxometría de RMN para evaluar la microestructura y para la monitorización del proceso de maduración de quesos de oveja de pasta prensada.*

- *Optimizar el análisis de ^{1}H-HRMAS/RMN para el estudio de quesos de oveja de pasta prensada.*

- *Determinar el potencial de la espectroscopía ^{1}H-HRMAS/RMN para el análisis y seguimiento del proceso de maduración de quesos de oveja de pasta prensada.*

- *Estimar el potencial de las técnicas quimiométricas basadas en la RMN para la clasificación de muestras de queso de oveja de pasta prensada en función del tiempo de maduración*

En cuanto a la segunada parte de este trabajo de investigación hay que tener en cuenta que los lactosueros son subproductos de la industria quesera de alto poder contaminante que contienen compuestos de interés tecnológico y nutricional; su aprovechamiento para la elaboración de películas comestibles sería una forma de revalorizarlos y de obtener un material de envasado de especial interés para productos lácteos, dada la similitud de origen del envase y del producto contenido. En esta área se han elaborado películas comestibles a partir de concentrados de proteína de lactosuero bovino, como una alternativa a otros materiales de envasado y para facilitar y mejorar la comercialización de porciones y lonchas de queso de oveja como productos listos para su consumo (Ready to eat, RTE).

El objetivo principal de esta segunda parte de la tesis doctoral fue obtener películas comestibles a partir de proteínas de lactosuero mediante la aplicación de calor y de ultrasonidos, con o sin adición de transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa), como material alternativo de envasado de porciones o lonchas de queso.

Para abordar este objetivo general de esta parte de la Tesis Doctoral se han considerado los siguientes objetivos parciales:

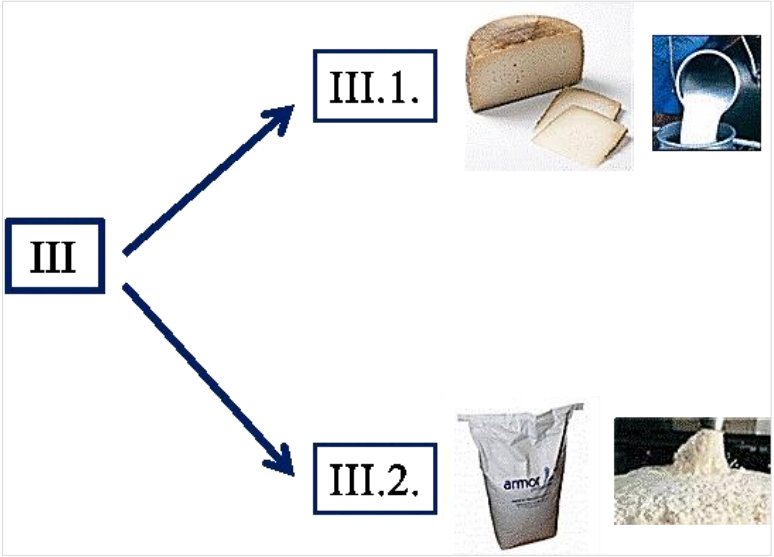
- *Determinar el comportamiento mecánico, los atributos de color y las propiedades de permeabilidad al vapor de agua y solubilidad de las películas de proteínas de lactosuero obtenidas.*

- *Analizar la microestructura de las películas mediante relaxometria de RMN mono y bidimensional.*

- *Estimar el potencial de aplicación de las películas de proteínas de lactosuero para la comercialización de cortes de queso de oveja de pasta prensada.*

En conjunto, se estima que se han abordado objetivos de interés científico y tecnológico, especialmente mediante la optimización de técnicas de RMN para el estudio de quesos y la estimación de su potencial de aplicación, como técnicas no destructivas, a nivel industrial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS



Preámbulo

En este apartado se recogen las características de los materiales empleados y las técnicas metodológicas utilizadas en el desarrollo de la Tesis Doctoral. No obstante, en cada Trabajo del **Apartado IV** (*Trabajo experimental. Resultados y Discusión*) se concretan y se aportan detalles específicos de la forma de proceder en las distintas experiencias llevadas a cabo.

Resumen gráfico

III.1. Material general de laboratorio

El agua destilada utilizada se obtuvo en un aparato Millipore Elix 3, que funciona por ósmosis inversa y proporciona un agua purificada de tipo II de calidad constante y fiable, con una resistividad del orden de 15 MΩ.

Todo el material de vidrio empleado en el trabajo experimental que se describe en esta memoria fue de la marca Pyrex® (vasos de precipitados, pipetas de vidrio, probetas, matraces Erlenmeyer, tubos de centrífuga, tubos Kjeldahl, etc).

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato AND (modelo FX-320) y KERN (modelo 440-33 y modelo 449-35N) y las de precisión en balanza analítica AND (modelo HR-120).

La homogeneización de las muestras, para la realización de las correspondientes determinaciones químicas, se efectuó en unos homogeneizadores Polytron (modelo PT 10-35) y Ultra Turrax (modelo T25 basic).

Las muestras, así como las disoluciones y preparados que no pueden permanecer a temperatura ambiente se conservaron en arcones de congelación Liebher y en frigoríficos Sanyo, Medicool, Philco, Fagor, Electrolux y Kelvinator.

Las medidas de pH se realizaron en un micro pH-metro Crison Digital (501 modelo 2001) equipado con un electrodo de vidrio.

Las disoluciones se prepararon en placas de agitación magnética Selecta (modelo Agimatic N), Bunsen (modelo MC-8) y Thermolyne (modelo Nuova II), dotados con calefacción.

Las pipetas automáticas empleadas fueron Discovery Comfort autoclavable HTTP de 20-200 µL, de 100-1000 µL y de 1-5 mL.

Las cucharas, espátulas y tijeras utilizadas fueron de acero inoxidable.

La concentración de volúmenes de disolventes orgánicos relativamente grandes se realizaró en un rotavapor Büchi (modelo EL), acoplado a un baño calefactor y a una bomba de vacío Eyela (modelo A-3S). Sin embargo, los volúmenes pequeños se evaporaron mediante corriente de nitrógeno (suministrado por Carburos Metálicos, Grupo Air Products).

La filtración de las muestras se realizó utilizando filtros Whatman 125 y Millipore FH 0,5 µm.

Los desecadores, donde se mantuvieron las muestras hasta su visualización en el microscopio óptico de barrido una vez sometidas a desecación mediante punto crítico, fueron de la marca Pyrex®.

Las centrifugaciones de los extractos de las muestras se realizaron en centrífugas Sorvall (modelo RC-5B) equipadas con rotores modelo GSA, GS3 y S600, y Orto-Alresa (modelo Digicen 20).

El calibre utilizado para medir las dimensiones de las probetas de ensayo para los análisis reológicos fue un pie de rey digital Tesa (modelo Shop-Cal) con accesorios Brown and Sharpe Centerline.

La deshidratación de las muestras para la determinación de la humedad tuvo lugar en una estufa Heraeus (modelo T6200) a una temperatura de 110 ºC y en un desecador a vacío con gel de sílice activado.

La reducción de las muestras a cenizas se realizó utilizando un horno mufla de la marca Heraeus (modelo M170), a una temperatura de 550 °C, donde se introdujo la muestra en cápsulas de porcelana de la marca Pobel.

III.2. Reactivos y disolventes

Todos los productos químicos utilizados en las experiencias que se describen en esta memoria fueron de calidad reactivos, suministrados por las marcas Merck, Panreac, Fluka y Sigma.

III.3. Trabajo experimental con quesos

III.3.1. Material experimental. Quesos de oveja

Se han estudiado cuatro tipos de quesos españoles de leche de oveja de coagulación enzimática y pasta prensada:

1) Elaborados en Castilla-La Mancha en una industria (I-CLM) siguiendo el proceso de producción de la Denominación de Origen Protegida (DOP) Queso Manchego (MAPA, 1995). Estos quesos se fabricaron con leche pasteurizada procedente de ovejas de la raza Manchega. Las particularidades de su elaboración se muestran en la **Tabla** III.**1**.

2) Elaborados en Castilla-La Mancha en una pequeña empresa siguiendo el procedimiento tradicional (T-CLM) con leche cruda obtenida de ovejas de las razas Manchega, Merina y Talaverana (**Tabla** III.**1**).

3) Elaborados en Castilla y León en una gran industria (I-CL) al amparo de la marca colectiva "Queso Castellano" (OHIM, 2009; BOCyL, 2010; Federación Castellano Leonesa de Industrias Lácteas, 2012) utilizando leche cruda de las razas Castellana y Churra, como se indica en la **Tabla** III.**1**.

4) Elaborados en Castilla y León de acuerdo a la marca colectiva "Queso Castellano" en una empresa familiar siguiendo una fabricación artesanal/tradicional (T-CL). Las particularidades del proceso de elaboración se indican en la **Tabla** III.**1**.

Todos los quesos fueron elaborados durante el mes de abril de 2013. Los quesos se analizaron a lo largo del proceso de maduración, en los días 2, 9, 30, 90 y 180 días después de la fabricación. Para su elaboración se utilizaron moldes con un diámetro entre 19 y 20,5 cm y una altura entre 14 y 15,5 cm. El peso de los quesos varió entre 3,7 y 4,3 kg en los quesos frescos y 3-3,5 kg al final del tiempo de maduración. En todos los casos, se adquirieron piezas enteras y fueron transformados en lonchas o porciones en el laboratorio bajo condiciones controladas de acuerdo a los requerimientos de los análisis.

El número de quesos analizados, así como el procedimiento seguido para la toma de muestras, en cada uno de los ensayo realizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se indicar en los distintos Trabajos del **Apartado IV** (Sección **IV.I**) de esta Memoria. Tras la adquisición de los quesos a los distintos tiempos de maduración, las piezas se mantuvieron a 4 ± 1 ºC hasta proceder a la toma de muestras para cada determinación.

Tabla III.**1.** Particularidades del proceso de elaboración de los quesos de leche de oveja estudiados

Símbolo	**I-CLM**	**T-CLM**	**I-CL**	**T-CL**
Producción local	Castilla-La Mancha	Castilla-La Mancha	Castilla y León	Castilla y León
Fabricación	En grandes empresas, elaborado seguiendo la norma del Consejo Regulador del queso Manchego con Denominación de Origen protegida	En pequeñas empresas siguiendo el proceso tradicional de queso Manchego	En grandes empresas siguiendo la norma de la marca de calidad queso Castellano	En pequeñas empresas siguiendo la norma de la marca de calidad queso Castellano
Designación comercial	Queso Manchego con Denominación de Origen Protegido (DOP)	Queso de oveja artesano	Queso Castellano de oveja	Queso Castellano de oveja artesanal
Raza de oveja	Manchega	Manchega, Merina y Talaverana	Castellana y Churra	Castellana y Churra
Pre-tratamiento de la leche	Pasteurizada	Cruda	Cruda	Cruda
Cultivo iniciador	Homofermentativo mesófilo BAL	Homofermentativo mesófilo BAL	Homofermentativo mesófilo BAL	Homofermentativo mesófilo BAL
Cuajo	Quimosina recombinante	Cuajo animal comercial (BioRen® Dried Calves' Vells)	Quimosina recombinante	Cuajo natural de cordero
Coagulación				
Temperatura (ºC)	30-32	30-32	32	28-32
Tiempo (min)	45	40-45	35-40	30-45
Corte de la cuajada	Proceso automatizado continuo	Proceso semi-continuo	Proceso automatizado continuo	Proceso semi-continuo
Tamaño de grano (mm)	5-10	5-10	5-8	5-10
Agitación	Proceso automatizado continuo	Proceso discontinuo	Proceso automatizado continuo	Proceso discontinuo
Pre-drenaje del suero de leche	Proceso automatizado continuo (con agitación y bombeado del suero de leche)	Manual (Drenaje del suero de leche por prensado suave)	Proceso semi-continuo (con agitación y bombeado del suero de leche)	Manual (Drenaje del suero de leche por prensado suave)
Escaldado				
Temperatura (ºC)	36-40	34-38	35-38	35-40
Tiempo (min)	30-35	30-40	40	30-40
Pre-prensado	Proceso automatizado continuo (En bloques de cuajada de acuerdo con el tamaño del molde)	Manual (En cubas de cuajar)	Proceso automatizado continuo (En cubas de cuajar)	Manual (En cubas de cuajar)
Temperatura (ºC)	30-32	30-32	30-32	30-32
Tiempo (min)	35	30	30	30
Moldeado	Automático	Manual	Manual	Manual
Prensado	Prensado automático	Prensado automático	Prensado automático	Prensado automático
Tiempo (h)	4	10-12	10-12	10
Desmoldeo	Automático	Manual	Automático	Manual
Salado	Por inmersión en salmuera (20g de NaCL/100ml)	Por inmersión en salmuera (20g de NaCL/100ml)	Por inmersión en salmuera (20g de NaCL/100ml)	Por inmersión en salmuera (20g de NaCL/100ml)
Temperatura (ºC)	10	10-15	10	10-15
Tiempo (h)	20-24	20-24	24-30	24-32
Maduración	En cámaras con control automático de temperatura y humedad relativa	En cámaras con control automático de la temperatura y humedad relativa	En cámaras con control automático de la temperatura y humedad relativa	En cámara en condiciones naturales
Temperatura (ºC)	8-10	10	10	10-12
Humedad relativa (%)	80	75-80	75-80	75-80
Tiempo	60 días para los quesos de más de 1,5 kg Semi-curado: 60-90 días Curado: 180 días			

*Bacterias ácido lácticas (BAL)

III.3.2. Determinación de parámetros físicoquímicos

III.3.2.1. Determinación de la actividad de agua

La actividad de agua (a_w) se determinó utilizando un higrómetro de punto de rocío modelo Decagon CX-1 (Decagon Devices Inc, Pullman, Washington, EEUU) a una temperatura de 20 ºC. En el equipo se introdujeron alrededor de 2 gramos de la muestra en la cápsula suministrada por el fabricante. Para comprobar que las medidas realizadas se encontraban dentro de un rango adecuado, cada vez que se conectó el equipo se comprobó su correcto funcionamiento utilizando dos líquidos de a_w conocida para comprobar que se alcanzaban los valores de referencia. Uno de los líquidos fue agua destilada (a_w = 1,000), y el otro una solución saturada de cloruro sódico (a_w = 0,775). El higrómetro proporcionó directamente los valores de actividad de agua (con una precisión de ± 0,003 unidades) y la temperatura a la que se realizó la medida. Se realizaron tres réplicas de cada muestra.

III.3.2.2. Determinación del pH

El pH se determinó por inmersión del electrodo en una solución homogeneizada de la muestra en agua destilada con una relación 1/10 (p/v), utilizando un pH-metro de la marca Crison Digital 501 modelo 2001 (Crison Instruments Ltd., Barcelona, España). La calibración del pH-metro se realizó con las soluciones tampones de referencia de pH 4 y 7 suministradas también por el fabricante. El electrodo se mantuvo sumergido en una solución de KCl 3M y AgCl para su correcta conservación. Se realizaron tres réplicas de cada muestra.

III.3.2.3. Determinación del contenido acuoso

La determinación del contenido de agua de las muestras fue realizada según el procedimiento de la AOAC (2006), mediante secado de la muestra, manteniéndola en una estufa marca Heraeus, modelo T6200 (Biotech S.L., Madrid, España) a una temperatura de 110 ºC hasta alcanzar peso constante. Para ello, las cápsulas de porcelana utilizadas se deshidrataron en una estufa a 110 °C durante 3 horas y se dejaron enfriar en un desecador de vidrio a vacío, cargado con gel de sílice activado. Se pesaron 4 g de muestra en una balanza de precisión y se introdujeron en las cápsulas de porcelana. A continuación, se deshidrataron en la estufa a 110 °C, hasta peso constante (aproximadamente 48 - 72 h). Las muestras deshidratadas se dejaron enfriar en un desecador y se volvieron a pesar en la balanza de precisión. El contenido de agua de la muestra se determinó por diferencia entre

el peso de la muestra fresca y el de la muestra desecada, una vez alcanzado el peso constante. El extracto seco (ES) se calculó restando el contenido de agua del peso de la muestra de queso.

III.3.2.3. Determinación del contenido en cenizas

El análisis de las cenizas, o contenido mineral total, de las muestras fue realizado siguiendo el procedimiento de la AOAC (2006), según el cual se pesaron alrededor de 4 g de muestra en una cápsula de porcelana previamente desecada y tarada, y se mantuvieron en una mufla a 550 °C hasta la incineración completa de la muestra. Una vez que la temperatura disminuyó, la muestra se introdujo en un desecador a vacío hasta su enfriamiento completo, para evitar la captación de humedad. Posteriormente, se pesó en una balanza analítica de precisión para calcular la cantidad total de cenizas por diferencia de pesada con la cápsula vacía, previamente tarada.

III.3.2.4. Determinación del contenido en grasa

La determinación del contenido de grasa de las muestras se realizó utilizando el método de Bligh y Dyer (1959), mediante una extracción en frío con cloroformo y metanol en presencia del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) para posteriormente cuantificarlo de forma gravimétrica, según el método descrito por Hanson y Olley (1963).

El método consistió en pesar 20 g de muestra, que se homogeneizó con una mezcla de metanol/cloroformo 40/20 (v/v), a la que se añadió una punta de espátula de BHT al 98 %, para evitar la oxidación durante el proceso. A continuación, se añadieron 20 mL de cloroformo y 20 mL de suero fisiológico y se homogeneizó, acoplado a un baño de hielo, durante 3 minutos. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a 21ºC y se separó en tres fases: la superior fundamentalmente acuosa, la intermedia que contiene las proteínas y la inferior que es la fase orgánica y contiene la grasa. Se tomaron 20 mL de la fase orgánica con ayuda de una pipeta Pasteur y se filtró a través de un algodón impregnado con cloroformo/metanol (2:1), que también contenía una punta de espátula de sulfato sódico anhidro para retener pequeños restos de agua que se pudieran haber arrastrado durante el proceso. Por último, se evaporó el cloroformo en un rotavapor.

El porcentaje de grasa de las muestras se estimó por diferencia de pesada:

$$\textbf{\% grasa} = 100 \times 2 \times (P_g - P_v) / M$$

donde: M = peso de la muestra (g); P_g = peso del matraz después de evaporar el disolvente (g) y P_v = peso del matraz vacío (g)

III.3.2.4. Determinación del contenido en proteína

La cuantificación de la proteína se realizó mediante la determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Las muestras se trataron en un digestor Kjeldahl Büchi Digestion Unit K-435 acoplado a una bomba (Büchi, Switzerland), que recogía los gases producidos durante el proceso de digestión. La neutralización y destilación de las muestras digeridas se efectuó en un destilador Kjeldahl automático (Büchi Distillation Unit B-324).

Para medir el contenido proteico de las muestras, primero se pesaron 1,5 g de las mismas, se trocearon y se introdujeron en un tubo Kjeldahl junto a una pastilla de 5 g de catalizador (99,9 % de K_2SO_4 y 0,1 % de Se), 3-4 perlas de vidrio y 20 mL de ácido sulfúrico al 96%. Se preparó también un blanco, consistente en un tubo Kjeldahl que contenía lo mismo que el anterior pero sin la muestra. Se cargó el digestor con los tubos Kjeldahl, se cerró el circuito y se calentaron a 350-400 ºC durante 4-5 horas, hasta que el contenido de los tubos quedó de color amarillo claro y transparente. Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se procedió a la destilación de la muestra digerida. La destilación se realizó manteniendo los contenedores de reactivos con cantidad suficiente para realizar el proceso. Para ello se utilizaron 45 mL de hidróxido de sódico (NaOH al 40 % p/v). Cada destilado resultante se recogió en un matraz de Erlenmeyer con 25 mL de ácido bórico (H_3BO_3 al 4 % p/v). La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realizó por medio de una volumetría ácido-base del ion borato formado, empleando ácido clorhídrico (HCl 0,5 N) y como indicador una mezcla de rojo de metilo (0,2 %) y azul de metileno (0,1 %) en etanol. Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoniaco destilados.

Para calcular el % de nitrógeno total se empleó la fórmula:

$$\textbf{\% Nitrógeno total} = V_{HCl} \times N_{HCl} \times P_m \text{ nitrógeno/mg muestra} \times 100$$

donde: V_{HCl} = volumen de mL de HCl gastados para neutralizar la muestra – volumen de mL de HCl empleados para neutralizar el blanco y N_{HCl} = normalidad de la disolución de HCl; P_m nitrógeno = peso molecular del nitrógeno (14,007 g mol^{-1}).

El cálculo de la cantidad de proteína a partir del nitrógeno total se obtuvo aplicando el factor de conversión 6,38, utilizado para productos lácteos y derivados, asumiendo que las proteínas de los productos lácteos tienen un 16 % de nitrógeno:

$$\textbf{\% proteína} = \textbf{\% } N_2 \textbf{ total x 6,38}$$

Todas las determinaciones químicas se realizaron al menos con tres réplicas de cada muestra.

III.3.3. Análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

III.3.3.1. Imagen y Relaxometría de RMN

El análisis de imagen (IRM) y de relaxometría de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker BIOSPEC 47/40 (Bruker GmBH, Ettlingen, Alemania) que opera a 4,7 Teslas (200 MHz), equipado con un sistema de gradientes apantallado de 6 cm de diámetro que permite un gradiente de 450 $mT \cdot m^{-1}$ (**Figura** III.**1**).

Figura III.**1.** Espectrómetro Bruker BIOSPEC 47/40 (Bruker GmBH, Ettlingen, Alemania) utilizado en el análisis de Imagen y de Relaxometría de RMN.

Las muestras se colocaron en el interior de una sonda de radiofrecuencia de volumen de 3,5 cm de diámetro interno, empleada para la transmisión y la recepción de la señal. Las condiciones de análisis específicas para el estudio de la IRM de los quesos y de relaxometría, tanto de los quesos como de las películas comestibles se recogen en los correspondientes **Trabajos** (**1**, **2** y **5**) del **Apartado IV**.

Para la obtención de los tiempos de relajación transversal (T_2), de espín-red o longitudinal (T_1) y el Coeficiente de Difusión Aparente (*CDA*) mediante IRM se

adquirieron series de imágenes eco de espín. En la obtención del valor de T_2, la señal de cada píxel en la serie de imágenes se ajustó a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$\mathbf{S\ (TE) = S_0 exp\ (-TE/T_2)}$$

donde: S (TE) es la señal de la imagen a cada tiempo de eco y S_0 es la señal cuando el TE es igual a cero.

Para las medidas de T_1 los datos de la serie de imágenes se ajustaron a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$\mathbf{S\ (TR) = S_0\ [1- exp\ (-TR/T_1)]}$$

donde: S (TR) es la señal de la imagen a cada TR y S_0 es la señal en el equilibrio.

Para las medidas del *CDA* se adquirió una serie de imágenes con diferentes ponderaciones de la difusión (factor *b*). Los datos obtenidos se ajustaron a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$\mathbf{S\ (b) = S_0 exp\ (-CDA * b)}$$

donde: S (*b*) es la señal potenciada en difusión y S_0 es la señal de la imagen cuando el valor de la potenciación en difusión (*b*) es igual a cero.

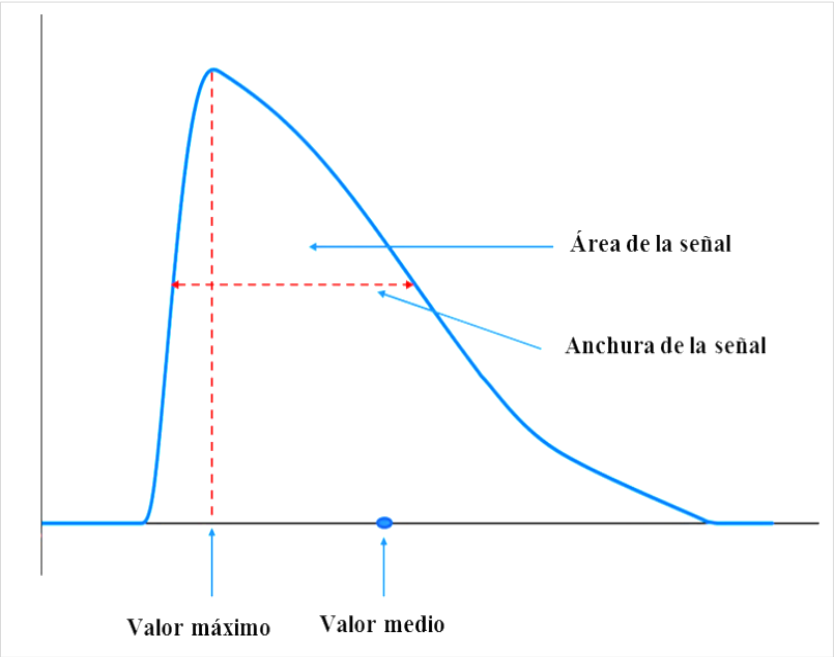


Figura III.**2.** Parámetros de la señal considerados en la distribución de los tiempos de relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1) obtenidos por relaxometría de RMN.

En el estudio de relaxometría, para el análisis comparativo de las distribuciones de T_1 y T_2 se consideraron los siguientes parámetros (**Figura** III.**2**):

Valor del máximo: valor del tiempo de relajación del máximo de la señal (ms)

Valor medio: tiempo de relajación promedio de la señal (ms)

Área de la señal: valor de la integral de la señal [unidades arbitrarías (u.a) x ms]

Cuando se compararon anchuras de señales se consideró la amplitud de la misma a la mitad de su altura.

Las muestras estudiadas se cortaron en las dimensiones requeridas y se procedió directamente a su análisis en los equipos indicados, como se menciona específicamente en el **Apartado IV.I** de esta memoria. El número de muestra vario según la matriz analizada.

III.3.3.2. Análisis mediante espectroscopía de RMN de alta resolución de ángulo mágico (*High Resolution Magic Angle* Spinning), ^{1}H-RMN/HRMAS

Los experimentos de ^{1}H-RMN /HRMAS se realizaron en un espectrómetro Bruker AMX500 (BrukerGmBH, Ettlingen, Alemania) que opera a 11,7 Teslas (frecuencia de resonancia 500,13 MHz) equipado con una sonda de HRMAS (**Figura** III.**3**). Se utilizaron aproximadamente 8 - 10 mg de muestras a los que se les agregó una solución de 20 µl D_2O con TSP a 0,1 mM. Las muestras (de queso y leche) se colocaron dentro de un rotor cilíndrico de óxido de zirconio de 50 µl.

Se optimizó la velocidad de giro para reducir al mínimo los cambios estructurales o químicos durante el análisis y la temperatura, para evitar el deterioro de la matriz estudiada y la degradación de compuestos termolábiles, además de la anchura espectral, la intensidad de gradiente y el tiempo de eco (s). La secuencia de pulsos empleada fue 1D Noesy con presaturación de la señal del agua con un tiempo para la relajación / presaturación de 2 s, un tiempo de mezcla de 150 ms y un t_1 fijo de 3 µs. Los espectros fueron adquiridos a 16k puntos de datos, como suma de 256 adquisiciones con un tiempo total del experimento de 14 min y una anchura espectral de 8333 Hz.

Todos los espectros fueron procesados utilizando el software MestRe Nova, versión 8.1.2. A continuación, se ajustó la fase y la línea base de los espectros y se referenciaron al TSP $\delta = 0$ ppm.

Figura III.**3.** Espectrómetro Bruker Avance 500 MHz equipado con sondas para el análisis de muestras en estado líquido y una sonda HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinnig*) para muestras semi-sólidas

Los detalles específicos de los análisis de esta naturaleza realizados en el desarrollo de la Tesis se indican en los **Trabajos 3** y **4** del **Apartado IV.I** de esta memoria.

Todos los estudios de RMN se realizaron en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico de la UCM.

III.3.4. Análisis de la microestructura por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El estudio de la microestructura de los quesos mediante MEB requirió una preparación previa de las muestras, la cual implicó su adquisición y corte, con las dimensiones apropiadas (< 0,5 cm^2), su deshidratación, evaporación y metalización (**Figura** III.**4**). Las zonas en las que se realizó la toma de muestra de los quesos para este estudio se especifica en el **Trabajo 2** del **Apartado IV**.

El corte de las muestras se realizó, con un bisturí de aluminio con mango modelo 4 y hoja No.18 (marca B. Braun), en forma de cubos con un tamaño de arista inferior a 5 mm o en forma de láminas con un grosor máximo de 5 mm obtenidos del centro de la muestra. Posteriormente, se sumergieron en una solución de glutaraldehído al 4 % en suero fisiológico durante 4 horas para su fijación. Durante este período las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

Para la deshidratación de las muestras, una vez fijadas, el agente empleado fue acetona. Se prepararon diferentes soluciones crecientes de acetona desde el 30 % hasta el 100 %. Las muestras se introdujeron dos veces en la misma concentración, haciendo un trasvase a otro recipiente con solución nueva cada 60 minutos. De esta forma, la muestra permaneció una hora en cada concentración de acetona.

A continuación se realizó el secado de las muestras mediante punto crítico (CPD, *Critical Point Drying*) que consiste en desplazar la acetona de las muestras con CO_2 líquido en condiciones estándar (temperatura = 31 °C, presión = 7,38 x 10^6 Pa), para posteriormente cambiar el CO_2 líquido a CO_2 en estado gaseoso y finalizar el proceso de secado liberando presión hasta alcanzar la presión atmosférica. El secado de punto crítico es un método para secar matrices sin que éstas colapsen o deformen su estructura original, minimizando las tensiones superficiales de la muestras. Se utiliza con frecuencia en microscopía electrónica de barrido cuando se pretende visualizar muestras biológicas. Para llevar a cabo este proceso se utilizó un secadero por punto crítico Balzers CDP-030.

El siguiente paso fue la metalización de las muestras, que consistió en recubrirlas con grafito y oro, utilizando los equipos Mini deposition System MED 010 Balzers para el recubrimient y Emitech K550x Sputter Coater, repectivamente. Este paso se realizó por 4 minutos para hacer conductoras la superficie de las muestras, eliminar la electricidad estática, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica.

Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido (modelo JSM 6400. JEOL, Japón) a diferentes aumentos (x100, x200, x500, x1.000, x2.000, x5.000), con el fin de observar la microestructura de los diferentes quesos. El proceso completo, desde el secado de las muestras mediante punto crítico hasta la visualización en el microscopio electrónico de barrido, fue realizado en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Instalación Científico Tecnológica Singular (ICTS) incluida en el CAI de la UCM.

Para el análisis de los resultados se contó con el apoyo y asesoramiento de los técnicos de dicho Centro.

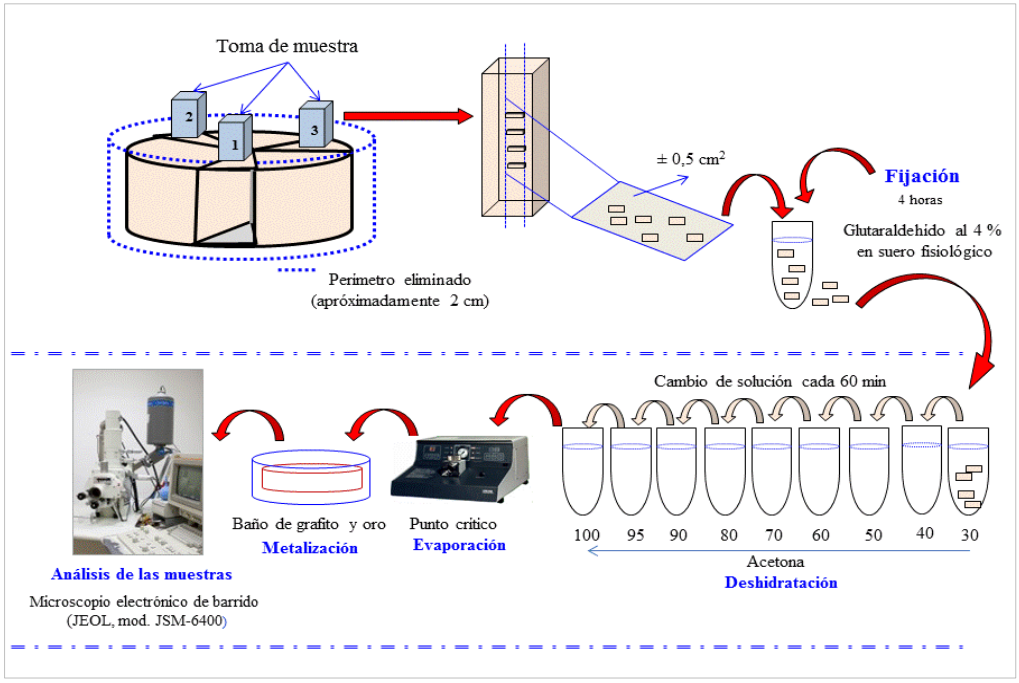


Figura III.**4.** Preparación de la muestras para el análisis de la Microscopia Electrónico de Barrido (MEB)

III.3.5. Determinación de las propiedades de textura

El análisis de perfil de textura (*Texture Profile Analysis*, TPA) se realizó con un texturómetro TA.XT2i Stable Micro System Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd. Surrey, Inglaterra) suministrado por Aname, S.L. y controlado desde un ordenador Pentium II mediante el programa Texture Exponent 32 versión 5.0.6.0. En los ensayos se utilizó una célula de carga de 25 kg. La calibración se realizó con una pesa de 5 kg. Para llevar a cabo el TPA se procedió de acuerdo a trabajos previos (Herrero *et al*, 2007, 2009; Romero de Ávila *et al*, 2010). Todos los ensayos se ejecutaron a 22 ºC, controlando la temperatura mediante una cámara termorregulable (Temperature Applied Sciences Ltd. UK) acoplada al texturómetro (**Figura** III. **5**).

Para la realización del TPA se utilizaron muestras con forma cilíndrica, con una altura de 15 mm y un diámetro de 25 mm, obtenidas mediante un sacabocados. La forma de proceder para la obtención de las muestras se describe en el **Trabajo 1** del **Apartado IV** de esta Tesis. El ensayo consistió en una prueba de doble compresión y para ello se empleó una sonda de presión con base plana de forma cilíndrica de aluminio de 25 mm de diámetro (modelo P/25) asociada a una plataforma de aluminio (modelo HDP/90) donde fueron colocadas las muestras para el análisis. El ensayo se efectuó a una velocidad de 2 mm s^{-1}. El tiempo de recuperación, transcurrido entre ambas compresiones, fue de 5

segundos, ascendiendo la sonda a su posición inicial a una velocidad de 10 mm s^{-1}. Para la adecuación del análisis se realizaron ensayos comprimiendo las muestras a un 50 y 70 % de su altura. Se realizaron diez réplicas de cada muestra.

Figura III. **5.** Texturómetro y cámara acoplada para controlar la temperatura durante el Análisis del perfil de textura (TPA)

Una vez concluido el ensayo, se obtuvieron las gráficas o curvas de deformación fuerza-tiempo (**Figura** III.**6**). En estas gráficas se representó la fuerza aplicada (ordenadas) frente al tiempo de ensayo (abscisas), en la que se definen los siguientes parámetros:

- **Dureza:** definida como la altura máxima obtenida en el primer ciclo de compresión. Representa la fuerza máxima para producir una cierta deformación. Se expresa en unidades de fuerza, (newtons, N).
- **Adhesividad:** corresponde al área de fuerza bajo el eje de abscisas que resulta tras la primera compresión. Se define como el trabajo necesario para retirar la sonda de la muestra después de realizar la primera compresión. Presenta siempre un valor negativo. Se expresa en unidades de fuerza x tiempo (N s).
- **Elasticidad:** se define como la capacidad de la muestra para recuperar su forma original, una vez que cesa (deja de aplicarse) la fuerza deformante. Corresponde a la diferencia entre las alturas registradas en la muestra tras la primera compresión (d_1) y al iniciar la segunda (d_2). Se expresa en unidades de longitud (m).
- **Cohesividad:** se define como el grado en que una muestra puede deformarse sin llegar a romperse. Corresponde a la relación que existe entre las áreas positivas de la segunda y la primera compresión ($Área_2/Área_1$). Es adimensional.

De estos parámetros se obtuvieron:

- **Gomosidad:** fuerza para desintegrar una muestra semisólida para tragar (dureza × cohesión). Se expresa en N.
- **Masticabilidad:** se define como el producto de la gomosidad y la elasticidad, es decir, el producto de dureza x cohesividad x elasticidad. Representa el trabajo necesario para desintegrar una muestra hasta dejarla lista para la deglución. Se expresa en unidades de fuerza x longitud, (N m).

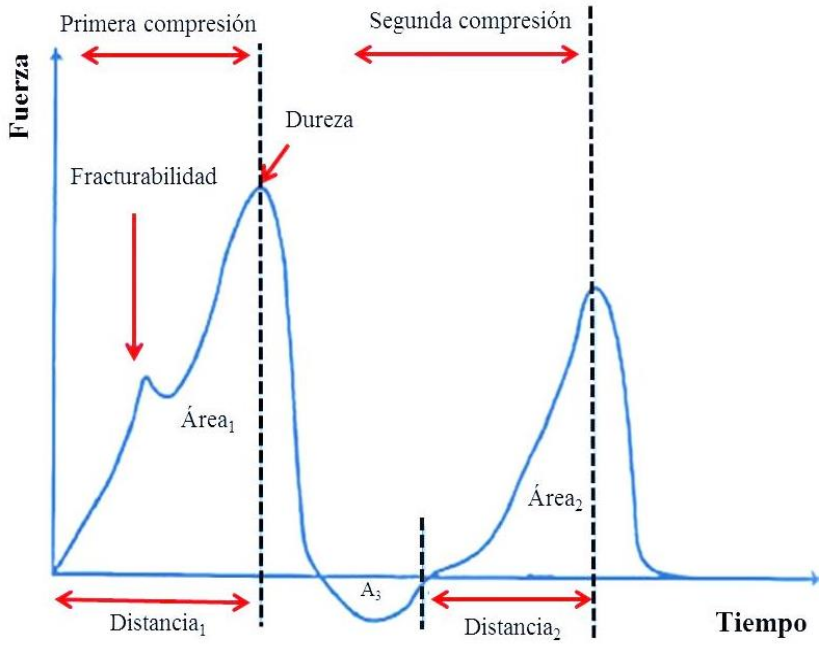


Figura III.6. Representación gráfica (tiempo-fuerza) de un Análisis de Perfil de Textura (TPA)

III.4. Trabajo experimental en películas comestibles

III.4.1. Material experimental. Proteína de lactosuero

Para la elaboración de las películas comestibles se empleó el producto "Protarmor 800" (Armorproteines, Saint-Brice, Coglès, Francia), un concentrado de proteínas de suero lácteo bovino (CPS). Según el fabricante, la composición del concentrado fue la siguiente: 80% proteína, 4% agua, 3,5% cenizas, 3,5% grasa y 9% lactosa.

III.4.2. Producción de películas comestibles. Preparación de soluciones y tratamientos

A partir del mencionado CPS se preparó una dispersión con una concentración del 8% de proteína (p/p) en agua destilada mediante agitación mecánica en un agitador

magnético (modelo ARE, VELP. Scientifica, Italia) a 25 ºC durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo se agregó glicerol en proporción 2:1 proteína: plastificante. Nuevamente se agitó por 30 minutos y se ajustó el pH a 7 con NaOH 2N.

La solución inicial se dividió en 8 lotes de 125 g de solución cada uno de ellos, los cuales se sometieron a distintos tratamientos:

1. **Sin tratamiento ni adición de transglutaminasa de origen microbiano (Control)**.
2. **Sin tratamiento y con adición de transglutaminasa de origen microbiano** (**T-MTGasa).** Lote al que se adicionaron 10 U/ g de MTGasa. La mezcla se agitó durante 30 minutos.
3. **Tratamiento térmico (T-calor)**. Lote calentado en un baño de agua circulante a 82 °C durante 30 min (contabilizado desde que las muestras adquirieron esa temperatura). Tras este tiempo se enfrió en una mezcla de agua-hielo.
4. **Tratamiento térmico y adición de MTGasa (T-Calor-MTGasa).** Lote calentado en un baño de agua circulante a 82 °C durante 30 min. Tras este tiempo se enfrió en una mezcla de agua-hielo y se adicionaron 10 U/ g de MTGasa. La mezcla se agito durante 30 minutos.
5. **Tratamiento con ultrasonidos durante 15 minutos (T-US-15)**. Lote sonicado durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos.
6. **Tratamiento con ultrasonidos durante 60 minutos (T-US-60)**. Lote sonicado durante 60 minutos en un baño de ultrasonidos.
7. **Tratamiento con ultrasonidos durante 15 minutos y adición de MTGasa (T-US-15+MTGasa)**. Lote sonicado durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos. Concluido ese tiempo, se agregaron 10 U/ g de MTGasa. La mezcla se agitó durante 30 minutos.
8. **Tratamiento con ultrasonidos durante 60 minutos y adición de MTGasa (T-US-60+MTGasa**. Lote sonicado durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos. Concluido ese tiempo, se agregaron 10 U/ g de MTGasa. La mezcla se agito durante 30 minutos.

El tratamiento de sonicación se realizó en un baño de ultrasonidos (modelo 35 kHz SONOREX Digital 10 P ultrasoundbath, Bandelin Electronic, Berlin, Alemania), previamente desgasificado durante 15 minutos. Las soluciones se trataron a un nivel de

potencia del 50%; la potencia de ultrasonidos de la onda ultrasónica generada fue de 20,8 W, medida previamente por calorimetría (Rodríguez-Turienzo *et al*., 2011).

La enzima transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa) utilizada fue TGT-PROQ, de Proquiga, (La Coruña, España). La actividad enzimática declarada por el fabricante del producto fue de 10^8 unidades/g.

Todos los lotes se desgasificaron a vacío, para eliminar las burbujas de aire retenidas en la solución.

De cada lote se pesaron 8,57 g de solución y se colocaron en una placa Petri con un diámetro de 9 cm, previamente rotuladas. Las placas se colocaron seguidamente en una estufa de secado por convección de aire (modelo IDL.FI 80, Indelab, Navarra-España) a 35 °C durante 18 horas. A continuación las placas se mantuvieron a una humedad relativa (HR) del 50% durante 96 h dentro de un desecador que contenía una solución saturada de carbonato de potasio saturado. La humedad relativa fue controlada periódicamente mediante un higrómetro (modelo 645, Testo, Lenzkirch-Alemania). Al cabo de este tiempo, las películas se cortaron y despegaron de las placas Petri y se almacenaron durante 48 horas a 50 ± 5 % de humedad relativa. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

III.4.3. Análisis del comportamiento y características de las películas comestibles

III.4.3.1. Determinación de extracto seco

El contenido de extracto seco se determinó por medio de la pérdida de peso por desecación. Se pesaron muestras de 0,1 ± 0,030 g, se introdujeron en cápsulas de porcelana previamente desecadas y pesadas, y se llevaron a una estufa de secado (Indelab, modelo IDL.AI 80, Navarra, España) a 105 ºC durante 24 h. El extracto seco se calculó por diferencia entre el contenido de humedad y el peso de la muestra inicial. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.4.3.2. Determinación de grosor

El grosor se midió usando un micrómetro electrónico digital (Selecta, Barcelona, España) de 0 - 25 mm con 0,001 mm de precisión. Las medidas se realizaron en tres puntos distintos de tres películas, con un total de 9 determinaciones por muestra.

III.4.3.3. Determinación de la solubilidad

Se determinó de acuerdo con el método descrito por Muñoz *et al.* (2012). Se sumergieron muestras entre 0,1 ± 0,006 g en 30 ml de agua destilada y se llevaron a una estufa de incubación a 24 °C durante 24 h. Luego se filtraron usando papeles de filtro (Whatman nº 54) previamente desecados y pesados. Los papeles de filtro se llevaron a una estufa en la que se secaron durante 24 horas a 105 ºC, tras lo cual se pesaron para determinar el peso de la materia seca insoluble. El peso de la materia seca solubilizada se calculó restando el peso de la materia seca insoluble al peso de la materia seca inicial de la muestra y se expresó como porcentaje del peso seco inicial. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.4.3.4. Determinación de la transmisión y permeabilidad al vapor de agua

Las propiedades de barrera al vapor de agua de cada película se determinaron gravimétricamente de acuerdo con el método descrito por Muñoz *et al.* (2012), basado en el reseñado por Gontard *et al.* (1993) y éste en el procedimiento ASTM E96-93 (ASTM, 1993). Las muestras de película se cortaron, ajustaron y sellaron sobre cápsulas de vidrio con borde esmerilado que contenían gel de sílice con un área expuesta de 3,6 ± 0,17 cm de diámetro, se pusieron en un desecador con agua destilada en una cámara acondicionada a 20 ± 0,5 ºC. La tasa de transmisión de vapor de agua (WVT) se calculó usando la fórmula:

$$\mathbf{WVT\ (g/h\ m^2) = W/A}$$

donde: W es el aumento de peso de la célula en 1 h y A es el área de la película expuesta (m^2).

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se calculó con la fórmula:

$$\mathbf{WVP\ (mm/kPa\ h\ m^2) = WVT*L/\Delta P}$$

donde: WVT es la transmisión de vapor de agua (g/h m^2); L es el espesor de la película (mm) y ΔP es la diferencia de presión parcial de vapor de agua (kPa) a través de los dos lados de la película (2,339 kPa, a 20 °C).

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.4.3.5. Determinación de las propiedades mecánicas

Se midieron usando un texturómetro EZ Test, y el software del Sistema de Procesamiento de Datos Trapezium 2 (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón) versión 2.22E

(2004), según el método ASTM D882 (ASTM, 2000; Carneiro-da-Cunha *et al*, 2009; Osés *et al*., 2009).

III.4.3.5.1. Pruebas de punción

Se recortaron 3 rectángulos de 3,3 x 4,5 cm de 3 placas distintas y se almacenaron 24 horas en el desecador al 50% de humedad relativa. Los rectángulos para la prueba de punción se colocaron sobre una placa de acrílico perforada con un orificio en el centro de 13 mm de diámetro. La punción se realizó con una sonda de 3mm de diámetro que se movía a una velocidad de 60 mm/min. La resistencia a la perforación o fuerza de punción (PS) se midió en 3 películas y en 3 puntos de cada una y se calculó dividiendo la máxima fuerza por el área de sección transversal de la película expuesta. La deformación a la punción (PD) se calculó utilizando la ecuación descrita por Gontard *et al.* (1993) y Sobral *et al.* (2001):

$$\mathbf{PD\ (\%) = \Delta l\ /\ l_0 = [(D^2 + l_0^2)^{1/2} - l_0]\ /\ l_0}$$

donde: D es el desplazamiento y l_0 es la longitud inicial de la película que corresponde al radio de la celda de medida (6,5 mm).

III.4.3.5.2. Pruebas de tracción

Se recortaron 8 tiras de 2 x 7 cm de películas de 5 placas diferentes y se almacenaron en un desecador a 50% de HR durante 48h. Las tiras para el ensayo de tracción se sujetaron con dos mordazas de acero separadas entre sí 60 mm y las medidas se realizaron aplicando una velocidad de separación de 20 mm / min. Se midieron la fuerza y la distancia recorrida durante la extensión. Se calculó la fuerza de tracción máximo dividiendo la carga máxima por el área de la sección transversal de la película. El porcentaje de elongación a la rotura se determinó mediante el cociente entre la longitud final en el punto de rotura y la longitud inicial de la muestra expresado en porcentaje.

III.4.3.6. Atributos de color

Las medidas de color y opacidad se realizaron utilizando un espectrofotómetro de esfera (modelo SP60, X-rite Inc., Michigan, EE.UU), con una abertura de 13 mm, empleando el iluminante D65 (luz día) y el ángulo de observación de 10º. El instrumento se calibró siempre antes de las medidas con los patrones blanco y negro suministrados por el fabricante. Se utilizó el espacio CIE *L*a*b** (CIE, 1976) y se determinaron las coordenadas de color *L** (luminosidad), *a** (rojo-verde) y *b** (amarillo-azul). Los valores

*C** (croma o saturación) y *H** (tono o matiz) se obtuvieron de los valores *a** y *b** mediantes las siguientes ecuaciones (**Figura** III.**7**):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$H^* = \arctan (b^*/a^*)$$

Las diferencias de color (ΔE^*) se calcularon de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

donde ΔL^*, Δa^* y Δb^* corresponden a los diferenciales entre el parámetro de color de la muestra y el parámetro de color del blanco utilizado como referencia

$$(L^* = 96{,}04;\ a^* = -0{,}36;\ b^* = 1{,}62)$$

La opacidad (Y) se calculó como la proporción entre la opacidad de la muestra sobre fondo negro (Y_b) y la opacidad de cada muestra sobre fondo blanco (Y_w). Los resultados se expresaron en % aplicando la siguiente ecuación:

$$Y\ (\%) = (Y_b / Y_w) \times 100$$

Las determinaciones se realizaron en tres muestras diferentes y en tres posiciones de la película escogidas de forma aleatoria.

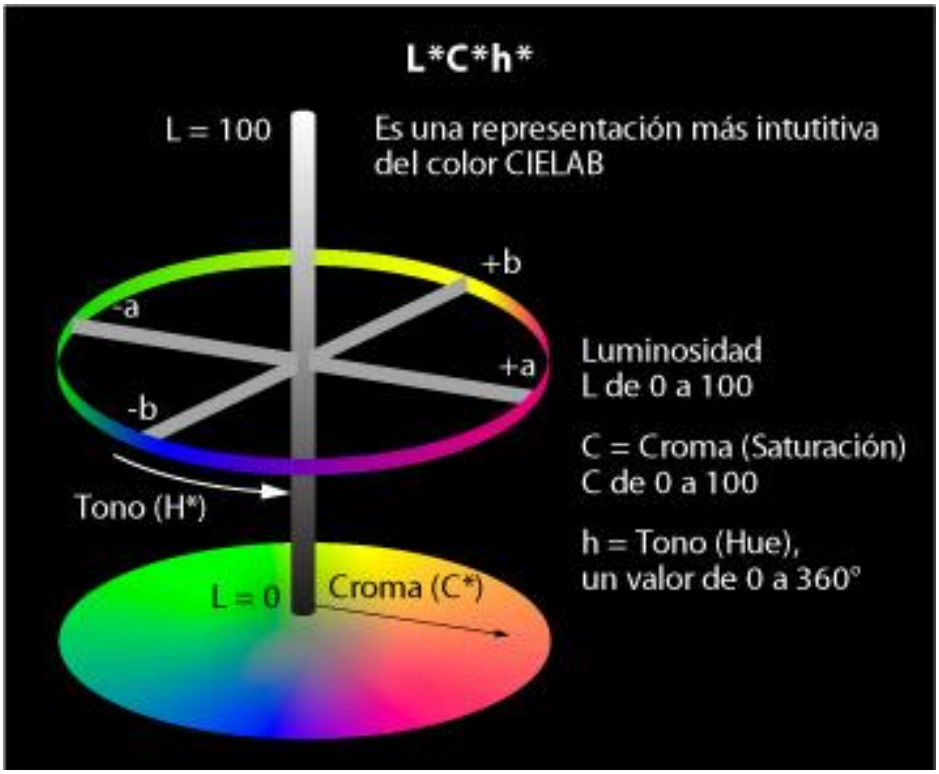


Figura III.7. Atributos de color derivados del espacio de color CIE*lab* (Boscarol, 2007).

III.4.4. Análisis de la estructura de las películas comestibles por relaxometría de RMN

El estudio de relaxometría de RMN de las películas se realizó en el equipo Biospec BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania) indicado en el **Punto** III.**3.3.1** de este Apartado. Los principios aplicados fueron los mencionados en dicho Punto. Las condiciones propias del experimento para adaptarse a las particularidades de las películas se indican en el **Trabajo 5** del **Apartado IV**.

III.4.5. Valoración preliminar de las películas comestibles como material de envasado.

La película comestible con mejor comportamiento físico y mecánico se utilizó para una evaluación preliminar de su posible uso como material de separación entre lonchas o para el recubrimiento de las superficies expuestas al aire cuando los quesos se cortan en porciones. Para ello, lonchas (5 cm de longitud, 3 cm de anchura y 0,3 cm de espesor) de queso Manchego de tres meses de maduración elaborados en grandes empresas se solaparon interponiendo entre ellas películas comestibles. Doce bloques constituidos por cuatro lonchas superpuestas (en cada bloque, 4 lonchas de queso, 3 separadores, 3 superficies superpuestas evaluables) se introdujeron en bolsas suministradas por Plastiñi (Plastinal S.L., Arrubal, La Rioja, España) constituidas por poliamida/copolímero de polietileno, con un espesor de 60 µm y de baja permeabilidad a los gases (velocidad de transmisión de 35 cm^3 24 h^{-1} m^2 bar^{-1} y 150 cm^3 24 h^{-1} m^{-2} bar^{-1} para O_2 y CO_2, respectivamente) y se cerraron por termosellado. Otros doce bloques similares de lonchas, pero utilizando como material de separación entre lonchas un material de uso comercial (Cellophane uso alimentario, N.R.S. 39.02647/V, suministrado por Vapta S.L., Humanes, Madrid) se envasaron en las mismas condiciones y se utilizaron como referencia. Los envases se conservaron en refrigeración a 4 ºC durante 7 días. Transcurrido este tiempo, los envases se mantuvieron a temperatura ambiente (23 ± 1 ºC) durante 2 horas, seguidamente se procedió a su apertura, se extrajo el bloque de lonchas y se estimaron los siguientes aspectos (**ANEXO** III.**1**):

1) *Facilidad de separación de las lonchas*, comparando bloques superpuestos con películas comestibles frente a material comercial, utilizando para evaluar la respuesta la escala:

-Más pegado, más difícil (1)

-Similar (2)

-Menos pegado, más fácil (3)

La valoración se hizo para cada superficie superpuesta (3 superficies por cada envase). Los resultados se expresaron como porcentaje (%) de cada valoración sobre el total de superficies evaluadas.

2) *Integridad de la loncha separada*, computando el número de lonchas rotas en la separación. Los resultados se expresaron como porcentaje de lonchas rotas sobre el total.

3) *Integridad del material de separación*, comparando el número de separadores rotos en la separación de las lonchas o al ser retirados de la superficie de las lonchas a las que permanecieron adheridos.

Las pruebas se realizaron por tres componentes del equipo investigador de forma individual. Cada evaluador utilizó cuatro envases de lonchas con películas comestibles como separador y cuatro envases de referencia (con material de separación comercial). Los evaluadores en las hojas de respuesta contaron con un apartado de observaciones en los que podían relatar cambios de color u olor (**ANEXO** III.**1**).

Se realizaron tres ensayos independientes

III. 5. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados de las determinaciones fisicoquímicas de los quesos y películas comestibles se llevó a cabo utilizando los programas Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE.UU.) y SPSS15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) para Windows

Para comprobar que los datos presentaban una distribución normal se aplicó el test de Shapiro-Wilks. Cuando los datos se ajustaron a una distribución normal se realizó un análisis ANOVA de una vía, para determinar las variaciones entre las medias obtenidas. Cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal, se empleó el test de Kruskal-Wallis para comprobar la hipótesis nula en la que las medianas de las variables, dentro de cada uno de los niveles de datos fueron las mismas. Para la comparación múltiple de las medias y establecer diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0{,}05$) se utilizó el test de Rango Múltiple de Duncan.

Para la comparación de dos grupos de muestras de películas se utilizó la prueba de la "*t de student*" (t-test) clásica.

Los resultados se expresaron como valores medios con su desviación estándar.

Un análisis de ANOVA de dos vías se utilizó para determinar los efectos simultáneos de dos variables o factores sobre determinados parámetros.

El análisis de regresión simple y múltiple para estudiar las correlaciones entre las variables se realizaron utilizando el test de Durbin-Watson, estableciendo un nivel de confianza del 95%.

Para estudiar la relación entre distintas variables se utilizó un modelo cuadrático de superficie de respuesta, siguiendo la ecuación de segundo orden:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

donde Y es la respuesta predicha, β_1, β_2, β_{11}, β_{22} y β_{12} son los coeficientes estimados de regresión. Ellos representan los efectos lineal, cuadrático y la interacción de los factores X_1 y X_2 (parámetros considerados) en la respuesta. La significancia de los parámetros de la ecuación para cada variable de respuesta se evaluó mediante el test de la F.

La raíz del error cuadrático medio (RMSE) se calculó de acuerdo con la ecuación (Baert *et al*. 2007):

Ecuación (1)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(Xpred - Xobs)^2}{n}}$$

donde, *Xpred* son los datos estimados, *Xobs* el resultado obtenido en los análisis experimentales y *n* el número de muestras.

Para la validación de modelos se utilizaron los siguientes parámetros descritos por Ross (1996): factor de precisión (*Af*) y el factor de sesgo (*Bf*), mediante las ecuaciones:

Ecuación (2)

$$Af = 10^{(\sum|\log(Xpred/Xobs)|)/n}$$

Ecuación (3)

$$Bf = 10^{[\sum \log(Xpred/Xobs)n]}$$

En el estudio de RMN-metabolómica (**Trabajo 4** del **Apartado IV**), se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) y un Análisis de Conglomerados o de *Cluster*. Para el ACP se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVI para Windows y el software de AMIX (versión 3.9.11, Bruker BioSpin, Alemania) para establecer las

diferencias en los metabolitos asociadas al tipo de queso y tiempo de maduración. Antes de realizar este análisis multivariante, en cada espectro individual, se redujeron los datos a procesar dividiéndolo de forma arbitraría para establecer regiones espectrales (*buckets*) de ancho variable. El espectro considerado fue desde 9,00 a 0,70 ppm. La integral de cada uno de los *buckets* se normalizó al área total del espectro. El número de componentes principales (CPs) empleados para el ACP fue establecido como el mínimo requerido para explicar el 95% de la varianza total. El análisis de la significancia de las variables (*buckets*) se basó en el procedimiento de Goodpaster *et al*. (2010) y Castejon *et al*. (2015), con un nivel de confianza del 95%. Para enfatizar las diferencias entre los datos experimentales, se ensayaron los siguientes procedimientos de escalado de los datos de los *buckets*:

- Centrado + No Escalado: eliminando únicamente el valor de la media de cada *bucket* en las variables correspondientes.
- Centrado + Varianza Unitaria: empleando la desviación estándar de cada variable como factor de escalado. Mediante esta transformación, se consigue que cada variable tenga el mismo peso en la totalidad del espectro, independientemente de la intensidad de la señal en el espectro original.
- Centrado + Pareto: utilizando la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable como factor de escalado. Este método es ampliamente utilizado para el tratamiento de datos espectroscópicos, ya que continúa manteniendo una distribución en el peso de las variables similar a la de los datos originales. Representa un escalado intermedio entre el no escalado y el escalado varianza unidad.

El Análisis *Cluster* se llevó a cabo con la metodología del programa SPAD SPAD.N, (2003). "Système Portable pour l'Analyse des Données". (Versión 5.6 CISIA Montreuil Cedex. France).

El tratamiento de datos realizado en cada una de las experiencias que constituyen esta Tesis doctoral se especifica en los correspondientes Trabajos del **Apartado IV** de la presente Memoria.

III. 6. Bibliografía

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995). Official Methods of Analysis (16th ed) (Washington, DC).

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2006). Association of Official Analytical Chemists (18th ed) (Washington, DC).

ASTM, (2000). D882-Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In: Annual Book of ASTM Standard. Philadelphia, pp. 160-168.

Baert, K., Valero, A., de Meulenaer B., Samapundo, S., Morshed, M., BO, L., Debevere, J., and Devlieghere, F. (2007). Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of Penicillium expansum. In: apples. *International Journal of Food Microbiology*, 118:139-150.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37.

Boletín Oficial de Castilla y León (BOCyL). 2010, número 70. Orden AYG/473/2010, pp. 32379.

Boscarol, M. (2007). El espacio de Color L*C*h. http://www.gusgsm.com/espacio_color_lch

Carneiro-da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Souza, M.P., Teixeira, J.A., and Vicente, A.A. (2009). Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale L*. *Journal of Food Engineering*, 95(3):379-385.

Castejón, D., García-Segura, J.M., Escudero, R., Herrera, A., and Cambero, M.I. (2015). Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging. *Analytica Chimica Acta*, 1-11.

Federación Castellano Leonesa de Industrias Lácteas. (2012). Regalmento de uso de la marca colectiva "Queso Castellano". Disponible en: www.quesocastellano.es/documentos/docu-3_2012-06-15.pdf

Gontard, N., Guilbert, S., and Cuq, J-L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58:206-211.

Goodpaster, A.M., Romick-Rosendale, L.E., and Kennedy, M.A. (2010). Statistical significance analysis of nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Analytical Biochemistry*, 401:134-143.

Hanson, S.W.F., and Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *BiochemicalJournal*, 89:101-102.

Herrero, A.M., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero De Avila, M.D., and. De La Hoz, L. (2007). Magnetic Resonance Imaging, Rheological Properties, and Physicochemical Characteristics of Meat Systems with Fibrinogen and Thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:9357-9364.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion (MAPA). (1995). Reglamento de la Denominación de Origen Queso Manchego y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial del Estado, 295:35548.

Muñoz, L., Aguilera, J., Rodriguez-Turienzo, L., Cobos, A., and Díaz, O. (2012). Characterization and microstructure of films made from mucilage of Salvia hispanica and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 111:511-518.

Office for harmonization in the internal market in the European Union (OHIM). (2009). Queso Castellano Trade mark number: 007454994, https://oami.europa.eu/eSearch/#basic/1+1+1+1/queso%20castellano

Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S.A., Cruz-Orea, A., Maté, J.I. (2009). Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *Journal of Food Engineering*, 92:56-62.

Rodríguez-Turienzo, L., Cobos, A., Moreno, V., Caride, A., Vieites, J.M., and Díaz O. (2011). Whey protein-based coatings on frozen Atlantic salmon (Salmo salar): Influence of the plasticizer and the moment of coating on quality preservation. *Food Chemistry*, 128:187-194.

Romero de Ávila, M.D., Ordóñez, J.A., De la Hoz, L., Herrero, A.M., and Cambero, M.I. (2010). Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham. *Meat Science*, 84:747-754.

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 81:501-508.

Sobral, P.J.A., Menegalli, F.C., Hubinger, M.D., and Roques, M.A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15:423-432.

ANEXO III.**1**. Hoja de respuesta diseñada para la valoración de películas comestibles como material para el envasado de quesos.

ANÁLISIS DE ENVASES DE QUESO EN LONCHAS

Evaluador:

Fecha:

Dispone de cuatro envases con lonchas de queso separadas por un material experimental (envases marcados con ME) y otros cuatro envases de REFERENCIA con el mismo producto pero separados por un material comercial (envases marcados como REF.). En cada envase hay cuatro lonchas y tres separadores interpuestos, lo que supone tres superficies de relación queso-material de separación-queso. Por favor, abra el envase y extraiga el conjunto de lonchas con cuidado. Separe las lonchas como habitualmente procede para el consumo de productos loncheados. Alterne la separación de lonchas de los envases ME y REF, de forma que pueda comparar el comportamiento. Valore los siguientes aspectos como seguidamente se indica.

1. **Facilidad de separación de las lonchas.**

	Comparando siempre el comportamiento de los envases ME con REF		
	Lonchas más pegadas en ME que en REF	Lonchas más o menos igual de pegadas	Lonchas menos pegadas en ME que en REF
	Más difícil de separar que en ME que en REF (1)	Similar comportamiento de ME y REF (2)	Más fáciles de separar de separar en ME que en REF (3)
Separador			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			

1. Integridad de la **loncha separada**

	Envases EM		Envases REF	
	Rota	Íntegro	Rota	Íntegro
Loncha				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

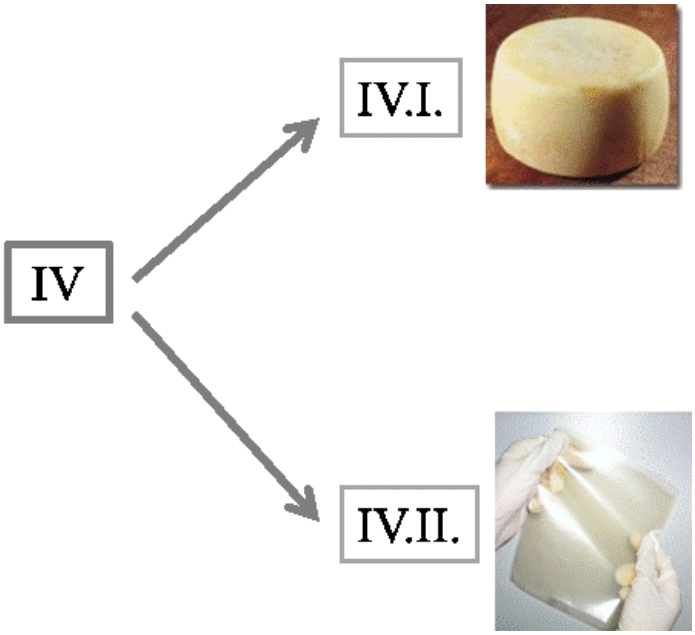
2. Integridad del **material de separación entre lonchas**

	Envases EM		Envases REF	
	Rota	Íntegro	Rota	Íntegro
Separador				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

3. **Observaciones**. Indique por favor cualquier aspecto, de la loncha o/y separador (color, olor, etc.) que considere puede afectar positiva o negativamente a la comercialización del producto loncheado.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Preámbulo

Trabajo realizado: presentación y objetivos

Como se ha mencionado en el **Apartado II** de esta memoria, en la presente Tesis Doctoral se han abordado dos líneas de trabajo, una desarrollada en quesos de oveja y otra en películas comestibles elaboradas con proteínas de lactosuero. En la primera etapa, se ha trabajado con los quesos de oveja de pasta prensada más representativos de la producción actual en España de este tipo de productos: Manchego (Denominación de Origen Protegida, DOP) puro de oveja de elaboración artesanal, ambos producidos en Castilla-La Mancha, y Castellano, marca colectiva, producido en Castilla y León de forma tradicional o industrial. El estudio se abordó desde el empleo de distintas técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), en el afán de determinar su potencial para abordar el análisis, estructural y bioquímico, de los mencionados quesos de oveja e incrementar el conocimiento existente sobre sus características. Cabe indicar que ciertas facetas del estudio son pioneras. En este contexto, es de destacar el empleo de técnicas de RMN para el estudio de quesos de pasta prensada y su integración en el análisis de la estructura y del comportamiento reológico, donde no se han encontrado precedentes en referencias bibliográficas.

Entre las técnicas de RMN, se han utilizado la imagen y la relaxometría de RMN para investigar los cambios en la macro y en la microestructura de los quesos a lo largo de su proceso de maduración (desde los primeros días de fabricación hasta los 180 días). Estas técnicas no son destructivas y podrían utilizarse en línea, sin necesidad de realizar toma de muestras y así no afectar la integridad de las piezas. Por otra parte, se ha recurrido a la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de alta resolución de ángulo mágico (high-resolution magic angle spinning in proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, ^{1}H-HRMAS/RMN) y a la metabolómica para obtener una información global, en un solo análisis, de distintos componentes del queso. Cabe indicar que ^{1}H-HRMAS/RMN permite analizar muestra semisólidas, sin preparación previa y puede aportar información de interés para la caracterización de los quesos, así como el seguimiento de los cambios bioquímicos durante la maduración.

En esta etapa se abordaron los siguientes hitos:

I.1. *Estudio del potencial de Imagen de Resonancia Magnética (IRM) como herramienta predictiva para la estimación de parámetros fisicoquímicos y características de textura.*

I.2. *Evaluación del poder de la IRM para la caracterización y discriminación de quesos de oveja de pasta prensada procedentes de distintos procesos de fabricación.*

I.3. *Estudio de la relación entre la evolución de la microestructura y los cambios en la distribución y movilidad de los protones durante la maduración de quesos de oveja de pasta prensada.*

I.4. *Evaluación del potencial de la relaxometría de RMN para la monitorización del proceso de maduración de quesos de oveja de pasta prensada.*

I.5. *Optimización de la espectroscopia de RMN con sonda HRMAS (^{1}H-HRMAS/RMN) para el análisis de quesos de oveja de pasta prensada.*

I.6. *Estudio del potencial de la ^{1}H-HRMAS/RMN para el análisis y seguimiento del proceso de maduración de quesos de oveja de pasta prensada.*

I.7. *Determinación del potencial de las técnicas quimiométricas basadas en la RMN para la clasificación de muestras de queso de oveja de pasta prensada en función del tiempo de maduración y del proceso de elaboración.*

En una segunda etapa, se ha abordado la elaboración de películas comestibles a partir de proteínas de lactosuero. Se ha intentado así ofrecer un material alternativo para el envasado de porciones o lonchas de queso, de naturaleza próxima al producto comercializado.

Los hitos planteados en esta etapa fueron:

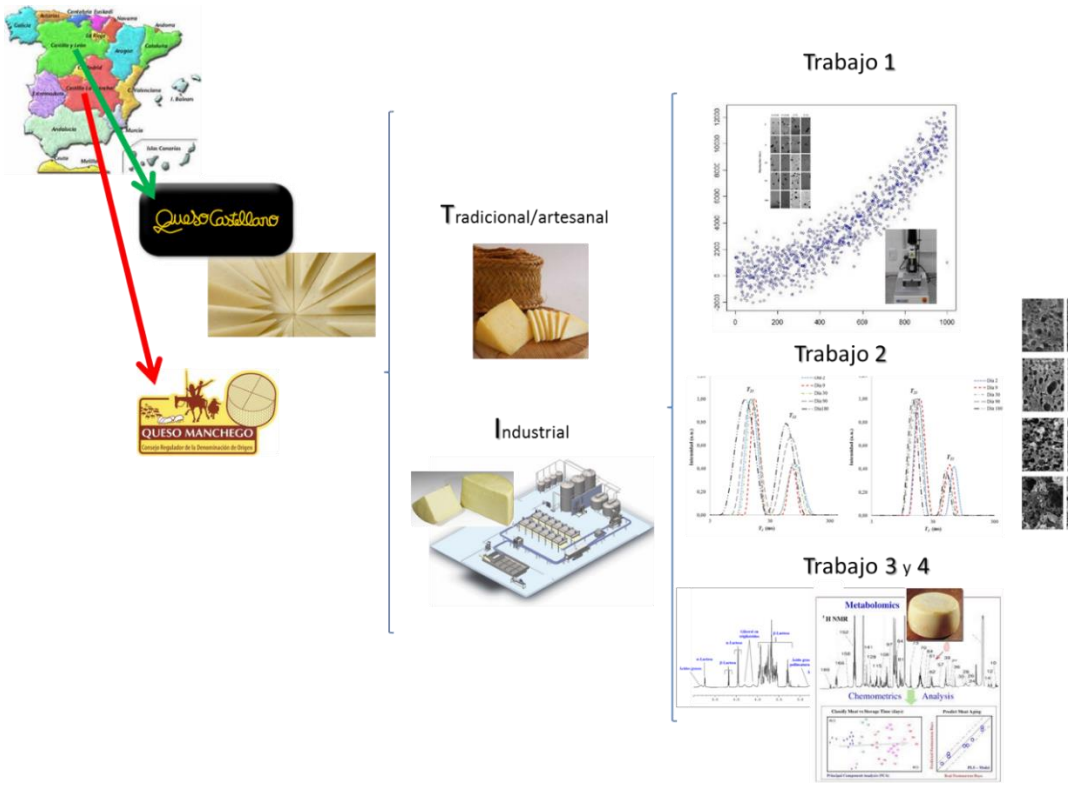
II.1. *Determinación de las propiedades de permeabilidad, color y mecánicas de las películas de proteínas de lactosuero.*

II.2. *Estimación de las características estructurales de las películas comestibles de lactosuero mediante relaxometria de RMN, mono y bidimensionales.*

II.3. *Estudio preliminar del potencial de aplicación de las películas de lactosuero para la comercialización de porciones y lonchas de queso de oveja de pasta prensada..*

IV.I. EXPERIENCIAS EN QUESOS

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) AL ESTUDIO DE QUESOS DE OVEJA ESPAÑOLES DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA Y PASTA PRENSADA



Breve reseña del producto analizado. Planificación del estudio

En el área mediterránea se producen diferentes tipos de queso elaborados con leche de oveja, dentro de estos, los quesos duros y semiduros elaborados exclusivamente con leche de oveja utilizando cuajo animal como coagulante son ampliamente aceptados por el consumidor porque presentan alta calidad sensorial. Su aroma y sabor característico se originan durante el proceso de maduración (Fox y Wallace, 1997). En España, especialmente en las regiones del noroeste (Castilla y León, CL) y centro (Castilla-La Mancha, CLM), se elaboran diversos tipos de quesos duros y semiduros con leche de oveja, que poseen tecnología de fabricación y apariencia externa similar. Estos tipos de queso se obtienen por coagulación enzimática y en la mayoría de los casos con la adición de cultivos iniciadores fundamentalmente de microorganismos mesófilos (generalmente cepas de *Lactococcus lactis ss plactis* y *Lactococcus lactis ss pcremoris*) (Poveda *et al*., 2004; Cabezas *et al*., 2007).

Los quesos de leche de oveja de coagulación enzimática y pasta prensada sin cocer fabricados en las regiones de CL y CLM son por lo general de forma cilíndrica y pesan alrededor de 3 - 4 kg. Se caracterizan por tener una pasta de consistencia firme y compacta, un alto contenido en grasa y en ocasiones presentar poros y cavidades (ojos) de pequeño tamaño distribuidos de manera desigual. El color varía del blanco al amarillo marfil o entre marrón grisáceo y marrón oscuro dependiendo del tipo de queso. Varios autores han estudiado el sabor, aroma y las características texturales de estos quesos de leche de oveja (Izco y Torre, 2000; González-Viñas *et al*., 2001; Fernández-García *et al*, 2002; Fernández-García *et al*., 2004; Benedito *et al*., 2006; Conde *et al*., 2008). Las diferencias significativas en las características sensoriales se han atribuido a varios factores, tanto de la materia prima como de las condiciones y formas de fabricación y maduración de los quesos. Cabe así citar el uso de leche de oveja de distintas razas, la alimentación recibida durante la lactación, incluso las condiciones climáticas y la zona geográfica que condicionan la tipología de los pastos, sin olvidar la calidad microbiológica de la materia prima (Perea *et al*., 2000; Fernández-García *et al*., 2006), junto con las condiciones de fabricación y maduración (Marcos, 1987; Ferrazza *et al*., 2004). Por otra parte, se han realizado diversas investigaciones de los aspectos bioquímicos implicados en la maduración de los quesos de oveja de esta naturaleza dada su elevada importancia comercial en España, (Fernández-García *et al*., 2002; Fernández-García *et al*., 2004; Gaya *et al*., 2005; Fernández-García *et al*., 2006).

En ambas regiones, CL y CLM, la producción de queso de leche de oveja puede ser tradicional (artesanal) o industrial. Los quesos tradicionales (T) se elaboran con leche cruda en pequeñas industrias locales, por lo general siguiendo el uso de sistemas discontinuos y manuales. Los quesos industriales se pueden elaborar a partir de leche cruda o pasteurizada, en instalaciones de funcionamiento semi-continuo o continuo y bajo el control estricto de las condiciones de procesado. De forma tradicional, para la elaboración de los quesos de CLM se ha utilizado cuajo bovino a diferencia de los quesos de CL donde se suele emplear cuajo ovino. El queso Manchego con Denominación de Origen Protegida (DOP) es uno de los quesos más populares de España. Este queso se fabrica en la región de CLM exclusivamente con leche, cruda o pasteurizada, de oveja de la raza Manchega. De acuerdo con lo requerido por el Consejo Regulador del Queso DOP Manchego (MAPA, 1995), el tiempo mínimo de maduración es de 60 días.

Por otra parte, en la región de CLM existe un número importante de pequeñas y medianas empresas que obtienen la leche de varias razas de oveja (como Manchega, Merina y Talaverana) de las granjas locales para la fabricación de quesos de leche de oveja. Esta variedad de queso se comercializa como queso de leche de oveja puro (100% queso elaborado con leche de oveja).

CL es la región española con mayor producción de queso, incluyendo el 85% de los quesos elaborados con leche de oveja, puro y mezcla (MAGRAMA, 2013). El queso de oveja de pasta prensada más conocido de esta región es el queso Castellano, que se hace a partir de leche, cruda o pasteurizada, obtenida de las razas Churra y Castellana, con cuajo animal como coagulante (Fernández-García *et al*., 2004; Román-Blanco *et al*., 1999). La mayor parte de los quesos de leche de oveja elaborados en CL corresponde a esta variedad, y son fabricados en grandes y pequeñas empresas. El queso tradicional Castellano posee un aroma característico de la leche de oveja, y es más lipolítico y picante que el queso manchego. Gaya *et al*. (2003) estudiaron los cambios en la microbiota, la composición y las características sensoriales del queso Castellano durante su maduración.

El queso de oveja castellano se consume en distintos tiempos de maduración, (tierno con un mínimo de 7 días, semicurado con al menos un mes, curado con más de 100 días, viejo cuando sobre pasa los 180 días y añejo con más de 270 días) no obstante, los quesos elaborados con leche cruda se comercializan después de dos meses desde la fabricación (Marcos, 1987; Federación Castellano Leonesa de Industrias Lácteas, 2012).

En la planificación del estudio de los quesos se abordaron tres hitos cuyos resultados se recogen en varios trabajos de acuerdo a la estructura que seguidamente se indica:

IV.I.1. Análisis de la macroestructura por Imagen de Resonancia Magnética Nuclear (IRM). Los resultados obtenidos se recogen en el **Trabajo 1**.

IV.I.2. Análisis de la microestructura por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Relaxometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los resultados obtenidos se recogen en el **Trabajo 2.**

IV.I.3. Análisis de los metabolitos por espectroscopía de RMN de alta resolución de ángulo mágico (^{1}H-HRMAS/RMN). Los resultados derivados se encuentran en los **Trabajos 3** y **4.**

Bibliografía

Benedito, J., Simal, S., Clemente, G., and Mulet, A.. (2006). Manchego cheese texture evaluation by ultrasonics and surface probes. *International Dairy Journal*, 16:431-438.

Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S., and Palop, Ma.LL. (2007). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, 18:11-17.

Conde, T., Mulet, A., Clemente,G., and Benedit, J. (2008). Detection of Internal Cracks in Manchego Cheese Using the Acoustic Impulse-Response Technique and Ultrasounds. *Journal of Dairy Science*, 91(3):918-927.

Federación Castellano Leonesa de Industrias Lácteas. (2012). Regalmento de uso de la marca colectiva "Queso Castellano". Disponible en: *www.quesocastellano.es/documentos/docu-3_2012-06-15.pdf*.

Fernández-García, E., Carbonell, M., and Núñez, M. (2002). Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 1. Comparison of raw and pasteurized milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 69:579-593.

Fernández-García, E., Carbonell, M., Calzada, J., Nuñez, M. (2006). Seasonal variation of the free fatty acids contents of Spanish ovine milk cheeses protected by a designation of origin: A comparative study. *International Dairy Journal*, 16: 252-261.

Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., and Nuñez, M. (2004). Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14:39-46.

Ferrazza, R.E., Fresno, J.M., Ribeiro, J.I., Tornadijo, M.E., and Mansur Furtado, M. (2004). Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. *Food Research International*, 37:149-155.

Fox, P.F. and Wallace, J.M. (1997). Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45:17-85.

Gaya, P., Fernández-García, E., Medina, M., and Nuñez, M. (2003). Seasonal variation in microbiological, chemical, textural and sensory characteristics during ripening of raw ewes' milk Castellano cheese. *Milchwissenschaft. Milk science international*, 58:376-379.

Gaya, P., Sánchez C, Nuñez, M., and Fernández-Garcíam, E. (2005). Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. Seasonal variation. *Journal of Dairy Research*, 72(3):287-95.

González-Viñas, M.A., Poveda, J.M., García-Ruíz, A., and Cabezas, L. (2001). Changes in chemical, sensory and rheological characteristics of Manchego cheeses during ripening. *Journal of Sensory Studies*. 16:361-371.

Izco, J.M., and Torre, P. (2000). Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the purge and trap method and analysed by GC-MS. *Food Chemistry*, 70, 409-417.

Marcos, A. (1987). Spanish and Portuguese cheese varieties. In Fox, P.F. (Ed). Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol. 2 (Ed) Elsevier, London, pp. 185-291.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) (2013). Caracterización del sector ovino y caprino en España. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 1-23

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion (MAPA). (1995). Reglamento de la Denominación de Origen Queso Manchego y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial del Estado, 295:35548.

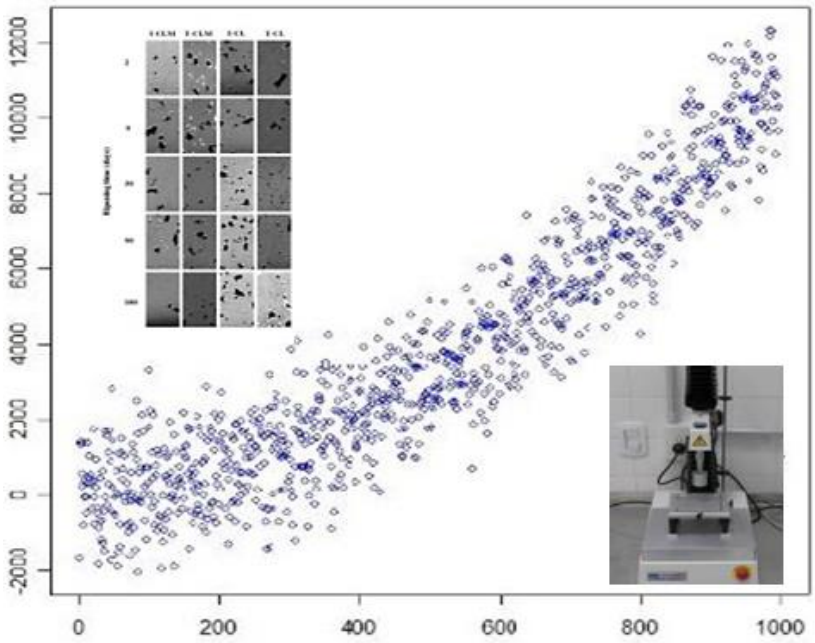
Perea, S., de Labastida, E.F., Najera, A.I., Chávarri, F., Virto, M., de Renobales, M., and Barron, L.J.R. (2000). Seasonal changes in the fat composition of Latxa sheep's milk used for Idiazabal cheese manufacture. *European Food Research and Technology*, 210:318-323.

Poveda, J.M., Cabezasa, L., and McSweeney, P.L.H. (2004). Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chemistry*, 84:213-218.

Román -Blanco, C., Santos-Buelga, J., Moreno-García, B. and Garcia-Lopez, M.-L. (1999). Composition and microbiology of Castellano cheese (Spanish hard cheese variety made from ewes' milk). *Milchwissenschaft. Milk science international*, 54:255-257.

IV.I.1. ANÁLISIS DE LA MACROESCTRUCTURA

Trabajo 1



Marco del estudio

Como es sabido, la formación del gel de caseínas es una etapa crítica en la elaboración del queso aunque conforme avanza el proceso de maduración, la matriz proteica cambia y se modifica su macroestructura. La apariencia visual, la macroestructura y las propiedades reológicas de los geles lácteos son atributos físicos importantes dado que condicionan la percepción sensorial y el comportamiento reológico de los quesos (Horne, 1998; Osorio *et al*., 2005).

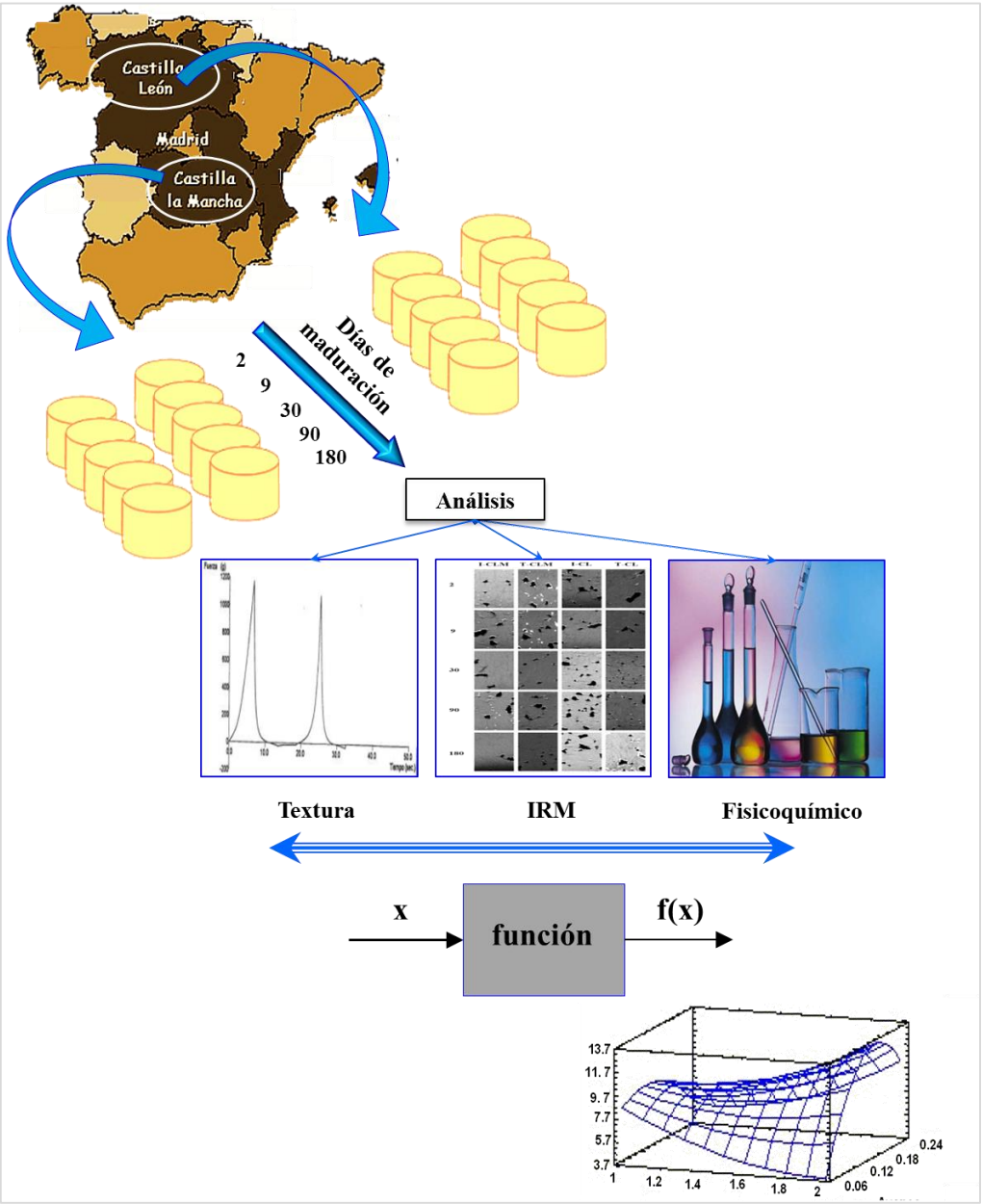
Los quesos de oveja de pasta prensada, tipo Manchego y Castellano, se caracterizan por presentar una estructura más o menos compacta con oquedades o poros (ojos). El queso Manchego madurado se caracteriza por presentar ojos pequeños desigualmente repartidos, pudiendo, en ocasiones carecer de ellos. Sin embargo, el queso Castellano se caracteriza por mostrar orificios dispersos de distinto tamaño, que pueden alcanzar el tamaño de granos de arroz.

La imagen de resonancia magnética (IRM) es una herramienta útil para el análisis de la macroestructura de distintas matrices alimentarias, como patatas (Mariette *et al*., 1999), geles de huevo (Lucas *et al*., 2002) y quesos (Mariette, 2009). Esta técnica requiere del diseño de un adecuado protocolo para obtener la distribución espacial de una determinada estructura, en una escala definida por el tamaño de *voxel* (desde 100 micras hasta varios milímetros). Con ella se han estudiado los cambios, a distintos niveles, de la matriz de distintos tipos de queso, incluido el desarrollo de oquedades y ranuras (Mariette, 2006) y la distribución del contenido acuoso y graso (Budiman *et al*., 2002; Rudan *et al*., 1998). Partiendo de los hallazgos en distintos alimentos, se planteó esta etapa de la investigación en la que se utilizó la IRM para estudiar la macroestructura de los quesos de oveja de pasta prensada y contribuir a su caracterización

TRABAJO 1

ANÁLISIS DE LA MACROESTRUCTURA DE QUESOS DE OVEJA POR IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA (IRM). POTENCIAL DE APLICACIÓN EN LA TRAZABILIDAD DEL PROCESO DE MADURACIÓN Y EN LA PREDICCIÓN DE CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y REOLÓGICAS

Resumen gráfico



Resumen

En los cuatro tipos de quesos de oveja de pasta prensada españoles [fabricados en Castilla-La Mancha (CLM) y Castilla y León (CL) siguiendo un proceso industrial (I-CLM y I-CL) o artesanal (T-CLM y T-CL)] se estudió la evolución de la estructura y de las características de textura durante el proceso de maduración mediante Imagen de Resonancia Magnética (IRM). Se obtuvieron los mapas correspondientes a los tiempos de relajación transversal (T_2) y longitudinales (T_1) y al coeficiente de difusión aparente (*CDA*). Estos mapas ofrecen información complementaria y detallada sobre la macroestructura de los quesos y pueden utilizarse para su caracterización e identificación dependiendo de su procedencia (CLM, CL), proceso de obtención (I, T) y tiempo de maduración. Los cambios detectados en las características fisicoquímicas (pH, a_w, extracto seco, grasa, proteína y ceniza) y en los parámetros de textura (dureza, adhesividad, cohesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad) a lo largo del proceso de maduración de los quesos dependieron de factores asociados a su fabricación y se detectó una interacción ($P < 0,05$) entre ambos factores (tiempo de maduración y tipo de queso) para cada atributo. El análisis de regresión lineal simple y múltiple permitió obtener modelos ($P < 0,01$) para la estimación del contenido acuoso, a_w y tiempo de maduración de cada tipo de queso a partir de los parámetros de IRM (T_1, T_2 y *CDA*). Se propone un modelo general para los quesos de oveja estudiados para predecir la dureza, cohesividad y elasticidad utilizando los valores T_1 y T_2, ya que, en un análisis de validación preliminar, se obtuvieron resultados precisos para estos parámetros texturales. En conjunto, cabe concluir que la IRM, y los parámetros derivados, constituyen una herramienta para el control de la calidad de los quesos de oveja de pasta prensada. En concreto esta técnica permiten monitorizar el proceso de maduración así como la predicción del tiempo de maduración, el contenido y actividad de agua y distintos atributos de textura.

IV.I.1. **TRABAJO 1. Análisis de la macroestructura de quesos de oveja por Imagen de Resonancia Magnética (IRM). Potencial de aplicación en la trazabilidad del proceso de maduración y en la predicción de características fisicoquímicas y reológicas**

IV.I.**1.1. Introducción**

Las propiedades de textura tienen una considerable relevancia en la percepción de la calidad por el consumidor. Las particularidades de la textura contribuyen a la caracterización e identificación de un tipo de queso y son cruciales para su aceptabilidad comercial. Aunque el comportamiento reológico de los diversos tipos de queso es muy diferente, se ha considerado que los factores que determinan los cambios de la textura son básicamente idénticos en todos los tipos, puesto que los componentes del queso son los mismos (Pappa *et al*., 2007) y solamente sus proporciones difieren de unos a otros. Las propiedades de textura, y la calidad global, se pueden relacionar con la particular macroestructura de cada tipo de queso. Por ejemplo, la forma y tamaño de los orificios o agujeros existentes en la matriz proteica de algunos quesos se modifican de acuerdo con el proceso de fabricación y tiempo de maduración (Mariette, 2009; Huc *et al*., 2014), cambiando la percepción en boca.

Tradicionalmente, la textura del queso ha sido evaluada por métodos sensoriales e instrumentales destructivos (Benedito *et al*., 2006; Conde *et al*., 2008). A este respecto, la IRM es una técnica no invasiva y no destructiva que proporciona información estructural de matrices biológicas (Kotwaliwale *et al*., 2012; Altan *et al*., 2011; Herrero *et al*., 2007). El uso de la IRM permite la observación y análisis de la macroestructura de distintos tejidos o matrices y la cuantificación de los tiempos de relajación longitudinal o espín-red (T_1) y de relajación transversal o spín-spín (T_2) así como del Coeficiente de Difusión Aparente (*CDA*) (Herrero *et al*., 2007). Estos parámetros son muy sensibles al contenido de agua y su distribución en bioestructuras, de forma que cualquier cambio provocará modificaciones de su valor (Ramos-Cabrera *et al*., 2006; Bernin y Topgaard, 2013; Chen *et al*., 2013).

La IRM se ha aplicado en lactología para obtener información sobre la distribución del agua y la estructura macroscópica, molecular y microscópica (Mariette, 2006). Varios estudios han demostrado que cualquier cambio en la estructura micelar de las caseínas puede detectarse por IRM (Mariette, 2003). Entre los efectos estudiados por esta tecnología se encuentran los derivados de tratamientos térmicos o de la congelación-descongelación

(Mariette, 2009). Estas investigaciones se han realizado en diversas cremas y quesos, como queso suizo, fresco, mozzarella, cheddar y azules (Mariette *et al*., 1999; Mariette, 2003).

En el presente trabajo se ha estudiado la estructura de cuatro tipos de quesos elaborados siguiendo un procedimiento tradicional o industrial en dos Comunidades: Castilla-La Mancha y Castilla y León. Con ello, se ha pretendido realizar un análisis representativo de los quesos españoles de oveja de pasta prensada. **El objetivo de este estudio fue monitorizar, mediante IRM, los cambios estructurales experimentados por estos tipos de queso durante el proceso de maduración y evaluar el potencial de esta técnica de RMN como herramienta predictiva para la estimación de parámetros fisicoquímicos y de textura. Por otra parte, se consideró la posibilidad de utilizar IMR para la caracterización de quesos de oveja procedentes de distintos procesos de fabricación.**

IV.I.**1.2. Materiales y Métodos**

IV.I.**1.2.1. Material experimental**

Como se ha mencionado anteriormente, se han estudiado quesos de pasta prensada elaborados en Castilla-La Mancha (CLM) producidos en una gran industria (I-CLM), a partir de leche pasteurizada de ovejas de la raza Manchega y siguiendo el procedimiento de la Denominación de Origen Protegida (DOP) queso Manchego (MAPA, 1995). De esta misma coumindad se obtuvieron quesos elaborados, con leche cruda de oveja, en una pequeña empresa siguiendo un procedimiento tradicional (T-CLM). En el estudio también se incluyeron quesos elaborados en Castilla y León (CL) siguiendo las normas de la marca de calidad "Queso Castellano" (OHIM, 2009; BOCyL, 2010; Federación Castellano Leonesa de Industrias Lácteas, 2012). Estos quesos se fabricaron con leche cruda en una gran industria (I-CL) y en una empresa familiar siguiendo un procedimiento tradicional (T-CL). Las particularidades del proceso de elaboración de cada uno de estos quesos se indican en la **Tabla** III.**1** y en el **Apartado III** (**Punto** III.**3.1**) de esta Memoria.

Todos los quesos se elaboraron durante el mes de abril de 2013. En cada caso se elaboraron 25 quesos y se analizaron a lo largo del proceso de maduración, en los días 2, 9, 30, 90 y 180 después de la elaboración. Se analizaron cinco quesos diferentes de cada tipo en cada tiempo de toma de muestra. Por lo tanto, en el estudio se han incluido 100 quesos. Para los distintos análisis se eliminaron 2 cm del perímetro externo y la parte central

(alrededor de 2 cm), como se muestra en la **Figura** IV.I.**1.1**. Las dimensiones y pesos de los quesos utilizados se indican en el **Punto** III.**3.1** del **Apartado III**.

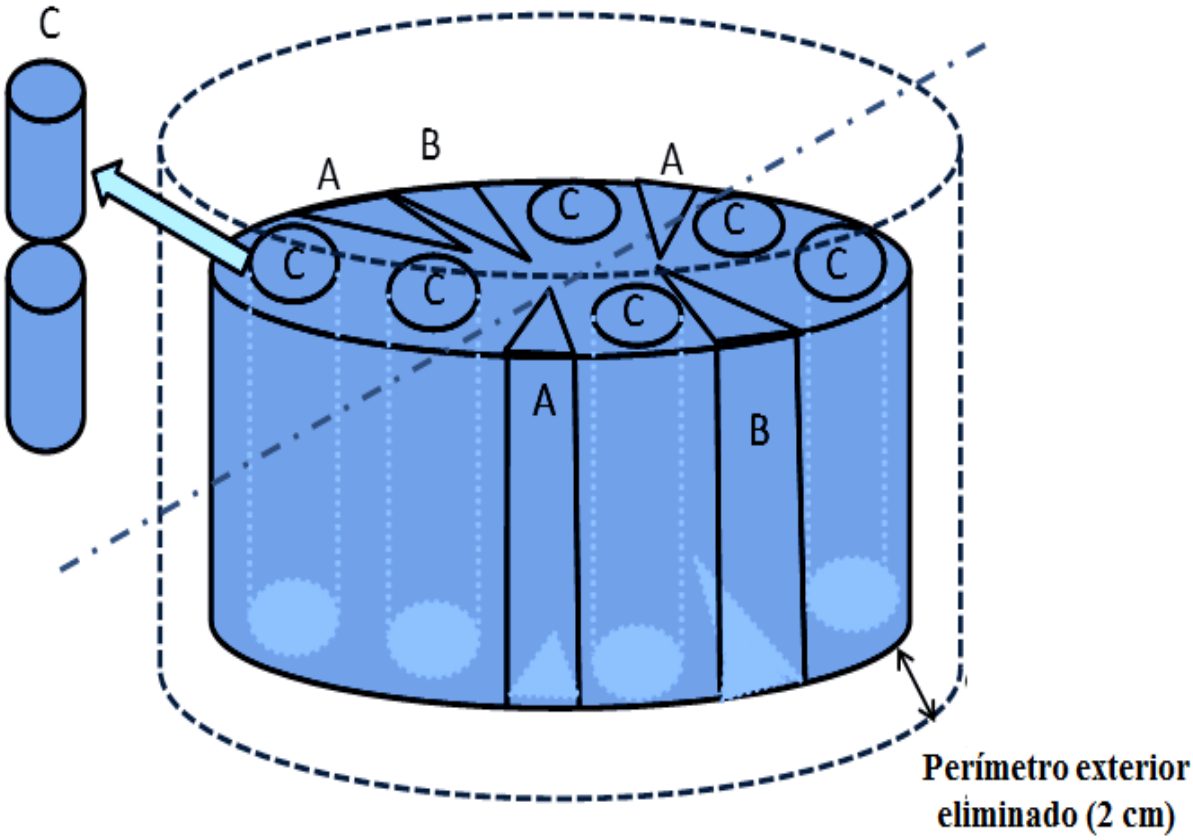


Figura IV.I.**1.1.** Protocolo seguido para la toma de muestras en los quesos Manchegos y Castellanos. A: Muestras para el análisis fisicoquímico. B: Muestras para el análisis de Imagen de Resonancia Magnética (IRM). C: Muestras para el análisis de textura.

IV.I.1.2.2. Determinaciones fisicoquímicas

La actividad de agua (a_w), el pH, el extracto seco (ES), el contenido de proteína y grasa se determinaron por triplicado en cada uno de los quesos, siguiendo el procedimiento descrito en el **Punto** III.**3.2** del **Apartado III** de esta Memoria.

IV.I.1.2.3. Análisis por Imagen de Resonancia Magnética (IRM)

Como se indica en el **Punto** III.**3.3.1** los estudios de IRM se realizaron en el CAI de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico de la UCM, en un espectrómetro Bruker BIOSPEC 47/40 (BrukerGmBH, Ettlingen, Alemania) que opera a 4,7 Teslas (200 MHz), equipado con un sistema de gradientes apantallado de 6 cm de diámetro que permite un gradiente de 450 $mT \cdot m^{-1}$. Las muestras empleadas en estos experimentos de IRM

fueron cortadas en pequeñas cuñas (3 cm largo, 2 cm ancho, 1,5 cm espesor) y se colocaron en el interior de una sonda de radiofrecuencia con 3,5 cm de diámetro interno, empleada para la transmisión y la recepción de la señal. Una vez realizada la homogeneización del campo se adquirieron series de imágenes de eco de espín que permitieron medir los tiempos de relajación espín-red o longitudinal (T_1) y espín-espín o transversal (T_2) y el Coeficiente de Difusión Aparente (*CDA*) (véase **Punto** III.**3.3.1** del **Apartado III**).

Para la obtencion de las medidas de T_2 se adquirió una serie de 60 imágenes con el tiempo de repetición (TR) de 6410,5 ms fijo y en las que el tiempo de eco (TE) varió de 5 a 300 ms. Para las medidas de T_1 se adquirió una serie de 12 imágenes con un TR que varió de 152,5 a 6002,5 ms y un TE fijo de 5 ms. Para las medidas del *CDA* se adquirió una serie de 6 imágenes con diferentes ponderaciones de la difusión [valor b = 48.389, 11464,994; 22426,470; 33309,845; 44152,785 y 54969,881 s mm^{-2}], TR = 2000 ms, TE = 45 ms, duración de los gradientes de difusión (δ) = 10 ms y tiempo entre los gradientes de difusión (Δ) = 45 ms. Los parámetros comunes en los tres experimentos de adquisición de estas imágenes fueron los siguientes: número de promedios: 2; matriz de adquisición: 256x128; campo de visión: 6x3 cm^2; número de cortes: 1; anchura del corte: 1 mm.

Para la obtención de los valores y los mapas de T_1, T_2 y *CDA* se empleó el programa Image J 1.44p (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/).

IV.I.**1.2.4. Determinación de parámetros de textura**

Para la realización del análisis del perfil de textura (TPA) se utilizaron muestras con forma cilíndrica, con una altura de 15 mm y un diámetro de 25 mm, obtenidas mediante un sacabocados (**Figura** IV.I.**1.1**) y cortados por un bisturí para obtener la altura deseada. Los ensayos se efectuaron a 22 ºC en un texturómetro TA.XT2i Stable Micro System Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Inglaterra), utilizando el programa Texture Exponent 32, versión 6.0.70 y una célula de carga de 25 kg. Siguiendo el procedimiento descrito en el **Punto** III.**3.5** del **Apartado III**, se realizó una prueba de doble compresión, hasta el 50% de la altura original de la muestra, para lo que se empleó una sonda de presión de aluminio, con base plana y forma cilíndrica (de 25 mm de diámetro), modelo P/25 asociada a una plataforma de aluminio, modelo. HDP/90, donde se colocaron las muestras.

Una vez concluido el ensayo, se obtuvo la correspondiente curva de deformación fuerza-tiempo, en la que se cuantificaron los siguientes parámetros (Bourne, 1978; Romero de Ávila *et al*., 2014), definidos en el **Punto** III.**3.5** del **Apartado III** de esta Memoria: dureza (N), elasticidad (cm), adhesividad (s N) y cohesión (adimensional). Sobre la base de estos datos se calculó la gomosidad (N) y la masticabilidad (N m).

IV.I.**1.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental y el análisis estadístico se llevaron a cabo utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI para Windows (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE.UU). Los efectos del tipo de queso (cuatro niveles: I-CL, T-CL, I-CLM y T-CLM) y del tiempo de maduración (cinco niveles: 2, 8, 30, 90 y 180 días) en los parámetros fisicoquímicos, de IRM y de textura se analizaron utilizando un diseño experimental factorial (4 x 5). Los datos (de cinco quesos de cada tipo y tiempo de maduración) se analizaron por un modelo para el análisis factorial de tres vías:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon ijk$$

donde *Y* son los datos observados, μ es la media general, α, β y αβ son los efectos principales y *ε* es el error residual.

Las determinaciones fisicoquímicas fueron realizadas por triplicado. Los resultados se expresaron como valores medios con sus desviaciones estándar (DS) en cada tipo de queso.

Para comprobar la distribución normal de los datos (90% de confianza), se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks. Cuando los datos se ajustaron a una distribución normal se realizó un análisis ANOVA de una vía, para determinar las variaciones entre las medias obtenidas. Para la comparación múltiple de las medias y establecer diferencias estadísticamente significativas ($P < 0{,}05$) se utilizó el test de Rango Múltiple de Duncan. Cuando los datos no se ajustaban a la distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis como se indica en el **Punto** III.**5** del **Apartado III**.

Un análisis de ANOVA de dos vías se utilizó para determinar los efectos simultáneos de las variables o factores [tipo de queso de oveja de pasta prensada (T-QOPP) y tiempo de maduración (TM)] sobre los parámetros fisicoquímicos, de IRM y de textura.

Los análisis de regresión lineal simple y múltiples (véase **Punto** III.**5**) se realizaron para determinar la relación entre variables (parámetros de IRM *versus* tiempo de

maduración, contenido de agua y a_w). Para estudiar la relación entre propiedades de textura y parámetros de IRM (T_1 y T_2) se utilizó un modelo cuadrático de superficie de respuesta, siguiendo la ecuación de segundo orden:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

donde Y es la respuesta predicha (parámetros de textura estimados), β_1, β_2, β_{11}, β_{22} y β_{12} son los coeficientes estimados de regresión. Estas representan los efectos lineal, cuadrático y la interacción de los factores X_1 y X_2 (parámetros de IRM: T_1 y T_2) en la respuesta.

La selección de variables en el modelo multivariado se realizó siguiendo el procedimiento de eliminación hacia atrás (*backward*) (Chatterjee y Hadi, 2006), que se basa en iniciar el análisis de regresión múltiple utilizando todos los predictores. A continuación, uno a uno, se elimina el término menos significativo, mientras se conserva la jerarquía del modelo. La variable *X* cuya extracción origina una pequeña disminución en R^2 es eliminada. Este proceso continúa hasta la eliminación de cualquier variable que disminuye el valor de R^2 o su significancia (Chatterjee y Hadi, 2006). La significancia de los parámetros de la ecuación para cada variable de respuesta se evaluó mediante el estadístico *F* de Fisher-Snedecor.

Debido a que los quesos son productos heterogéneos, cada unidad se dividió longitudinalmente a la mitad y cada parte se consideró como una unidad de análisis para el estudio de IRM y de las propiedades de textura (**Figura** IV.I.**1.1**). Para IRM se tomó una porción (aproximadamente 50 g) en cada mitad y cinco regiones de interés (*Region of Interest*, ROI) se analizaron en cada porción. Finalmente se calculó el valor medio (± DS) de cada mitad para su procesado estadístico. En el caso del TPA, de cada mitad se tomaron tres muestras (**Figura** IV.I.**1.1**). Con este proceder, un total de 200 datos de los parámetros de IRM y TPA se procesaron para el análisis de regresión múltiple con el fin de obtener modelos de superficie de respuesta representativos. La raíz del error cuadrático medio (*Root Mean Square Error, RMSE*) se determinó mediante el uso de 30 datos seleccionados al azar de cada tipo de queso de oveja de diferentes tiempos de maduración. La RMSE (Baert *et al*. 2007), se calculó de acuerdo con la ecuación:

Ecuación (1)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(Xpred - Xobs)^2}{n}}$$

donde, *Xpred* son los datos estimados, *Xobs* el resultado obtenido en los análisis experimentales y *n* el número de muestras.

El modelo de regresión múltiple obtenido fue validado en dos muestras adicionales de cada tipo de queso de oveja con diferente tiempo de maduración. El modelo fue validado mediante la comparación de los datos estimados (*Xpred*) con los obtenidos en el análisis reológico (TPA) (*Xobs*). Para este propósito, se calculó el factor de exactitud (*Accuracy factor*, *Af*) y el factor de sesgo (*Bias factor*, *Bf*), siguiendo lo propuesto por Ross (1996), con las siguientes ecuaciones:

Ecuación (2)

$$Af = 10^{(\sum|\log(Xpred/Xobs)|)/n}$$

Ecuación (3)

$$Bf = 10^{[\sum \log(Xpred/Xobs)n]}$$

IV.I.**1.3. Resultados y discusión**

IV.I.**1.3.1. Parámetros fisicoquímicos**

La composición química general, el pH y a_w de los quesos de oveja utilizados en el presente estudio en diferentes momentos de maduración se muestran en la **Tabla** IV.I.**1.1**. Se realizó un estudio inicial para establecer el efecto del tipo de queso de oveja de pasta prensada (T-QOPP) y del tiempo de maduración (TM) en las características fisicoquímicas. El análisis ANOVA de dos vías (**Tabla** IV.I.**1.2**) indicó que el pH se vio afectado significativamente ($P < 0,05$) por T-QOPP. El valor más alto se obtuvo para los quesos I-CLM (osciló de 5,69 a 5,44) y el más bajo se encontró en los quesos de elaboración tradicional (T-CLM y T-CL) (entre 5,3 y 5,1) (**Tabla** IV.I.**1.2**). Las variaciones de los valores de pH entre tipos de quesos (T-QOPP) podría ser consecuencia de ligeras diferencias en el protocolo de fabricación y el origen de la leche de oveja. Sin embargo, los valores de pH cayeron dentro de los intervalos de datos informados por varios autores (González-Viñas *et al.*, 2001; Etayo *et al.*, 2006; Poveda *et al.*, 2004) para tipos similares de queso de leche de oveja.

Tabla IV.I.**1.1.** Características fisícoquímicas de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] a distintos tiempos de maduración.

Parámetros fisícoquímicos	Tiempo de maduración (Días)	Tipo de queso			
		I-CLM	T-CLM	I-CL	T-CL
a_w	2	0,952±0,001 $^{a,\chi}$	0,961±0,001 $^{a,\alpha}$	0,957±0,002 $^{a,\beta}$	0,964±0,003 $^{a,\alpha}$
	9	0,951±0,003 $^{a,\alpha}$	0,954±0,002 $^{ab,\alpha}$	0,952±0,002 $^{b,\alpha}$	0,945±0,009 $^{a,\alpha}$
	30	0,942±0,008 $^{b,\alpha}$	0,946±0,003 $^{bc,\alpha}$	0,946±0,003 $^{b,\alpha}$	0,929±0,001 $^{b,\beta}$
	90	0,936±0,003 $^{bc,\alpha}$	0,942±0,008 $^{c,\alpha}$	0,896±0,008 $^{c,\chi}$	0,926±0,003 $^{b,\beta}$
	180	0,933±0,003 $^{c,\alpha}$	0,904±0,003 $^{d,\beta}$	0,897±0,010 $^{c,b\chi}$	0,891±0,002 $^{c,\chi}$
pH	2	5,69±0,04 $^{a,\alpha}$	5,58±0,03 $^{a,\beta}$	5,26±0,03 $^{ab,\beta}$	5,18±0,06 $^{a,\beta}$
	9	5,66±0,06 $^{a,\alpha}$	5,19±0,06 $^{b,\chi}$	5,33±0,04 $^{a,\beta}$	5,06±0,06 $^{ab,\chi}$
	30	5,44±0,02 $^{b,\alpha}$	5,14±0,05 $^{b,\beta\chi}$	5,22±0,03 $^{b,\beta}$	5,07±0,02 $^{b,\chi}$
	90	5,48±0,01 $^{b,\alpha}$	5,20±0,02 $^{b,\beta}$	5,23±0,01 $^{b,\beta}$	5,11±0,01 $^{ab,\chi}$
	180	5,49±0,02 $^{b,\alpha}$	5,13±0,01 $^{b,\chi}$	5,30±0,01 $^{a,\beta}$	5,11±0,04 $^{ab,\chi}$
Extracto Seco (ES) (g/100 g de queso)	2	50,85±0,20 $^{d,\beta}$	51,92±2,95 $^{b,\alpha}$	50,82±0,55 $^{c,\beta}$	52,91±0,29 $^{d,\alpha}$
	9	51,08±0,36 $^{d,\beta}$	54,45±5,44 $^{b,\alpha}$	52,49±1,17 $^{c,\beta}$	54,73±0,83 $^{c,\alpha}$
	30	58,06±0,43 $^{c,\beta}$	56,37±0,15 $^{ab,\chi}$	63,83±1,83 $^{b,\alpha}$	58,38±0,46 $^{b,\beta}$
	90	63,00±1,11 $^{b,\beta}$	60,88±1,16 $^{a,\beta\chi}$	66,97±0,57 $^{a,\alpha}$	61,56±0,88 $^{a,\beta}$
	180	67,37±0,36 $^{a,\alpha}$	61,01±2,39 $^{a,\beta}$	67,19±0,54 $^{a,\alpha}$	63,09±0,82 $^{a,\beta}$
Cenizas (g/100 g ES)	2	6,01±0,09 $^{c,\beta}$	6,33±0,24 $^{b,\beta}$	7,56±0,34 $^{b,\alpha}$	6,93±0,47 $^{b,\alpha}$
	9	6,11±0,13 $^{c,\beta}$	6,67±0,19 $^{b,\beta}$	7,71±0,48 $^{b,\alpha}$	7,06±0,27 $^{b,\alpha}$
	30	6,17±0,06 $^{bc,\beta}$	6,57±0,51 $^{b,\alpha\beta}$	7,39±0,72 $^{b,\alpha}$	6,99±0,27 $^{b,\alpha}$
	90	6,49±0,29 $^{b,\beta}$	6,69±0,18 $^{b,\beta}$	7,65±0,12 $^{b,\alpha}$	6,95±0,55 $^{b,\beta}$
	180	8,38±0,27 $^{a,\alpha}$	7,33±0,46 $^{a,\beta}$	8,40±0,23 $^{a,\alpha}$	8,01±0,22 $^{a,\alpha\beta}$
Grasa (g/100 g ES)	2	50,25±2,15 $^{a,\beta}$	54,37±2,89 $^{a,\alpha\beta}$	55,27±0,78 $^{a,\alpha}$	55,24±1,32 $^{a,\alpha}$
	9	51,91±1,60 $^{a,\alpha}$	53,88±1,27 $^{a,\alpha}$	54,56±1,48 $^{a,\alpha}$	54,38±1,09 $^{a,\alpha}$
	30	51,93±0,72 $^{a,\beta}$	53,94±1,31 $^{a,\alpha\beta}$	54,11±1,17 $^{a,\alpha}$	54,08±1,31 $^{a,\alpha}$
	90	50,65±0,43 $^{a,\beta}$	52,31±3,70 $^{a,\alpha\beta}$	55,14±1,24 $^{a,\alpha}$	54,64±3,32 $^{a,\alpha}$
	180	52,05±0,89 $^{a,\beta}$	52,84±1,61 $^{a,\alpha\beta}$	54,30±1,06 $^{a,\alpha}$	54,13±1,21 $^{a,\alpha}$
Proteína (g/100 g ES)	2	35,84±1,94 $^{a,\alpha}$	33,66±0,92 $^{b,\alpha\beta}$	33,22±0,56 $^{a,\alpha\beta}$	32,02±1,29 $^{b,\beta}$
	9	36,74±1,89 $^{a,\alpha}$	32,97±1,04 $^{b,\beta}$	34,56±1,12 $^{a,\alpha\beta}$	33,12±0,83 $^{ab,\beta}$
	30	36,94±0,99 $^{a,\alpha}$	33,55±0,54 $^{b,\beta}$	34,18±1,37 $^{a,\beta}$	33,86±0,74 $^{a,\beta}$
	90	36,17±3,26 $^{a,\alpha\beta}$	37,26±1,53 $^{a,\alpha}$	33,92±1,04 $^{a,\beta}$	34,35±1,01 $^{a,\beta}$
	180	37,24±0,89 $^{a,\alpha}$	37,75±1,44 $^{a,\alpha}$	34,49±1,48 $^{a,\beta}$	34,97±0,86 $^{a,\beta}$

a, b, c, d: valores en la misma columna para cada característica fisicoquímica con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración. α, β, χ: valores en la misma fila con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso.

Se detectó una interacción significativa ($P < 0,05$) entre ambos factores (TM y T-QOPP) (**Tabla** IV.I.**1.2**), debido a que el valor de pH de un determinado tipo de queso fue dependiente del tiempo de maduración. En general, el pH de los quesos de CLM

disminuyó durante la primera semana (sobre todo en los quesos artesanales) y después de 30 días mostraron valores similares (**Tabla** IV.I.**1.1**). Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Corzo *et al*. (2000). Los quesos estudiado de CL presentaron valores de pH similares a lo largo de todo el período de maduración (2 - 180 días). Estos resultados están de acuerdo con los valores de pH publicados por Ferrazza *et al*. (2004) para queso de oveja del mismo origen geográfico, como queso Zamorano. Se ha informado que en los quesos de oveja de elaboración artesanal, el pH disminuye en las primeras 24 h después de la fabricación, mientras que en los fabricados con leche pasteurizada el descenso se produce durante la primera semana (Medina y Nuñez, 2004). Las diferencias detectadas con posterioridad en los valores del pH de los distintos T-QOPP estudiados podrían ser consecuencia de ligeras variaciones en el nivel de proteólisis, en función de factores de composición y sus cambios durante la maduración (Revilla *et al*., 2007). El aumento de la temperatura en la maduración favorece la proteólisis y la reducción del pH en quesos tipo Manchego (Gaya *et al*., 1990).

En cuanto a la a_w, sólo se observó un efecto significativo ($P < 0,05$) del TM (**Tabla** IV.I.**1.2**). Para todos los T-QOPP estudiados, los valores de a_w se redujeron con el aumento de TM (**Tabla** IV.I.**1.2**). Se detectó una interacción significativa ($P < 0,05$) entre el T-QOPP y el TM (**Tabla** IV.I.**1.2**) en relación con la velocidad e intensidad del descenso de a_w durante la maduración de los diferentes quesos. En general, los quesos de CL mostraron una disminución mayor de la a_w (con valores iníciales alrededor de 0,96 y de 0,89 a los 180 días de maduración) que los de CLM (de 0,95 a 0,9) (**Tabla** IV.I.**1.1**). Los resultados obtenidos están de acuerdo con valores descritos para quesos similares (Corzo *et al*., 2000; Ferrazza *et al*, 2004). Varios autores (Corzo *et al*., 2000) han informado que la a_w de los quesos tipo manchego disminuye progresivamente durante el período de maduración, con un descenso más pronunciado después de 90 días de maduración. Como era de esperar, el contenido de extracto seco (ES) mostró una evolución paralela al de la a_w, (**Tabla** IV.I.**1.1**), con una constante pérdida de agua (con el consiguiente incremento del porcentaje de ES) durante la maduración del queso (Nuñez *et al*., 1992). En consecuencia, se encontró un efecto significativo del TM en el contenido de ES (**Tabla** IV.I.**1.2**). La interacción significativa ($P < 0,05$) hallada entre ambos factores (T-QOPP y TM), indica que el efecto del T-QOPP en el contenido de ES depende del TM. En este caso, el contenido de ES aumentó a medida que avanzó el tiempo de maduración, aunque el incremento fue mayor para los quesos industriales (de un contenido inicial aproximado de

51 a 67 g / 100 g de queso a los 180 días) en comparación con los de fabricación tradicional (de 52 a 63 g / 100 g) (**Tabla** IV.I.**1.1**).

Tabla IV.I.**1.2.** Efecto del tipo de queso de leche de oveja de pasta prensada (T-QOPP) y del tiempo maduración (TM) en las características fisicoquímicas, parámetros de IRM y propiedades de textura[a].

Parámetros	Factores					
	T-QOPP		***TM***		***Interacción*** **T-QOPP *vs* TM**	
	Estadistico *F*	Valor *P*	Estadistico *F*	Valor *P*	Estadistico *F*	Valor *P*
pH	41,70	0,00	2,25	0,08	14,75	0,00
a_w	1,27	0,29	34,3	0,00	16,1	0,00
Extracto Seco (ES) (g / 100 g de queso)	0,84	0,48	56,29	0,00	5,99	0,00
Proteína (% ES)	7,68	0,00	2,82	0,03	1,61	0,13
Grasa (% ES)	11,56	0,00	0,19	0,94	0,63	0,81
Cenizas (% ES)	8,54	0,00	8,55	0.00	1,59	0,13
T_2	31,19	0,00	5,17	0,00	645,28	0,00
T_1	145,95	0,00	14,62	0,00	68,01	0,00
CDA	2,09	0,10	85,68	0,00	6,04	0,00
Dureza (N)	50,07	0,00	74,95	0,00	6,95	0,00
Adhesividad (Ns)	41,3	0,00	75,71	0,00	13,42	0,00
Cohesividad (adimensional)	408,68	0,00	295,86	0,00	17,67	0,00
Elasticidad (m)	267,43	0,00	44,24	0,00	5,79	0,00
Gomosidad (N)	262,15	0,00	10,43	0,80	8,81	0,00
Masticabilidad (N m)	76,34	0,00	16,92	0,00	3,84	0,00

[a] Determinado por ANOVA de dos vías
Valor *P* de los efectos (tipo de queso y Tiempo de maduración) y sus interacciones sobre los parámetros de IRM y texturales de quesos de oveja. Estadístico *F* (valor de la media de cuadrados entre grupos / valor de la media de cuadrados dentro de grupos)

El contenido de proteínas y de cenizas (g / 100 g de ES) fueron significativamente afectados por T-QOPP y el TM (**Tabla** IV.I.**1.2**). Sin embargo, el contenido de grasa sólo dependió del T-QOPP ($P < 0,05$). Estos resultados indicaron que el contenido de este componente en ES se mantuvo más o menos constante durante todo el periodo de maduración (**Tabla** IV.I.**1.1**). La evolución de estos componentes (proteína, grasa y

cenizas) del queso a lo largo del proceso de maduración fueron diferentes dependiendo del T-QOPP y/o del TM, pero no se detectaron efectos significativos derivados de ambos factores (interacción T-QOPP x TM, $P > 0,05$). Estos resultados están en consonancia con los datos publicados por Revilla *et al*. (2007). En general, los quesos CL mostraron un mayor contenido de grasa que los de CLM (alrededor de 52 frente a 54 g / 100 g de ES) (**Tabla** IV.I.**1.1**). Sin embargo, estos últimos (I-CLM y T-CLM) mostraron un contenido de cenizas (alrededor de 6,5 g /100 g de ES) más bajo que los de I-CL (alrededor de 7,6 g / 100 g de ES) (**Tabla** IV.I.**1.1**). Estos resultados pueden compararse con los hallazgos de otros autores (Marcos *et al*., 1979) en los que se indica que, en el queso tipo Manchego, la concentración de cenizas se relaciona inversamente con la hidrólisis enzimática de β-caseína. Este hecho estaría condicionado por el proceso de elaboración. La variabilidad en el contenido de ceniza puede estar también asociada a ligeras modificaciones en el procedimiento de salazón de los quesos (concentración de sal y tiempo de inmersión) (véase **Tabla** III.**1**, **Apartado III**).

En términos generales, las oscilaciones detectadas en la composición química de cada T-QOPP estuvieron en el intervalo de valores que pueden encontrarse en la literatura para este tipo de quesos (Corzo *et al*., 2000). Las pequeñas diferencias observadas (**Tabla** IV.I.**1.1**), al comparar los distintos T-QOPP, pueden atribuirse al papel de varios factores propios de su proceso de elaboración y cuyo efecto ha sido indicado por diversos autores, como la raza de oveja utilizada (Sakul y Boylan, 1992), la variabilidad de los pastos dependiendo de la zona geográfica de procedencia (Auldist, *et al*., 1998), forma de proceder y condiciones de maduración (Cichoscki *et al*., 2002).

IV.I.**1.3.2. Análisis de la estructura de los quesos por Imagen de Resonancia Magnética (IRM)**

Un ejemplo de los mapas de T_2, T_1 y *CDA* obtenidos por IRM de los cuatro T-QOPP en diferente tiempo de maduración se muestra en las **Figuras** IV.I.**1.2** (mapas T_2), IV.I.**1.3** (mapas T_1) y IV.I.**1.4** (mapas *CDA*). Independientemente de su ponderación (T_2, T_1 y *CDA*), todas las imágenes mostraron una buena homogeneidad de la señal a través de la superficie.

IV.I.**1.3.2.1. Tiempo de relajación transversal espín-espín (T_2)**

T_2 es una medida de las interacciones espín-espín; por lo que puede considerarse que refleja el efecto del conjunto de los protones del sistema sobre cada protón,

principalmente del agua y de la grasa. Los mapas T_2 muestran información importante acerca de la estructura del queso (**Figura** IV.I.**1.2**). En estos mapas, el oscurecimiento se asocia con valores bajos de T_2 y los colores más claros y brillantes con valores altos; el color negro corresponde a la estructura porosa o cavidades que contienen aire y los colores claros y brillantes a la presencia de agua libre, mientras que la grasa libre se puede observar como áreas menos brillantes (McRobbie *et al*., 2006).

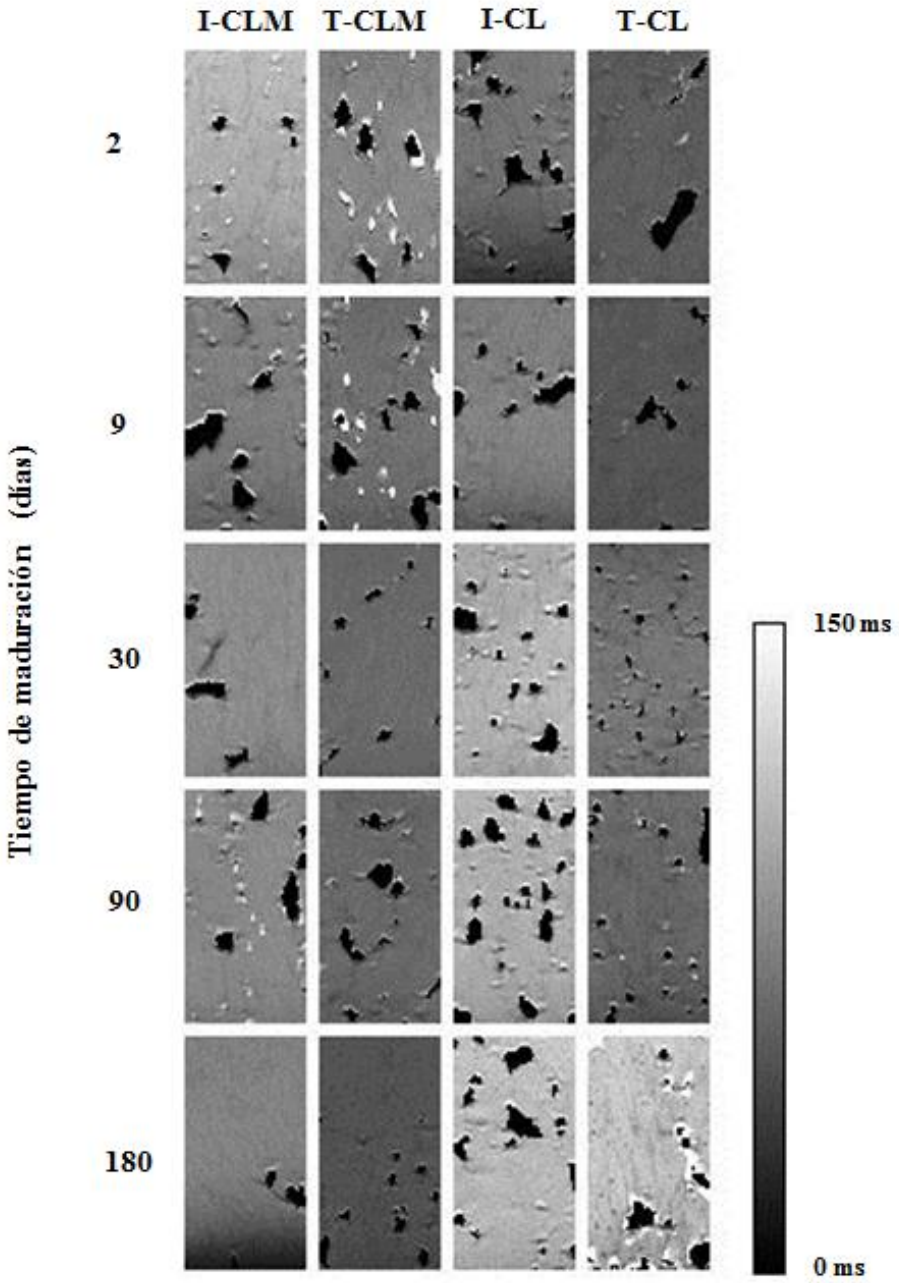


Figura IV.I.**1.2.** Ejemplo de mapas del tiempo de relajación transversal (T_2) de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] a distintos tiempos de maduración.

En general, los quesos de CL mostraron una estructura menos compacta que los quesos de CLM. En los mapas T_2 (**Figura** IV.I.**1.2**) del queso CL se pueden observar grandes aberturas y agujeros (ojos) intercaladas por toda la matriz, principalmente en el queso industrial (I-CL). En los quesos CLM, (**Figura** IV.I.**1.2**) se observó una matriz más homogénea y compacta según aumentó el tiempo de maduración. En consecuencia, los quesos CLM madurados (180 días) presentaron ojos más pequeños y más espaciados. Sin embargo, en la matriz de los quesos CL se mantuvo o aumentó el tamaño de los agujeros a lo largo de la maduración (**Figura** IV.I.**1.2**). Estos resultados coinciden con las afirmaciones de diversos autores (Mariette, 2006) en relación con el hecho de que el tamaño, número y forma de los agujeros en la matriz de queso se modifican de acuerdo con el proceso de fabricación y contribuyen a la calidad global del producto. En general, los agujeros con formas regulares y esféricas se han atribuido a la producción de CO_2 por la actividad bacteriana. Los espacios heterogéneos, en forma y tamaño, se deberían a limitaciones mecánicas al atraparse aire durante la manipulación de la cuajada (Mariette, 2006).

La **Tabla** IV.I.**1.3** muestra los valores de T_2 para las cuatro tipos de quesos de oveja estudiados. Es de destacar que los valores de T_2 de los quesos de CLM mostraron un comportamiento inverso de los de CL respecto a su evolución a lo largo del proceso de maduración. El valor de T_2 del queso CLM disminuyó con el incremento del tiempo desde la fabricación (de 59,0 a 43,5 ms para I-CLM y 45,3 a 27,6 ms para T-CLM, de 2 a 180 días), mientras que el valor T_2 de los quesos de CL se incrementó (de 37,5 a 60,4 y 21,0 a 63,7 ms para I-CL y T-CL, respectivamente en los 180 días de maduración). Este resultado indica claramente que los cambios de T_2 a través del tiempo de maduración dependen del tipo de queso de oveja, en coherencia con la interacción significativa ($P < 0,05$) entre ambos factores (T-QOPP y TM) obtenida con ANOVA (**Tabla** IV.I.**1.2**). Al comienzo del proceso de maduración (de 2 a 9 días después de la fabricación), los quesos de CLM mostraron valores más altos de T_2, indicando un mayor contenido de agua libre. Estos resultados sugieren que la matriz de los quesos jóvenes de CLM tendría mayor presencia de espacios que contienen agua libre que los quesos jóvenes de CL (menores T_2). Sin embargo, al final de la maduración (90 y 180 días) los quesos CL mostraron valores de T_2 más altos que los de CLM. El incremento del valor T_2 en los quesos de CL se produjo cuando el contenido de agua disminuyó al avanzar el tiempo de maduración (**Tabla** IV.I.**1.2**). El T_2 es particularmente sensible a la porosidad de la matriz de la muestra. En

principio, tiempos largos de T_2 corresponden a grandes poros o espacios (*pools*) en la matriz (Simpson *et al*., 2003). Estos resultados están de acuerdo con la estructura que se muestra en la **Figura** IV.I.**1.2**, donde los quesos de CL, al final de la maduración, mostraron una matriz constituida por grandes espacios, probablemente porque se produjo mayor grado de contracción durante la maduración, causando la apertura de la estructura y el consecuentemente aumento del tamaño de los orificios. Cabe suponer que la contracción de la matriz, además de originar una estructura más abierta, contribuiría a la liberación de grasa y agua que se ubicarían en los orificios con un alto grado de libertad. Todo ello contribuiría al incremento del valor T_2. Los tejidos biológicos con alto contenido de agua presentan valores de T_2 en el intervalo de 40 - 200 ms, mientras que en las estructuras en las que predomina la fase grasa los valores de este parámetro oscilan entre 10 y 100 ms (McRobbie *et al*., 2006). Del análisis de la evolución de T_2 durante la maduración se desprende que, la matriz de caseínas de los quesos de CL, se modifica desde una estructura uniforme con abundante agua fuertemente unida a las proteínas (bajo T_2) a una estructura porosa, parcialmente deshidratada, por la que fluye grasa libre (alto T_2).

Sin embargo, los resultados obtenidos para los quesos de CLM indicaron que durante la maduración se incrementaría en la matriz las interacciones proteína-agua, proteína-proteína y proteína-grasa, generando el cierre en la estructura, reduciendo el tamaño y el número de poros u ojos del queso. Como resultado, este tipo de queso evolucionaría experimentando un descenso del agua libre y un incremento de la grasa ligada o atrapada en los pequeños poros de la matriz, con el consiguiente descenso de T_2.

Las diferencias encontradas entre los tipos de queso analizados pueden atribuirse a las variaciones en su proceso de fabricación, sobre todo del pre-tratamiento de la leche (crudo *versus* pasteurizado), variabilidad de la microbiota de la leche y del tipo de cuajo (Fallico *et al*., 2006; O'Callaghan y Guinee, 2004; Nuñez *et al*, 1992; Nieto-Arribas *et al*., 2009). En general, los quesos elaborados con leche cruda maduran más rápidamente y desarrollan sabores más fuertes que los fabricados con leche pasteurizada (Gaya *et al*., 1990; Lau *et al*., 1991). Diversos autores han indicado que la pasteurización influye en la bioquímica del proceso de maduración del queso mediante la alteración de la microflora natural de la leche, la inactivación parcial o completa de ciertas enzimas nativas y una ligera desnaturalización de las proteínas de suero de leche (Grappin y Beuvier, 1997; González-Viñas *et al*, 2001).

Tabla IV.I.**1.3.** Parámetros de Imagen de Resonancia Magnética (IRM) de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] a distintos tiempos de maduración.

Parámetros de IRM	**Tiempo de maduración (Días)**	**Tipo de queso**							
		I-CLM		**T-CLM**		**I-CL**		**T-CL**	
T_2 (ms)	2	59,60±1,51	a,α	45,30±0,82	a,β	37,50±3,63	d,χ	21,00±0,67	c,δ
	9	47,00±1,56	b,α	37,60±1,07	b,χ	42,60±1,35	c,β	22,20±0,79	c,δ
	30	45,20±1,14	c,β	36,10±0,74	b,χ	58,20±1,40	b,α	36,40±1,58	b,χ
	90	44,12±0,46	cd,β	35,10±1,79	b,χ	58,10±1,20	b,α	35,20±1,48	b,χ
	180	43,50±1,08	d,β	27,60±0,70	c,χ	60,40±1,58	a,α	63,70±1,83	a,α
T_1 (ms)	2	473,30±12,28	a,χ	499,10±15,69	a,χ	766,80±15,56	a,α	662,00±18,78	a,β
	9	424,30±15,39	a,δ	486,40±11,43	b,χ	597,10±16,68	b,β	659,60±18,98	a,α
	30	381,10±9,63	b,δ	462,80±9,30	c,χ	578,60±15,33	c,β	602,00±18,52	b,α
	90	355,90±9,88	c,χ	424,70±9,51	cd,β	569,50±11,58	cd,α	544,40±20,10	c,α
	180	362,40±7,26	c,δ	404,10±5,43	d,χ	557,90± 5,70	c,α	485,80±10,20	d,β
CDA (10^{-5} mm^2 s^{-1})	2	1,05±0,14	a,α	0,92±0,13	a,α	1,09±0,23	a,α	0,89±0,13	a,α
	9	0,96±0,11	a,α	0,88±0,11	b,α	0,75±0,20	b,α	0,94±0,13	a,α
	30	0,40±0,80	b,β	0,55±0,14	c,αβ	0,41±0,11	c,β	0,74±0,21	b,α
	90	0,39±0,12	b,αβ	0,46±0,12	c,αβ	0,37±0,07	c,β	0,74±0,20	b,α
	180	0,38±0,13	b,α	0,43±0,13	c,α	0,32±0,11	c,α	0,37±0,13	c,α

T_2= Tiempo de relajación transversal; T_1= Tiempo de relajación longitudinal; *CDA*= Coeficiente de difusión aparente

a, b, c, d: valores en la misma columna para cada parámetro de IRM con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración.

α, β, χ: valores en la misma fila con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso

Tabla IV.I.**1.4.** Análisis de regresión lineal simple del tiempo de maduración (días), el contenido de agua (g / 100 g de queso), a_w y parámetros de IRM (P-IRM) de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)]

Variable dependiente	Variable independiente (P-IRM)	Tipo de queso (parámetros IRM. P-IRM)														
		T_2 (m.s)					T_1 (m.s)					*CDA* (10^{-5} mm^2 s^{-1})				
		Coeficiente de regresión	Valor t	Valor *P*	R^2	SE	Coeficiente de regresión	Valor t	Valor *P*	R^2	SE	Coeficiente de regresión	Valor t	Valor *P*	R^2	SE
Tiempo de maduración	Constante	377.53	6.53	0.000	0,42***	50.44	481.37	8.06	0.000	0,51***	47.56	149.46	9.44	0.000	0,44***	50.67
	P- IRM (I-CLM)	-6.53	-5,50	0.000			-1.05	-7,06	0.000			-137.21	-6,18	0.000		
	Constante	427.69	14.07	0.000	0,76***	33.59	802.25	17.01	0.000	0,83***	27.36	187.31	9.57	0.000	0,49***	48.39
	P- IRM (T-CLM)	-10.06	-12,17	0.000			-1.62	-15,74	0.000			-193.01	-6,82	0.000		
	Constante	-202,58	-5,65	0.000	0,55***	45.77	360.90	5.82	0.000	0,33*	55.59	139.33	9.28	0.000	0,42***	51.76
	P- IRM (I-CL)	5.18	7.57	0.000			-0.49	-4,86	0.000			-131.17	-5,88	0.000		
	Constante	-83.60	-10,78	0.000	0,91***	21.75	591.56	21.76	0.000	0,89***	22.62	200.14	10.18	0.000	0,54***	46.29
	P- IRM (T-CL)	4.08	20.49	0.000			-0.90	-19,61	0.000			-187.41	-7,44	0.000		
Contenido en agua	Constante	2.99	0.64	0.050	0,67**	4.14	-14.11	-1,83	0.050	0,80***	3.10	31.43	15.53	0.000	0,73**	3.66
	P- IRM (I-CLM)	0.78	4.55	0.001			0.14	7.30	0.000			16.07	5.87	0.001		
	Constante	23.01	4.54	0.001	0,55**	3.12	2.31	0.29	0.050	0,66**	2.73	32.93	10.51	0.000	0,47*	3.40
	P- IRM (T-CLM)	0.56	4.00	0.002			0.09	4.99	0.000			16.02	3.37	0.005		
	Constante	78.31	24.02	0.000	0,93***	2.07	-2.49	-0,25	0.050	0,59**	4.95	28.74	12.26	0.000	0,69**	4.33
	P- IRM (I-CL)	-0.75	-12,20	0.000			0.07	4.33	0.001			18.96	5.34	0.000		
	Constante	49.71	38.38	0.000	0,77***	2.01	10.61	3.40	0.005	0,89***	1.41	32.88	14.76	0.000	0,58**	2.72
	P- IRM (T-CL)	-0.22	-6,61	0.000			0.05	10.08	0.000			12.25	4.25	0.001		
a_w	Constante	0.90	70.42	0.000	0,58*	0.006	0.87	80.20	0.000	0,76***	0.004	0.93	324.81	0.000	0,67**	0.01
	P- IRM (I-CLM)	0.00	3.68	0.004			0.00	6.49	0.000			0.02	5.12	0.000		
	Constante	0.83	50.37	0.000	0,78***	0.01	0.74	20.59	0.000	0,70***	0.012	0.90	54.22	0.000	0,32*	0.02
	P- IRM (T-CLM)	0.00	6.91	0.000			0.00	5.47	0.000			0.06	2.45	0.030		
	Constante	1.05	36.08	0.000	0,59**	0.02	0.80	17.96	0.000	0,40*	0.02	0.90	77.51	0.000	0,46*	0.02
	P- IRM (I-CL)	0.00	-4,12	0.001			0.00	2.90	0.010			0.06	3.27	0.006		
	Constante	0.98	195.56	0.000	0,91***	0.01	0.75	27.99	0.000	0,79***	0.01	0.87	62.64	0.000	0,58**	0.02
	P- IRM (T-CL)	0.00	-11,53	0.000			0.00	6.92	0.000			0.08	4.20	0.001		

***$P < 0,0000$; **$P < 0,001$; *$P < 0,01$. SE = error estándar de la estimación. R^2= coeficiente de determinación. El valor *P* para R^2 se determinó mediante el estadístico *F*.
T_2= Tiempo de relajación transversal; T_1= Tiempo de relajación longitudinal; *CDA*= Coeficiente de difusión aparente.

El valor del T_2 se ha relacionado principalmente con el contenido de agua y con la porosidad de la matriz. Cambios en el contenido total de agua, y en el grado de retención de la misma, pueden detectarse por modificaciones del T_2 (Boulby y Rugg-Gunn, 2003). En consecuencia, pequeñas variaciones del proceso de fabricación del queso afectará la estructura de la matriz y su evolución durante la maduración, con las consiguientes modificaciones de T_2. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el valor del T_2 se puede utilizar para la caracterización estructural de diferentes matrices de queso, aunque presenten una composición química similar.

El análisis de regresión lineal simple se aplicó para determinar la relación existente entre T_2 y el tiempo de maduración, el contenido de agua, y la a_w de cada tipo de queso (**Tabla** IV.I.**1.4**). El coeficiente de determinación (R^2) para el tiempo de maduración *versus* T_2 fue significativo ($P < 0{,}001$) en todos los tipos de quesos, aunque para los elaborados en CLM el coeficiente de regresión fue negativo, lo que indicó una correlación inversa entre ambas variables (valores de 0,42 y 0,76, para los R^2 de los quesos I-CLM y T-CLM, respectivamente). Sin embargo, en el caso de los quesos de CL la correlación fue positiva (con valores de 0,55 y 0,91 para R^2 de los quesos I-CL y T-CL, $P < 0{,}0001$) dado que el T_2 aumentó con el avance de la maduración. Para el contenido de humedad del queso *versus* T_2, los coeficientes de determinación más elevados ($R^2 = 0{,}93$, y $R^2 = 0{,}77$; $P < 0{,}0000$ para I-CL y T-CL, respectivamente) se obtuvieron para los quesos que presentaron la matriz más abierta, con agujeros o cavidades grandes (es decir, los queso de CL), mientras que las piezas con estructura más compacta (quesos de CLM) presentaron R^2 más bajo ($R^2 = 0{,}47$ y $R^2 = 0{,}55$, $P < 0{,}001$ para I-CLM y T-CLM, respectivamente), aunque en todos los casos los coeficientes de regresión fueron positivos y significativos (**Tabla** IV.I.**1.4**). En anteriores trabajos (Altan *et al*., 2011), varios autores encontraron también una correlación lineal entre la intensidad de la señal IRM y el contenido de agua de otros tipos de queso (como el feta). Se considera que los resultados obtenidos, en el presente trabajo, corroboran la relación existente entre T_2, no sólo con el contenido de agua, sino también con la porosidad de la matriz.

Las ecuaciones de regresión (**Tabla** IV.I.**1.4**) obtenidas constituyen un ejemplo de las posibilidades de monitorizar y estimar la maduración y el contenido de agua de los quesos a partir del T_2. No obstante, cada tipo de queso, dependiendo de sus características estructurales presenta un comportamiento diferente de los parámetros de IRM a lo largo de maduración, dando lugar a diferentes modelos de regresión. Por tanto, para cada tipo de

queso, sería necesario llevar a cabo un análisis particular para la obtención de los correspondientes coeficientes de regresión. Similares consideraciones pueden hacerse respecto a la a_w *versus* T_2. En este caso, el R^2 más elevado se obtuvo para los quesos tradicionales (T-CL con un R^2 de 0,91, $P < 0,0000$ y T-CLM con un R^2 de 0,78, $P < 0,01$). Al igual que con el contenido acuoso, el coeficiente de regresión para los quesos CLM fue positivo, mientras que fueron negativos para las muestras de CL. La a_w representa el agua disponible (Esteban y Marcos, 1990) por tanto es lógica su relación con la medida de T_2, dado que este parámetro depende fundamentalmente de los protones del agua. Los resultados, en un determinado tiempo de maduración, vendrían a indicar que las estructuras más compactas, en comparación con las matrices altamente porosas, presentarían una menor disposición de agua que las abiertas.

IV.I.**1.3.2.2. Tiempo de relajación longitudinal *espín-red* (T_1)**

T_1 es una medida de cómo los espines, pricipalmente de los protones del agua, ceden su energía a otras moléculas, fundamentalmente a las macromoléculas (Herrero *et al*., 2007, 2009). El agua libre presenta un alto T_1 debido a su movilidad y a que cede su energía al medio con dificultad. Cuando el agua está unida a macromoléculas, disminuye el valor de T_1 por la pérdida de movilidad y la mayor facilidad para la liberación de energía (Gowland y Stevenson, 2003). Para los cuatro tipos de queso considerados, los mapas obtenidos de T_1 se vuelven progresivamente más oscuros con el tiempo de maduración (**Figura** IV.I.**1.3**). Como es sabido (McRobbie *et al*., 2006), los mapas correspondientes a las imágenes ponderadas en T_1 muestran más claramente los límites entre diferentes estructuras biológicas. El color más oscuro (grises oscuros-negro) indica valores de T_1 bajos asociados a la reducción del contenido de agua en matrices biológicas (Herrero *et al*., 2007, 2009). Sin embargo, el color más brillante (gris claro) corresponde a valores más altos de T_1 (**Tabla** IV.I.**1.3**), por su mayor contenido acuoso. Los resultados obtenidos sugieren que la IRM, especialmente a través de los mapas de T_1, puede ser una herramienta útil para el seguimiento del proceso de maduración de los quesos.

De acuerdo con la **Figura** IV.I.**1.3**, los quesos jóvenes (de 2 a 9 días de fabricación), presentaron mapas de T_1 con predominio de colores claros y más brillantes, correspondientes a matrices hidratadas (con menor extracto seco, **Tabla** IV.I.**1.1**). Estas apreciaciones están de acuerdo con la relación de T_1 con el contenido de agua (Herrero *et al*., 2009; Altan *et al*., 2011). Se sabe que los quesos presentan una matriz de caseína (con

diferente nivel de humedad) constituida por un entramado de cadenas proteicas formando una red continua en la que se sitúan los glóbulos de grasa (McMahon *et al*., 2009). Al final del período de maduración estudiado (180 días), los mapas se tornaron más oscuros, indicando la pérdida de agua y la sucesiva ocupación de los espacios de la matriz por aire y grasa.

Los mapas T_1 también permitieron observar que la matriz de los quesos de CLM presentó una estructura más uniforme que la correspondiente a los de CL. Al parecer, la matriz de caseína en el queso CLM fue progresivamente deshidratándose con el avance de los tiempos de maduración, mientras que sucesivamente la fase grasa fue incorporándose de forma uniforme (**Figura** IV.I.**1.3**), lo que se deduce de la imagen uniforme mostrada por la matriz de estos quesos sólo interrumpida por orificios u ojos, (espacios negros), en lo que puede apreciarse la presencia de un contenido acuoso, correspondiente al suero retenido (espacios blanco) en los primeros días tras la fabricación, especialmente en los de elaboración tradicional. Los quesos de CL, después de 9 días de maduración, mostraron una matriz de caseína discontinua, dado que sobre el fondo gris claro se apreciaron zonas irregulares de tonalidad más oscura, que podría corresponder a la acumulación de grasa (**Figura** IV.I.**1.3**).

A modo de resumen puede decirse que los mapas de T_1 correspondientes a los quesos de CL sugieren una matriz (fondo gris claro) que se caracteriza por presentar agujeros intercalados (ojos) que contienen aire (oscuro), cúmulos de grasa (manchas gris más oscuras) y una red fina con agua retenida (malla blanca sobre fondo oscuro). Esta estructura está probablemente asociada con procesos de sinéresis o de contracción de la matriz proteica durante la maduración. Este comportamiento también puede observarse en la evolución de los valores de T_1 (**Tabla** IV.I.**1.3**). En los cuatro tipos de queso, con el aumento del tiempo de la maduración, el valor T_1 disminuyó (**Tablas** IV.I.**1.3** y IV.I.**1.4**). Como en el caso de T_2, se encontró una interacción significativa de los dos factores estudiados, T-QOPP y TM (**Tabla** IV.I.**1.2**). Por lo tanto, el efecto del tiempo de maduración varió dependiendo del tipo de queso considerado. En general, los quesos de CL mostraron valores más altos de T_1 en comparación con los de CLM (**Tabla** IV.I.**1.2**). Estos resultados sugieren que el agua y la grasa presentaron una distribución más libre en la matriz de los quesos de CL que en los de CLM, ya que los valores de T_1 disminuyen cuando los protones del agua están más unidos a macromoléculas como las proteínas (Gowland y Stevenson, 2003). Se sabe que los fluidos tienen T_1 largos (por ejemplo, 1500

a 2000 ms), los tejidos a base de agua presentan valores medios (por ejemplo, 400-1200 ms) y los tejidos grasos generalmente tienen T_1 cortos (por ejemplo, 100-150 ms) (McRobbie *et al*., 2006).

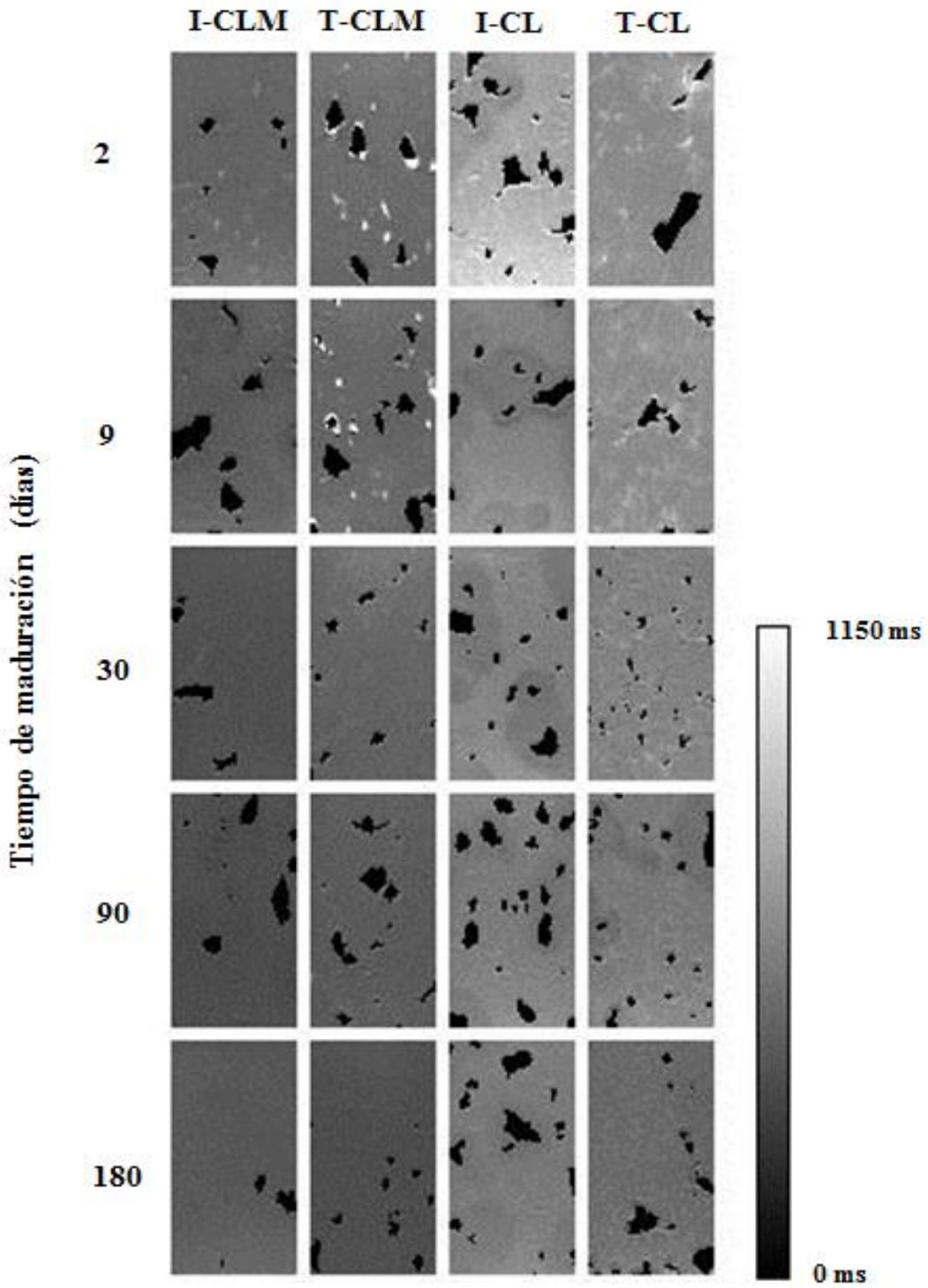


Figura IV.I.**1.3.** Ejemplo de mapas del tiempo de relajación longitudinal (T_1) de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] a distintos tiempos de maduración.

A lo largo de la maduración, los valores de T_1 de los quesos de CL variaron en un intervalo más amplio (de 766,8 a 557,9 ms en I-CL y de 662,0 a 485,80 en T-CL) que el mostrado por los quesos de CLM (entre 473,3 y 362,40 ms para I- CLM y entre 499,1 y 404,1 ms para T-CLM). Estos resultados indicarían que ambos tipos de queso (CL y CLM) experimentaron una pérdida de agua durante el proceso de maduración (reducción de los valores T_1), pero son los quesos de CLM los que sufrieron una menor modificación en sus interacciones iniciales de proteína-proteína y proteína-grasa. Los dados obtenidos servirían para reforzar los comentarios, anteriormente realizados, en relación con los cambios experimentados por la matriz de los quesos de CL. Según se ha sugerido, en estos quesos, de forma simultánea a la pérdida de humedad, se produciría una liberación de grasa que sería acumulada en ciertas zonas de la matriz proteica. Esto explicaría, que al final de la maduración, los valores más elevados de T_1 y T_2 se presenten en los quesos de CL frente a los de CLM.

El análisis de regresión lineal simple (**Tabla** IV.I.**1.4**) ratificó una disminución significativa de T_1 durante la maduración (con R^2 entre 0,31 y 0,89; $P < 0,01$), que a su vez fue paralela a la disminución del contenido de humedad de los quesos (con R^2 entre 0,66 y 0,89; $P < 0,01$). Estos resultados coinciden con los obtenidos en queso feta por Altan *et al* (2011), quienes encontraron una relación similar entre el contenido acuoso y los valores de T_1. Como era de esperar, en todos los quesos de oveja estudiados se obtuvieron R^2 significativos (entre 0,40 y 0,79, $P < 0,01$) al relacionar la a_w con T_1. Cabe asumir que las ecuaciones de regresión lineal obtenidas (**Tabla** IV.I.**1.4**) reflejan el efecto de las condiciones de fabricación de los quesos en la estructura de la matriz y en la forma de evolucionar durante la maduración. En conjunto puede concluirse que tanto T_2 como T_1 tienen potencial para estimar el tiempo de maduración, el contenido acuoso y la a_w de los quesos de oveja de pasta prensada, aunque es necesario obtener ecuaciones de regresión para cada tipo o variedad.

Teniendo en cuenta que cada tipo de queso de oveja presentó unas características estructurales, en buena medida reflejadas por los valores de T_1, y un comportamiento durante el proceso de maduración propio, en gran parte reflejado en la velocidad de deshidratación, se estudió la posibilidad de obtener un modelo de regresión múltiple para estimar el tiempo de maduración de los quesos de oveja (independientemente del tipo) desde el parámetro de IRM y el contenido de extracto seco de los quesos (ES),

obteniéndose la siguiente ecuación, con un admisible R^2 (0,71), altamente significativo ($P < 0,0000$; SE = 38,01):

$$\textit{Tiempo de maduración}\ (\text{días}) = -398,53 + 0.95*T_1 + 0,15*ES^2 - 0,02*T_1*ES$$

IV.I.1.3.2.3. Coeficiente de Difusión Aparente (*CDA*)

El *CDA* es una medida del movimiento de traslación promedio de las moléculas de agua. Este parámetro indica la magnitud de la difusión (de las moléculas de agua) dentro de una matriz biológica (Sener, 2001). Algunas barreras, como las paredes celulares y las matrices proteicas organizadas, reducen la capacidad del agua para difundir. La rotura, o el desequilibrio, de estas estructuras biológicas se refleja en un incremento del *CDA* (Wheeler-Kingshott *et al*., 2003). Por lo tanto, los mapas de *CDA* (**Figura** IV.I.**1.4**) permiten evaluar los cambios de difusión en la matriz de los quesos durante el proceso de maduración.

En los mapas de *CDA* (**Figura** IV.I.**1.4**) el color más brillante indica mayor valor de este parámetro (Herrero *et al*., 2007, 2009). En este caso, la intensidad de la señal disminuyó y el brillo y la intensidad del color de los mapas se redujo con el avance del tiempo de maduración (**Figura** IV.I.**1.4**). Estos cambios reflejarían la pérdida de agua de la matriz de queso coexistiendo con la progresiva consolidación de la estructura de queso. De forma similar, en previos estudios realizados en matrices no alimentarias, los *CDA* más bajos se han asociado con la densidad de los tejidos (Sener, 2001). La **Tabla** IV.I.**1.3** muestra los valores medios de los *CDA* para los diferentes tipos de quesos a lo largo de la maduración.

Los quesos frescos (2 y 9 días después de la fabricación) mostraron valores de *CDA* similares (entre 1,9 y 0,9 10^{-5} mm^2 s^{-1}), independientemente del tipo de queso (**Tabla** IV.I.**1.3**). Los resultados del ANOVA multifactorial (**Tabla** IV.I.**1.2**) indicaron que el *CDA* varió ($P < 0,000$) con el tiempo de maduración, aunque su modificación dependió del tipo de queso, como se refleja en la significativa interacción ($P < 0,05$) existente entre ambos factores (TM y T-QOPP). Estos resultados sugieren que en estos tipos de queso de leche de oveja, las moléculas de agua son compartimentadas en la matriz proteica con una movilidad dependiente de las características estructurales.

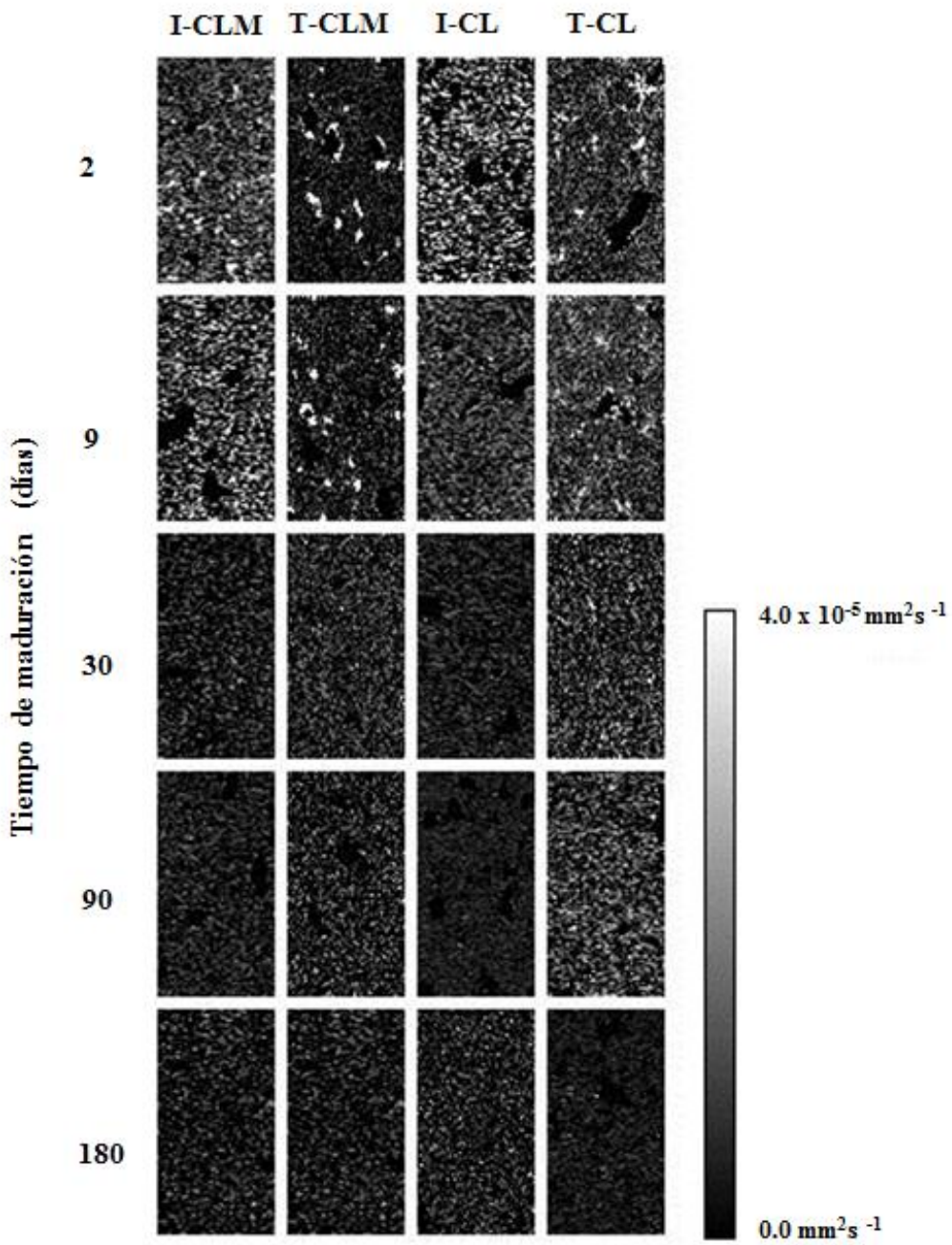


Figura IV.I.**1.4.** Ejemplo de mapas del Coeficiente de Difusión Aparente (*CDA*) de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] a distintos tiempos de maduración

En general, según aumentó el tiempo de maduración, el valor del *CDA* se redujo. Este comportamiento estaría principalmente asociado a la progresiva disminución del contenido de agua y en menor grado con el establecimiento de interacciones proteína-proteína y proteína-agua con la consiguiente estabilización de la matriz del queso (en particular durante el primer mes de maduración). Por tanto, el *CDA* estará condicionado por el grado de compartimentación y estructuración de la matriz de los quesos. El descenso

del *CDA* fue más lento en los quesos T-CL, probablemente debido a su estructura abierta (**Figura** IV.I.**1.2** y IV.I.**1.3**). Al final de la maduración (180 días), los quesos tradicionales (CL y CLM) mostraron los valores de *CDA* más elevados (Tabla IV.I.**1.3**), en contraposición con el contenido en extracto seco (**Tabla** IV.I.**1.1**). Hasta donde los autores tienen conocimiento, no se ha encontrado ninguna referencia en la que se haya estudiado en quesos el *CDA* y su evolución durante el proceso de maduración. En el análisis de regresión lineal simple, para cada tipo de queso, relacionando el *CDA* y el tiempo de maduración (TM), así como el contenido de agua y a_w, se obtuvieron R^2 significativos ($P < 0,01$) en todos los casos (**Tabla** IV.I.**1.4**), aunque para TM y a_w los valores de la correlación fueron, en general, bajos. En varias estructuras proteicas (distintas al queso) se han descrito correlaciones significativas entre el *CDA* y el contenido de agua (Herrero *et al*., 2007, 2009). Además de las ecuaciones de regresión lineal mostradas en la **Tabla** IV.I.**1.3**, teniendo en cuenta que la evolución del *CDA* durante la maduración fue similar para los cuatro tipos de queso, se relacionaron los valores de este parámetro (sin considerar el tipo de queso) con el contenido acuoso de todos los quesos, obteniéndose el siguiente modelo de regresión lineal:

$$\text{Contenido de agua (\%)} = 16,04\ CDA\ (10^{-5}\ mm^2\ s^{-1}) + 31,22$$
$$(R^2 = 0,63;\ P < 0,0000).$$

Este hecho sugiere que el *CDA* es un parámetro útil para estimar el contenido de humedad en los quesos de leche de oveja.

Las modificaciones de los parámetros de IRM en los distintos tipos de queso reflejan los cambios estructurales a lo largo del proceso de maduración. Los resultados del análisis de regresión lineal sugieren que los tres parámetros de IRM (T_2, T_1 y *CDA*) pueden utilizarse para estimar el contenido de agua de los quesos, aunque en general el coeficiente de determinación fue mayor cuando se utilizó T_1 como variable independiente. Los parámetros de IRM (en especial, T_1 y T_2) también se pueden utilizar para estimar la a_w de los quesos y el tiempo de maduración (**Tabla** IV.I.**1.4**).

IV.I.**1.3.3. Características de la textura de los quesos de oveja de pasta prensada**

Las propiedades de textura de los cuatro tipos de queso se presentan en la **Tabla** IV.I.**1.5**. El análisis de los resultados obtenidos a lo largo del proceso de maduración permitió observar que los quesos de CLM elaborados con leche pasteurizada (I-CLM) presentaron los valores más altos ($P < 0,05$) de dureza (desde 24 hasta 42 N) y gomosidad

(desde 13 y 21 N), probablemente debido a la estructura más compacta y uniforme de estos quesos (**Figuras** IV.I.**1.2** y IV.I.**1.3**). Estos hechos pueden asociarse al empleo de leche pasteurizada y a diversos factores de su producción (**Tabla** III.**1**), como el tiempo y la presión en el moldeado de la cuajada (Watkinson *et al*, 2001; Fallico *et al.*, 2006), tipo de cuajo (Etayo *et al.*, 2006; Nuñez *et al.*, 1992) y cultivo iniciador (Nieto-Arribas *et al.*, 2009). Algunos autores indican que el queso Manchego elaborado con leche pasteurizada exhibe una textura más firme que los elaborados con leche cruda (Gaya *et al.*, 1990). En este mismo sentido, se ha afirmado que la proteólisis es más intensa en los quesos fabricados con leche cruda, lo que conlleva la reducción de la firmeza al debilitarse la red de proteínas de queso (Gaya *et al.*, 1990; Creamer y Olson. 1982).

Tabla IV.I.**1.5.** Propiedades de textura de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] a distintos tiempos de maduración.

Parámetros de textura	Tiempo de maduración (Días)	Tipo de queso			
		I-CLM	T-CLM	I-CL	T-CL
Dureza (N)	2	24,09±2,38 $^{c,\alpha}$	13,70±3,30 $^{c,\alpha}$	17,17±2,03 $^{b,\beta}$	18,92±3,19 $^{bc,\beta}$
	9	27,55±3,68 $^{c,\alpha}$	25,76±3,15 $^{b,\alpha}$	17,68±1,66 $^{b,\beta}$	15,40±3,28 $^{c,\beta}$
	30	36,23±3,50 $^{ba,\alpha}$	26,69±4,28 $^{b,\beta}$	18,29±1,84 $^{b,\chi}$	17,15±3,88 $^{bc,\chi}$
	90	32,43±3,78 $^{b,\alpha}$	29,82±3,32 $^{ab,\alpha\beta}$	19,20±3,64 $^{b,\chi}$	21,77±4,59 $^{ab,b\chi}$
	180	42,14±4,30 $^{a,\alpha}$	34,01±2,65 $^{a,\beta}$	30,09±2,60 $^{b,\beta}$	31,17±5,33 $^{a,\beta}$
Adhesividad (Ns)	2	-0,12±0,04 $^{b,\beta}$	-0,02±0,01 $^{c,\beta}$	-0,05±0,02 $^{c,\beta}$	-0,14±0,03 ^{b,a}
	9	-0,14±0,07 $^{b,\alpha}$	-0,07±0,02 $^{c,\beta\chi}$	-0,04±0,02 $^{c,\chi}$	-0,10±0,06 $^{bc,\alpha\beta}$
	30	-0,12±0,05 $^{b,\alpha}$	-0,06±0,03 $^{c,\beta}$	-0,08±0,02 $^{b,\beta}$	-0,06±0,02 $^{c,\beta}$
	90	-0,13±0,01 $^{b,\beta}$	-0,27±0,03 $^{b,\alpha}$	-0,07±0,01 $^{b,\beta}$	-0,33±0,04 $^{b,\alpha}$
	180	-0,25±0,09 $^{a,\beta}$	-0,33±0,05 $^{a,\alpha}$	-0,09±0,01 $^{a,\chi}$	-0,32±0,11 $^{a,\alpha\beta}$
Cohesividad (adimensional)	2	0,67±0,03 $^{a,\beta}$	0,74±0,04 $^{a,\alpha}$	0,66±0,02 $^{a,\beta}$	0,29±0,01 ^{a,c}
	9	0,58±0,14 $^{b,\alpha}$	0,62±0,04 $^{b,\alpha}$	0,58±0,07 $^{b,\alpha}$	0,25±0,02 $^{b,\beta}$
	30	0,61±0,06 $^{ab,\alpha}$	0,44±0,04 $^{c,\beta}$	0,47±0,03 $^{c,\beta}$	0,24±0,02 $^{b,\chi}$
	90	0,41±0,06 $^{c,\alpha}$	0,41±0,04 $^{c,\alpha}$	0,34±0,01 $^{d,\beta}$	0,16±0,01 $^{c,\chi}$
	180	0,34±0,04 $^{c,\alpha}$	0,28±0,03 $^{d,\beta}$	0,27±0,02 $^{e,\beta}$	0,16±0,03 $^{c,\chi}$
Elasticidad (m)	2	0,0006±0,0001 $^{c,\chi}$	0,0017±0,0003 $^{c,\beta}$	0,0007±0,0001 $^{c,\chi}$	0,0025±0,0005 ^{b,a}
	9	0,0011±0,0003 $^{b,\chi}$	0,0018±0,0002 $^{c,\beta}$	0,0010±0,0002 $^{b,\chi}$	0,0034±0,0005 $^{a,\alpha}$
	30	0,0011±0,0003 $^{b,\chi}$	0,0019±0,0002 $^{bc,\beta}$	0,0011±0,0002 $^{b,\chi}$	0,0031±0,0003 $^{a,\alpha}$
	90	0,0017±0,0006 $^{a,b\chi}$	0,0022±0,0002 $^{b,\beta}$	0,0011±0,0003 $^{b,\chi}$	0,0039±0,0004 $^{a,\alpha}$
	180	0,0016±0,0003 $^{a,\chi}$	0,0033±0,0003 $^{a,\alpha}$	0,0019±0,0004 $^{a,\beta}$	0,0033±0,0003 $^{a,\alpha}$
Gomosidad (N)	2	16,14±1,76 $^{a,\alpha}$	10,07±1,88 $^{b,\beta}$	11,33±1,17 $^{a,\beta}$	5,55±0,68 $^{a,\chi}$
	9	15,09±2,32 $^{a,\alpha}$	15,85±1,75 $^{a,\alpha}$	10,23±2,08 $^{ab,\beta}$	3,85±0,49 $^{b,\chi}$
	30	20,78±3,76 $^{a,\alpha}$	11,66±1,20 $^{b,\beta}$	8,53±1,14 $^{b,\beta}$	4,08±0,83 $^{ab,\chi}$
	90	13,33±2,26 $^{b,\alpha}$	12,33±2,65 $^{ab,\alpha}$	6,58±1,71 $^{b,\beta}$	3,36±1,94 $^{b,\beta}$
	180	14,28±1,98 $^{b,\alpha}$	9,68±2,34 $^{b,\beta}$	8,23±1,27 $^{b,\beta}$	4,91±2,24 $^{ab,\chi}$
Masticabilidad (N m)	2	0,010±0,003 $^{b,\beta}$	0,017±0,004 $^{b,\alpha}$	0,008±0,001 $^{b,\beta}$	0,014±0,002 $^{a,\chi}$
	9	0,016±0,004 $^{ab,\beta}$	0,028±0,003 $^{a,\alpha}$	0,010±0,002 $^{b,\delta}$	0,013±0,001 $^{a,\alpha}$
	30	0,023±0,003 $^{a,\beta}$	0,023±0,006 $^{a,\alpha}$	0,009±0,001 $^{b,\beta}$	0,013±0,003 $^{a,\beta}$
	90	0,021±0,006 $^{a,\alpha}$	0,028±0,004 $^{a,\alpha}$	0,007±0,002 $^{b,\beta}$	0,013±0,004 $^{a,\beta}$
	180	0,023±0,005 $^{a,\beta}$	0,032±0,006 $^{a,\alpha}$	0,016±0,003 $^{a,\chi}$	0,016±0,002 $^{a,\chi}$

a, b, c, d: valores en la misma columna para cada atributo de textura con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración.
α, β, χ: valores en la misma fila con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso.

En general, se ha observado un aumento de la dureza con el avance del tiempo de maduración asociado a un incremento paralelo del contenido en extracto seco. Varios autores (Gaya *et al*., 1990; Revilla *et al*., 2007) describieron un comportamiento similar en queso Manchego. El comportamiento observado puede relacionarse con el establecimiento de interacciones proteína-proteína dando lugar a un alto grado de entrecruzamiento en la red tridimencional que constituye la matriz de este tipo de quesos. Esta estructura se ha asociado a un comportamiento mecánico con elevada resistencia a la deformación (Lobato-Calleros *et al*., 2001; 2007). La gomosidad mostró un comportamiento inverso a la dureza, es decir se redujo durante de maduración. Una interacción significativa, entre los dos factores considerados (TM y T-QOPP), se encontró para todos los parámetros de TPA (**Tabla** IV.I.**1.5**). Estos resultados reflejaron que el comportamiento reológico de los quesos estudiados a lo largo de la maduración difiere dependiendo de las condiciones de fabricación.

Estos resultados pueden relacionarse con los hallazgos de diversos autores (Lawrence *et al*., 1987) referentes a las distintas formas de evolución de la estructura de los quesos a lo largo de su maduración. En general, los quesos con más de 30 días de maduración mostraron mayor ($P < 0,05$) adhesividad y elasticidad (**Tabla** IV.I.**1.5**). Al final de la maduración (180 días), los quesos de fabricación tradicional (T-CL y T-CLM) fueron más adhesivos que los de origen industrial (I-CL y I-CLM). El incremento de este atributo de textura con la maduración probablemente se deba al aumento de la grasa libre y de su fluencia en la matriz del queso, haciendo que las superficies sean más adhesivas. Varios autores (Gaya *et al*., 1990) han encontrado modificaciones de las características de textura similares a las aquí descritas durante la maduración de los quesos de oveja de pasta prensada.

En diversos trabajos (Jack *et al*., 1993) se ha indicado que las características de textura están condicionadas por las propiedades estructurales de la matriz de proteína y la grasa inmersa en ella. El incremento de la elasticidad con el tiempo, también observada por otros autores (Gaya *et al*., 1990), estaría asociado al hecho de que la estructura de la matriz del queso durante la maduración cambia haciéndose más compacto (**Figuras** IV.I.**1.2** y IV.I.**1.3**), reduciéndose la fragilidad y aumentando el comportamiento elástico. Lawrence *et al*. (1987) observaron que la textura cambia sobre todo en las primeras semanas de maduración (de la primera a la segunda) por la acción del cuajo, especialmente sobre la fracción de α_{s1}-caseína (péptido α_{sl}-I), facilitando la reestructuración de la matriz. En este

contexto se ha establecido una correlación entre los niveles del fragmento de αs_1-I-caseína y la textura en quesos de leche de oveja (Revilla *et al*., 2007).

La cohesividad, en general, disminuyó a medida que aumentó el tiempo de maduración. Este comportamiento puede estar relacionado con la deshidratación progresiva de la matriz. El queso fabricado tradicionalmente de CL mostró los valores más bajos de cohesividad, probablemente porque este tipo de queso presentó la estructura más abierta, con poros grandes y menos continuos que los otros quesos de leche de oveja (**Figuras** IV.I.**1.2** y IV.I.**1.3**). En cuanto a la masticabilidad, los quesos jóvenes (2 - 9 días después de la fabricación) mostraron valores más bajos que los de un periodo de maduración más largo. En el trabajo de Lobato-Calleros *et al*. (2007) se informó que los quesos que mantenían la estructura globular de la grasa de la leche mostraban valores más bajos de masticabilidad y adhesividad que aquellos con una fracción grasa constituida por numerosas y pequeñas gotas (aceite), con mayor capacidad de fluir.

IV.I.**1.3.4. Relación entre los parámetros de IRM y de textura. Modelos de predicción y validación**

Como es sabido, los atributos de textura dependen de la estructura del sólido analizado (Ding y Gunasekaran, 1998). La IRM es una técnica con elevado potencial para analizar la morfología y estructura de diversos tejidos y matrices biológicas (Mariette *et al*., 2001). Con el fin de analizar si el comportamiento reológico de los quesos de oveja estaba condicionado por su organización estructural, se estudió la relación entre las características de textura y los parámetros de IRM. Con este fin, se utilizó un modelo de superficie de respuesta de segundo orden. Este modelo es flexible y puede adaptarse a diversas formas funcionales para proporcionar una buena predicción de la respuesta verdadera. Para obtener los modelos de estimación de cada atributo de textura desde los parámetros de IRM, se procesaron todos los datos conjuntamente, sin tener en cuenta el tipo de queso. Con este proceder se intentó conseguir un modelo que pudiera aplicarse a los cuatro tipos de queso estudiados.

Al aplicar el mencionado modelo de superficie de respuesta se observó que los coeficientes de determinación (R^2) más significativos se obtenían utilizando los valores de T_1 y T_2 como variables independientes, mientras que la incorporación de los Coeficientes de Difusión Aparente (*CDA*) dio lugar a R^2 más bajos y no siempre significativos (P > 0,05). Este hecho era de esperar ya que T_2 y T_1 proporcionan mayor información

estructural. Únicamente se consideraron las funciones de respuesta para los parámetros de TPA adquiridos directamente del ensayo (dureza, elasticidad, adherencia, y cohesión). Sin embargo, no se procesaron los datos de los atributos secundarios o derivados (gomosidad y masticabilidad).

La **Tabla** IV.I.**1.6** muestra los coeficientes de regresión estimados para las variables de respuesta, junto con los correspondientes R^2 y los valores *F* y *P*. Las superficies de respuesta se representan gráficamente en la **Figura** IV.I.**1.5**. El más alto R^2 (0,76) se obtuvo para la dureza. Para la elasticidad y la cohesividad se obtuvieron R^2 ($P < 0,05$) muy similares (0,69 y 0,66, respectivamente). Debido a que la morfología de los quesos de oveja de pasta prensada no es homogénea, estos coeficientes de determinación (R^2) se consideraron aceptables, y los modelos adecuados para la predicción de la dureza, elasticidad y cohesividad de los quesos utilizando los parámetros de resonancia magnética (**Tabla** IV.I.**1.6**, **Figura** IV.I.**1.5**). La adhesividad presentó el R^2 más bajo (0,46, $P < 0,01$); indicando el menor ajuste de los datos reales a los modelos empíricos.

Para cuantificar el error cuadrático de las diferencias entre un valor predicho por un modelo y un valor real u observado se determinó la raíz del error cuadrático medio (RMSE) para cada parámetro de TPA (**Tabla** IV.I.**1.7**). Los resultados de este valor confirmaron la bondad del ajuste del modelo a los datos de dureza de los quesos de distintos tipos y tiempos de maduración. La RMSE también indicó un buen ajuste de los modelos de cohesividad y elasticidad de los quesos, excepto en el caso de los fabricados de forma tradicional de CL. Estos resultados probablemente se deben a la menor estandarización de la producción de este tipo de quesos. Teniendo en cuenta el orden de magnitud de los valores observados (**Tabla** IV.I.**1.5**), el mayor RMSE correspondió a la adhesividad (**Tabla** IV.I.**1.7**), indicando por tanto que el modelo para este parámetro predice con menor exactitud. Este resultado era de esperar dado el bajo R^2 obtenido para ese modelo (**Tabla** IV.I.**1.6**).

Se han hecho diversos intentos para analizar la estructura macroscópica de los quesos empleando diversas técnicas con el objetivo de establecer su relación con características y criterios de calidad (Mariette *et al*., 1999). Los primeros estudios en los que se utilizó la IRM fueron realizados en queso fresco suizo para analizar la morfología de los agujeros y poros y definir su estructura interna (Rosenberg *et al*., 1992). Con un enfoque similar, también se ha empleado la IRM para la clasificación de distintos quesos blandos y relacionar la macroestructura con la textura percibida en el análisis sensorial

(Mariette *et al*, 2001; Mariette, 2006). Cabe indicar que la IRM también se ha utilizado para estudiar la estructura de los quesos azules (Onea *et al.*, 2003) o el efecto de la congelación en queso mozzarella (Kuo *et al.*, 2003). El presente trabajo es un intento de relacionar valores cuantitativos de la IRM con el comportamiento reológico de los quesos, lo que se considera un avance en la aplicación de esta técnica no destructiva que podría aplicarse a quesos íntegros sin necesidad de tomar muestras que deterioren las piezas.

Tabla IV.I.**1.6.** Modelos de regresión para las propiedades de textura utilizando los parámetros de IRM (T_2 y T_1) de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)]

Variable dependiente	Variable independiente	Coeficiente de regresión	SE	Valor *F*	Valor *P*	
Dureza (N)	constante	187,50	17,75			**R^2**
	T_1	-0,43	0,04	111,32	0,0000	0,76****
	T_2	-1,61	0,40	16,14	0,0001	**Adj, R^2**
	$(T_1)^2$	3,0x10-4	2,9x10-5	107,33	0,0000	0,75
	$(T_2)^2$	0,0140	2,6x10-3	28,12	0,0000	**SE**
	$(T_1 \times T_2)$	8,8x10-4	4,0x10-4	4,41	0,0380	4,1800
Adhesividad (Ns)	constante	-1,51	0,15			**R^2**
	T_1	2,2x10-3	4,6x10-4	23,07	0,0000	0,46**
	T_2	0,03	3,3x10-3	91,71	0,0000	**Adj, R^2**
	$(T_1)^2$	-1,7x10-6	4,3x10-8	15,74	0,0001	0,44
	$(T_2)^2$	-3,3x10-4	3,8x10-5	74,77	0,0000	**SE**
						0,0900
Cohesividad (adimensional)	constante	-6,50	0,48			**R^2**
	T_1	0,02	1,2x10-3	153,26	0,0000	0,66****
	T_2	0,15	0,012	150,57	0,0000	**Adj, R^2**
	$(T_1)^2$	-5,7x10-6	6,7x10-7	72,29	0,0000	0,65
	$(T_2)^2$	-5,3x10-4	1,3x10-4	16,99	0,0001	**SE**
	$(T_1 \times T_2)$	-1,9x10-4	1,7x10-5	134,85	0,0000	0,0900
Elasticidad (m)	constante	0,02	8,6x10-4			**R^2**
	T_1	-1,9x10-5	1,0x10-6	93,24	0,0000	0,69****
	T_2	-4,0x10-4	2,8x10-5	207,57	0,0000	**Adj, R^2**
	$(T_2)^2$	1,8x10-6	3,6x10-7	24,9	0,0000	0,68
	$(T_1 \times T_2)$	3,9x10-7	4,7x10-8	70,44	0,0000	**SE**
						0,0004

***P < 0,0000; **P < 0,001. SE = error estándar de la estimación. R^2= coeficiente de determinación. El vapor P para R^2 se determinó mediante el estadístico F.
T_2= Tiempo de relajación transversal; T_1= Tiempo de relajación longitudinal

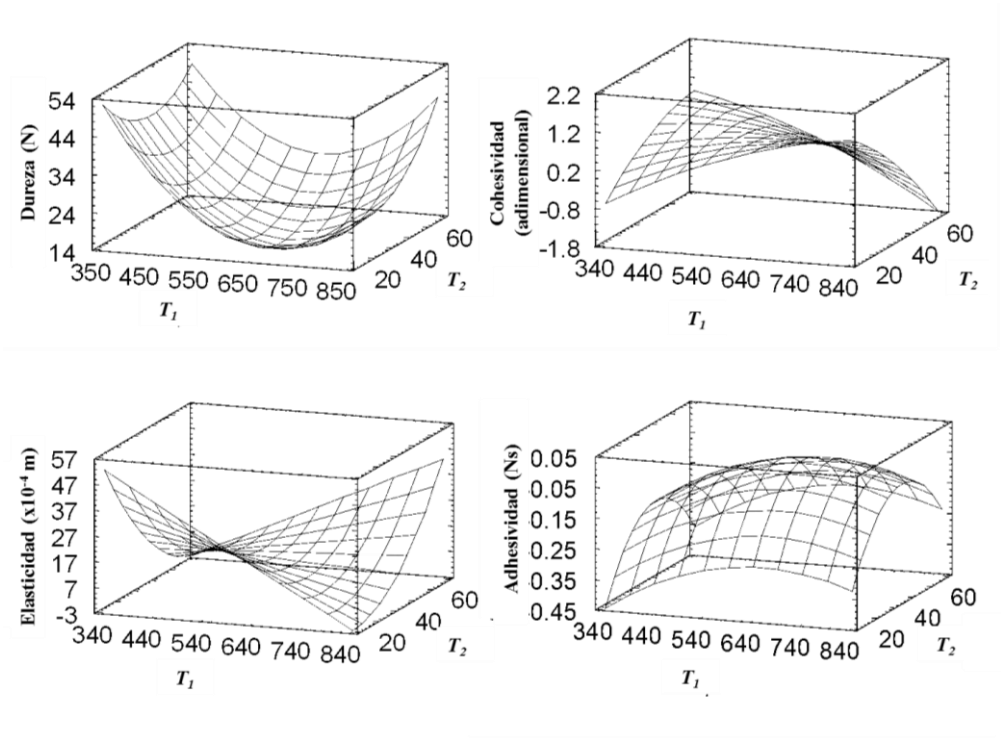


Figura IV.I.**1.5**. Representación gráfica de la superficie de respuesta para el tiempos de relajación longitudinal (T_1) y los parámetros de textura (dureza, cohesividad, elasticidad y adhesividad) de los quesos de leche de oveja de pasta prensada.

Para concluir este capítulo, se realizó un estudio de validación preliminar de los modelos de regresión lineal múltiple obtenidos (**Tabla** IV.I.**1.6**). Para ello, se utilizaron dos muestras adicionales de los cuatro tipos de queso de oveja (CLM y de CL, tradicionales e industriales) adquiridos en los cinco tiempos de maduración estudiados (2, 9, 30, 90, 180 días de fabricación). Los resultados de la comparación de los datos obtenidos en el TPA con estas nuevas muestras, no utilizadas en la generación del modelo, y las predicciones se muestran en la **Tabla** IV.I.**1.7**, donde se muestran el factor de exactitud (*Af*) y el factor de sesgo (B_f). Estos factores permiten estimar el intervalo de aplicabilidad y los límites de fiabilidad de los modelos. A_f indicó la dispersión de las observaciones entorno a las predicciones del modelo. Un modelo predictivo ideal debería tener valores *Af* [Eq. (2)] y *Bf* [Eq. (3)] iguales a 1. Sin embargo, típicamente el valor *Af* aumenta en 0,10 a 0,15 por cada variable considerada en los modelos (Ross *et al*., 2000). En consecuencia, la bondad de los modelos se consideró satisfactoria para la predicción de la dureza de los cuatro tipos de queso. Las predicciones difirieron sólo en aproximadamente el 9% para I-CL, el 10% para T-CLM y del 14 al 15% para T-CL e I-CLM respectivamente (**Tabla** IV.I.**1.7**). En el caso de la cohesión, la precisión de la estimación por los modelos también sería alta para los quesos de CLM (I y T) y CL (I), con

diferencias cercanas al 15 - 18%. Para la elasticidad de este tipo de quesos, el modelo permitiría un acercamiento a los valores observados de alrededor del 68-73%. Sin embargo, los valores observados para la cohesión y la elasticidad de los quesos de T-CL se distanciarían notablemente de los datos de predicción, probablemente debido a la mayor heterogeneidad de los quesos de producción tradicional. No obstante, la falta de ajuste más manifiesta fue para la adhesividad, sobre todo para el queso tradicional (T-CL y T-CLM).

Tabla IV.I.**1.7.** Raíz del error cuadrático medio (RMSE) y los parámetros de validación [factor de exactitud (*Af*) y el factor de sesgo (B_f)] de los modelos obtenidos para las propiedades de textura de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)]

Modelo de parámetros de textura	Tipo de queso	RMSE	*Af*	*Bf*
Dureza (N)	I-CLM	5,89	1,18	1,17
	T-CLM	3,46	1,10	1,02
	I-CL	2,72	1,09	0,95
	T-CL	4,05	1,15	0,85
Adhesividad (Ns)	I-CLM	0,07	1,45	1,09
	T-CLM	0,09	2,12	1,62
	I-CL	0,04	1,79	1,01
	T-CL	0,05	1,66	1,04
Cohesividad (adimensional)	I-CLM	0,07	1,15	1,01
	T-CLM	0,08	1,18	0,95
	I-CL	0,08	1,18	1,06
	T-CL	0,17	3,39	3,33
Elasticidad (m)	I-CLM	0,0004	1,37	1,12
	T-CLM	0,0006	1,31	1,03
	I-CL	0,0003	1,32	1,02
	T-CL	0,0021	2,70	0,36

RMSE calculado utilizando la *Ecuación* (1). *Af* obtenido de la *Ecuación* (2). B_f de acuerdo a *Ecuación* (3).

El B_f permite conocer, sobre los valores observados, si los modelos sobreestiman o subestiman el parámetro para el que se obtuvieron. En el caso de la dureza de los quesos de CLM (I y T), se obtuvieron valores de *Bf* mayor de uno. Esto indicaría que la media predicha de este parámetro será más alta que la de los valores observados. Sin embargo, la estimación de la dureza del queso de CL sería menor que los datos reales (B_f<1) (**Tabla**

IV.I.**1.7**). Los valores *Bf* obtenidos para los modelos de cohesividad indicaron que el promedio predicho para quesos industriales (I-CLM y I-CL) es ligeramente superior al de los valores reales (1,01 y 1,06, respectivamente), mientras que estaría sensiblemente por debajo en los quesos tradicionales de CLM (*Bf* = 0,95). De acuerdo con los valores de *Bf*, la media predicha de la elasticidad para estos quesos (I-CLM, T-CLM y I-CL) también estaría ligeramente sobreestimada (1,02 a 1,12). Comentarios similares se pueden hacer con respecto a la estimación de la media de la adhesividad. En todos los casos, los valores de B_f más alejados de 1 se encontraron en los quesos de elaboración tradicional, sin duda por la ya comentada menor estandarización de la producción en empresas pequeñas siguiendo procedimientos más manuales (**Tabla** IV.I.**1.7**).

Los resultados obtenidos confirman que los parámetros de IRM (T_2 y T_1) se pueden utilizar para obtener modelos de regresión para predecir la dureza de quesos de leche de oveja en diferente tiempo de maduración con una alta precisión. La cohesividad y la elasticidad también pueden estimarse, aunque en el caso del queso de fabricación tradicional

IV.I.1.4. Conclusiones

La evolución de las características fisicoquímicas (pH, a_w, ES, grasa, proteína y ceniza) y de los parámetros de textura (dureza, adhesividad, cohesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad) a lo largo del proceso de maduración de los quesos de leche de oveja de pasta prensada está condicionada por los factores asociados a su fabricación.

Los quesos de oveja de pasta prensada pueden caracterizarse e identificarse por Imagen de Resonancia Magnética (IRM), aunque presenten atributos fisicoquímicos similares. Los mapas obtenidos por esta técnica, incluyendo los derivados de los tiempos de relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1) y del coeficiente de difusión aparente (*CDA*), ofrecen una información complementaria, que permite un análisis detallado de la macroestructura de la matriz proteica de los quesos. Esta información podría utilizarse como referencia para la determinación de su procedencia [Castilla La Mancha (CLM) - Castilla y León (CL)], proceso de obtención (tradicional - industrial) y tiempo de maduración (desde quesos frescos hasta curados).

Los valores de T_2 son particularmente sensibles a la porosidad de la matriz del queso y a la distribución de los protones en la misma. Este parámetro puede utilizarse, por

tanto, para monitorizar los cambios acontecidos a este nivel y supervisar el proceso de fabricación y maduración de los quesos. El tiempo de relajación longitudinal (T_1) informa de la relación del agua con el entorno y proporciona una información útil para el seguimiento del proceso de maduración del queso y de los cambios estructurales relacionados con la pérdida de humedad. El valor del *CDA* se relaciona con la difusión de los protones en la matriz del queso e informa del grado de consolidación y compactación de su estructura.

Los parámetros de resonancia magnética (T_1, T_2 y *CDA*) permiten obtener modelos de regresión, para cada tipo de queso de oveja, para la predicción del contenido acuoso, a_w y tiempo de maduración. Los atributos de textura de los quesos de leche de oveja, como dureza, cohesividad y elasticidad, se pueden estimar desde los valores de T_1 y T_2 con una aceptable aproximación de los datos predichos por el modelo y los valores reales u observados.

En conjunto, cabe concluir que la Imagen de Resonancia Magnética, y los parámetros derivados, constituyen una herramienta para el control de la calidad de los quesos de oveja de pasta prensada. En concreto esta técnica permite monitorizar el proceso de maduración así como la predicción del tiempo de maduración, el contenido y actividad de agua y distintos atributos de textura.

En el presente trabajo se han estudiado cuatro tipos de queso de oveja de pasta prensada, en consecuencia la aplicación de los resultados obtenidos se limita a ese ámbito. No obstante, es importante indicar que se ha puesto de manifiesto el potencial de la IRM para caracterizar y estudiar la estructura de los quesos y para establecer su relación con la textura, el componente acuoso y la maduración de los quesos. Estudios similares permitirían extender la aplicación de esta técnica a la caracterización de distintas tipos de quesos y obtener modelos de predicción específicos.

IV.I.1.5. Bibliografía

Altan, A., Oztop, M.H., McCarthy, K.L., and McCarthy, M.J. (2011). Monitoring changes in feta cheese during brining by magnetic resonance imaging and NMR relaxometry. *Journal of Food Engineering*, 107:200-207.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995). *Official Methods of Analysis* (16th ed) (Washington, DC).

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2006). *Association of Official Analytical Chemists* (18th ed.) (Washington, DC).

Auldist, A., Walsh, B.J., and Thomson, N.A (1998). Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research*, 65:401-411.

Baert, K., Valero, A., de Meulenaer B., Samapundo, S., Morshed, M., BO, L., Debevere, J., and Devlieghere, F. (2007). Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of Penicillium expansum in apples. *International Journal of Food Microbiology*, 118:139-150.

Benedito, J., Simal, S., Clemente, G., and Mulet, A. (2006). Manchego cheese texture evaluation by ultrasonics and surface probes. *International Dairy Journal*, 16:431-438.

Bernin, D., and Topgaard, D. (2013). NMR diffusion and relaxation correlation methods: New insights in heterogeneous materials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18:166-172.

Boletín Oficial de Castilla y León (BOCyL). 2010, número 70. Orden AYG/473/2010, pp. 32379.

Boulby, P.A., and Rugg-Gunn, F. (2003). T_2: The transverse relaxation time. In: Toofts P. (Ed.). Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease. (Ed): John Wiley and Sons, West Sussex, England, pp. 143-173.

Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32:62-66.

Budiman, M., Stroshine, R.L., and Cornillon, P. (2002). Moisture measurement in cheese analogue using stretched and multi-exponential models of the magnetic resonance T_2 relaxation curve. *Journal of Dairy Research*, 69:619-632.

Chatterjee, S., and Hadi, A.S. (2006). Variable selection procedures. In Balding, D.J., Cressie, N.A.C., Fisher, N.I., Johnstone, I.M., Kadane, J.B., Molenberghs, G., Ryan, L.M., Scott, D.W., Smith, A.F.M., and Teugels, J.L. (Eds.), Regression analysis by example (Wiley Series in Probability and statistics) (4th ed.) (Ed): John Wiley and Sons, New Jersey-EE.UU, pp. 289-290.

Chen, Q., Zhang, C., Zhao, J., and Ouyang. Q. (2013). Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. *Trends in Analytical Chemistry*, 52:261-274.

Cichoscki, A.J., Valduga, E., Valduga, A.T., Tornadijo, M.E., and 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*, 3:329-336.

Conde, T., Mulet, A., Clemente,G., and Benedit, J. (2008). Detection of Internal Cracks in Manchego Cheese Using the Acoustic Impulse-Response Technique and Ultrasounds. *Journal of Dairy Science*, 91:918-927.

Corzo, N., Villamiel, M., Arias, M., Jiménez-Pérez, S., and Morales, F.J. (2000). The Maillard reaction during the ripening of Manchego cheese. *Food Chemistry*, 71:255-258.

Creamer, L.K., and Olson, N.F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47:631-636.

Ding, K., and Gunasekaran, S. (1998). Three-dimensional image reconstruction procedure for food microstructure evaluation. *Artificial Intelligence Review*, 12:245-262.

Esteban, M., and Marcos A. (1990). Equations for calculation of Water activity in cheese from its Chemical composition: A Review. *Food Chemistry*, 353:179-186.

Etayo, I., Peréz-Elortondo, F.J., GIL, P.F., Albisu, M., Virto, M., Conde, S., Rodríguez-Barron, L.J., Najera, A.I., Gomez-Hidalgo, M.E., Delgado, C., Guerra, A., and 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.

Fallico, V., Tuminello, L., Pediliggieri, C., Horne, J., Carpino, S., and Licitra, G. (2006). Proteolysis and Microstructure of Piacentinu Ennese Cheese MadeUs ing Different Farm Technologies. *Journal of Dairy Science*, 89:37-48.

Federación Castellano Leonesa de Industrias Lácteas. (2012). Regalmento de uso de la marca colectiva "Queso Castellano". Disponible en: *www.quesocastellano.es/documentos/docu-3_2012-06-15.pdf*

Ferrazza, R.E., Fresno, J.M., Ribeiro, J.I., Tornadijo, M.E., and Furtado, M. (2004). Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. *Food Research International*, 37:149-155.

Gaya, P., Medina, M., Rodriguez-Marin, M.A., and Nuñez, M. (1990). Accelerated Ripening of Ewes' Milk Manchego Cheese: The Effect of Elevated Ripening Temperatures. *Journal of Dairy Science*, 7:26-32.

González-Viñas, M.A., Poveda, J.M., García-Ruíz, A., and Cabezas, L. (2001). Changes in chemical, sensory and rheological characteristics of Manchego cheeses during ripening. *Journal of Sensory Studies*. 16:361-371.

Gowland, P.A., and Stevenson, V.L. (2003). T_1: The longitudinal relaxation time. In: Toofts P. (Ed.). Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease. (Ed): John Wiley and Sons, West Sussex-UK, pp. 111-143.

Grappin, R., and Beuvier, E., (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7:751-761.

Hanson, S.W.F., and Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89:101-102.

Herrero, A.M., Cambero, M.I., ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero De Avila, M.D., and. De La Hoz, L. (2007). Magnetic Resonance Imaging, Rheological Properties, and Physicochemical Characteristics of Meat Systems with Fibrinogen and Thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:9357-9364.

Herrero, A.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero de Ávila, M.D., and Cambero, M.I. (2009). Magnetic resonance imaging studies of the cold-set gelation on plasma powder and meat systems. *Food Research International*, 42:1362-1372.

Horne, D. (1998). Casein interactions: Casting light on the black Boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8:171-177.

Huc, D., Mariette, F., and Michon, C. (2014). Rheological characterisation of semi-hard cheese using lubricated squeezing flow test. *International Dairy Journal*, 36:101-109.

Jack, F.R., Paterson, A., and. Piggott, J.R. (1993). Relationships between rheology and composition of Cheddar cheese and texture as perceived by consumers. *International Journal of Food Science & Technology*, 28:293-302.

Kotwaliwale, N., Curtis, E., Othman, S., Naganathan, G.K., and Subbiah, J. (2012). Magnetic resonance imaging and relaxometry to visualize internal freeze damage to pickling cucumber. *Postharvest Biology and Technology*, 68:22-31.

Kuo, M.I., Anderson, M., and Gunasekaran, S. (2003). Determining Effects of Freezing on Pasta Filata and Non-Pasta Filata Mozzarella Cheeses by Nuclear Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Dairy Science*, 86:2525-2536.

Lau, K.L., Barbano, M., and Rasmussen, R.R. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science*, 74:727-740.

Lawrence, R.C., Creamer, L.K., and Gilles J. (1987). Texture Development During Cheese R ipening. *Journal of Dairy Science*, 70:1748-1760.

Lobato-Calleros, C., Reyes-Hernández, J., Beristain, C.I., Hornelas-Uribe, Y., Sánchez-García, J.E., and Vernon-Carter, E. J. (2007). Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. *Food Research International*, 40:529-537.

Lobato-Calleros, C., Robles-Martínez, J.C., Caballero-Pérez, J.F., Aguirre-Mandujano, E., and Vernon-Carter, E.J. (2001). Fat replacers inlow-fat mexican manchego cheese. *Journal of Texture Studies*, 32:1-14.

Lucas, T., Mariette, F., Cambert, M., and Rodrique, M. (2002). Thermal coagulation of egg white: an MRI study of the process and a tentative NMR interpretation. 6 th international conference on applications of magnetic resonance in food science, Paris. pp. 4-6.

Marcos, A., Fernández-Salguero, J., Esteban, M.A., and León F. (1979). Relation of Ash/Moisture Quotients in Some Cheeses to Hydrolysis of as- and b-Casein. *Journal of Dairy Science*, 62:392-397.

Mariette F, Collewet G, Fortier P, and Soulie J.M. (2001). In: Webb, G.A., Belton, P., Gil, A.M., and Delgadillo, I. (Eds). Magnetic Resonance in Food Science. A View to the Future. (Ed): The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 67.

Mariette F. (2003). NMR relaxometry and MRI for food quality control: application to dairy products and processes. In: Webb, A., Belton, P.S., Gill, A.M., Rutledge, D.N. (Eds). Magnetic resonance in food science: latest developments. (Ed):Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 209.

Mariette F. (2009). Investigations of food colloids by NMR and MRI. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14:203-211.

Mariette, F. (2006). NMR Relaxation of Dairy Products. In: Webb G. (Ed). Modern Magnetic Resonance, Part 3: Applications in Materials Science and Food Science. (Ed) Royal Society of Chemistry, London, UK, pp.1801.

Mariette, F. (2009). Investigations of food colloids by NMR and MRI. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14:203-211.

Mariette, F., Brannelec, C., Vitrac, O., and Bohuon, P. (1999). Effet du procédé de friture sur la répartition et l'état de l'eau mesurée par RMN et IRM. Les produits alimentaires et l'eau, Agoral 99. Nantes. (Ed): Tec & Doc, pp. 411-6.

Mariette, F., Collewet, G., Marchal, P., and Franconi, J.M. (1999). In: Belton, P., Hills, B., Webb, G.A. (Eds). Advances in Magnetic Resonance in Food Science. (Ed):The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 24.

McMahon, D.J., Motawee, M.M., and McManus, W.R. (2009). Influence of brine concentration and temperature on composition, microstructure, and yield of feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 92:4169-4179.

McRobbie, D.W., Moore, E.A., Graves, M.J., and Prince, M.R. (2006). MRI from Picture to Proton, 2^{edn}, Cambridge University Press.

Medina, M., and Nuñez, M. (2004). Cheeses made from ewes' and goats' milk. In: Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., and Guinee, T.(Eds). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1: General aspects. 3rd. (Ed): Elsevier, Amsterdam-Netherlands, pp: 279-299.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) (2013). Caracterización del sector ovino y caprino en España. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, pp. 1-23.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion (MAPA). (1995). Reglamento de la Denominación de Origen Queso Manchego y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial del Estado, 295:35548.

Nieto-Arribas, P., Poveda, J.M., Sesena, S., Palop, L., and Cabezas, L. (2009). Technological characterization of Lactobacillus isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, 20:1092-1098.

Nuñez, M., Medina, M., Gaya, P., Guillen, A.M., and Rodríguez-Marín, M.A. (1992). Effect of recombinant chymosin on ewes' milk coagulation and Manchego cheese characteristics. *Journal of Dairy Research*, 59:81-87.

O'Callaghan, D.J., and Guinee, T.P. (2004). Rheology and texture of cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1:511-540.

Office for harmonization in the internal market in the European Union (OHIM). (2009). Queso Castellano Trade mark number: 007454994, *https://oami.europa.eu/eSearch/#basic/1+1+1+1/queso%20castellano*

Onea, A., Collewet, G., Fernandez, C., Vartan, C., Richard, N., and Mariette, F. (2003). Quality analysis of blue-veined cheeses by MRI: A preliminary study. Proceedings of the SPIE, The International Society for Optical Engineering. San Diego, CA, USA.

Osorio, J.F., Velázquez, H.J., Mejia, L.G. (2005). Caracterización reológica y textural del queso Edam. *Dyna*, 72:33-45.

Pappa, E.C., Kandarakis, I., and Mallatou, H. (2007). Effect of different types of milks and cultures on the rheological characteristics of Teleme cheese, *Journal of Food Engineering*, 79 (1):143-149

Poveda, J.M., Cabezasa, L., and McSweeney, P.L.H. (2004). Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chemistry*, 84:213-218.

Ramos-Cabrer, P., Van Duynhoven, J.P., Timmer, H., and Nicolay, K. (2006). Monitoring of moisture redistribution in multicomponent food systems by use of magnetic resonance imaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:672-677.

Real Decreto 1069/2007. (2007). BOE núm. 272, de 13 de noviembre. pp. 46516-46520.

Revilla, I., Rodrıíguez-Nogales, J.M., and Vivar-Quinta, A.M. (2007). Proteolysis and texture of hard ewes' milk cheese during ripening as affected by somatic cell counts. *Journal of Dairy Research*, 74 :127-136.

Romero de Ávila, M., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A., De la Hoz, L., and Herrero, A.M. (2014). Rheological behaviour of commercial cooked meat products evaluated by tensile test and texture profile analysis (TPA). *Meat Science*, 98:310-315.

Rosenberg, M., McCarthy, M.J., and Kauten, R. (1992). Evaluation of Eye Formation and Structural Quality of Swiss-Type Cheese by Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Dairy Science*,75:2083.

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 81:501-508.

Ross, T., Dalgaard, P., and Tienungoon, S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of Listeria in fishery products. *International Journal of Food Microbiology*, 62:231-245.

Rudan, M.A., Barbano, D.M., Guo, M.R., and Kindstedt, P.S. (1998). Effect of the modification of fat particle size by homogenization on composition, proteolysis, functionality, and appearance of reduced fat Mozzarella Name: cheese. *Journal of Dairy Science*, 81:2065-2076.

Sakul, H., and Boylan, W.J. (1992). Lactation curves for several U.S. sheep breeds. *Animal Production*, 54: 229-233.

Sener, R.N. (2001). Diffusion MRI: apparent diffusion coefficient (*ADC*) values in the normal brain and a classification of brain disorders based on *ADC* values *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 25:299-326.

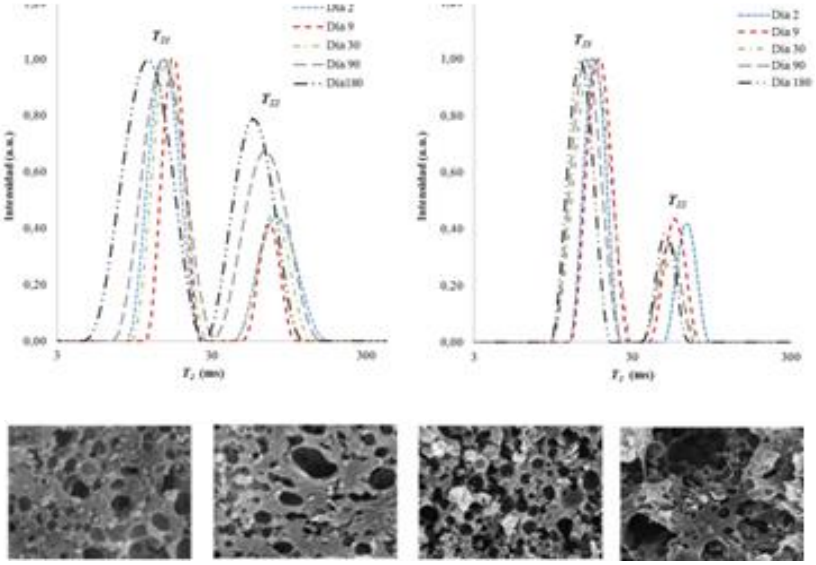
Simpson, N.E., Grant, S.C., Blackband S.J., and Constantinidis, I. (2003). NMR Properties of Alginate Microbeads. *Biomaterials*, 24:4941-4948.

Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A., and White, N. (2001). Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*, 11:455-464.

Wheeler-Kingshott, A.M., Barker, G.J., Steens, S.C.A., and van Buchem, M. (2003). ADC: The diffusion of water. In P. Toofts (Ed.). Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease. (Ed): John Wiley and Sons, West Sussex, England, pp. 203-210.

IV.I.2. ANÁLISIS DE LA MICROESTRUCTURA

Trabajo 2



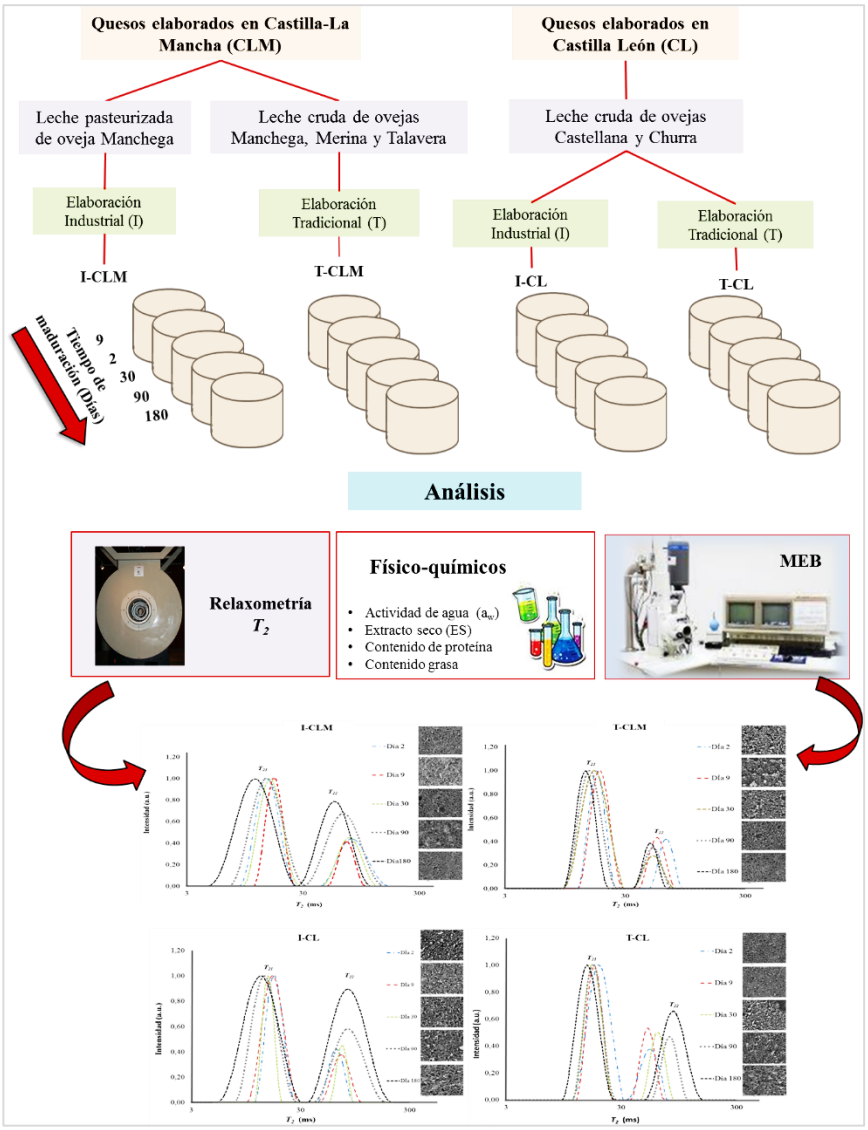
Marco del estudio

El análisis de la microestructura del queso y en particular los cambios que se producen a este nivel en la matriz de caseína durante su proceso de maduración, puede aportar importante información para entender el desarrollo de sus características sensoriales. Además este conocimiento permitiría una caracterización más certera de los quesos para el control de fraudes comerciales, tanto en relación a los tipos de quesos como a la asignación de tiempos de maduración. La Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) permite la observación de los elementos estructurales de pequeña escala del queso (microorganismos, grado de entrecruzamiento de la matriz proteica, estructura y perfil de las oquedades o poros, etc.) (Everett y Auty, 2008). La relaxometría de RMN aporta información sobre las interacciones caseína-caseína y de esta proteína con el agua y la grasa, así como el estado del agua en el seno del gel lácteo (libre o ligado a las biomoléculas) (Everett y Auty, 2008; Mariette, 2009). En este contexto se planteó esta parte de la investigación en el que se utilizaron ambas técnicas, (MEB y relaxometría de RMN), para obtener una información más completa sobre la evolución de la matriz de los quesos de oveja de pasta prensada a lo largo del proceso de maduración.

TRABAJO 2

APLICACIÓN DE LA RELAXOMETRÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) A LA MONITORIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE QUESOS DE OVEJA. MODIFICACIONES EN LA MICROESTRUCTURA

Resumen gráfico



Resumen

En quesos Manchegos (CLM) y Castellanos (CL) de elaboración industrial y tradicional se ha estudiado la evolución, a lo largo de la maduración (2-180 días), del tiempo de relajación espín-espín (T_2) por relaxometría de RMN y su microestructura por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). En todos los casos, T_2 presentó un comportamiento bimodal con dos componentes: uno de relajación más corta (T_{21}) asociado a los protones del agua fuertemente ligada a las macromoléculas y otro de relajación más larga (T_{22}) atribuido a los protones de la fase grasa. Los parámetros de estos componentes (anchura y valor del máximo de la señal) variaron dependiendo del tipo de queso. Los resultados de T_2 y MEB sugieren que el proceso de maduración en los quesos de CLM favorece la compactación de la estructura del queso y conduce a una estructura en la que la grasa estaría restringida o compartimentada en pequeños poros o cavidades, mientras que en los quesos de CL hay una mayor tendencia a la coalescencia de los poros o cavidades y a la aparición de estructuras abiertas con menor compartimentación de la grasa. Se han establecido modelos de regresión lineal para la estimación de la a_w y el extracto seco de los quesos, a partir del componente T_{21}, y del tiempo de maduración utilizando los dos componentes de T_2. Cabe concluir que la relaxometría de RMN presenta un elevado potencial para la monitorización y control, en las líneas de procesado, de la maduración de los quesos de oveja de pasta prensada.

IV.I.2. **TRABAJO 2. Aplicación de la relaxometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) a la monitorización del proceso de maduración de quesos de oveja. Modificaciones de la microestructura**

IV.I.**2.1. Introducción**

La relaxometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica no destructiva que permite estudiar el estado del agua en distintas matrices alimentarias (Chen *et al*., 1997; Ruan *et al*., 1997; Schmidt, 1990) y analizar, a través de la información obtenida, su microestructura. El estudio de la movilidad del agua en sistemas heterogéneos se puede abordar mediante la determinación del tiempo de relajación transversal espín-espín (T_2). En sistemas complejos se han descrito múltiples componentes de T_2, cada uno de los cuales informa de diferentes niveles de estado y movilidad de los protones.

Como es sabido (Everett y Olson, 2003; Everett y Auty, 2008), el queso es una mezcla compleja de componentes moleculares, donde la grasa, el agua, la sal y diversos minerales están contenidos dentro de una red de proteína (caseínas). La movilidad y distribución del agua dentro de esta red sufre distintos cambios durante la maduración, incluyendo un proceso de deshidratación, donde el agua difunde desde el interior hacia la superficie del queso (Simal *et al*., 2001).

La situación de las moléculas de agua en los distintos entornos (Budiman *et al*., 2002) da lugar a curvas de relajación T_2 multiexponencial derivadas de las diversas contribuciones de los núcleos (Gianferri *et al*., 2007a). Algunos autores, como Kuo *et al*. (2001) y Gianferri *et al*. (2007 a, b), utilizaron la relaxometría de RMN para investigar la movilidad del agua en el queso *Mozzarella*. Sin embargo, es importante resaltar que, hasta la fecha, esta técnica no ha sido aplicada al análisis de los quesos de oveja de pasta prensada ni al estudio de su proceso de maduración. En el presente trabajo, se analizaron, por esta técnica, los quesos de oveja, Manchego y Castellano de elaboración industrial y tradicional. **El objetivo fue estudiar por relaxometría de RMN los cambios en la distribución y movilidad de los protones del agua durante el proceso de maduración, y su relación con la microestructura de los quesos de oveja de pasta prensada elaborados en España. La aportación científico-técnica buscada fue determinar el potencial de esta técnica para la monitorización del proceso de elaboración de este tipo de queso.**

IV.I.2.2. Materiales y métodos

IV.I.2.2.1. Material experimental

Los quesos estudiados, así como los tiempos de maduración a los que se realizaron las determinaciones fueron los descritos en el **Punto** III.**3.1** del **Apartado III**. En cada tiempo de análisis se utilizaron tres quesos de cada tipo y se tomaron de cada pieza tres muestras (**Figura** IV.I.**2.1**) para cada análisis, eliminándose la zona de corteza (1 cm de la capa externa) y la zona central (1 cm).

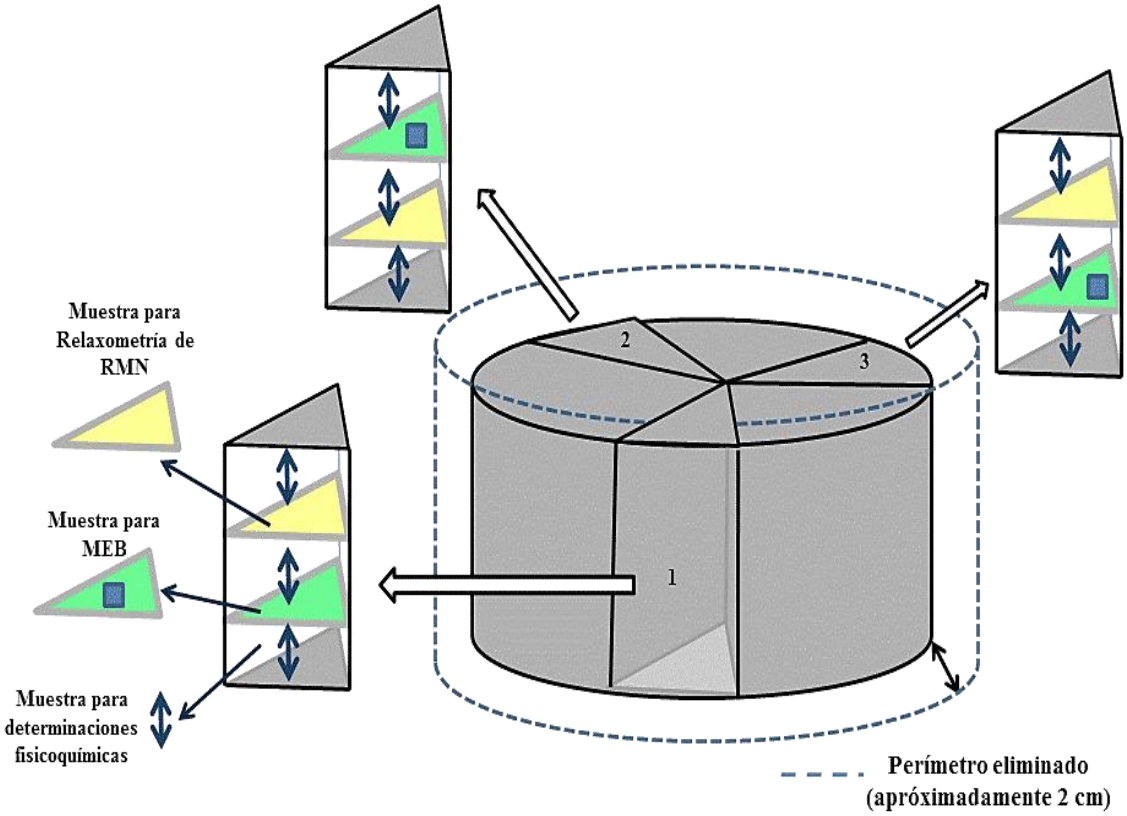


Figura IV.I.**2.1.** Protocolo seguido en los quesos de Castilla-La Mancha y de Castilla y León para la toma de las muestras requeridas en la determinación de los parámetros fisicoquímicos, el análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y de relaxometría de RMN.

IV.I.2.2.2. Análisis fisicoquímicos

En cada queso se determinó la actividad de agua (a_w), el extracto seco (ES) y el contenido de proteína y de grasa siguiendo los procedimientos descritos en el **Punto** III.**3.2** del **Apartado III** de esta memoria.

IV.I.2.2.3. Análisis de la microestructura por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La MEB en los distintos quesos de oveja durante la maduración se realizó en el Centro Nacional de Microscopia Electrónica de la UCM. Las muestras (**Figura** IV.I.**2.1**) se cortaron en láminas con un grosor máximo de 5 mm. El procedimiento seguido para la preparación de las muestras se detalla en el **Punto** III.**3.4** del **Apartado III** de Material y Métodos. El análisis se realizó en un microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM-6400.

IV.I.2.2.4. Análisis de relaxometría de RMN. Determinación del tiempo de relajación espín-espín (T_2)

El análisis de relaxometría se realizó en el CAI de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico de la UCM como se indica en el **Punto** III.**3.3.1** del **Apartado III**. Las medidas del tiempo de relajación espín-espín o transversal (T_2) de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker BIOSPEC 47/40 (BrukerGmBH, Ettlingen, Alemania) que funciona a 4,7 Teslas (200 MHz), equipado con un sistema de gradientes apantallado de 6 cm de diámetro que permite un gradiente máximo de 450 $mT \cdot m^{-1}$. Las muestras empleadas en estos experimentos (**Figura** IV.I.**2.1**) fueron cortadas en pequeñas cuñas (3 cm largo, 2 cm ancho y 1,5 cm espesor) y se colocaron en el interior de una sonda de radiofrecuencia de 3,5 cm de diámetro interno, empleada para la transmisión y la recepción de la señal. Una vez realizada la homogeneización del campo se adquirió una serie de imágenes de eco de espín la cual permitió medir los tiempos de relajación transversal multiexponencial (T_2).

Para las medidas T_2 se adquirió una serie de 60 imágenes con el tiempo de repetición (TR) de 6410,5 ms, y en las que el tiempo de eco (TE) varió de 5 a 300 ms con un intervalo para cada imagen de 5 ms. Otros parámetros de adquisición fueron: matriz de adquisición = 256x128; campo de visión = 6x3 cm^2; número de cortes = 1 y anchura del corte =1 mm. Para obtener las distribuciones de T_2 en diferentes regiones de interés (ROIs) de la imagen se utilizó el programa de software Analyze NNLS (Bjarnason y Mitchell, 2010) que emplea el paquete Matlab Simulink R2010b (MathWorksNatick, Massachusetts, USA).

IV.I.2.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVI para Windows (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE.UU),

siguiendo los procedimientos descritos en el **Punto** III.**6** del **Apartado III**. Materiales y Métodos.

La comprobación de que los datos presentaron una distribución normal se realizó aplicando el test de Shapiro-Wilks. Cuando los datos se ajustaron a una distribución normal se realizó un análisis ANOVA de una vía, para determinar las variaciones entre las medias obtenidas. Sin embargo, cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal, se empleó el test de Kruskal-Wallis. Para la comparación múltiple de las medias y establecer diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0{,}05$) se utilizó el test de Rango Múltiples de Duncan. Los resultados se expresaron como valores medios con su desviación estándar. El análisis de regresión simple se realizó utilizando el test de Durbin-Watson (DW), estableciéndose un nivel de confianza del 95%.

IV.I.**2.3. Resultados y discusión**

IV.I.**2.3.1. Parámetros fisícoquímicos**

Los valores medios y la desviación estándar de la actividad de agua (a_w) y extracto seco (ES) así como de grasa y proteína (sobre ES) a distintos tiempos de maduración se muestran en la **Figura** IV.I.**2.2**. Como es sabido, la actividad de agua (a_w) indica la proporción de agua libre y por tanto, disponible para las reacciones enzimáticas y químicas propias de la maduración del queso y de aquellas implicadas en el deterioro del producto. Como se mencionó en el **Trabajo 1** (véase **Punto** IV.I.**1.3.1**), en los cuatro quesos estudiados, la a_w disminuyó significativamente ($P < 0{,}05$) durante el tiempo de maduración. Estos resultados coinciden con las afirmaciones recogidas en diversos trabajos. Varios autores (Esteban y Marcos, 1990) relatan la caída de la a_w en diferentes quesos (fresco y madurados) durante las etapas de elaboración, salado y maduración, como resultado de la concentración de los sólidos acompañada de la producción de compuestos nitrogenados no proteicos de bajo peso molecular y solutos solubles derivados de los procesos de glicólisis, proteólisis y lipólisis.

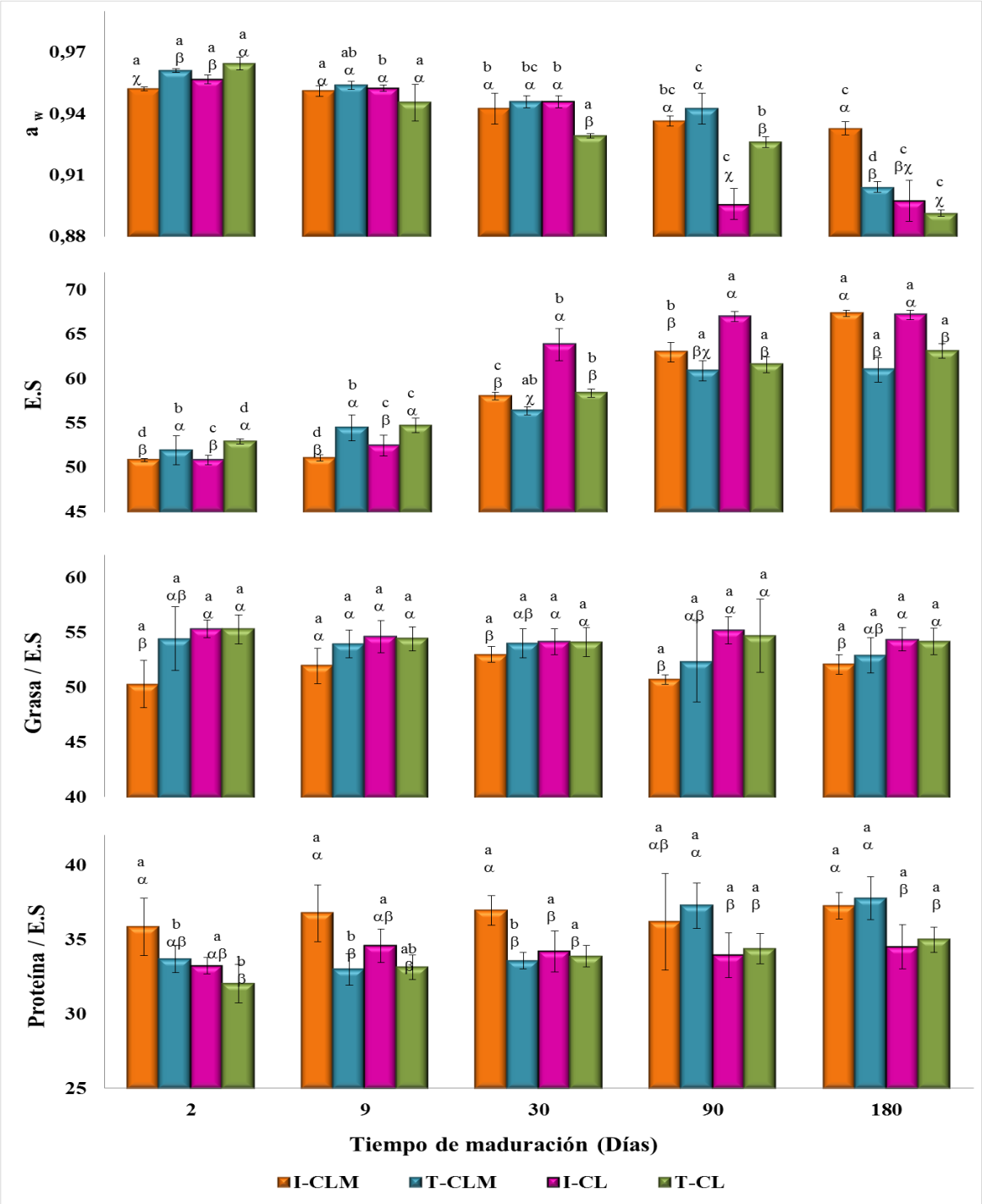


Figura IV.I.**2.2.** Parámetros fisicoquímicos de quesos de Castilla-La Mancha [de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] en distintos tiempos de maduración.

a, b, c, d: para un mismo parámetro, valores correspondientes al mismo tipo de queso y distintos tiempos de maduración con diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración.

α, β, χ: para un mismo parámetro, valores correspondientes al mismo tiempo de maduración y distintos tipo de queso y distintos tiempos de maduración con diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso.

E.S: extracto seco; Componente/E.S: expresado sobre extracto seco (g/100 g de extracto seco)

Como era de esperar, y como se indicó en el trabajo anterior (IV.I.**1.1**), se observó un incremento del contenido en extracto seco (g/100 g de queso) con el tiempo de maduración (**Figura** IV.I.**2.2**) y paralelo al descenso de la a_w. Estos datos concuerdan con los resultados de diferentes autores (González-Viñas *et al*., 2001; Ballesteros *et al*., 2006; Cabezas *et al*., 2007) a lo largo del proceso de maduración de quesos de oveja manchego. El contenido de materia grasa y proteína (expresada en g/100 de ES de queso) no se vio afectado por el tiempo de maduración. Sin embargo, se observaron algunas diferencias entre los tipos de queso, que en general expresan un mayor contenido de proteína y menor de grasa en el queso I-CLM. Estas variaciones son atribuibles a las diferencias en el proceso de elaboración, como se indicó en el **Trabajo 1** (IV.I.**1.3.1**).

IV.I.**2.3.2. Análisis de la microestructura de la matriz de los quesos de oveja de pasta prensada por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

La **Figura** IV.I.**2.3** muestra la microestructura de los quesos de oveja de pasta prensada fabricados en Castilla-La Mancha (I-CLM y T-CLM) y Castilla y León (I-CL y T-CL) a distintos tiempos de maduración (2, 7, 30, 90 y 180 días) analizada por MEB. Las imágenes, a 3000 aumentos, permitieron observar claramente diferencias entre ellos.

En general, los quesos mostraron una microestructura constituida por una matriz proteica formada por una red tridimensional en la que se intercalan poros o cavidades, de distinto tamaño y forma. Esta estructura coincide básicamente con la descrita por diversos autores (Jaros *et al*., 2001; Argüelles *et al*., 2007; Everett y Auty, 2008) para distintos tipos de quesos, incluidos quesos manchegos elaborados con distintos tipos de salazón (Pavia *et al*., 1999). En todos los casos, se describe una matriz proteica, generada por la unión de caseínas entrelazadas, interrumpida por canales, cavidades o poros por los que fluiría el suero (especialmente en los primeros días de fabricación), aire, glóbulos grasos, microorganismos y minerales precipitados. Como se mencionó en el **Trabajo 1** (véase IV.I.1.1.**3.2**), Mariette (2006) relacionó el tamaño, número y forma de los poros o cavidades de la matriz del queso con las condiciones del proceso de elaboración. En este sentido se ha descrito que las cavidades redondeadas o esféricas se relacionan con la producción de CO_2 por diversos microorganismos, mientras que los espacios irregulares se deberían a factores mecánicos o de manipulación durante el moldeado de la cuajada (Mariette, 2006).

Las micrografías correspondientes a los primeros días de elaboración (2 y 9 días) de los quesos T-CLM, I-CL y T-CL, a diferencia de los I-CLM, mostraron una microestructura

caracterizada por una red proteica tupida, en la que era posible observar las micelas de caseína relacionadas entre sí, formando racimos y cadenas sin orientación definida. Los quesos I-CLM presentaron una matriz proteica de apariencia homogénea, definida y compacta, lo que refleja una fusión de la cuajada más pobre. Estas diferencias se atribuyen en gran medida al tratamiento previo de la leche utilizada para la elaboración de los distintos quesos. Como se ha indicado (**Punto** III.**3.1** del **Apartado III**. Material y Métodos), el queso I-CLM fue el único fabricado con leche pasteurizada mientras que los demás quesos se elaboraron con leche cruda. Diferencias similares fueron descritas por Buffa *et al.* (2001) y Fallico *et al*. (2006) en la microestructura de quesos, de cabra y oveja, producidos a partir de leche cruda y pasteurizada. En general, los quesos elaborados con leche pasteurizada mostraron una matriz más uniforme que los fabricados con leche cruda.

La imagen de los quesos I-CLM jóvenes podría relacionarse con los efectos del tratamiento térmico de la leche en la formación de la matriz de distintos tipos de quesos descritos en diversos artículos (Singh y Waungana, 2001; Pastorino *et al*., 2003; Fallico *et al*., 2006). Los autores indican que, como consecuencia de la pasteurización de la leche, se produce una disminución de la fusión de las micelas de caseína, debida a la formación de un complejo entre β-lactoglobulina (β-LG) y κ-caseína (κ-CN) y a los menores niveles de calcio soluble (Singh y Waungana, 2001; Pastorino *et al*., 2003). Por otra parte, varios autores (Guinee *et al*., 1995; Fallico *et al*., 2006) asociaron la estructura de la cuajada de quesos semiduros elaborados con leche pasteurizada con un mayor nivel de proteólisis primaria. Este hecho se atribuye a que el tratamiento térmico produce un menor grado de fusión de la cuajada y mayor desarrollo superficial en la matriz proteica con el consiguiente incremento de la accesibilidad de la proteinasas a la para-k-caseína, contribuyendo así a un mayor nivel de la proteólisis primaria en el queso (Guinee *et al*., 1995).

La observación conjunta de las micrografías de todos los quesos obtenidas a distintos tiempos permite apreciar, en mayor o menor grado, la coalescencia de poros o cavidades y la consolidación de la matriz proteica con el avance del proceso de maduración. Estos resultados coinciden con las apreciaciones recogidas por otros autores (Buffa *et al*., 2001; Fallico *et al*., 2006; Lopez *et al*., 2007). En estos trabajos se indica el fortalecimiento de las interacciones en la red de caseína a medida que ésta se deshidrata dando lugar a una microestructura más compacta y firme (Fallico *et al*., 2006). En consecuencia, en los quesos más madurados y comerciales (30, 90 y 180 días) se apreció una microestructura con una matriz proteica más estructurada y homogénea, menor número de poros o cavidades aunque,

en general, de mayor tamaño, especialmente al final del periodo de maduración estudiado. Estos cambios se relacionan con los procesos de sinéresis de la red proteica y la pérdida gradual de la humedad desde la superficie del queso (Fallico *et al*., 2006) a lo largo de la maduración. Pese a estas generalidades, la microestructura de cada tipo de queso presentó algunas particularidades. Los quesos I-CLM mantuvieron, hasta el final del proceso de maduración, una matriz más uniforme. Puede decirse que la matriz proteica de estos quesos fue la que menos cambios presentó a lo largo del proceso de maduración. Por otra parte, se observó una moderada y progresiva reducción del número de poros o cavidades, presentando al final del estudio (180 días) una estructura porosa aunque con cavidades de menor tamaño que las observadas en otros quesos. Los quesos T-CLM mostraron una estructura más abierta con poros irregulares, observándose un progresivo incremento de su tamaño durante la maduración. Estos quesos, a los 180 días, presentaron una imagen claramente distinta a la mostrada por los quesos más frescos, caracterizada por una matriz más compacta y estructurada rodeando amplios poros o cavidades.

En las micrografías de los quesos I-CL se observaron, durante todo el proceso de maduración, una estructura abierta, con numerosas y extensas cavidades de distintas formas, dando lugar a una estructura semejante a la de un panal de abejas. Los quesos T-CL presentaron una evolución similar a la de los quesos I-CL durante los primeros 90 días de elaboración. Sin embargo, al final de la maduración la microestructura de los quesos T-CL mostró una apariencia más cavernosa, con extensas cavidades y poros de distinto tamaño y forma.

Es evidente que la estructura tridimensional del queso se ve modificada por las variables del proceso de fabricación, como tipo y tratamiento térmico de la leche, concentración de cultivos iniciadores, temperatura de coagulación, corte de la cuajada, prensado (prensa y tiempo), salazón (procedimiento y tiempo) y tiempo de maduración (Buffa *et al*., 2001; Boutrou *et al*., 2002); cualquier cambio puede modificar la microestructura y jugar un importante papel en las propiedades finales del queso (Pereira *et al*., 2009) como se ha observado en distintos quesos por diversos autores. Fallico *et al*. (2006) analizaron la microestructura del queso italiano Piacentinu Ennese de elaboración industrial (con leche pasteurizada) y tradicional (con leche cruda) con el objetivo de caracterizar su matriz y evaluar el impacto de la tecnología empleada en la elaboración. Estos autores encontraron, al igual que en el presente trabajo, que los quesos industriales presentaban

escasas modificaciones de la microestructura de la matriz con el tiempo, en contraposición con los tradicionales, que mostraron una marcada evolución con el tiempo de maduración.

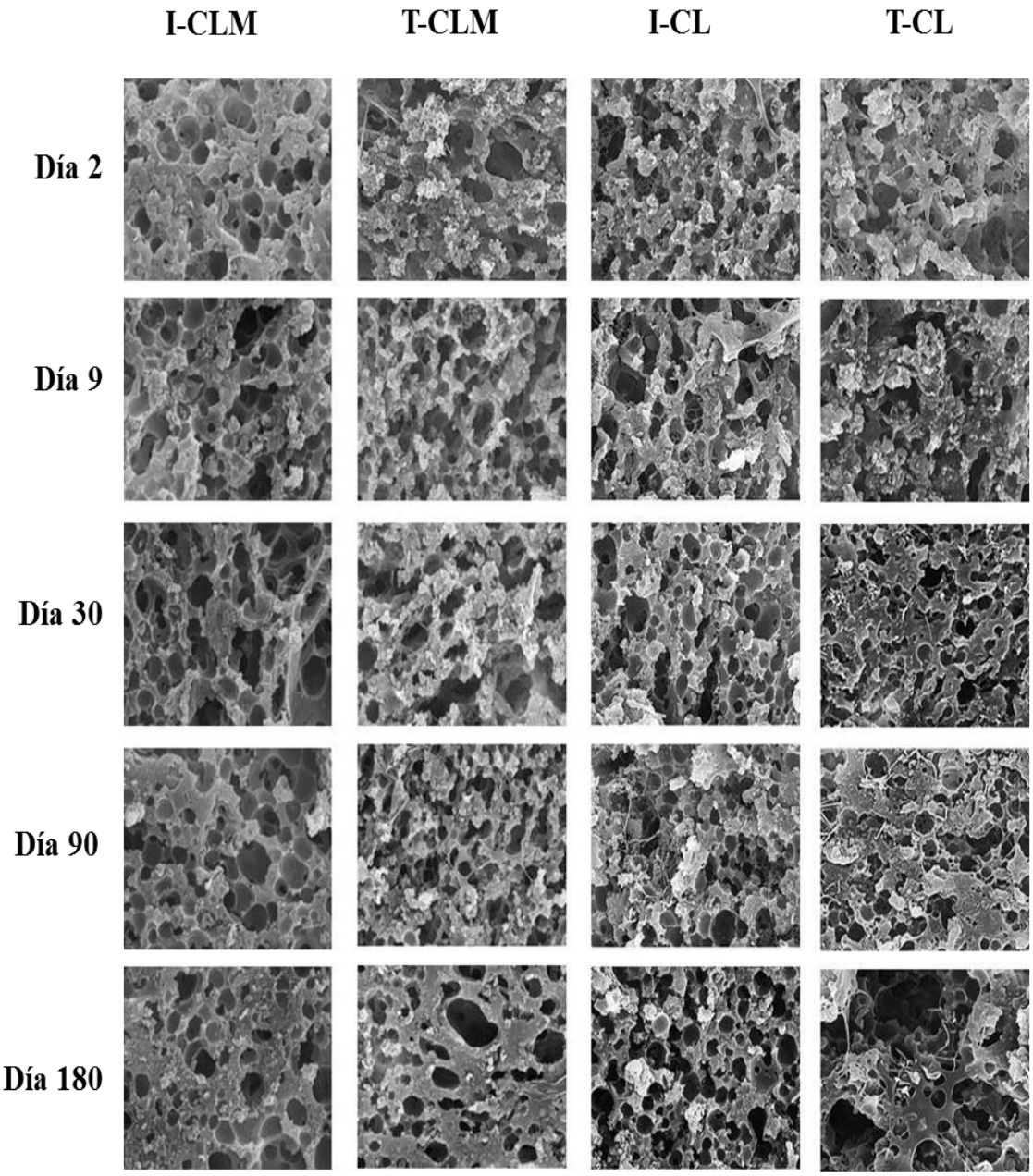


Figura IV.I.**2.3.** Micrografías electrónicas de barrido (× 3000) que muestran la microestructura de quesos de oveja de Castilla-La Mancha [de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] a distintos tiempos de maduración.

Madadlou *et al*. (2005) estudiando el queso iraní blanco observaron diferencias en la microestructura relacionadas que la concentración de cuajo, en favor de un incremento del tamaño de los poros tanto mayor cuanto más elevada fue la concentración del componente enzimático. En el mismo tipo de queso (Madadlou *et al*., 2006) se ha detectado que el

aumento de la temperatura de coagulación (34 - 41,5 ºC) incrementa la cantidad de grasa y proteína y reduce el contenido de humedad de la matriz de la cuajada, presentando ésta una microestructura más compacta. Pavia *et al*. (1999) estudiaron el efecto del procedimiento de salado en quesos tipo manchego. Estos autores describieron que el salado por inmersión a vacío *versus* el procedimiento convencional producía una microestructura más homogénea y compacta, con poros de menor tamaño y glóbulos de grasa más pequeños y dispersos de forma uniforme dentro la matriz de proteína. Respecto al efecto del tiempo trascurrido desde la elaboración, Tunick *et al*. (1997) estudiaron durante el almacenamiento del queso mozzarella la reorganización de submicelas de caseína. Estos autores observaron que los espacios y las dimensiones de estas unidades cambiaban durante el almacenamiento, en la mayoría de los casos por la formación de agregados más grandes con unidades cercanas, por lo que no se encontraron cambios significativos en la densidad electrónica total de los quesos frescos y almacenados (seis semanas).

IV.I.**2.3.3. Análisis por relaxometría de RMN del tiempo de relajación espín-espín (T_2) en quesos de oveja de pasta prensada**

El tiempo de relajación transversal (T_2) de RMN es una medida del efecto relajante de las interacciones espín-espín. El T_2 en sistemas heterogéneos, como el queso, se ve afectado por la red estructural debido a que cada protón está influenciado por los núcleos de diferentes componentes (agua, grasa, proteínas) de su entorno (Karoui y De Baerdemaeker, 2007; Mulas *et al*., 2013). Este hecho conduce a la aparición de múltiples tiempos de relajación para T_2, donde cada uno de ellos representa los diferentes estados de los protones. De esta forma, esta técnica, en comparación con otras técnicas espectroscópicas, proporciona valiosos datos sobre el estado del agua, en particular sobre la movilidad del agua en un sistema (Ruan *et al*., 1998; Kuo *et al*., 2001). Las señales T_2, de forma específica, pueden proveer información acerca de la estructura, componentes y comportamiento de una determinada muestra (Kuo *et al*., 2001).

Los cuatro tipos de queso de leche de oveja de pasta prensada, elaborados en Castilla-La Mancha (I-CLM y T-CLM) y en Castilla y León (I-CL y T-CL), a distintos tiempos de maduración (2, 9, 30, 90 y 180 días) mostraron un comportamiento bimodal en las curvas normalizadas de relajación transversal (T_2) (**Figuras** IV.I.**2.4** y IV.I.**2.5**), debido a la presencia de dos componentes (T_{21} y T_{22}).

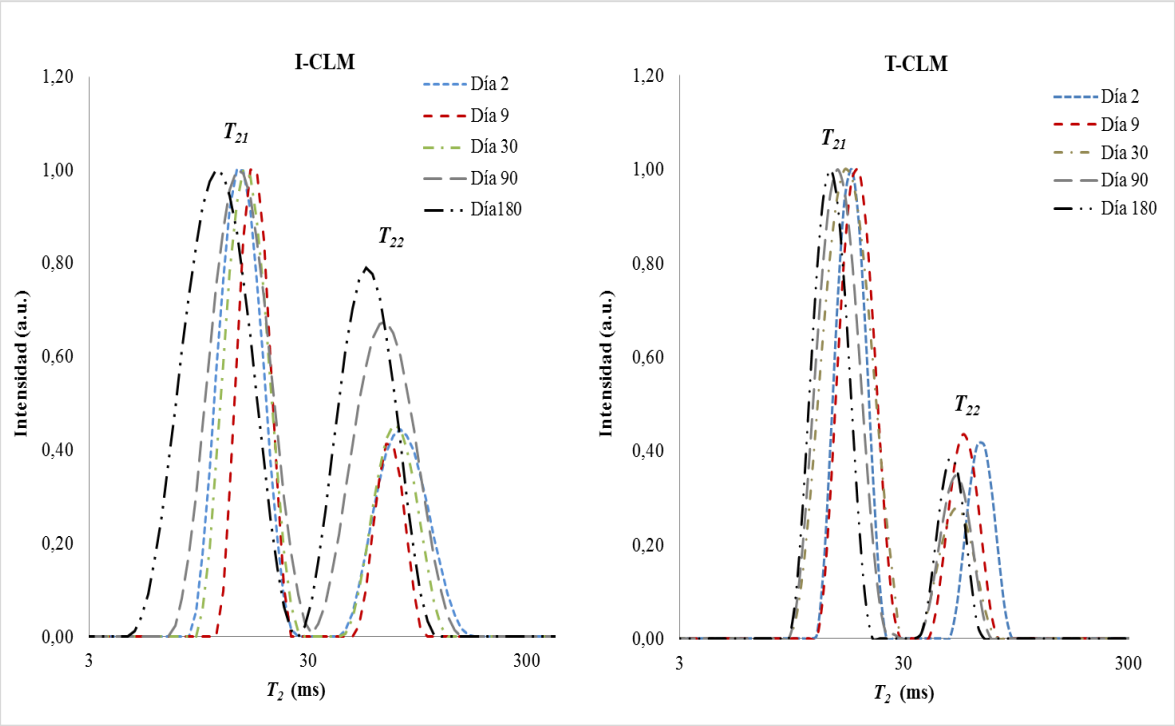


Figura IV.I.**2.4.** Distribuciones de los tiempos de relajación espín-espín (T_2) para los quesos de oveja de Castilla-La Mancha de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM) a distintos tiempos de maduración.

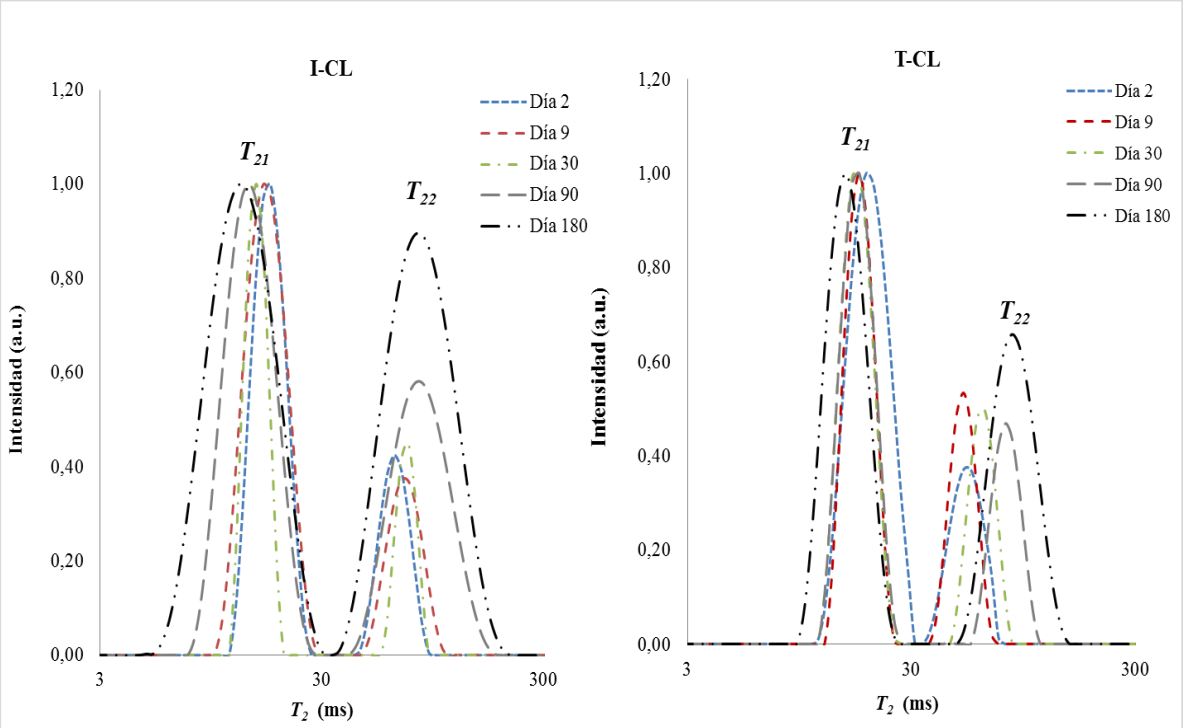


Figura IV.I.**2.5.** Distribuciones de los tiempos de relajación espín-espín para los quesos de oveja de Castilla y León procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL) a distintos tiempos de maduración.

Este comportamiento bimodal de los tiempos de relajación T_2 coincide con los resultados de varios artículos existentes en la bibliografía en los que la relajación de protones en distintos tipos de quesos se ha analizado por relaxometría de RMN. En este campo, Kuo *et al*. (2001) y Luo *et al*. (2013) estudiaron la movilidad del agua del queso Mozzarella. Estos autores encontraron dos componentes de relajación: uno de relajación más corta, que se relacionó con una fracción de agua menos móvil ($T_2 < 11$ ms), y otro de relajación más larga, relacionado con la fracción de agua más móvil ($T_2 = 20$ a 80 ms). Resultados similares son relatados en el artículo de Mulas *et al*. (2013) en el que se analizaron queso *Pecorino*, elaborado con leche tratada térmicamente, y queso *Fiore Sardo* fabricado con leche cruda. En este caso, de los dos componentes detectados, uno se asoció con los protones del agua que interactúan fuertemente con las proteínas y el otro más largo se relacionó con el agua unida a la grasa. En otros trabajos (Gianferri *et al*., 2007a; Gianferri *et al*., 2007b; Noronha *et al*., 2008), donde la matriz estudiada fue queso fresco, se encontraron varios componentes con una interpretación similar.

Las diferencias halladas al comparar los resultados ahora obtenidos y los mostrados en distintos trabajos encontrados en la bibliografía son atribuibles al tipo de queso y a las consiguientes variaciones del proceso de fabricación, lo que hace que la información estructural del queso sea diferente. Cabe destacar que, hasta donde los autores han sido capaces de buscar, el presente trabajo es el primer estudio por relaxometría de RMN de quesos de oveja de pasta prensada españoles. Finalmente, indicar que para comparar los resultados obtenidos en distintas matrices también es necesario tener en cuenta las variables de análisis de RMN utilizadas como tipo de equipo y temperaturas. En este trabajo los pulsos de radiofrecuencia empleados fueron largos y por tanto el tiempo de eco (TE) también. En consecuencia, las señales de los componentes de T_2 muy cortos no fueron detectadas.

Teniendo en cuenta los estudios previos, el componente con el menor tiempo de relajación (T_{21}) fue asociado a los protones de una fracción menos móvil de agua de la matriz del queso, correspondiente al agua que está fuertemente unido a macromoléculas (Kuo *et al*., 2001; Luo *et al*., 2013; Mulas *et al*., 2013; Gianferri *et al*., 2007a; 2007b; Noronha *et al*., 2008). El segundo componente (T_{22}) ha sido atribuido a los protones de la fase grasa (Noronha *et al*., 2008; Altan *et al*., 2011; Mulas *et al*., 2013). Estos dos componentes se evaluaron teniendo en cuenta dos parámetros: la anchura del pico o señal y el valor del máximo (Véase **Figura** III.**2** del **Apartado III**). Los dos componentes (T_{21} y T_{22}) estuvieron

presentes en todos los quesos analizados aunque las señales presentaron mayor o menor anchura, dependiendo del tipo de queso.

En los quesos elaborados de forma industrial (I-CLM y I-CL) se observó una anchura mayor de las señales de los componentes T_{21} y T_{22} en comparación con las obtenidas para los quesos elaborados de forma tradicional (T-CLM y T-CL). La anchura de las señales de T_2 se ha relacionado con la homogeneidad de las muestras (Kuo *et al*., 2001), asociándose el incremento de su amplitud con matrices menos uniformes. La distribución más amplia de los tiempos de relajación se debe a la existencia de mayores diferencias en los entornos físicos de los protones y, por lo tanto, menor uniformidad estructural (Noronha *et al*., 2008). De acuerdo con estos criterios, los resultados obtenidos indicarían que, en comparación con los quesos artesanales, los quesos de elaboración industrial presentarían mayor heterogeneidad, en la distribución de los glóbulos de grasa así como en la distribución y tamaño de los poros. Aunque esta información pueda parecer contradictoria con las apreciaciones recogidas en el análisis de la microestructura por MEB (**Punto** IV.I.**2.3.2** de este trabajo), ha de entenderse que el componente de relaxometría informa de los entornos de movilidad de los protones. Puede considerarse por tanto, que en la estructura de los quesos industriales hay poros de muy pequeño tamaño (microporos) en conjunción con otros de mayor tamaño que interrumpen la estructura de la matriz proteica presentándose distintos grados de confinamiento y retención del agua y de la grasa. Mientras que en los quesos tradicionales la matriz proteica se encontraría rodeando cavidades o poros de distintos tamaño, pero en los que la difusión de los protones sería igualmente viable. Esto explicaría que aunque la imagen de los quesos tradicionales resulte menos homogénea (distinto tamaño de orificios y una matriz más entrecortada) tenga sin embargo un comportamiento de relajación más uniforme. Estas diferencias pueden atribuirse a las variaciones en el proceso de elaboración de los distintos quesos (Mulas *et al*., 2013), como se comenta a lo largo de este trabajo.

El valor del máximo de las señales T_2 detectadas en los distintos quesos analizados se muestra en la **Tabla** IV.I.**2.1**. En todos los quesos, los valores correspondientes al componente T_{21} disminuyeron progresivamente con el incremento del tiempo de maduración ($P < 0{,}05$). Este descenso fue más manifiesto en los quesos elaborados en Castilla y León que en los procedentes de Castilla-La Mancha, aunque no se encontraron diferencias significativas ($P > 0{,}05$) asociadas al tipo de queso de un determinado tiempo de maduración. En el caso de los quesos T-CL, los valores de T_{21} oscilaron desde un máximo, al inicio de la

experiencia, de 18,36±1,38 hasta un mínimo de 14,15±0,91 al final del tiempo de maduración (180 días) mientras que en los quesos I-CL la variación fue desde 17,11±0,70 hasta 12,55±0,82.

En el caso de los quesos de la comunidad de Castilla-La Mancha el cambio fue más marcado en los quesos de elaboración industrial (I-CLM) con un descenso de cuatro unidades a lo largo de la experiencia (desde 15,55±0,65 a los 9 días hasta 11,42±1,82 a los 180 días de maduración) mientras que en los quesos tradicionales (T-CLM) la oscilación fue de algo más de dos unidades (16,69±0,72 a 14,15±1,0).

El componente T_{21} puede atribuirse a las moléculas de agua embebidas en la red tridimensional constituida por moléculas de caseína. Este agua puede difundir desde las zonas donde se encuentra libre hacia la matriz biopolimérica e interaccionar con la estructura de la proteína, y en consecuencia su valor estaría relacionada con el intercambio difusivo (Gianferri *et al*., 2007a; Gianferri *et al*., 2007b). Por tanto, el descenso de los valores T_{21}, observado a lo largo del proceso de maduración del queso, sería debido a la concomitante pérdida del suero y la sucesiva deshidratación de la matriz proteica. Este hecho genera la reorganización de la red de proteínas y el consiguiente cambio de la microestructura. Estos resultados están en consonancia con las afirmaciones de Luo *et al*. (2013) quienes observaron que las caseínas menos hidratadas eran menos solubles y obstaculizaban los procesos de difusión, a la vez que se incrementaban las interacciones intermoleculares con la consiguiente reestructuración de la matriz.

El componente del tiempo de relajación transversal T_{22} reveló una evolución a lo largo del proceso de maduración inverso dependiendo del origen de los quesos (**Tabla** IV.I.**2.1**). Mientras en los quesos elaborados en Castilla-La Mancha (I-CLM y T-CLM) el valor de T_{22} disminuyó significativamente ($P < 0,05$) a medida que se incrementaba el tiempo de maduración, en los quesos procedentes de Castilla y León (I-CL y T-CL) ocurrió lo contrario, aumentando progresivamente ($P < 0,05$). De esta forma, durante el tiempo de estudio, los quesos T-CL presentaron el valor más bajo (46,28±1,53) de T_{22} a los 2 días de elaboración y el más alto (83,26±1,02) al final de la experiencia (180 días). Un comportamiento similar mostraron los quesos I-CL, con valores de T_{22} mínimos (65,99±1,37) iniciales y máximos (78,08±0,73) al concluir la maduración. Contrariamente, en los quesos de Castilla-La Mancha, el componente T_{22} presentó los valores más elevados (79,21±1,05 para I-CLM y 66,65±2,72 para T-CLM) en los primeros días de elaboración y

mínimos (69,91±2,92 en los quesos I-CLM y 55,14±3,94 para los T-CLM) a los 180 días de maduración.

Tabla IV.I.**2.1.** Valor del máximo de los componentes T_{21} y T_{22} del tiempo de relajación espín-espín de los quesos de oveja de Castilla-La Mancha [elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)] y de Castilla y León [procedentes de la producción industrial (I-CL) y tradicional (T-CL)] a distintos tiempos de maduración.

	Tiempo de maduración (días)	Tipo de queso							
		I-CLM		T-CLM		I-CL		T-CL	
T_{21} (ms)	2	15,55±0,65	a,α	16,69±0,72	a,α	17,11±0,70	a,α	18,36±1,38	a,α
	9	16,71±1,70	a,α	17,41±1,05	a,α	17,49±1,78	a,α	16,71±0,64	a,α
	30	15,29±0,19	a,α	16,94±1,67	a,α	15,66±0,58	a,α	16,04±0,96	a,α
	90	15,20±1,09	a,α	16,01±1,67	a,α	13,48±1,57	b,α	14,83±0,61	b,α
	180	11,42±1,82	b,α	14,15±1,01	b,α	12,54±0,82	b,α	14,15±0,91	b,α
T_{22} (ms)	2	79,21±1,05	a,α	66,65±2,72	a,β	65,99±1,37	d,β	46,28±1,53	d,χ
	9	71,60±2,92	b,α	57,76±2,36	b,χ	66,86±1,12	b,β	53,25±1,68	c,δ
	30	69,91±2,92	b,α	55,14±3,94	b,χ	71,60±2,92	c,α	62,05±2,53	b,β
	90	67,33±2,64	b,χ	53,52±4,70	b,δ	76,20±0,97	b,β	81,96±0,54	a,α
	180	52,51±2,19	c,χ	42,02±1,39	c,δ	78,08±0,73	a,β	83,26±1,02	a,α

a, b, c, d: para un mismo componente, valores en la misma columna con diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración.
α, β, χ, δ: para un mismo componente, valores en la misma fila con diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso.
Valor del máximo de acuerdo a como se indica en la **Figura** III.**2** del **Apartado III**

El componente T_{22} se ha relacionado con el tiempo de relajación transversal experimentado por los protones de la fase grasa, de acuerdo con varios trabajos previos (Mariette, 2011; Mulas *et al*., 2013). Estos autores atribuyeron, a los protones del agua relacionada con la grasa, tiempos de relajación transversal T_{22} en el intervalo de 20 a 100 ms. En este margen se engloba, además, el tiempo de relajación transversal T_{22} determinado en aceite vegetal (Noronha *et al*., 2008). En el presente estudio se han detectado modificaciones del componente T_{22}, asociadas al tipo de queso y al tiempo de maduración, incluidas en el margen de dispersión mencionado y por tanto puede asociarse a los protones de la fase grasa. No obstante, en los quesos jóvenes, inmediatamente después de su elaboración, en este componente también participarían los protones del agua libre (del suero de la leche), pero a medida que se produce la deshidratación del queso, los protones ligados a la fase grasa irían tomando mayor protagonismo.

El incremento de este componente en los quesos elaborados en Castilla y León

(I-CL y TCL) con el tiempo de maduración indicaría el progresivo aumento de los poros o espacios asociados a la grasa, con el envejecimiento de la matriz del queso. Sin embargo, en los quesos de Castilla-La Mancha se produciría una evolución inversa, con una reducción gradual de los poros o espacios ocupados por la grasa, con la consiguiente disminución de los valores de T_{22} con el avance de la maduración. Estas consideraciones se encuentran afianzadas por los hallazgos de Noronha *et al*. (2008). Estos autores indicaron que los glóbulos y acúmulos de grasa más grandes, permiten una mayor libertad de movimiento de los protones de la fase grasa provocando un aumento del componenteT_{22}. El-Bakry *et al*. (2011) sugieren que si el diámetro de los glóbulos grasos es más grande, bajará la interacción en la interfase grasa-agua aumentando la movilidad molecular dentro de las dos fases y, por tanto, se incrementará el tiempo de relajación del componente T_{22}.

Los valores del componente T_{22} mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los distintos tipos de queso de un mismo tiempo de maduración (**Tabla** IV.I.**2.1**), reflejando las diferencias estructurales, y más en concreto en la distribución de la grasa. En esta línea, cabe destacar que los quesos I-CLM presentaron los valores más altos de T_{22} ($P < 0,05$) en los primeros días de elaboración (79,21±1,05 y 71,60±2,92, respectivamente a los 2 y 9 días). De acuerdo con lo indicado hasta ahora, estos resultados indicarían una matriz abierta, con mayores espacios para la distribución de la grasa y del agua libre, en los quesos frescos de I-CLM, frente a la estructura más compacta, con pequeños poros, que presentarían los restantes quesos de oveja estudiados. El valor inicial más bajo de T_{22} ($P < 0,05$) correspondió a T-CL (46,28±1,53 y 53,25±1,68, respectivamente a los 2 y 9 días) que presentaría, por tanto, la estructura más cerrada y más ocluida para la difusión de los protones. Como se ha mencionado, el distinto comportamiento de la matriz de los quesos, a lo largo del proceso de maduración, dependiendo de su origen, hizo que al final de la experiencia (180 días) la distribución de los valores máximos y mínimos de T_{22} se invirtieran (el máximo correspondió a T-CL y el mínimo a T-CLM e I-CLM). Estos datos concuerdan con los reflejados en las micrografías (**Figura** IV.I.**2.3**) que seguidamente se analizaran de forma conjunta (**Punto** IV.I.**2.4**).

Dado que sólo se han encontrado diferencias significativas($P < 0,05$) asociadas al tipo de queso (comparación de quesos del mismo tiempo de maduración) para el componente T_{22} (**Tabla** IV.I.**2.1**), se puede asumir que la microestructura de los quesos de oveja estudiados difieren sustancialmente en la distribución de la grasa y en los cambios de la porosidad de la matriz, mientras que los procesos de deshidratación y pérdida del agua

relacionada con la red de caseínas fue muy similar en todos los casos (como refleja el valor de T_{21}).

Como se había mencionado anteriormente, las diferencias entre los tipos de queso pueden ser atribuidas a las variaciones en su proceso de fabricación, cuyo efecto en distintos componentes y características ha sido indicado por diversos autores, tales como la utilización de leche cruda o pasteurizada (Fallico *et al*., 2006), tipo de cultivo iniciador (Merrill *et al*., 1994; Metzger *et al*., 2001), tamaño del corte de la cuajada (Everard *et al*., 2009), tiempo y fuerza de prensado (Dejmek y Walstra, 2004), tiempo y concentración de la sal en la etapa de la salazón (Skeie *et al*., 1997).

IV.I.**2.3.4. Análisis comparativo de la microestructura de la matriz de quesos de oveja de pasta prensada por MEB y relaxometría de RMN**

La MEB permite la observación y análisis de la microestructura de la matriz del queso (distribución, porosidad, etc.) previa deshidratación y eliminación parcial de la grasa en el proceso de preparación de las muestras requerido para este análisis. Sin embargo, la relaxometria de RMN, y en concreto el análisis de T_2, es una técnica no destructiva, que no requiere preparación previa, y ofrece, a través de los protones del agua ligada a biomoléculas (componente T_{21}), información de la evolución de la red proteica y, por los protones relacionados con la fase grasa (componente T_{22}), de la distribución del componente lipídico, la porosidad y densidad de la matriz del queso (Karoui y De Baerdemaeker, 2007; Mulas *et al*., 2013; Gianferri *et al*., 2007a). De esta forma, se considera que ambas técnicas ofrecen información complementaria y permiten una mejor caracterización de los quesos y análisis de los cambios estructurales asociados al proceso de maduración.

Las micrografías obtenidas por MEB (**Figura** IV.I.**2.3**) permiten observar que los quesos de oveja estudiados están constituidos por una matriz sólida, correspondiendo a una red tridimensional interrumpida por espacios, poros o cavidades de diferente tamaño con una relación matriz-cavidades dependiente del tipo de queso. La información aportada por los parámetros de relaxometría de RMN incrementa el conocimiento de esta microestructura aportando información sobre los elementos embebidos o atrapados en la misma. Las diferencias encontradas en los distintos tipos de quesos relativas a la anchura de las señales T_2 (**Figuras** IV.I.**2.4** y IV.I.**2.5**) permiten concluir que, dentro de un determinado tipo de queso (CLM o CL), el entorno físico es más homogéneo en los de elaboración tradicional que en los producidos a nivel industrial, en cuanto a la difusión de los protones. Esta

información escapa de lo que es posible observar en una imagen de la microestructura mediante MEB. Por tanto, la combinación de ambas técnicas permitiría profundizar en la proyección de la microestructura de la matriz biológica. La evolución de la microestructura del queso con el tiempo de maduración (desde 2 hasta 180 días), puede apreciarse por MEB fundamentalmente por dos factores: la consolidación de la matriz sólida (densidad y continuidad), y los cambios en la porosidad (número y tamaño de los poros o cavidades).

La evolución de los valores del componente de T_{21} de RMN (**Tabla** IV.I.**2.1**) informa que los cambios en la matriz sólida se deben, en todos los quesos, sobre todo a la pérdida del agua atrapada por la red tridimensional proteica (descenso de T_{21}) y a su consiguiente reestructuración. Como es sabido, los cambios de la densidad de la matriz afecta a la relajación de los protones del agua y, por consiguiente, al proceso de intercambio químico entre las moléculas de agua, los biopolímeros y otros solutos que constituyen la matriz (Kuo *et al*., 2001; Luo *et al*., 2013). Teniendo en cuenta el componente T_{21}, las micrografías obtenidas al principio de la maduración corresponderían a la microestructura de la matriz del queso más hidratada (mayor T_{21}), como una esponja mojada. Sin embargo, durante la maduración se pueden apreciar los cambios derivados de la pérdida progresiva del agua unida a las macromoléculas.

Las variaciones encontradas en el componente T_{22} a lo largo del proceso de maduración (**Tabla** IV.I.**2.1**) se relacionan directamente con las modificaciones estructurales (especialmente apreciables en los cambios de la porosidad) observadas por MEB en la matriz de todos los quesos (**Figura** IV.I.**2.3**). Como se ha mencionado, T_{22} se relaciona con la distribución de la grasa y la porosidad de las matrices (Mulas *et al*., 2013; Noronha *et al*., 2008). El inverso comportamiento de T_{22} con el avance del tiempo de maduración en los quesos de Castilla-La Mancha (con una significativa reducción de su valor) y de Castilla y León (con un marcado aumento) (**Tabla** IV.I.**2.1**) se relaciona con la mayor tendencia al incremento de la densidad de la matriz, en los quesos de CLM, y del tamaño de las cavidades, en los de CL, como puede observarse en las correspondientes micrografías (**Figura** IV.I.**2.3**). Las microestructuras más representativas de esta evolución corresponden a los quesos I-CLM y T-CL.

Los quesos I-CLM mostraron al inicio del proceso de maduración (2-9 días) los valores más elevados de T_{22} (**Tabla** IV.I.**2.1**) y una imagen con abundantes y amplios poros o cavidades (**Figura** IV.I.**2.3**) en los que difundiría la grasa y el suero. Sin embargo, al final del estudio (180 días), mostraron los valores más bajos del mencionado componente de

RMN lo que indicaría una microestructura mucho más cerrada, donde la difusión de la grasa estaría más condicionada. Sin embargo, los quesos T-CL presentaron los valores más bajos de T_{22} tras los primeros días de elaboración y una microestructura más abigarrada, con poros y cavidades que se incrementaron, tanto en número como en tamaño, con el avance del proceso de maduración, de forma que, al final del periodo de estudio, mostraron los valores más altos de T_{22} coincidiendo con una estructura abierta, con grandes espacios en los que la grasa difundiría con facilidad.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el proceso de maduración en los quesos de CLM favorece la compactación de la estructura del queso y conduce a una estructura en la que la grasa estaría restringida o compartimentada en pequeños poros o cavidades, mientras que en los elaborados en CL hay una mayor tendencia a la coalescencia de los poros o cavidades y a la aparición de estructuras abiertas con menor compartimentación de la grasa.

IV.I.**2.3.5. Relación de los parámetros de relaxometría de RMN con las características fisicoquímico y el tiempo de maduración de los quesos de oveja**

La **Tabla** IV.I.**2.2** muestra los resultados del análisis de regresión lineal simple entre las características fisicoquímicas, el tiempo de maduración y los valores de los componentes T_{21} y T_{22} obtenidos por relaxometría de RMN. En esta Tabla se muestran los parámetros en los que se detectaron coeficientes de determinación (R^2) significativos ($P < 0,05$) para alguno de los componentes de T_2. Cabe destacar que no se encontraron relaciones significativas ($P > 0,05$) entre los valores de T_{21} y T_{22} con el contenido de proteína o de grasa de los quesos. Sólo en el caso de los parámetros fisicoquímicos relacionados con la disposición del contenido acuoso (a_w y extracto seco) se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) significativos ($P < 0,05$) con T_{21}, aunque en ningún caso con T_{22}.

En el caso de la a_w, los quesos con valores más elevados presentaron más altos T_{21}, ajustándose la relación entre ambas variables a un modelo de regresión lineal ($aw = 0,009\ T_{21} + 0,80$) con un moderado coeficiente de determinación ($R^2 = 0,52$; $P<0,005$). De forma similar, fue posible establecer un modelo lineal, aunque en este caso negativo, entre el contenido en extracto seco (ES) de los quesos y T_{21} ($ES = -2,48\ T_{21} + 96,94$, $R^2 = 0,77$, $P<0,00005$). Estos resultados están en consonancia con la mencionada asociación de T_{21} con el contenido de agua ligado a la matriz proteica del queso y de T_{22} a su componente lipídico (Kuo *et al*., 2001; Luo *et al*., 2013; Mulas *et al*., 2013).

Tabla IV.I.**2.2.** Análisis de regresión lineal simple relacionando las características físico-químicas y el tiempo de maduración de los quesos de oveja de pasta prensada *versus* valores de los componentes del tiempo de relajación espín-espín (T_{21} y T_{22}) obtenidos por relaxometría de RMN.

Variable dependiente	Variable independiente	Coeficiente de regresión	R^2	SE
a_w	Constante	0,80	0,52***	0,02
	T_{21}	0,01		
	Constante	0,97	0,10	0,02
	T_{22}	-0,001		
ES	Constante	96,94	0,77****	2,79
	T_{21}	-2,48		
	Constante	52,52	0,04	11,87
	T_{22}	0,10		
TM	Constante	515,54	0,68****	40,34
	T_{21}	-29,00		
	Constante	30,80	0,11	70,92
	T_{22}	0,59		
TM-CLM	Constante	400,91	0,71****	15,74
	T_{21}	-22,53		
	Constante	292,20	0,62***	30,52
	T_{22}	-4,00		
TM-CL	Constante	628,54	0,76****	35,24
	T_{21}	-36,50		
	Constante	-239,13	0,60***	44,07
	T_{22}	4,40		

R^2: Coeficiente de determinación; SE: Error estándar de la estimación.
*P < 0,05; **P < 0,005; ***P < 0,0005; ****P < 0,00005.

ES: Extracto seco; TM: Tiempo de maduración; CLM: quesos elaborados en Castilla-La Mancha; CL: quesos elaborados en Castilla y León.

Cuando se relacionaron los valores de los componentes de relaxometría de RMN del conjunto de quesos analizados con el tiempos de maduración (TM) sólo fue posible obtener modelos de regresión con un R^2 significativo para T_{21} (TM = -29,00 T_{21} + 515,54; R^2 = 0,68; P < 0,00005), sin embargo, se hallaron modelos altamente significativos con T_{22} cuando el procesado de los datos se realizó teniendo en cuenta la procedencia geográfica de los quesos, obteniéndose modelos específicos para los producidos en Castilla-La Mancha (TM-CLM = -4,00T22 + 292,20; R^2 = 0,62, P < 0,0005) y para los fabricados en Castilla-La Mancha (TM-CL= 4,40 T22 -239,13; R^2 = 0,60; P < 0,005).

Este proceder permitió también incrementar el R^2 (P > 0,70) del modelo de regresión para la estimación del TM utilizando T_{21} en los queso de elaboración industrial (TM-CLM = -22,53T21 + 400,91; TM-CL = -36,50T21 + 628,54; P < 0,00005), como puede apreciarse

en la **Tabla** IV.I.**2.2**. Cabe indicar el incremento de R^2 (0,80) del modelo de regresión para la estimación del TM utilizando conjuntamente los valores de T_{21} de los queso de elaboración industrial de ambas zonas geográficas (TM-QI = -32,05 T_{21} + 539,53; P < 0,00005), a diferencia de lo ocurrido cuando se utilizaron los valores máximos de T_{21} de los quesos de elaboración tradicional (T-CLM y T-CL). Estos resultados, sin duda están relacionados con la mayor homogeneidad del procesado industrial frente a la elaboración artesanal (Ballesteros *et al*., 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, abren la posibilidad del futuro uso en continuo de la relaxometría de RMN para monitorizar en línea la maduración de los quesos de oveja de pasta prensada (a través de la estimación de la a_w y del extracto seco) así como para el control del tiempo de curado.

IV.I.**2.4. Conclusión**

En general, los quesos de oveja mostraron, en el análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB), una microestructura constituida por una matriz proteica formada por una red tridimensional en la que se intercalan poros o cavidades, de distinto tamaño y forma. Durante el transcurso de la maduración (2-180 días), se produjo una compactación de la matriz proteica y una reducción del número de poros o cavidades con un aumento de su tamaño, en mayor o menor grado dependiendo del tipo de queso.

Todos los quesos mostraron en el análisis de relaxometría de RMN, un comportamiento bimodal del tiempo de relajación espín-espín (T_2) con dos componentes: uno de relajación más corta (T_{21}) asociado a los protones del agua fuertemente ligada a las macromoléculas y otro de relajación más larga (T_{22}) atribuido a los protones de la fase grasa. Los parámetros (anchura de pico y valor del máximo) de estas señales complementan la información sobre la microestructura de los quesos aportada por la MEB y una mejor comprensión del proceso de maduración de los quesos.

La evolución de la microestructura de los quesos de oveja durante el proceso de maduración difiere sustancialmente dependiendo del origen de los quesos. En el caso de los elaborados en Castilla-La Mancha predomina la compactación de la estructura del queso, presentándose en el producto comercial (90-180 días) una estructura más cerrada en la que la difusión de la grasa estaría restringida a pequeños espacios o poros. En los elaborados en Castilla y León hay una mayor tendencia a la coalescencia de los poros o cavidades y a la aparición de estructuras más abiertas con menor retención o compartimentación de la grasa.

Es posible obtener modelos de regresión lineal para la estimación de la a_w y el extracto seco de los quesos de oveja de pasta prensada a partir del componente T_{21}. Los valores de ambos componentes de T_2 podrían utilizarse para el cálculo del tiempo de curado. En conjunto, cabe concluir que la relaxometría de RMN presenta un elevado potencial para la monitorización y control, en las líneas de procesado, de la maduración de los quesos de oveja de pasta prensada.

IV.I.2.5. Bibliografía

Altan, A., Oztop, M.H., McCarthy, K.L., and McCarthy, M.J. (2011). Monitoring changes in feta cheese during brining by magnetic resonance imaging and NMR relaxometry. *Journal of Food Engineering*, 107:200-207.

Argüelles, A., Castelló, M., Sanz, J., and Fito, P. (2007). Application of SAFES methodology in Manchego-type cheese manufacture. *Journal of Food Engineering*, 83:229-237.

Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Viñas, M.A., and Cabezas, L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17:249-255.

Bjarnason, T.A., and Mitchell, J.R. (2010). Analyze NNLS: Magnetic resonance multiexponential decay image analysis. *Journal of Magnetic Resonance*, 206:200-204.

Boutrou, R., Famelart, M.H., Gaucheron, F., Le Graet, Y., Gassi, J.Y., Piot, M., and Leonil, J. (2002). Structure development in a soft cheese curd model during manufacture in relation to its biochemical characteristics. *Journal of Dairy Research*, 69:605-618.

Budiman, M., Stroshine, R.L., and Cornillon, P. (2002). Moisture measurements in cheese analogue using stretched and multi-exponential models of the magnetic resonance T_2 relaxation curve. *Journal of Dairy Research*, 69:619-632.

Buffa, M.N., Trujillo, A.J., Pavia, M., and Guamis, B. (2001). Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treatedgoats' milk. *International Dairy Journal*, 11:927-934.

Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S., and Palop, M.LL. (2007). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, 18:11-17.

Chen, P.L., Long, Z., Ruan, R., and Labuza, T.P. (1997). Nuclear magnetic resonance studies of water mobility in bread during storage. *Food Science and Technology Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 30:178-183.

Dejmek, P., and Walstra, P. (2004). The syneresis of rennet-coagulated curd. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., and Guinee, T.P.(eds). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1, General Aspects, 3rd. (Ed). Chapman and Hall, London, UK. pp. 71-103.

El-Bakry, M., Duggan, E., O'Riordan, E.D., and O'Sullivan, M. (2011). Effect of chelating salt type on casein hydration and fat emulsification during manufacture and post-manufacture functionality of imitation cheese. *Journal of Food Engineering*, 102:145-153.

Esteban, M., and Marcos, A. (1990). Equations for calculation of water activity in cheese from its chemical composition: A Review. *Food Chemistry*, 35(3):179-186.

Everard, C.D., O'Callaghan, D.J., Mateo, M.J., Castillo., M., Payne, F.A., and O'Donnel, C.P. (2009). The use of colour parameters derived from an online fibre-optic sensor to monitor curd syneresis during cheese making. *Journal of Food Engineering*, 94:1-6.

Everett, D.W., and Auty, M.A. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18:759-773.

Everett, D.W., and Olson, N.F. (2003). Free oil and rheology of Cheddar cheese containing fat globules stabilized with different proteins. *Journal of Dairy Science*, 86:755-763.

Fallico, V., Tuminello, L., Pediliggieri, C., Horne, J., Carpino, S., and Licitra, G. (2006). Proteolysis and microstructure of Piacentinu Ennese cheese made using different farm technologies. *Journal of Dairy Science*, 89:37-48.

Gianferri, R., D'Aiuto, V., Curini, R., Delfini, M., and Brosio, E. (2007a). Proton NMR transverse relaxation measurements to study water dynamic states and age-related changes in Mozzarella di Bufala Campana cheese. *Food Chemistry*, 105:720-726.

Gianferri, R., Maioli, M., Delfini, M., and Brosio, E. (2007b). A low-resolution and high-resolution nuclear magnetic resonance integrated approach to investigate the physical structure and metabolic profile of Mozzarella di Bufala Campana cheese. *International Dairy Journal*, 17:167-176.

González-Viñas, M.A., Poveda, J.M., García Ruíz, A., and Cabezas, L. (2001). Changes in chemical, sensory and rheological characteristics of Manchego cheeses during ripening. *Journal of Sensory Studies*, 16:361-371.

Guinee, T.P., Pudja, P.D., Reville, W.J., Harrington, D., Mulholland, E.O., Cotter, M., and Cogan, T.M. (1995). Composition, microstructure and maturation of Semi-hard cheeses from high protein ultrafiltered milk retentates with different levels of denatured whey protein. *International Dairy Journal*, 5:543-568.

Jaros, D., Petrag, J., Rohm, H., and Ulberth, F. (2001). Milk fat composition affects mechanical and rheological properties of processed cheese. *Applied Rheology*, 11:19-25.

Karoui, R., and De Baerdemaeker, J. (2007). A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102:621-640.

Kuo, M.I., Gunasekaran, S., Johnson, M., and Chen, C. (2001). Nuclear magnetic resonance study of water mobility in pasta filata and non-pastafilata Mozzarella. *Journal of Dairy Science*, 84:1950-1958.

Lopez, C., Camier, B., and Gassi, J-Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, 17:235-247.

Luo, J., Pan, T., Gou, H.Y., and Ren, F.Z. (2013). Effect of calcium in brine on salt diffusion and water distribution of Mozzarella cheese during brining. *Journal of Dairy Science*, 96:824-831.

Madadlou, A., Khosroshahi, A., and Mousavi, M.E. (2005). Rheology, Microstructure, and functionality of low-fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet. *Journal of Dairy Science*, 88(9):3052-3062.

Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi S.M., and Djome, Z.E. (2006). Microstructure and rheological properties of Iranian white cheese coagulated at various temperatures. *International Dairy Journal*, 89:2359-2364.

Mariette F. (2006). NMR imaging of dairy products. In: Webb, G.A, (Ed). Modern magnetic resonance, part 3: applications in materials science and food science. (Ed): Springer, Dordrecht, Paises Bajos, pp.1779-84.

Mariette, F. (2009). Investigations of food colloids by NMR and MRI. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14:203-2011.

Mariette, F. (2011). Nuclear Magnetic Resonance: Principles. Elsevier Ltd. All rights reserved.

Merrill, R.K., Oberg, C.J., and McMahon, D.J. (1994). A method for manufacturing reduced fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 77:1783-1789.

Metzger, L.E., Barbano, D.M., Kindstedt, P.S., and Guo M.R. (2001). Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese: II. Chemical and functional properties during storage. *Journal of Dairy Science*, 84:1348-1356.

Mulas, G., Roggio, T., Uzzau, S., and Anedda, R. (2013). A new magnetic resonance imaging approach for discriminating Sardinian sheep milk cheese made from heat-treated or raw milk. *Journal of Dairy Science*, 96:7393-7403.

Noronha, N., Duggan, E., Ziegler, G.R., O'Riordan, E.D., and O'Sullivan, M. (2008). Investigation of imitation cheese matrix development using light microscopy and NMR relaxometry. *International Dairy Journal*, 18:641-648.

Pastorino, A.J., Ricks, N.P., Hansen, C.L., and McMahon, D.J. (2003). Effect of calciumand water injection on structure-function relationships of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86:105-113.

Pavia, M., Guamis, B., Trujillo, A.J., Capellas, M., and Ferragut, V. (1999). Changes in microstructural, textural and colour characteristics during ripening of Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal*, 9:91-98.

Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., and Malcata, F.X. (2009). Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. *Trends in Food Science and Technology*, 20(5):213-219.

Ruan, R., Chang, K., Chen, P.L., Fulcher, R.G., and Bastian, E.D. (1998). A magnetic resonance imaging technique for quantitative mapping of moisture and fat in a cheese block. *International Dairy Journal*, 80:9-15.

Ruan, R., Zou, C., Wadhawan, C., Martines, B., Chen, P.L., and Addis, P. (1997). Studies of hardness and water mobility of cooked wild rice using nuclear magnetic resonance. *Journal of Food Process and Preservation*, 21:91-104.

Schmidt, S.J. (1990). Characterisation of water in foods by NMR. In: Finley, J.W., Schmidt, S.J., and Serianui, A.S. (Eds.). NMR application in biopolymers. (Ed): Plenum Press, New York, USA, p. 415.

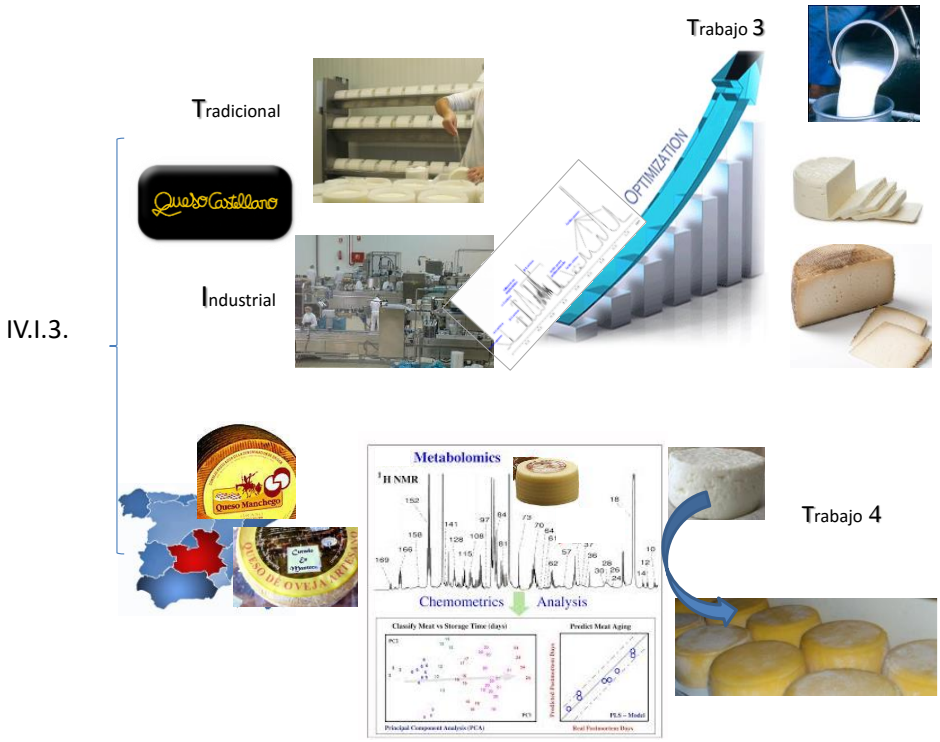
Simal, S., Sánchez, E.S., Bon, J., Femenia, A., and Roselló, C. (2001). Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistances to mass transfer. *Journal of Food Engineering*, 48:269-275.

Singh, H., and Waungana A. (2001). Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal*, 11:543-551.

Skeie, S., Narvhus, J.A., Ardo, Y., Thorvaldsen, K., and Abrahamsen, R.K. (1997). The effect of reduced salt content on the function ofliposome encapsulated Neutrase and heat-treated lactobacilli inrindless low-fat cheese. *Lait*, 77:575-587.

Tunick, M.H., Cooke, P.H., Malin, E.L., Smith, P.W., and Holsinger, V.H (1997). Reorganization of casein submicelles in Mozzarella cheese During Storage. *International Dairy Journal*, 7:49-55.

IV.I.3. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO Y METABOLÓMICO



Preámbulo

Marco de estudio. Planificación y objetivos.

En los últimos años se han utilizado distintas técnicas espectroscópicas de RMN para analizar los metabolitos de diversos tipos de quesos. En general, en los trabajos realizados se han analizado fracciones obtenidas fundamentalmente con agua (Moreno *et al*., 2011; Ruyssen *et al*., 2013) y con distintos disolventes orgánicos (Moreno *et al*., 2011; Rodrigues *et al*., 2011; Piras *et al*., 2013) para obtener su espectro ^{1}H-RMN. Entre los quesos analizados se encuentran, queso italianos como *Pecorino Sardo* (Scano *et al*., 2011), *Fiore Sardon* (Piras *et al*., 2013), holandeses como *Gouda* (Ruyssen *et al*., 2013) y otros como quesos de vaca experimentales (Rodrigues *et al*., 2011). En el caso de los quesos españoles, se encuentra el trabajo de Moreno *et al*. (2011) en el que se analizaron las fracciones acuosa y orgánica de quesos Manchegos de 3, 6 y 9 meses de maduración, elaborados con leche cruda y pasteurizada.

Las muestras semisólidas íntegras, como el queso de pasta prensada, pueden estudiarse mediante RMN con la técnica HRMAS (siglas del inglés *High Resolution Magic Angle Spinning*). El uso del giro con ángulo mágico (θ = 54,7 º), combinado con la tecnología utilizada en las sondas de alta resolución de RMN de muestras líquidas, permite obtener espectros de alta resolución de sistemas heterogéneos, incluyendo componentes en estado sólido y líquido. La alta velocidad de giro de la muestra, típicamente 4-6 kHz, a la posición del ángulo mágico proporciona una reducción de los efectos de la anchura de línea típicos de muestras sólidas, causados por la heterogeneidad de la muestra y las interacciones anisotrópicas residuales. Tales efectos son normalmente promediados en muestras líquidas, donde las moléculas giran isótropa y rápidamente.

La espectroscopia ^{1}H-RMN/HRMAS permite identificar simultáneamente los metabolitos polares y apolares, y por tanto, caracterizar todo el contenido metabólico de un tejido o una estructura intacta, directamente, sin manipulación, evitando largos tiempos de manipulación, así como la posible alteración de la muestra. Esta metodología se ha utilizado para el análisis directo de distintos tipos de queso (con o sin solución tampón), como el *Parmigiano Reggiano* (Shintu *et al*., 2004; Shintu y Caldareli, 2005), *Emmental* (Shintu y Caldareli, 2006), *Mozzarella* di Bufala Campana (Mazzei y Piccolo, 2012) y más recientemente el queso semiduro danés *Danbo*, (Lamichhane *et al*., 2014). En relación con la aplicación de la espectroscopia ^{1}H-RMN/HRMAS al análisis de quesos españoles, sólo

se ha encontrado un estudio preliminar (Castejon *et al*., 2008), en queso Zamorano (DOP, Orden de 6 de mayo de 1993), llevado a cabo en el mismo equipo (espectrómetro Bruker AMX500 11,7 T) con el que se ha desarrollado el presente trabajo doctoral. En este estudio se puso de manifiesto el potencial de esta técnica para analizar los metabolitos de queso de oveja de pasta prensada.

En los últimos años la aplicación de los avances de la espectroscopía de RMN y de las técnicas ómicas, la metabolómica, ha abierto nuevas perspectivas, permitiendo cambiar e incrementar los objetivos del estudio de muestras alimentarias. La RMN metabolómica, como cualquier metodología analítica emergente, requiere la búsqueda y mejora de diversos aspectos experimentales, tanto desde el punto de vista de la técnica de análisis como de los posibles sistemas a estudiar. En la presente Tesis Doctoral se ha intentado avanzar en la aplicación de esta metodología para su uso en el análisis de quesos de pasta prensada elaborados en España. El desarrollo de esta parte del trabajo doctoral se abordó en dos etapas:

1) Como primer paso se abordó la necesaria adaptación de la espectroscopia ^{1}H-RMN/HRMAS a la matriz a analizar (queso de pasta prensada). Esta parte del estudio se realizó en queso Castellano de elaboración industrial y tradicional, analizándose la leche cruda de oveja y el producto en distintos momentos de su maduración. Los resultados obtenidos constituyen el Capítulo **3** de esta tesis doctoral, en el que se planteó alcanzar dos hitos:

- *Optimizar los parámetros de adquisición para el estudio mediante ^{1}H-RMN/HRMAS de muestras íntegras de quesos de pasta prensada*

- *Determinar el potencial de la ^{1}H-RMN/HRMAS para el análisis, caracterización y seguimiento del proceso de maduración de quesos de oveja de pasta prensada.*

2) En un segundo paso y vez optimizada la técnica de RMN, se afrontó aplicar esta espectroscopía junto con el análisis metabolómico al estudio de quesos de pasta prensada. Este estudio se realizó en queso Manchego de elaboración industrial y tradicional y constituye el **Trabajo 4** de la Tesis en el que se abordó fundamentalmente el hito:

- *Estimar el potencial de las técnicas quimiométricas basadas en HRMAS para la clasificación de muestras de queso de oveja de pasta prensada en función del tiempo de maduración y del sistema de fabricación (industrial y tradicional).*

En resumen, el trabajo de este apartado de la Tesis Doctoral se planificó para abordar objetivos de carácter científico y técnico. Por una parte, se pretendía adaptar y estandarizar el análisis de los quesos de pasta prensada de mayor producción en nuestro país mediante espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS e incrementar la asignación de las señales obtenidas a los distintos componentes de los alimentos. De otro lado, se ha pretendido determinar el potencial de esta técnica para su aplicación en el control del proceso de maduración de los quesos así como para la trazabilidad de los productos dependiendo de su origen y sistema de producción.

Bibliografía

Castejón, D., Villa, P., Miralles, B., Mengibar, M., and Herrera, A. (2008). Aplicación de la resonancia magnética nuclear de alta resolución con ángulo mágico (HRMAS) en el estudio de la maduración del queso. Alimentaria congresos, 1: 68.69.

Lamichhane S, Yde CC, Mielby LH, Kidmose U, Møller JR, Hammershøj M, and Bertram HCS. (2014). High-resolution magic-angle spinning studies of semi-hard Danbo (30+) cheese-impact of processing conditions and relation to sensory perception. In: Capozzi, F., Laghi, L., and Belton, P. (Eds). Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance. (Ed): Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp: 171-179.

Mazzei, P., and Piccolo, A. (2012). ^{1}H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*, 132:1620-1627.

Moreno, M., Moreno, A., Goez, M.V., Poveda, J.M., and Cabezas, L. (2011). Study of the proteolytic and lipolytic process in Manchego cheese by NMR. In: Renou, J-P., Belton, P.s., and Webb, G.A. (Eds). Magnetic Resonace in Food Science. (Ed): Royal Society of Chemistry, Clermont-Ferrand, Francia, pp: 54-59.

Piras, C., Cesare Marincola, F., Savorani, F., Engelsen, S.B., Cosentino, S., Viale, S., and Pisano, M.B. (2013). A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chemistry*, 141:2137-2147.

Rodrigues, D., Santos, C.H., Rocha-Santos, T., Gomes, A.M., Brian J. Goodfellow, B.J., and Freitas, A. (2011). Metabolic Profiling of Potential Probiotic or Synbiotic Cheeses by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 4955-496.

Ruyssen, T., Janssens, M., Van Gasse, B., Van Laere, D., Van der Eecken, N., De Meerleer, M., Vermeiren, L., Van Hoorde, K., Martins, J.C., Uyttendaele, M., and De Vuyst L. (2013). Characterisation of Gouda cheeses based on sensory, analytical and high-field 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy determinations: Effect of adjunct cultures and brine composition on sodium-reduced Gouda cheese. *International Dairy Journal*, 33:142-152

Scano, P., Anedda, R., Melis, M. P., Dessi', M.A., Lai, A., and Roggio, T. (2011). ^{1}H- and ^{13}C-NMR Characterization of the Molecular Components of the Lipid Fraction of Pecorino Sardo Cheese. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88:1305-1316.

Shintu, L., and Caldareli, S. (2005). High-Resolution MAS NMR and Chemometrics: Characterization of the Ripening of Parmigiano Reggiano Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4026-4031.

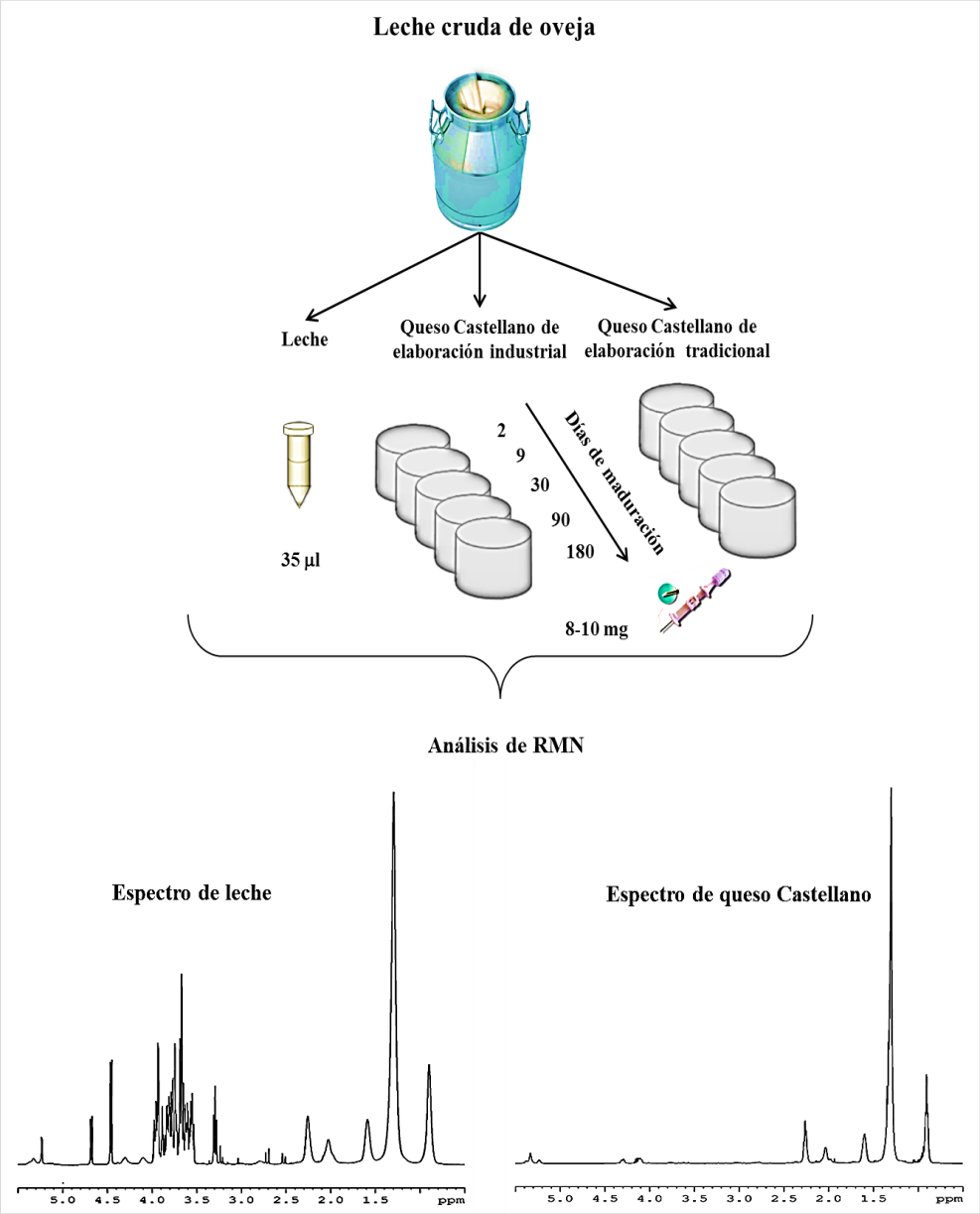
Shintu, L., and Caldareli, S. (2006). Toward the Determination of the Geographical Origin of Emmental(er) Cheese via High Resolution MAS NMR: A Preliminary Investigation *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4148-4154.

Shintu, L., Ziarelli, F., and Caldarelli, S. (2004). Is high resolution magic angles spinning (NMR) a practical speciation for cheese samples? Parmiggiano Reggiano as a case study. *Magnetic Resonance in Chemistry and Biology*, 42, 396-401.

TRABAJO 3

CARACTERIZACIÓN DEL QUESO CASTELLANO MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ÁNGULO MÁGICO (^{1}H-RMN/HRMAS)

Resumen gráfico



Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición y monitorizar el proceso de maduración de queso de oveja Castellano, utilizando por primera vez la espectroscopia ^{1}H-RMN/HRMAS. Esta técnica permite el estudio directo de las muestras y aporta información de múltiples compuestos en un mismo análisis. Como primer paso, se optimizaron los principales parámetros para obtener espectros de alta calidad. Se ha utilizado un espectrómetro Bruker AMX500 11,7 T (500,13 MHz) con una sonda de HRMAS. Muestras (8-10 mg) de queso (2, 9, 30, 90, 180 días de maduración) procedentes de la elaboración tradicional e industrial se introdujeron en un rotor de zirconio con 20 µl de agua deuterada (D_2O) y trimetilsilil propionato de sodio (TSP) a 1 mM. Con el mismo proceder se analizaron muestras de la leche cruda utilizada en la elaboración artesanal de los quesos. Los ensayos se realizaron a 25 ºC. Se determinó que la velocidad de giro óptima fue 6000Hz. En los espectros se han identificado 116 señales correspondientes a diversos metabolitos. El proceso de maduración produjo sobre todo cambios en las regiones de aminoácidos libres y carbohidratos. Se concluye que la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS es una herramienta eficaz y rápida que permite la monitorización de los procesos de proteólisis y glucólisis acontecidos en este tipo de queso desde su fabricación hasta el momento de su comercialización.

IV.I.3. **TRABAJO 3. Caracterización del queso Castellano mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Ángulo Mágico (^{1}H-RMN/HRMAS)**

IV.I.3.**3.1. Introducción**

Durante el proceso de maduración, de los quesos de pasta prensada y coagulación enzimática, se producen notables cambios como consecuencia de las transformaciones simultáneas experimentadas por los componentes de la leche (lactosa, proteínas y lípidos) (Ballesteros *et al*., 2006; Argüelles *et al*., 2007). Estas modificaciones se deben fundamentalmente a procesos hidrolíticos de los que resultan las características típicas para cada grado de maduración. Los cambios acontecidos se pueden resumir principalmente en tres procesos: la glucólisis, producida sobre todo por la acción de las bacterias lácticas que se inicia en la coagulación de la leche produciendo ácido láctico; la proteólisis, con un importante papel en el sabor y la textura de los quesos; y la lipólisis, especialmente implicada en el desarrollo del aroma y el sabor de los quesos madurados.

El queso Castellano de oveja (BOCyL, 2010) ha sido menos estudiado que otros del mismo tipo elaborados en España (como el queso Manchego o Zamorano). No obstante, existen relevantes estudios sobre su microbiota (Gaya *et al*., 2003), textura y otras características sensoriales (Gaya *et al*., 2003), así como de la evolución de su perfil de volátiles (Fernández-García *et al*., 2004) durante el proceso de maduración (60 a 180 días). La composición de diferentes tipos de queso (Manchego, Roncal, Idiazábal, Cheddar, Dubliner) se ha evaluado tradicionalmente mediante el empleo de diferentes técnicas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la de gases (GC) o la iónica y la espectrometría de masas (Marsili, 1985; Izco y Torres, 2000; Escriche *et al*., 2000; Varming *et al*., 2013; Diana *et al*., 2014; Gómez-Torres *et al*., 2015). En la mayoría de los casos estos análisis son dirigidos a un determinado grupo de compuestos y requieren una manipulación o preparación previa de la muestra que en muchas circunstancias incluyen tediosos y largos procesos de extracción, existiendo el riesgo de su modificación o alteración (Ruyssen *et al*., 2013).

La espectroscopía de RMN es una alternativa rápida y precisa para el estudio de matrices biológicas. Esta técnica, gracias a la sonda de HRMAS (*High Resolution Magic Angle Sppinnig*), permite analizar, de forma directa, muestras semi-sólidas (Mannina *et al*., 2012) y obtener espectros de alta resolución (Delgado-Goñi *et al*., 2013). La ^{1}H-RMN/HRMAS ofrece en un único experimento tanto los compuestos liposolubles como

hidrosolubles presentes en una determinada muestra (Mucci *et al*., 2013), sin necesidad de manipulación previa, lo que reduce el tiempo de análisis y evita posibles pérdidas o contaminaciones derivadas de procedimientos de extracción y separación (Lião *et al*., 2010). Esta técnica requiere pequeñas cantidades de muestra para el análisis, más o menos unos 15 miligramos, la cual va depender del tamaño del rotor (Beckonert *et al*. 2010; Delgado-Goñi *et al*., 2013) lo que permite, en sistemas heterogéneas, realizar el estudio de cada una de las porciones que lo integran o analizar distintas partes de una misma muestra que ofrezcan información de la dispersión de su composición (Mazzei y Piccolo, 2012; Mucci *et al*., 2013). En los últimos años, la técnica de ^{1}H-RMN/HRMAS ha sido aplicada al estudio de diferentes matrices alimentarias, incluyendo distintos tipos de queso, como *Mozzarella* (Mazzei y Piccolo, 2012), carne (Ritota *et al*., 2012), pescado (Castejón *et al*., 2010), tomate (Sánchez-Pérez *et al*., 2011), cítricos (Mucci *et al*., 2013), pimientos y ajos (Ritota *et al*., 2010; 2012).

El objetivo principal del presente trabajo fue caracterizar y monitorizar el proceso de maduración del queso Castellano de elaboración artesanal e industrial utilizando por primera vez la espectroscopía ^{1}H-RMN/HRMAS. Para ello, en una primera etapa fue necesario optimizar los principales parámetros de adquisición con el fin de obtener espectros de alta calidad y establecer condiciones de análisis estándar que podrían utilizarse para el estudio de quesos de pasta prensada de similares características. El análisis mediante ^{1}H-RMN/HRMAS del proceso de elaboración del queso Castellano se ha realizado desde la leche hasta el producto comercial (3 - 6 meses de maduración).

IV.I.3.**3.2. Material y Métodos**

IV.I.3.**3.2.1. Selección de las muestras**

Se analizaron 3 muestras de leche cruda de oveja (de las razas Castellana y Churra) y 30 quesos de oveja Castellanos (CL) de elaboración industrial (I-CL) y tradicional (T-CL) procedentes de explotaciones ubicadas en Castilla y León. La leche analizada fue la utilizada para la elaboración de los quesos T-CL. Las características de los quesos estudiados, así como los tiempos de maduración (2, 9, 30, 90 y 180 días) a los que se realizó el estudio de RMN fueron los descritos en el **Punto** III.**3.1** En cada tiempo de análisis se utilizaron cinco quesos de cada tipo, en total las muestras analizadas son: dos tipos de elaboración (I-CL y T-CL) x 5 tiempos x 5 quesos = 50. En cada uno de ellos, y previa eliminación de la corteza

(1 cm de la capa externa) y de la zona central (1 cm), se tomó una muestra utilizando una aguja para biopsia (Biopsy punch, Stiefel, de 3 mm de diámetro). Cada análisis se realizó por triplicado.

IV.I.3.**3.2.2. Análisis de ^{1}H-RMN/HRMAS**

Las muestras de leche de oveja cruda (35 µl) y de queso de oveja Castellano (8-10 mg) se introdujeron directamente en un rotor de zirconio de 50 µl añadiendo 20 µl de una disolución de 1 mM trimetilsilil propionato de sodio (TSP) en agua deuterada (D_2O); el TSP fue utilizado como referencia de desplazamiento químico mientras que el del agua deuterada sirvió para obtener la señal del *lock*, la cual sirve para asegurar la estabilidad del campo magnético del espectrómetro. Los experimentos de ^{1}H-RMN/HRMAS se realizaron en un espectrómetro Bruker AMX500 (Bruker GmBH, Alemania) que opera a 11,7 Teslas (frecuencia de resonancia del ^{1}H, 500,13 MHz). Los espectros de RMN se procesaron utilizando el software MestReNova, versión 8.1.2. (Santiago de Compostela, España).

Para la optimización del método de RMN se consideraron como valores de partida los descritos por Castejón *et al*. (2008). En la **Tabla** IV.I.3.**3.1** se muestran los principales parámetros considerados en la optimización del método, así como los intervalos de trabajó para cada uno de ellos: temperatura (entre 4 y 25 ºC), anchura espectral (de 16,7 a 25,0 ppm), velocidad de giro (entre 4000 y 6000 Hz), intensidad del gradiente del campo magnético (filtro de difusión, entre 5 y 95 %) y tiempo de eco (filtro T_2, entre 0,01 y 0,3 s).

Se realizaron tres tipos de experimentos monodimensionales (1D) con supresión de la señal del agua:

(i) 1D Noesy con supresión de agua, secuencia estándar donde se observan todos los metabolitos.

(ii) *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG), una secuencia eco de espín con filtro T_2, que permite observar las señales de bajo peso molecular y alto-medio T_2.

(iii) Filtro de difusión, una secuencia eco de espín que permite observar las señales de alto peso molecular.

Para poder confirmar las asignaciones se realizaron experimentos de ^{1}H-RMN/HRMAS bidimensionales (2D):

i) ^{1}H,^{1}H-COSY (*COrrelated SpectroscopY*), utilizando los siguientes parámetros de adquisición: un pulso de presaturación del agua de 1s, para determinar la calidad del espectro resultante (relación señal/ruido). Anchura espectral de 8333 Hz en ambas dimensiones, una matriz de adquisición de 2048 puntos en f_2 y de 384 incrementos en f_1.

ii) ^{1}H,^{1}H-TOCSY (*TOtal Correlated SpectroscopY*), utilizando los mismos parámetros anteriores y un tiempo de mezcla de 70 ms.

Tabla IV.I.3.**3.1.** Principales parámetros optimizados para el análisis de quesos Castellano de oveja mediante ^{1}H-RMN/HRMAS

Parámetros optimizados	Intervalo de valores	Valor seleccionado	Experimento 1D
Temperatura (ºC)	4 - 25	25	1D Noesypr, filtro de difusión y filtro T_2 o CPMG
Velocidad de giro (Hz)	4000 - 6000	6000	1D Noesypr, filtro de difusión y filtro T_2 o CPMG
Anchura espectral (*SW* en ppm)	16,7 - 25,0	25	1D Noesypr, filtro de difusión y filtro T_2 o CPMG
Intensidad de gradiente (%)	5 - 95	60	Filtro de difusión
Tiempo eco (s)	0,01 - 0,3	0,25	Filtro T_2 o CPMG

IV.I.3.3.2.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de realizó como se indica en el **Punto** III.**5** utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE.UU.) para Windows. Cuando los datos se ajustaban a una distribución normal (test de Shapiro-Wilks) se realizó un análisis ANOVA de una vía, para determinar las variaciones entre las medias obtenidas. Sin embargo, cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal, se empleó el test de Kruskal-Wallis. Para la comparación múltiple de las medias y establecer diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) se utilizó el test de Rango Múltiple de Duncan. Los resultados se expresaron como valores medios con su desviación estándar.

IV.I.3.**3.3. Resultados y Discusión**

IV.I.3.**3.3.1. Optimización de los parámetros del análisis de ^{1}H-RMN/HRMAS**

La **Tabla** IV.I.3.**3.1** muestra los valores seleccionados para los parámetros de adquisición en la optimización del análisis mediante ^{1}H-RMN/HRMAS del queso Castellano.

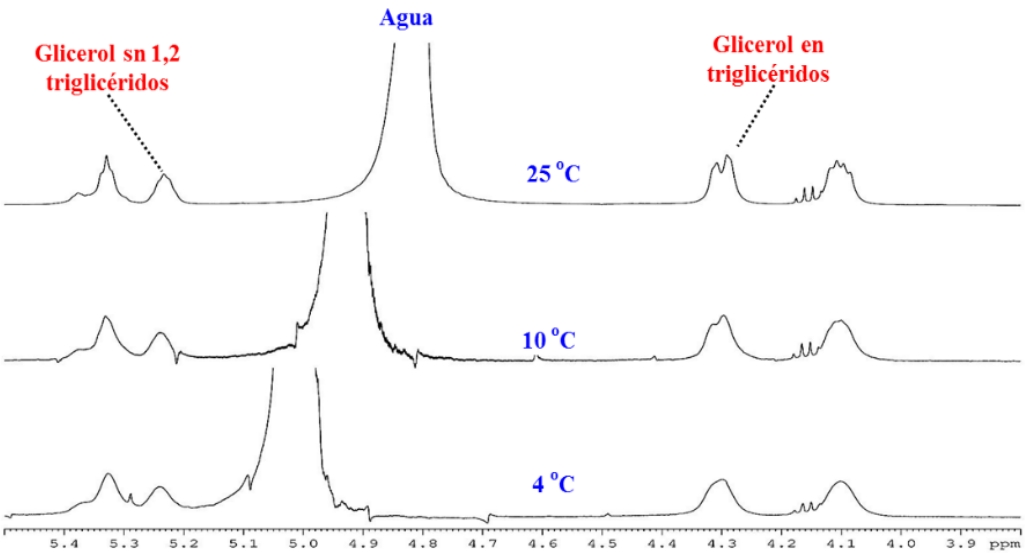


Figura IV.I.3.**3.1.** Ejemplo de espectro ^{1}H-RMN/HRMAS con pulso de 90º a diferentes temperaturas.

La *temperatura* empleada en la adquisición se optimizó para evitar el solapamiento de las señales de los metabolitos de interés de los quesos con la del agua, la cual es sensible a la temperatura como puede apreciarse en los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS de la **Figura** IV.I.3.**3.1** en los que se indica su desplazamiento químico a 4, 10 y 25 ºC. Como puede observarse, a 25 ºC la señal del agua aparece a un desplazamiento químico que no afectó las señales colindantes correspondientes a los triglicéridos. Por tanto, se consideró esta temperatura como la más adecuada para realizar los espectros 1D de las muestras de quesos.

Una vez definido el rango espectral (0,5 a 10 ppm) donde estaban presentes los metabolitos de las muestras de queso Castellano, se seleccionaron la velocidad de giro y la anchura espectral (*SW*) necesarias para evitar que los posibles artefactos de giro estuvieran presentes en la región de interés. Los artefactos de giro de las señales hiperintensas aparecen en el espectro a una distancia de desplazamiento químico igual a la velocidad de giro utilizada (Beckonert *et al*., 2010). La **Figura** IV.I.3.**3.2** muestra ejemplos de espectros de ^{1}H-RMN/HRMAS adquiridos con diferentes velocidades de giro. Como puede observarse una velocidad de giro de 6000 Hz evitó la presencia de los artefactos producidos por las señales más intensas en el rango espectral en estudio. Aunque con 5000 Hz también se consiguió este efecto (**Figura** IV.I.3.**3.3**), en la elección de este parámetro se tuvo en cuenta que una mayor velocidad de giro está asociada con una mayor intensidad de señal (Engelke, 1998). Por todo ello, se seleccionó 6000 Hz como la velocidad de giro para el análisis.

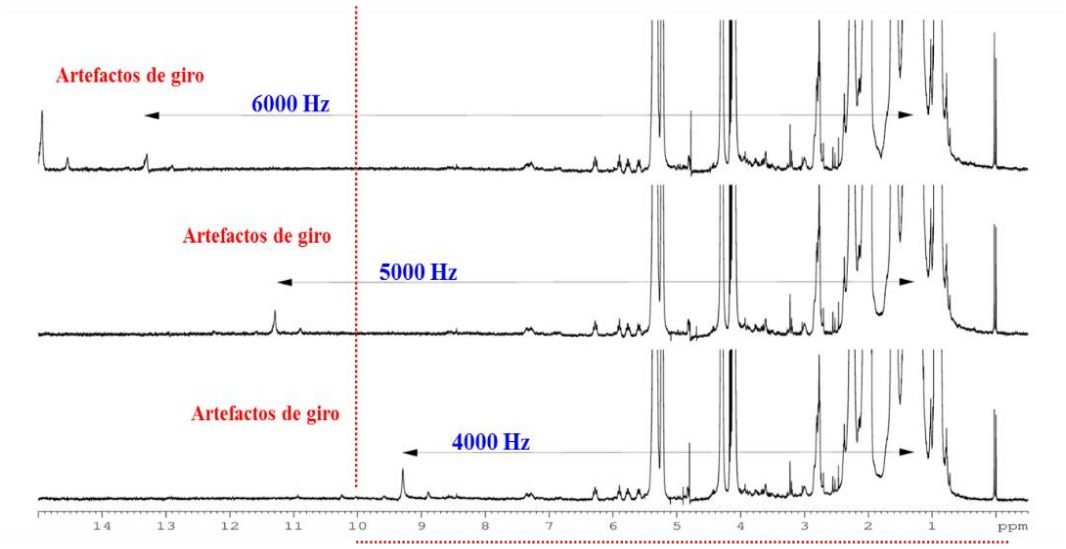


Figura IV.I.3.**3.2.** Ejemplos de un espectro de ^{1}H-RMN/HRMAS con diferentes velocidades de giro mediante experimentos de 1D Noesypr.

Dado que los espectros se adquirieron en un espectrómetro con tecnología analógica, era necesario buscar una *SW* lo suficientemente amplia para que los artefactos de giro no interfirieran en el análisis de los datos. En la **Figura** IV.I.3.**3.3** se muestran dos ejemplos del efecto del tamaño de la *SW*. Como puede apreciarse una *SW* inferior a 17 ppm origina que los artefactos de giro producidos por las señales intensas de los ácidos grasos se ubiquen en la región comprendida entre 0,5 y 10 ppm, mientras que el empleo de una *SW* de 25 ppm hizo que los mismos artefactos se localizaran fuera del rango de desplazamiento químico estudiado. Este valor de 25 ppm *SW* fue, por tanto, seleccionado para el análisis.

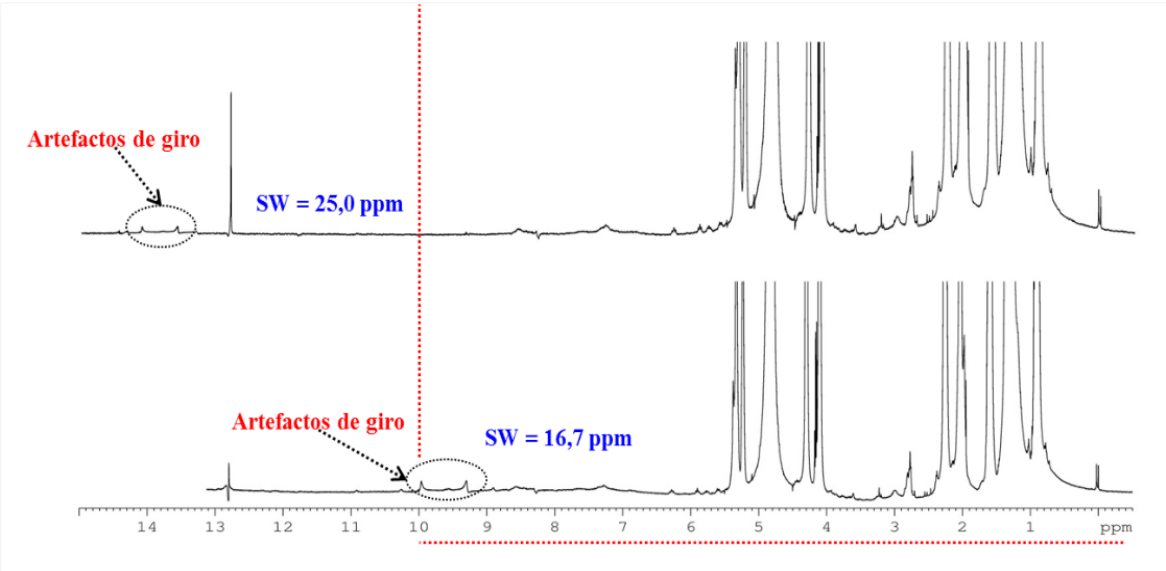


Figura IV.I.3.**3.3.** Ejemplos de espectros de ^{1}H-RMN/HRMAS a diferentes anchuras espectrales (adquiridos a 4000 Hz)

Además de la optimización de los principales parámetros de adquisición comunes a todos los experimentos 1D empleados, fue necesario la selección de aquellos específicos para los experimentos con filtro de difusión y con filtro T_2. Esta optimización se realizó con el fin de observar mejor las señales con mayor peso molecular ("espectro lipofílico") y las señales con un T_2 largo ("espectro acuoso"). Es decir se buscó obtener el espectro lipofílico más puro de la fracción lipídica y un espectro lo más limpio posible de la fracción acuosa. El empleo de estos "espectros simplificados" permite confirmar el desplazamiento químico de señales solapadas, facilitando su identificación y su integración. Para el experimento con filtro de difusión ("espectro lipofílico") se optimizó el parámetro de la intensidad del gradiente. Con este fin, se partió de 53,5 Gauss/cm (100% de la intensidad del gradiente), que es el gradiente máximo de la sonda de HRMAS con la que se trabajó, y se realizaron distintos experimentos donde se varió esta intensidad entre el 5% y 95% (5, 25, 50, 75, 95 %). Con este proceder se observó que al 5 % las señales de bajo peso molecular (aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.) permanecían en el espectro, al 50 % seguían apareciendo algunas de estas señales mientras que al 75 % y 95 % ya no eran detectadas. Para establecer el valor mínimo que permitiera eliminar las señales de los metabolitos de bajo peso molecular, se realizaron nuevos experimentos utilizando intensidades de gradiente entre 55 y 75% (55, 60, 65, 70 y 75 %). Los resultados obtenidos permitieron seleccionar la intensidad de gradiente del 60% (32,1 Gauss/cm) como valor mínimo que conseguía el objetivo buscado.

En el análisis CPMG que emplea un filtro T_2 ("espectro acuoso"), el parámetro clave a seleccionar es el tiempo de eco. Para ello se modificó el número de experimentos entre 500, 750 y 950 que implica una variación en los valores del tiempo de eco final de 0,01, 0,25 y 0,3 s respectivamente. El tiempo de eco que permitió adquirir el "espectro acuoso más puro" (eliminando las señales con un T_2 corto sin alterar las señales con T_2 mayor, como aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.) fue 0,25 s.

La optimización de los mencionados parámetros permitió obtener información complementaria de la composición del queso Castellano a partir de los tres experimentos 1D. La **Figura** IV.I.3.**3.4** presenta un ejemplo de cada uno de los experimentos 1D realizados, donde el experimento 1D Noesy mostraría el perfil metabólico global (espectro completo), el espectro ^{1}H-RMN con filtro de difusión mostraría el perfil lipídico (las señales anchas correspondientes a los ácidos grasos, triglicéricos, los principales fosfolípidos y otros componentes liposolubles) y el experimento CPMG con filtro T_2 aportaría información sobre

el perfil acuoso, (aminoácidos, ácidos orgánicos, azucares, y otros componentes de bajo peso molecular).

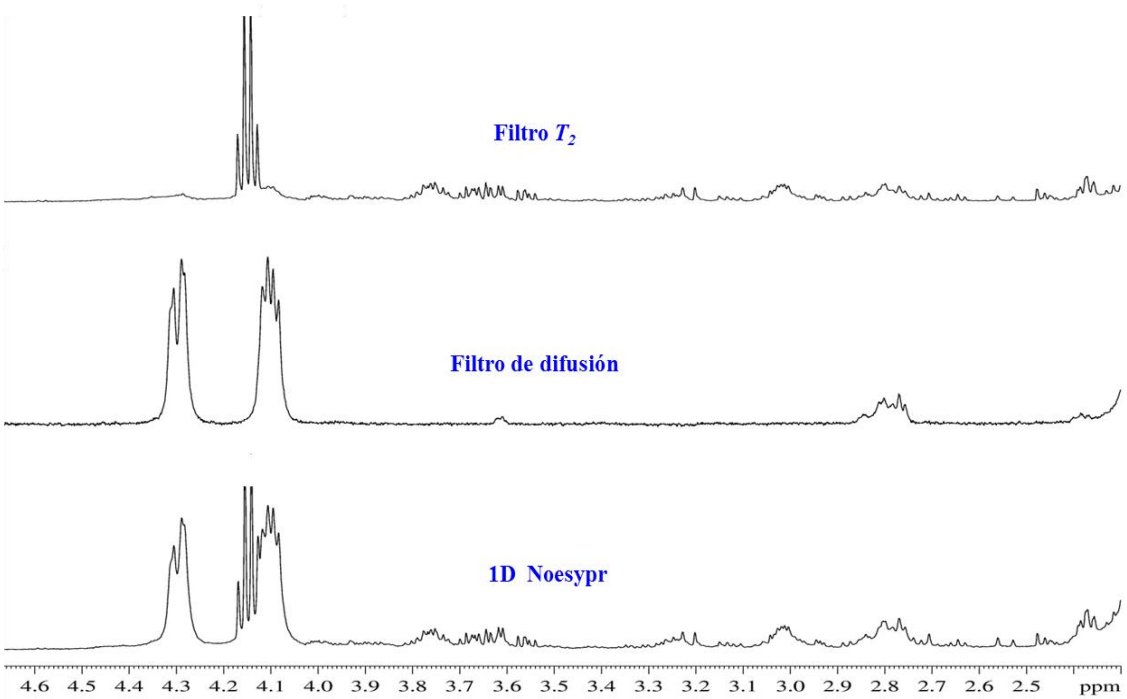


Figura IV.I.3.**3.4.** Espectros ^{1}H-RMN/HRMAS 1D (2,5 a 5,1 ppm) de muestras de queso I-CL con un tiempo de maduración de 180 días obtenidos mediante los experimentos con filtro T_2, filtro de difusión y 1D Noesypr.

IV.I.3.**3.3.2. Análisis mediante ^{1}H-RMN/HRMAS de leche de oveja cruda**

Para poder evaluar de una forma global los cambios metabólicos asociados al proceso de elaboración del queso, en el presente trabajo se analizaron muestras de leche cruda de oveja de las razas autorizadas para la elaboración de queso Castellano. Esta leche se obtuvo de una explotación ganadera que suministraba a la empresa de elaboración de queso tradicional (T-CL). La leche analizada fue recogida el día anterior a su análisis y en el mismo mes (abril) en el que se produjeron los quesos.

La **Figura** IV.I.3.**3.5** muestra una ampliación (0,5-5,5 ppm) del espectro de ^{1}H-RMN/HRMAS de la leche donde se asignan la mayoría de los metabolitos presentes. Las principales señales se asociaron a los ácidos grasos (con un desplazamiento químico de 0,9; 1,3; 1,6; 2,1; 2,3 y 5,3 ppm), al ácido cítrico (en el rango espectral entre 2,5 y 2,7 ppm), a los derivados de la lactosa**,** como la señal β-lactosa (3,3 y 4,6 ppm) y α-lactosa (4,4 ppm) y a los triglicéridos (4,4 ppm). Los espectros obtenidos para la leche de oveja mostraron un perfil de metabolitos similar al hallado por otros autores (Hu *et al*., 2004; Sundekilde *et al*.,

2013) en leche de vaca cruda. En estos espectros la relación en porcentaje de ácidos grasos y de carbohidratos fue 61,4±0,2 y 38,6±0,3, respectivamente. Estos valores están en consonancia con el elevado contenido graso que caracteriza a este tipo de leche (Kalyankar *et al*., 2016) y a la riqueza en ácidos grasos descrita por diversos autores por distintas técnicas (Raynal-Ljutovac *et al*., 2008). Los resultados obtenidos sugieren que la RMN puede utilizarse para un análisis rápido del perfil metabolómico completo de la leche de oveja.

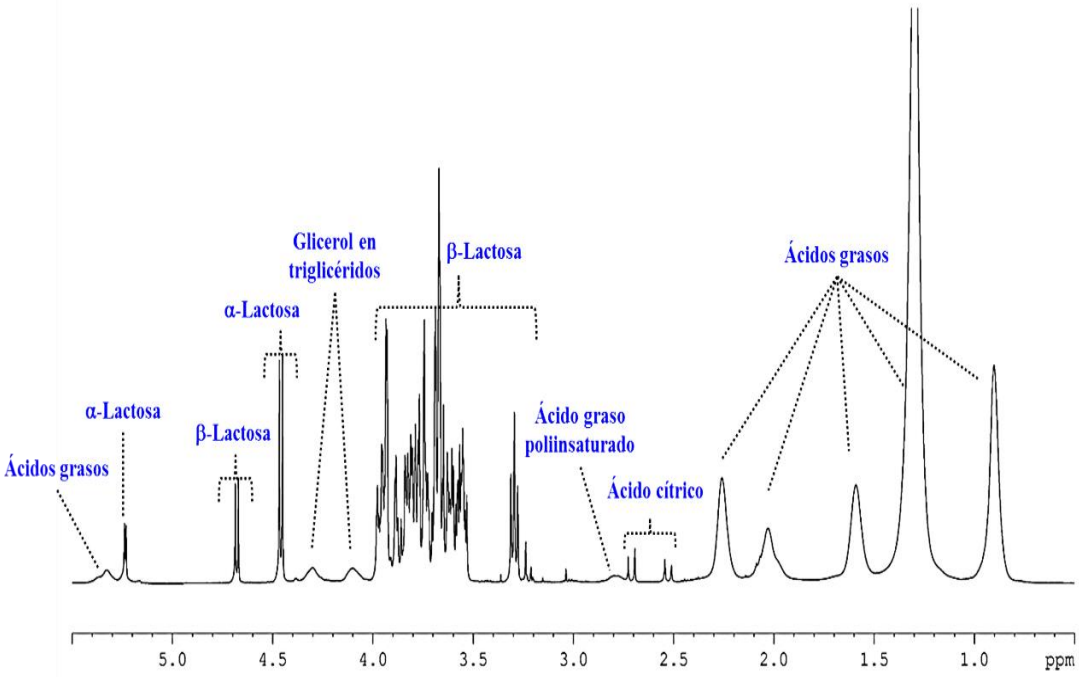


Figura IV.I.3.**3.5.** Espectro ^{1}H-RMN/HRMAS (0,5-5,5 ppm) de la leche de oveja.

IV.I.3.**3.3.3. Análsisis mediante ^{1}H-RMN/HRMAS del queso Castellano**

La **Figura** IV.I.3.**3.6** muestra un ejemplo de los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS correspondiente a quesos I-CL de 180 días. Las señales dominantes a este tiempo de maduración fueron: aminoácidos (como la fenilalanina, la tirosina o la lisina), ácidos grasos (como el ácido caproleico, ácido linoleico conjugado y otros ácidos grasos saturados, monoinsaturados y polinsaturados), ácidos orgánicos (como los ácidos fórmico, láctico o acético) y triglicéridos.

Como se ha mencionado, hasta donde los autores conocen, este estudio representa la primera experiencia en la que quesos Castellanos se analizan por ^{1}H-RMN/HRMAS, desde los primeros días de su elaboración (2 y 9 días) hasta distintos tiempo de comercialización

(30, 90 y 180 días), lo que ha permitido monitorizar los cambios metabólicos a lo largo de su proceso maduración.

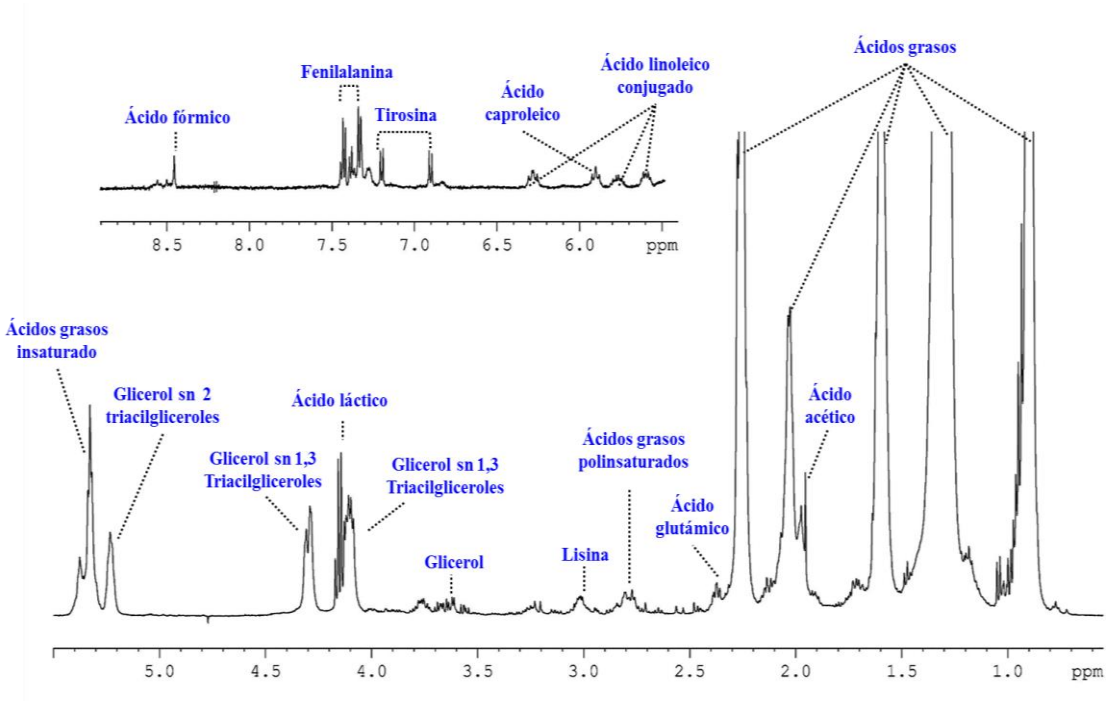


Figura IV.I.3.**3.6.** Ampliación del espectro ^{1}H-RMN/HRMAS (0,5 a 5,5 ppm) del queso I-CL a 180 días de maduración, con los principales compuestos presentes. La región aromática del espectro (5,4 a 8,9 ppm) se muestra detallada en la parte superior.

Las señales del espectro de ^{1}H-RMN/HRMAS se asignaron por comparación con los desplazamientos químicos descritos en la literatura (de Angelis-Curtis *et al*., 2000; Shintu *et al*., 2004; Castejón *et al*., 2010; Scano *et al*., 2011; Rodrigues *et al*., 2011; Ruyssen *et al*., 2013; Piras *et al*., 2013., Castejón *et al*., 2015) y en la base de datos Human Metabolome Database (HMDB; http://www.hmdb.ca). Con el fin de verificar la identificación de las señales, el estudio se apoyó en experimentos 2D homonucleares que proporcionan información sobre los acoplamientos escalares protón-protón a corta (^{1}H,^{1}H-COSY) y larga distancia (^{1}H,^{1}H-TOCSY)

La **Figura** IV.I.3.**3.7** muestra un ejemplo de un espectro 2D ^{1}H,^{1}H-COSY del queso I-CL a 180 días de maduración, con la asignación de las principales correlaciones presentes. Como resultado del estudio de asignación llevado a cabo se identificaron un total de 116 señales sobre los espectros ^{1}H-RMN de los quesos Castellanos (I-CL y T-CL) a distintos tiempos de maduración. La **Tabla** IV.I.3.**3.2** muestra el desplazamiento químico, grupo funcional y multiplicidad de cada uno de los compuestos así como las principales señales de correlación 2D que confirma su asignación.

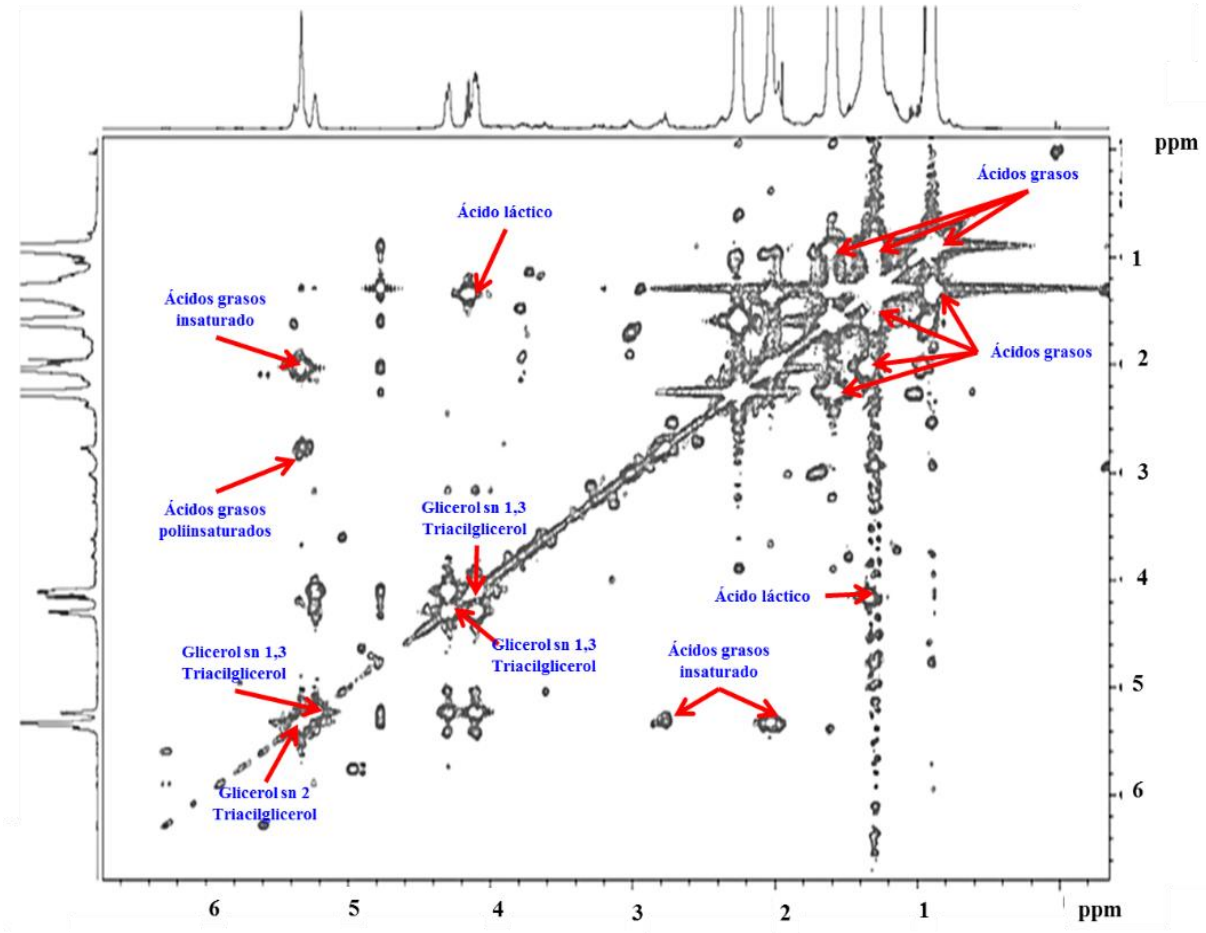


Figura IV.I.3.**3.7.** Ejemplo de un espectro 2D ^{1}H,^{1}H-COSY de queso I-CL a 180 días de maduración. La figura incluye las principales señales de correlación presentes.

Las señales de los hidratos de carbono identificadas en el espectro ^{1}H-RMN del queso se asociaron a compuestos derivados de la α y β lactosa. Al comparar los espectros ^{1}H-RMN de la leche (**Figura** IV.I.3.**3.5**) con los de los quesos (**Figura** IV.I.3.**3.7**) se pudo observar que las señales asociadas a la lactosa en las muestras de leche no estaban presentes en las muestras de queso. Sin embargo, los espectros ^{1}H-RMN del queso mostraron las señales correspondientes a los monosacáridos que conforman la lactosa (α y β-galactosa, α y β-glucosa) en los primeros días de su elaboración (2 - 30 días). Estos resultados coinciden con los obtenidos por varios autores (Corzo *et al*., 2000; Garde *et al*., 2012) en quesos similares de oveja (Manchegos). Por otra parte, los mismos monosacáridos han sido identificados en otros tipos de queso (Fiore Sardo) analizados por RMN (Mazzei y Piccolo, 2012; Piras *et al*., 2013).

Por otra parte, en el espectro ^{1}H-RMN se identificaron 18 aminoácidos, entre los que se hallaron aromáticos, como la fenilalanina, el triptófano y la tirosina. A estos compuestos

se les atribuye un importante papel en el desarrollo del aroma característico de los quesos al final de su maduración (Yvon y Rijnen, 2001). Otros aminoácidos detectados han sido relacionados por diversos autores (Bergamini *et al*., 2010; Barcina *et al*., 1995; Izco *et al*., 2000; Populin *et al*., 2007; Varming *et al*., 2013) con características sápidas concretas, como matices dulces (glicina, alanina, prolina, treonina), amargos (arginina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, lisina) y umami (ácido glutámico). En general, el perfil de aminoácidos encontrado en el queso de oveja Castellano es similar al descrito en otros quesos de leche oveja españoles, como el queso Manchego (Fernández-García *et al*., 1988), el Mahón (Polo *et al*., 1985) y el Gamonedo (González de Llano *et al*., 1991).

Entre los componentes del queso Castellano se han identificado también ácidos orgánicos, como acético, butírico, cítrico, fórmico y ácido láctico. Estos metabolitos son importantes para el control del crecimiento y actividad de la microbiota y además contribuyen al desarrollo del sabor y aroma de la mayoría de los quesos (Fox *et al*., 1993; González de Llano *et al*.,1996). Los ácidos orgánicos detectados coinciden con los identificados, por esta misma técnica, en quesos italianos (como *Mozzarella* y *Fiore Sardo*) por Mazzei y Piccolo (2012) y Piras *et al*. (2013), así como los hallados, por otros métodos de análisis (como GC y HPLC), en quesos de oveja similares, como el Argentino, el Manchego y el Zamorano (Bergamini *et al*., 2010), o en distintas variedades de queso entre los que cabe citar el blanco en escabeche Turco (Akalin *et al*., 2002) y en distintos quesos de leche de cabra (Buffa *et al*., 2004).

En los espectros de los quesos Castellanos (I-CL y T-CL) fueron también identificadas señales derivadas del glicerol y de ácidos grasos, tanto de cadena corta (por ejemplo, butírico) como de cadena larga (saturados, mono y poliinsaturados), entre los que pueden destacarse la presencia de: caproleico, linoleico, linolenico y linoleico conjugado (CLA). Como era de esperar, las señales de los ácidos grasos fueron las más intensas en el espectro ^{1}H-RMN **(Figura** IV.I.3.**3.8**). La asignación de las señales del componente graso en el presente trabajo es muy similar a la mencionada por Scano *et al*. (2011) en quesos italianos (*Pecorino sardo*), aunque estos autores trabajaron con un extracto lipídico, mientras que los resultados mostrados en la **Tabla** IV.I.3.**3.2** corresponden al análisis directo del queso, sin ninguna manipulación o preparación previa. Otros compuestos identificados fueron el etanol, la colina y el colesterol, metabolitos habitualmente detectados en estudios de distintos tipos de queso (Bergamini *et al*., 2010; Scano *et al*., 2011; Piras *et al*., 2013).

Tabla IV.I.3.**3.2.** Señales asignadas en el espectro ^{1}H-RMN/HRMAS de quesos Castellanos en diferentes tiempos de maduración.

	δ (ppm)	Compuesto	Grupo / Multiplite	Información adicional
1	0,72	Colesterol	CH_3 (s)	Scano *et al.* (2011)
2	0,91	Ácidos grasos	CH_3 (t)	COSY (1,30)
3	0,93	Ácido butírico	CH_3 (t)	COSY(1,58); TOCSY(2,21)
4	0,94	Isoleucina	δ–CH_3	COSY (1,27;148)
5	0,97	Leucina	δ–CH_3/δ'–CH_3 (d)	COSY (1,72); TOCSY (3,74)
6	0,98	Ácidos grasos (ω–3)	CH=CH–CH_2 –CH_3 (t)	COSY (2,08); TOCSY (2,79; 5,35)
7	0,99	Valina	γ–CH_3 (d)	COSY (2,29); TOCSY (3,61)
8	1,02	Isoleucina	γ–CH_3 (d)	COSY (1,98); TOCSY (3,68)
9	1,05	Valina	γ'–CH_3 (d)	COSY (2,29); TOCSY (0,99)
10	1,19	Etanol	CH_3 (t)	COSY (3,66)
11	1,27	Isoleucina	γ–CH_2 (m)	COSY (1,02)
12	1,30	Ácidos grasos	$(CH_2)_n$ (s)	COSY (1,60; 2,04); TOCSY (2,27;5,35)
13	1,33	Treonina	γ–CH_3	COSY (4,26); TOCSY (3,58)
14	1,34	Ácido láctico	β–CH_3 (d)	COSY (4,13)
15	1,47	Lisina	γ–CH_2 (m)	COSY (1,71; 1,91); TOCSY (3,02)
16	1,48	Isoleucina	γ–CH_2	COSY (1,02)
17	1,48	Alanina	β–CH_3 (d)	COSY (3,78)
18	1,60	Ácidos grasos	CH_2 –CH_2–CH_2 –COOR	COSY (1,30; 2,27)
19	1,69	Arginina	γ–CH_2 (m)	COSY (1,90; 3,25)
20	1,71	Lisina	δ–CH_2	COSY (1,47; 3,02); TOCSY (1,91)
21	1,72	Leucina	γ–CH	COSY (0,97)
22	1,72	Leucina	β–CH_2	COSY (3,74)
23	1,90	Arginina	β–CH_2 (m)	COSY (1,69; 3,76)
24	1,91	Lisina	β–CH_2	COSY (1,47; 3,77); TOCSY (1,71)
25	1,91	Ácido γ–aminobutírico	β–CH_2 (q)	COSY (2,31; 3,01)
26	1,93	Ácido acético	CH_3 (s)	Castejón *et al*, (2010)
27	1,98	Isoleucina	β–CH	COSY (1,02)
28	2,04	Ácidos grasos insaturados	CH_2(trans)–H=CH– (m)	COSY (1,30; 5,35); TOCSY (2,80)
29	2,08	Ácidos grasos insaturados	CH_2(cis)–CH=CH– (m)	COSY (0,98; 3,35); TOCSY (2,83)
30	2,13	Ácido glutámico	β–CH_2	COSY (2,36; 3,77)
31	2,13	Metionina	S–CH_3	Castejón *et al.* (2010)
32	2,14	Glutamina	β,β'–CH_2	COSY (2,44; 3,78)
33	2,18	Metionina	β–CH_2	COSY (2,64; 3,88)
34	2,27	Ácidos grasos	CH_2– CH_2– COOR	COSY (1,60); TOCSY (1,30)
35	2,29	Valina	β–CH (m)	COSY (0,99; 1,05; 3,61)
36	2,31	Ácido γ–aminobutírico	α–CH_2 (m)	COSY (1,91)
37	2,36	Ácido glutámico	β–CH_2	COSY (2,13); TOCSY (3,77)
38	2,44	Glutamina	β–CH_2 (m)	COSY (2,14; 3,78)

39	2,54	Ácido cítrico	CH_2	COSY (2,71)
40	2,63	Metionina	γ –CH_2	COSY (2,18); TOCSY (3,85)
41	2,70	Ácido aspártico	β–CH2	COSY (3,90)
42	2,71	Ácido cítrico	CH2	COSY (2,54)
43	2,79	Ácidos grasos linoleico	CH_2–CH=CH–CH_2–CH=CH–CH_2 (m)	COSY (3,35); TOCSY (0,98; 1,30; 2,08)
44	2,83	Ácidos grasos linolenico	CH_2=CH–CH–CH_2=CH–CH=CH_2 (m)	COSY (3,35); TOCSY (2,04)
45	2,86	Asparagina	β–CH_2 (dd)	COSY (2,90)
46	2,90	Asparagina	β'CH_2 (dd)	COSY (2,86)
47	3,01	Ácido γ–aminobutírico	γ–CH_2 (m)	COSY (1,91)
48	3,02	Lisina	ε–CH_2 (m)	COSY (1,71); TOCSY (1,47; 1,91; 3,77)
49	3,06	Tirosina	β–CH2	COSY (3,94)
50	3,13	Fenilalanina	β–CH_2	COSY (3,99)
51	3,21	Tirosina	β–CH_2	COSY (3,94)
52	3,21	Colina	N–CH_3 (s)	Piras *et al*. (2013)
53	3,26	Arginina	δ–CH_2 (t)	COSY (1,69); TOCSY (1,90; 3,76)
54	3,27	Fenilalanina	β–CH_2	COSY (3,99)
55	3,27	β–Glucosa	CH–2 (m)	COSY (4,65; 3,65)
56	3,37	Prolina	δ–CH (t)	Piras *et al*. (2013)
57	3,42	Prolina	δ´–CH (t)	Piras *et al*. (2013)
58	3,48	β–Galactosa	CH–2 (m)	COSY (4,57); TOCSY (3,92)
59	3,54	Colina	β–CH_2	COSY (4,07)
60	3,55	α–Glucosa	CH–2 (m)	COSY (5,22)
61	3,55	Glicina	α –CH_2 (s)	Castejón *et al.* (2010)
62	3,58	Treonina	α–CH (d)	COSY (4,26); TOCSY (1,33)
63	3,61	Valina	α–CH (d)	COSY (2,29); TOCSY (0,99; 1,05)
64	3,62	Glicerol sn 1,2 diacilglicerol	HO–CH_2–CH– (d)	Scano *et al.* (2011)
65	3,63	β–Galactosa	CH–3 (m)	TOCSY (4,57)
66	3,65	β–Glucosa	CH–3 (m)	COSY (3,27); TOCSY (4,65)
67	3,66	Etanol	CH_2 (q)	COSY (1,19)
68	3,69	Glicerol sn 1,3 diacilglicerol	–CH_2–OOC– (m)	Scano *et al.* (2011)
69	3,68	Isoleucina	α–CH	COSY (1,98); TOCSY (1,02)
70	3,70	α–Glucosa	CH–3 (m)	TOCSY (5,22)
71	3,74	Leucina	α–CH (m)	COSY (1,72); TOCSY (0,97)
72	3,75	Arginina	α–CH_2 (t)	COSY (1,90); TOCSY (1,69; 3,25)
73	3,77	Lisina	α–CH (t)	COSY (1,91); TOCSY (3,02)
74	3,77	Ácido glutámico	α–CH (m)	COSY (2,11); TOCSY (2,36)
75	3,78	Glutamina	α–CH (m)	COSY (2,14); TOCSY (2,44)
76	3,78	Alanina	α–CH	COSY (1,48)
77	3,82	α–Galactosa	CH–2 (m)	COSY (5,25)
78	3,84	α–Galactosa	CH–3 (m)	TOCSY (5,25)
79	3,85	Metionina	α–CH	COSY (2,18)
80	3,87	α–Glucosa	CH–4 (m)	TOCSY (5,22)

81	3,90	Ácido aspártico	α–CH	COSY (2,70)
82	3,92	β–Galactosa	C4H (m)	TOCSY (3,48; 4,57)
83	3,94	Tirosina	α–CH	COSY (3,06; 3,21)
84	3,98	α–Galactosa	CH–4 (m)	TOCSY (5,25)
85	3,99	Fenilalanina	α–CH (dd)	COSY (3,13; 3,27)
86	4,01	Asparagina	α–CH (dd)	Piras *et al.* (2013)
87	4,07	Colina	α–CH_2	COSY (3,54)
88	4,12	Glicerol sn 1,3 triacilglicerol	CH_2–OOC (dd)	COSY (4,30; 5,26)
89	4,13	Ácido láctico	α–CH (q)	COSY (1,34)
90	4,26	Treonina	α–CH (m)	COSY (3,58)
91	4,30	Glicerol sn 1,3 triacilglicerol	CH_2–OOC–(dd)	COSY (4,12; 5,26)
92	4,57	β–Galactosa	CH–1 (d)	COSY (3,48); TOCSY (3,65; 3,92)
93	4,65	β–Glucosa	CH-1 (d)	COSY (3,27); TOCSY (3,65)
94	4,90	Ácido caproleico	=CH- (dd)	COSY (5,77)
95	4,97	Ácido caproleico	=CH- (dd)	COSY (5,77)
96	5,08	Glicerol sn 1,2 triacilglicerol	–CH–OOC– (m)	COSY (4,30)
97	5,22	α–Glucosa	CH-1 (d)	COSY (3,55); TOCSY (3,70; 3,87)
98	5,26	Glicerol sn 2 triacilglicerol	–CH–OOC– (m)	COSY (4,12; 4,30)
99	5,27	Ácido linoleico conjugado	=CH-	COSY (5,93); TOCSY (5,27; 6,26)
100	5,25	α–Galactosa	CH–1 (d)	COSY (3,82); TOCSY (3,84; 3,98)
101	5,35	Ácido graso insaturado	–CH (cis)=CH– (m)	COSY (2,04; 2,79; 2,83); TOCSY (0,98; 1,30; 2,35)
102	5,37	Ácido graso insaturado	–CH (trans)=CH– (m)	Scano *et al.* (2011)
103	5,65	Ácido linoleico conjugado	–CH= (dd)	COSY (5,65; 5,93); TOCSY (5,65)
104	5,77	Ácido caproleico	–CH=CH_2 -(m)	COSY (4,90; 4,97)
105	5,93	Ácido linoleico conjugado	–CH= (t)	COSY (5,27; 6,28); TOCSY (5,65)
106	6,28	Ácido linoleico conjugado	–CH= (dd)	COSY (5,65; 5,93); TOCSY (5,27)
107	6,89	Tirosina	CH–3,5 (d)	COSY (7,17)
108	7,17	Tirosina	CH–2,6 (d)	COSY (6,89)
109	7,19	Triptófano	CH–6	TOCSY (7,53)
110	7,32	Fenilalanina	CH–2,6 (m)	COSY (7,42)
111	7,33	Histidina	CH–4 (s)	COSY (8,52)
112	7,39	Fenilalanina	CH–3,5 (m)	COSY (7,42)
113	7,42	Fenilalanina	CH–4 (m)	COSY (7,32)
114	7,53	Triptófano	CH–t	TOCSY (7,19)
115	8,42	Ácido fórmico	CH (s)	Castejón *et al.* (2010)
116	8,52	Histidina	CH–2 (s)	COSY (7,33)

δ : desplazamiento químico (ppm); s: singlete; d: duplete; dd: duplete duplete; m:multiplete

IV.I.3.**3.3.4. Evolución de los metabolitos durante la maduración del queso Castellano**

A lo largo del proceso de maduración de los quesos de oveja de pasta prensada y coagulación enzimática, como el Castellano, confluyen procesos de glucólisis, proteólisis y lipólisis, que han sido estudiadas por diversos autores (Fox *et al*., 2000; Núñez *et al*., 1989; entre otros). Los trabajos realizados en este campo emplean diversas técnicas de análisis que habitualmente sólo permiten el estudio de un grupo de componentes, lo que dificulta el estudio del proceso global, cuya complejidad radica precisamente en que reacciones de distinta naturaleza se desarrollan simultáneamente. En este contexto, la espectroscopía de RMN, como ya se ha mencionado, tiene la ventaja de aportar información de diversas sustancias en el mismo espectro. La **Figura** IV.I.3.**3.8** muestra un ejemplo de los espectros durante el tiempo de maduración del queso Castellano. Esta Figura muestra únicamente el comportamiento del queso de elaboración industrial (I-CL), los resultados correspondientes al queso tradicional (T-CL) presentaron un comportamiento similar al queso (I-CL), aunque se detectaron diferencias cuantitativas que serán posteriormente analizadas (**Punto** IV.I.3.**3.5**). Los principales cambios asociados a la maduración se observan en las regiones asignadas a azucares, aminoácidos y ácidos orgánicos.

En la **Figura** IV.I.3.**3.8** se puede observar la disminución gradual del contenido de hidratos de carbono (β-galactosa y otros azúcares), desde los primeros días de elaboración del queso hasta concluir el tiempo de maduración estudiado (180 días). Este proceso se debería al metabolismo de la lactosa residual (0,7 - 1,5 %) que permanece en la cuajada tras el drenaje del suero (Fox *et al*., 1993; 1996) y que es rápidamente transformada (Piras *et al*., 2013) en los monosacáridos constituyentes (α y β-galactosa, α y β-glucosa) mediante la acción de la β-*galactosidasa* producida, fundamentalmente, por los cultivos estárter de bacterias ácido lácticas (BAL) homofermentativos. En consecuencia, en ninguna de las muestras estudiadas se apreció la presencia de lactosa. Las señales correspondientes a los azúcares se observaron en los espectros de las muestras de queso hasta los tres meses de fabricación (**Figura** IV.I.3.**3.8**), sin duda debido a que a medida que avanzó el proceso de maduración los monosacáridos fueron progresivamente transformados en ácido pirúvico para finalmente dar lugar a ácido láctico (Cogan y Daly, 1987). Estas primeras transformaciones en el proceso de maduración del queso contribuyen a su desarrollo aromático. Parte del ácido láctico formado puede reaccionar con radicales básicos presentes en el queso y dar lugar a las correspondientes sales. Los resultados obtenidos coinciden con los hallazgos de Piras *et al*. (2013), quienes observaron la rápida disminución del contenido

de hidratos de carbono en el inicio del proceso de maduración y su relación con el metabolismo de la lactosa (Garde *et al*., 2012) así como la ausencia de galactosa y glucosa en periodos avanzados de maduración de quesos similares, como el Zamorano (Castejón *et al*., 2008).

Con el progreso de la maduración se observó, en algunos casos la aparición y en otros el incremento de la intensidad, de las señales relacionadas con los aminoácidos (**Figura** IV.I.3.**3.8**), sin duda reflejo de la proteólisis acontecida. Este hecho tiene gran importancia en la formación de la textura y en el desarrollo de sabor y aroma del queso (Fox y Wallace, 1997; Piras *et al*., 2013) y está en consonancia con los hallazgos de diversos estudios. En este contexto, algunos aminoácidos, como el ácido glutámico, se han propuesto como índices de maduración del queso (Farkye y Fox, 1990). En la **Figura** IV.I.3.**3.9** se representa el valor de la integral (área) de las señales asignadas a los aminoácidos que presentaron mayores diferencias ($P < 0{,}0001$) durante los primeros 180 días desde la fabricación de los quesos (tirosina, triptófano, fenilalanina).

Las señales relacionadas con los ácidos orgánicos láctico, cítrico, fórmico y acético, así como con el ácido graso de cadena corta, butírico, mostraron diferencias significativas ($P < 0{,}05$) a lo largo del proceso de maduración de los quesos (**Tabla** IV.I.3.**3.3**). Como puede observarse en la **Figura** IV.I.3.**3.8**, la señal relacionada con el ácido láctico fue la más intensa de este grupo, siendo cuantitativamente el mayoritario, al igual que en otros tipos de quesos (Buffa *et al*., 2004; Tormo y Izco, 2004). Este metabolito contribuye a la calidad del queso, y juega un importante papel en el desarrollo integral de su sabor (Califano y Bevilacqua, 2000). Por otra parte, el ácido láctico también favorece la acción del cuajo en este tipo de quesos de coagulación realmente mixta (Núñez *et al*., 1992; Picón *et al*., 1994).

Como es sabido, la ruta del metabolismo de la lactosa en la fabricación del queso depende del tipo de bacterias lácticas presentes. Las bacterias lácticas homofermentativas (*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *lactobacillus* homofermentativos) convierten prácticamente toda la glucosa en ácido láctico (Piras *et al*., 2013; Mazzei y Piccolo, 2012). Inicialmente las bacterias ácido-lácticas mesófilas y termófilas metabolizan la lactosa a ácido L-láctico. La glucosa se metaboliza a L-láctico por la ruta glucolítica. Mientras que la galactosa se metaboliza por la vía tagatosa o por la ruta de Leloir a glucosa-1-fosfato, que después se metaboliza a D, L-lactato por vía glucolítica. Las bacterias lácticas heterofermentativas (*Leuconostoc* y ciertos *Lactobacillus*) fermentan la glucosa dando lugar a pequeñas cantidades de ácido láctico y etanol, acetato y CO_2.

El ácido cítrico, a diferencia de los demás ácidos orgánicos, mostró una caída progresiva de su concentración ($P < 0,05$) con el avance de la maduración (**Figura** IV.I.3.**3.8**; **Tabla** IV.I.3.**3.3**). Una tendencia similar ha sido descrita por diversos autores (Lombardi *et al*., 1994) en otros quesos como el *Reggianito*. De acuerdo con la afirmaciones de Hugenholtz (1993), la disminución progresiva del ácido cítrico durante el curso de la maduración podría estar relacionado con la presencia de cepas citrato-positivo como *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* subespecie *lactis* biovariedad *diacetylactis*), ciertas especies de *Leuconostoc* y/o otras "bacterias lácticas no estárter" (*non starter lactic acid bacteria*, NSLAB), como *Lactobacillus plantarum*. En conjunto, esta microbiota transforma el mencionado ácido en compuestos intermedios como piruvato y α-acetolactato y finalmente en diacetilo, CO_2, acetoina y 2,3-butilénglicol (Fox *et al*., 1990; Cogan, 1987; Cogan y Daly, 1987).

Las NSLAB son especialmente importantes en quesos de leche cruda y en quesos maduros (Fox y McSweeney, 1996) y a veces se encuentran en cultivos iniciadores artesanales. Esta microbiota tiene una importante repercusión en las características del producto final. En esta línea, el diacetilo, producido a partir del citrato contribuye al aroma y al sabor del queso. El metabolismo del citrato se relaciona también con la formación de ojos característicos y la aparición de texturas abiertas como consecuencia de la producción de CO_2 (Fox y McSweeney, 1996).

La presencia de ácido fórmico se incrementó hasta los primeros 30 días de maduración y se mantuvo más o menos constante a partir de entonces (**Figura** IV.I.3.**3.8**; **Tabla** IV.I.3.**3.3**). El aumento inicial de ácido fórmico se podría asociar con la presencia de *Streptococcus thermophilus*, que produce la formación de este ácido a partir de lactosa (Thomas *et al*., 1985) junto con ácido pirúvico y CO_2. Varios autores también han observaron una tendencia similar para el ácido fórmico en el comienzo de la maduración de distintos tipos de queso como *Reggianito* (Lombardi *et al*., 1994) y *Mozzarella* (Califano y Bevilacqua, 1999). La formación de este ácido orgánico se ha relacionado con la estimulación de la proliferación de *lactobacillus* en los sistemas lácticos (Driessen, 1984; Horiuchi y Sasaki, 2012; Suzuki *et al*., 1986; Galesloot *et al*., 1968).

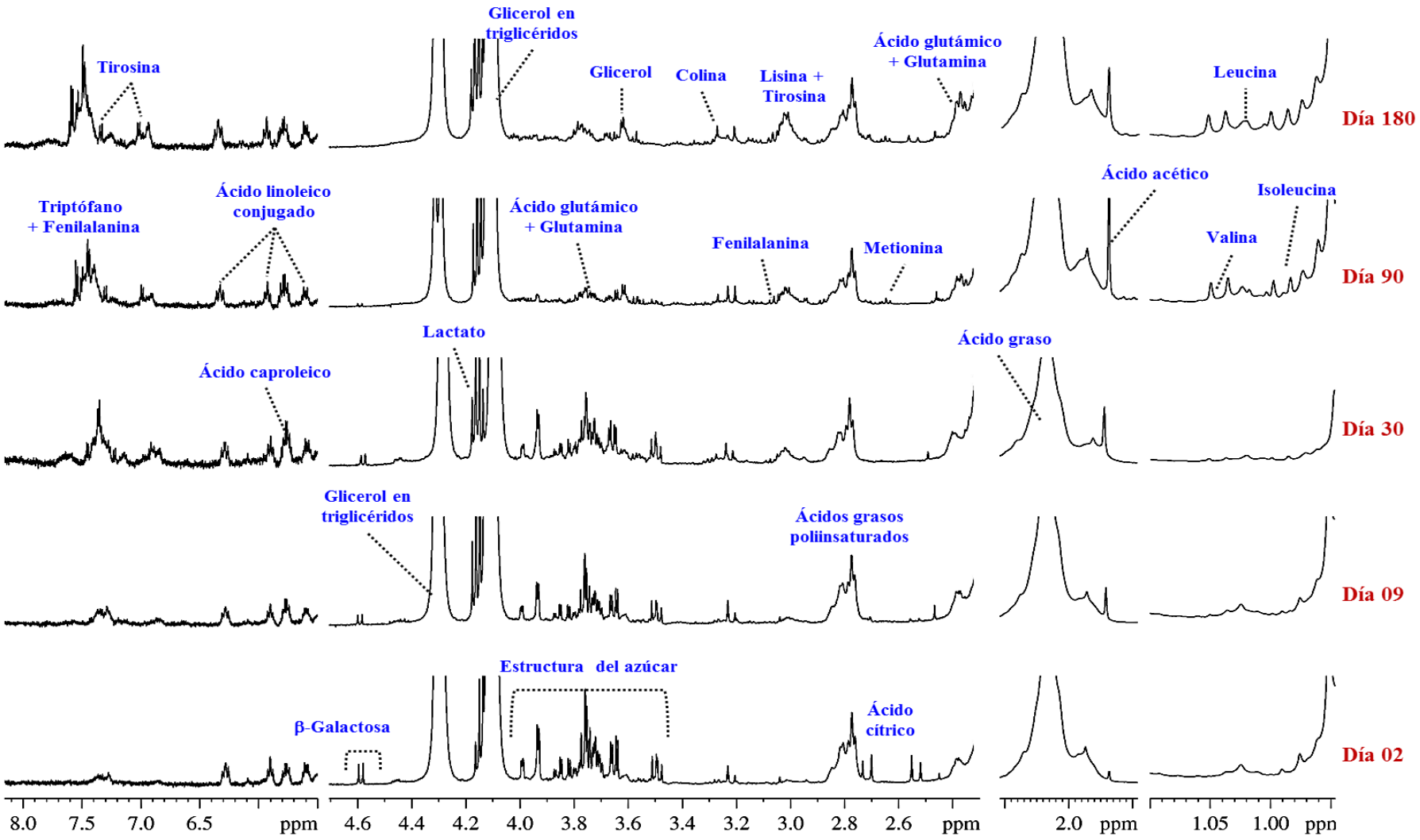


Figura IV.I.3.**3.8.** Evolución de los espectros de ^{1}H-RMN/HRMAS durante la maduración del queso Castellano (corresponde a queso de elaboración industrial)

El ácido acético se incrementó ($P < 0,05$) después de los primeros meses de maduración (30-90 días) y después se mantuvo más o menos constante (**Figuras** IV.I.3.**3.8** y **3.9**, **Tabla** IV.I.3.**3.3**). Este comportamiento es similar al descrito en diversos quesos por varios autores (Lues y Bekker 2002; St-Gelais *et al*., 1991; Marsili, 1985; McGregor y Blanco, 1990; Bouzas *et al*., 1991), quienes observaron un descenso inicial de este ácido seguido de un incremento gradual hasta los seis meses de maduración. Algunos autores (Upreti *et al*., 2006) han atribuido las variaciones del nivel de ácido acético a su carácter de intermediario en diversas rutas de degradación de la lactosa. Los lactococos (*Lactococcus lactis* sbsp. *lactis*, *Lc*. *lactis* subsp. *cremoris* y *Lc*. *raffinolactis*) constituyen la microbiota predominante al principio de la maduración en la mayoría de los quesos (Mundt, 1986). Como homofermentativos aseguran la transformación de la lactosa residual en ácido láctico, aunque algunas especies producen también pequeñas cantidades de compuestos secundarios, entre los que se encuentra el ácido acético y el etanol. Las NSLAB, como *leuconostoc* están presentes especialmente en quesos de leche cruda (Devoyod y Poullain, 1988). Estas bacterias heterofermentativas también producen etanol, diacetilo y acético. Este ácido, junto con el acetaldehido y diacetilo, se considera dentro de los compuestos responsables del sabor de los quesos y tiene un importante papel en la formación del aroma.

Por otra parte, el ácido butírico incremento ligeramente ($P < 0,05$) en la primera etapa de la maduración (primeros 30 días) y después se mantuvo o se redujo (**Figura** IV.I.3.**3.8**; **Tabla** IV.I.3.**3.3**). No obstante, la integración de esta señal se encuentra complicada por el hecho de que con un similar desplazamiento químico aparecen señales correspondientes a aminoácidos, como valina, isoleucina y leucina. Aunque la señal del ácido butírico es claramente mayoritaria, el incremento de los aminoácidos libres con el tiempo de maduración (Fox, 1989) dificulta la observación de la evolución del ácido graso. Este ácido graso de cadena corta contribuye directamente al aroma del queso (Najera *et al*., 2003; Macedo y Malcata, 1996). Su evolución durante la maduración se relaciona con la actividad lipolítica y proteolítica y se ha asociado a la microbiota secundaria predominante (Akalin *et al*., 2002). Se ha descrito que los ácidos acético, propiónico y butírico proceden tanto de la lipólisis de la grasa de la leche (Woo *et al*., 1984) como de la metabolización de hidratos de carbono y proteínas por las bacterias lácticas (Bills *et al*., 1969). Algunas bacterias ácido lácticas, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus*, presentan actividad lipásica y esterásica pequeña (Kamaly *et al*., 1990, Freitas *et al*., 1999; Katz *et al*., 2002). La esterasa pregástrica (EPG), presente en la pasta de cuajo sin purificar (Fox y Stepaniak, 1993)

presenta una gran especificidad sobre los ácidos grasos de cadena corta (especialmente el ácido butírico) esterificados en la posición sn-3. Esta lipasa del cuajo de ternera, cabrito y cordero se ha asociado con el desarrollo de matices sápidos picantes, que es una característica descrita en los quesos Castellanos de oveja (Fernández-García *et al*., 2004).

Tabla IV.I.3.**3.3.** Evolución de los ácidos orgánicos y del ácido butírico a lo largo de la maduración de quesos de oveja Castellanos de elaboración industrial (I-CL) o tradicional (T-CL).

δ (ppm)	Metabolitos	Tiempo de maduración (días)	Tipo de queso	
			I-CL	T-CL
8.42	**Fórmico**	2	$0{,}57x10^{-4} \pm 0{,}08x10^{-4}$ c, α	$0{,}11x10^{-4} \pm 0{,}01x10^{-4}$ e, β
		9	$0{,}51x10^{-4} \pm 0{,}01x10^{-4}$ c, α	$0{,}23x10^{-4} \pm 0{,}19x10^{-4}$ d, β
		30	$0{,}64x10^{-4} \pm 0{,}03x10^{-4}$ b, β	$0{,}74x10^{-4} \pm 0{,}11x10^{-4}$ a, α
		90	$0{,}78x10^{-4} \pm 0{,}07x10^{-4}$ a, α	$0{,}50x10^{-4} \pm 0{,}02x10^{-4}$ b, β
		180	$0{,}36x10^{-4} \pm 0{,}01x10^{-4}$ d, α	$0{,}39x10^{-4} \pm 0{,}02x10^{-4}$ c, α
2.71	**Cítrico**	2	$7{,}77x10^{-4} \pm 0{,}40x10^{-4}$ a, α	$4{,}17\ x10^{-4} \pm 0{,}39x10^{-4}$ e, β
		9	$8{,}48x10^{-4} \pm 0{,}30x10^{-4}$ a, α	$6{,}45x10^{-4} \pm 0{,}38x10^{-4}$ d, β
		30	$5{,}70x10^{-4} \pm 0{,}37x10^{-4}$ b, β	$7{,}26x10^{-4} \pm 0{,}19x10^{-4}$ c, α
		90	$5{,}81x10^{-4} \pm 0{,}57x10^{-4}$ b, β	$8{,}78x10^{-4} \pm 0{,}10x10^{-4}$ b, α
		180	$6{,}34x10^{-4} \pm 0{,}53x10^{-4}$ b, β	$9{,}10x10^{-4} \pm 0{,}24x10^{-4}$ a, α
1.93	**Acético**	2	$0{,}34x10^{-2} \pm 0{,}02x10^{-2}$ c, β	$0{,}61x10^{-2} \pm 0{,}02x10^{-2}$ c, α
		9	$0{,}39x10^{-2} \pm 0{,}01x10^{-2}$ b, β	$0{,}46x10^{-2} \pm 0{,}02x10^{-2}$ d, α
		30	$0{,}39x10^{-2} \pm 0{,}02x10^{-2}$ b, β	$0{,}93x10^{-2} \pm 0{,}01x10^{-2}$ b,α
		90	$0{,}48x10^{-2} \pm 0{,}02x10^{-2}$ a, β	$0{,}99x10^{-2} \pm 0{,}02x10^{-2}$ a, α
		180	$0{,}46x10^{-2} \pm 0{,}04x10^{-2}$ a, β	$0{,}99x10^{-2} \pm 0{,}01x10^{-2}$ a, α
1.34	**Láctico**	2	$2{,}47x10^{-1} \pm 0{,}01x10^{-1}$ a, α	$1{,}98x10^{-1} \pm 0{,}03x10^{-1}$ b, β
		9	$2{,}46x10^{-1} \pm 0{,}02x10^{-1}$ a, α	$2{,}36x10^{-1} \pm 0{,}02x10^{-1}$ a, β
		30	$2{,}43x10^{-1} \pm 0{,}02x10^{-1}$ b, α	$2{,}08x10^{-1} \pm 0{,}04x10^{-1}$ b, β
		90	$2{,}28x10^{-1} \pm 0{,}04x10^{-1}$ c, α	$1{,}96x10^{-1} \pm 0{,}04x10^{-1}$ bc, β
		180	$2{,}28x10^{-1} \pm 0{,}05x10^{-1}$ c, α	$1{,}94x10^{-1} \pm 0{,}01x10^{-1}$ c, β
0.94	**Butírico**/Isoleucina (señales parcialmente superpuestas)	2	$0{,}58x10^{-1} \pm 0{,}01x10^{-1}$ a, α	$0{,}40x10^{-1} \pm 0{,}02x10^{-1}$ c, β
		9	$0{,}58x10^{-1} \pm 0{,}02x10^{-1}$ a, α	$0{,}51x10^{-1} \pm 0{,}02x10^{-1}$ a, β
		30	$0{,}60x10^{-1} \pm 0{,}01x10^{-1}$ a, α	$0{,}46x10^{-1} \pm 0{,}02x10^{-1}$ b,b
		90	$0{,}55x10^{-1} \pm 0{,}03x10^{-1}$ b, α	$0{,}44x10^{-1} \pm 0{,}03x10^{-1}$ bc,β
		180	$0{,}55x10^{-1} \pm 0{,}01x10^{-1}$ b, α	$0{,}40x10^{-1} \pm 0{,}02x10^{-1}$ c, β

δ: desplazamiento químico (ppm). Intensidad de las señales (unidades arbitrarias) más significativas con el tiempo de maduración.

a, b, c, d, e: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tipo de queso y distintos tiempos de maduración con diferentes letras difieren significativamente (P< 0,05). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración.

α, β: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tiempo de maduración y distintos tipo de queso con diferentes letras difieren significativamente (P< 0,05). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso.

La presencia de etanol se incrementó en ambos tipos de quesos Castellanos (I-CL y T-CL) en los primeros días de elaboración (**Figuras** IV.I.3.**3.8** y **3.9**, **Tabla** IV.I.3.**3.3**) y después descendió progresivamente con el avance de la maduración. El incremento inicial de este alcohol se debería, como se ha mencionado anteriormente, a la fermentación de la

lactosa por bacterias heterofermentativas (Urdaneta *et al*., 1995; Muñoz *et al*., 2003; Marilley y Casey, 2004). Este metabolito tiene gran importancia en los quesos de oveja (Izco y Torre, 2000; Kondyli *et al*., 2002; Bintsis y Robinson, 2004; Carbonell *et al*., 2002) debido a su contribución directa al sabor y al aroma del queso o por la formación de ésteres con ácidos grasos (Fox *et al*., 1990; Cogan y Hill, 1993). El contenido de este alcohol, junto con otros metabolitos, se ha utilizado en modelos de predicción para estimar el tiempo de maduración (Buffa *et al*., 2004).

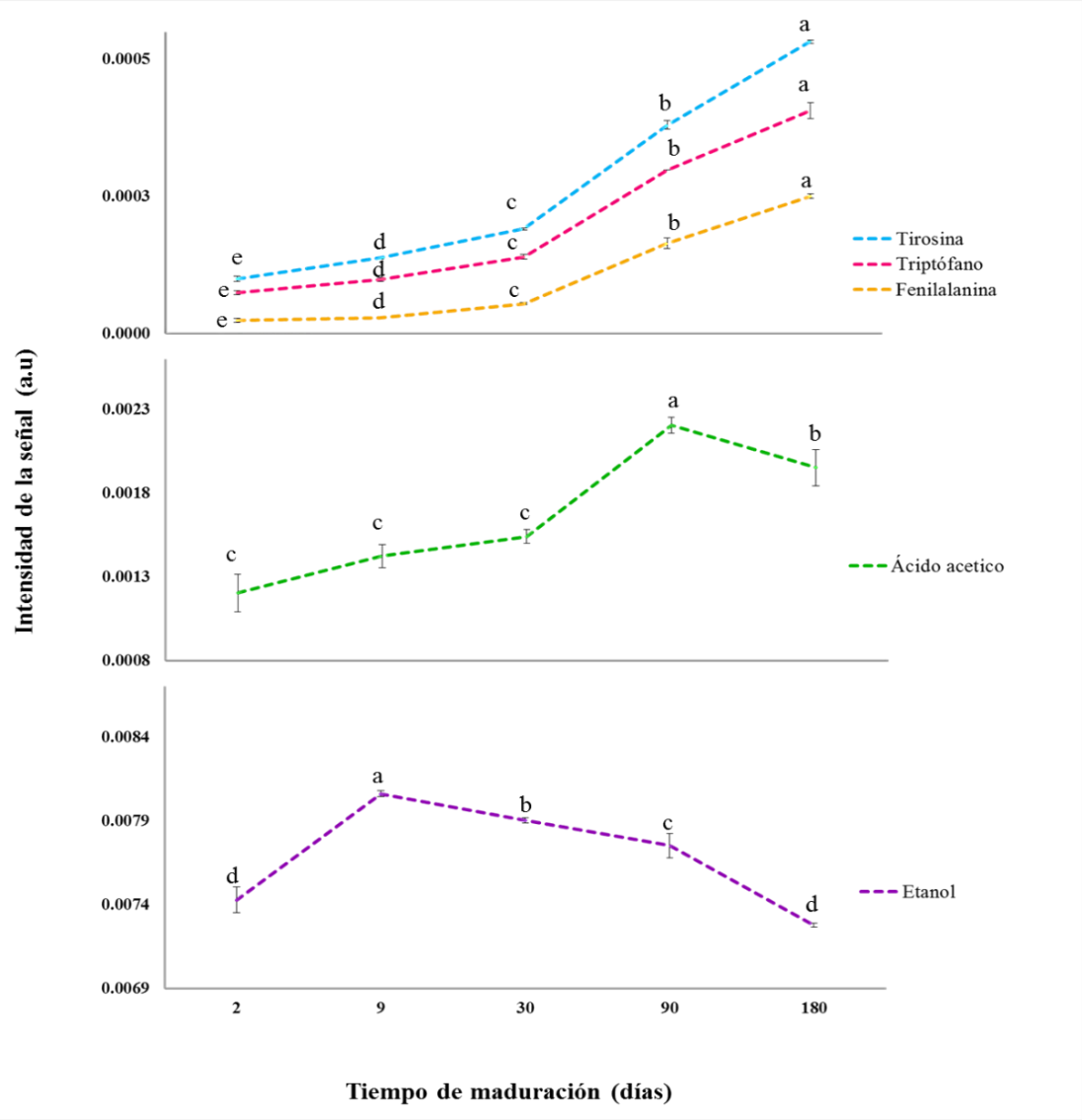


Figura IV.I.3.**3.9.** Evolución de los metabolitos que presentaron mayor variación ($P < 0{,}01$) durante la maduración del queso Castellano de elaboración industrial.

a.u: unidades arbitrarias de las regiones espectrales 6,89 ppm (tirosina); 7,20 ppm (triptófano); 7,42 ppm (fenilalanina); 1,90 ppm (ácido acético) y 1,17 (etanol).
a, b, c, d, e: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tipo de queso y distintos tiempos de maduración con diferentes letras difieren significativamente ($P < 0{,}05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración.

La señal asignada al ácido linoleico conjugado (CLA) no presentó diferencias significativas ($P > 0,05$) durante el tiempo de maduración del queso Castellano (I-CL y T-CL) (**Figura** IV.I.3.**3.10**). Estos resultados concuerdan con los mostrados por diversos autores (Luna *et al*., 2007) para tres tipos de quesos españoles con Denominación de Origen protegida (D.O.P., Mahón, Manchego y Cabrales) durante su maduración (2, 60, 120 y 180 días). Estos autores observaron que el contenido total de CLA varía de un tipo de queso a otro, pero el contenido de cada uno de ellos permanecía prácticamente constante durante su maduración (Luna *et al*., 2007).

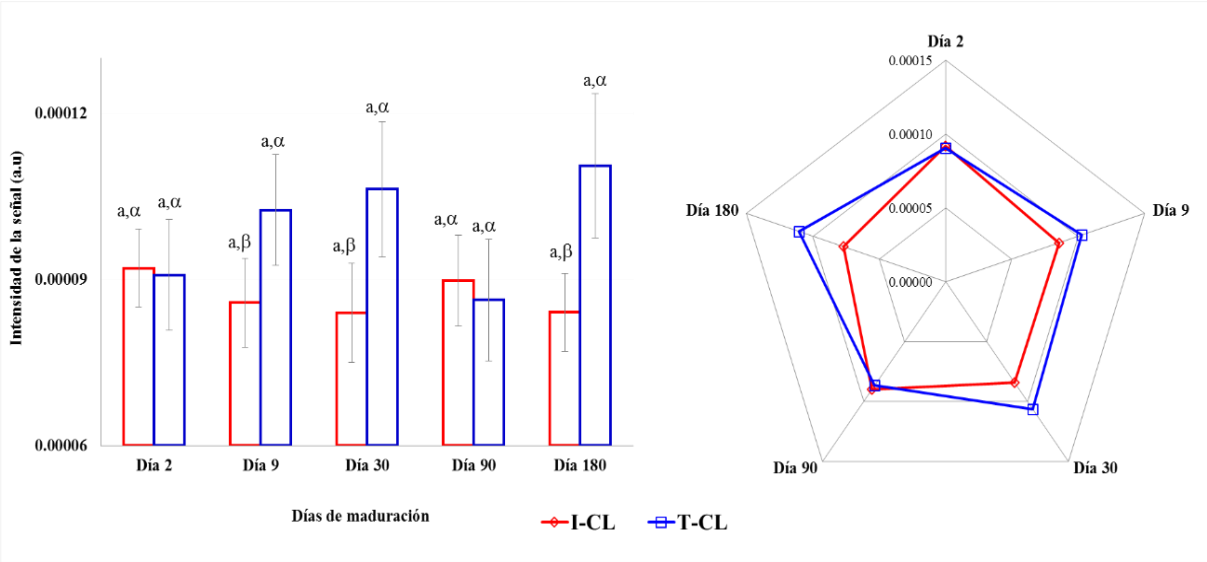


Figura IV.I.3.**3.10.** Evolución del ácido linoleico conjugado (CLA) durante la maduración de quesos Castellanos de elaboración industrial (I-CL) y tradicional (T-CL). Intensidad de la señal (unidades arbitrarias) de la región espectral 6,28 ppm.

a, b, c, d, e: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tipo de queso y distintos tiempos de maduración con diferentes letras difieren significativamente ($P< 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración.
α, β: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tiempo de maduración y distintos tipo de queso con diferentes letras difieren significativamente ($P< 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso.

El CLA se encuentra especialmente presente en productos derivados de rumiantes, como derivados lácteos. Su concentración en leche es mayor en la de oveja que en la de vaca (Banni y Martin, 1998; Prandini *et al*., 2007). Además de la especie, el contenido de CLA en leche está relacionado con la dieta y época del año (Nudda *et al*., 2005). En consecuencia, su presencia puede incrementarse mediante la intervención de la dieta, potenciando el pastoreo y el consumo de pastos o el uso de suplementos de ácidos grasos poliinsaturados (Luna *et al*., 2007; Stanton *et al*., 2003). Dada la especificidad de la presencia de CLA, la espectroscopía de RMN podría utilizarse como un método rápido para monitorización de su

contenido en distintos quesos para evaluar el origen de la materia prima utilizada en la fabricación (especie, raza, régimen de cría y la dieta de los animales).

El espectro de RMN (**Figura** IV.I.3.**3.8**), además del CLA permitió observar la evolución de los ácidos grasos (0,87 y 1,60 ppm, **Tabla** IV.I.3.**3.2**) y, de forma específica, los ácidos grasos insaturados cis y trans (2,05; 5,31 y 5,40 ppm), linoleico (2,85 ppm), linolenico (2,78 ppm) y caproleico (5,76 ppm) en los quesos Castellanos (I-CL y T-CL). Estos componentes no presentaron una tendencia clara durante el tiempo de maduración estudiado, de forma similar a los hallazgos de diversos estudios realizados en quesos elaborados con leche de oveja (Fernández-García *et al*., 2004; Scano *et al*., 2011). Como es sabido, en la mayoría de los tipos de queso (Manchego, *Gouda*, *Gruyére* o *Cheddar*), la lipólisis no es muy intensa y generalmente no supera el 2% de los triglicéridos. Sólo en los quesos madurados por mohos en la superficie, el grado de lipólisis puede alcanzar hasta un 10 % de los triglicéridos, y en quesos azules puede suponer hasta el 25 % de los ácidos grasos totales (Gripon, 1993; Bhowmik y Marth, 1990; Fox y Stepaniak, 1993). El ácido butírico, anteriormente comentado (**Figura** IV.I.3.**3.8**, **Tabla** IV.I.3.**3.3**), fue la única señal de ácido graso en la que se apreciaron modificaciones cuantitativas relacionadas con la maduración. Aunque sin cambios significativos (P > 0,05), la señal del ácido caproleico también mostró una tendencia de incremento de su intensidad en los periodos intermedios de maduración (**Figura** IV.I.3.**3.8**). Estos resultados se relacionan con el conocido posicionamiento de los ácidos grasos de cadena corta principalmente en la posición sn-3 de los triglicéridos (Parodi, 1979) así como la acción, incluso a bajas concentraciones, de la lipoprotein-lipasa nativa de la leche (Olivecrona y Bengtsson-Olivecrona, 1991).

IV.I.3.**3.3.5. Análisis comparativo del metaboloma de los quesos de oveja Castellano de fabricación industrial y tradicional**

Como se ha mencionado, los espectros de RMN de los quesos Castellanos de elaboración industrial (I-CL) y tradicional (T-CL) presentaron perfiles y variaciones metabólicas similares durante el tiempo de maduración. Sin embargo, se detectaron diferencias cuantitativas ($P < 0,05$) en ciertas regiones espectrales en función del método de fabricación. En concreto, las mayores variaciones se encontraron en las señales derivadas de los aminoácidos, ácidos orgánicos y etanol. Sin embargo, en otras señales, como las correspondientes al CLA (**Figura** IV.I.3.**3.10**), y en general a los distintos ácidos grasos, no se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre I-CL *versus* T-CL. Estos resultados

coinciden con los obtenidos por otras técnicas por varios autores (Luna *et al*., 2007) en relación con la permanencia del contenido de CLA en el proceso de elaboración y maduración de quesos. En consecuencia, las señales del CLA, por mantenerse constantes y aparecer en la región olefínica del espectro a un desplazamiento químico sin solapamientos, lo que facilita su integración, pueden utilizarse como señales de referencia para la cuantificación relativa de los metabolitos del espectro ^{1}H-RMN (Cruz-Díaz *et al*., 2014).

La **Figura** IV.I.3.**3.11** muestra los metabolitos que presentaron mayores variaciones de intensidad (P < 0,0001) en función del tipo de fabricación (T-CL *versus* I-CL). Como puede observarse la tirosina, la fenilalanina, el etanol y los ácidos glutámico y acético presentaron mayor concentración en el queso T-CL (perímetro externo) que en el I-CL. La forma de la superficie definida por los cambios cuantitativos de los mencionados metabolitos en ambos tipos de queso fue muy similar, indicando una evolución paralela durante la maduración. En general, las diferencias cuantitativas entre los dos tipos de queso surgieron a partir de los 9 días de fabricación, manteniéndose el nivel de diferenciación más o menos constante durante el periodo de estudio. La fenilalanina y tirosina son dos de los principales aminoácidos que participan en la formación de compuestos aromáticos asociados a las características sensoriales del queso (Irigoyen *et al*, 2007; Kênia *et* al., 2016) y, como se ha mencionado anteriormente, el ácido glutámico es de especial interés, ya que contribuye al sabor umami en el queso (Preininger *et al*., 1996; Drake *et al*., 2007; Andersen *et al*, 2010; Varming *et al*., 2013).

Por otra parte, el ácido acético y el etanol participan de igual forma en el desarrollo del sabor y aroma del queso (Bergamini *et al*., 2010). Estos resultados sugieren que el queso T-CL presenta atributos sápidos y aromáticos más intensos que el de elaboración industrial (I-CL). Diversos autores han evaluado la intensidad del olor (Gómez-Ruiz *et al*., 2002) y del sabor (Ballesteros *et al*., 2006) de quesos de elaboración industrial y tradicional. En general, las valoraciones sensoriales (olor, intensidad de sabor, persistencia de sabor, matices sápidos a leche de oveja, ácidos, picantes y amargos) fueron más altas (P < 0,05) en los quesos tradicionales que los industriales (Ballesteros *et al*., 2006; Gómez-Ruiz *et al*., 2002).

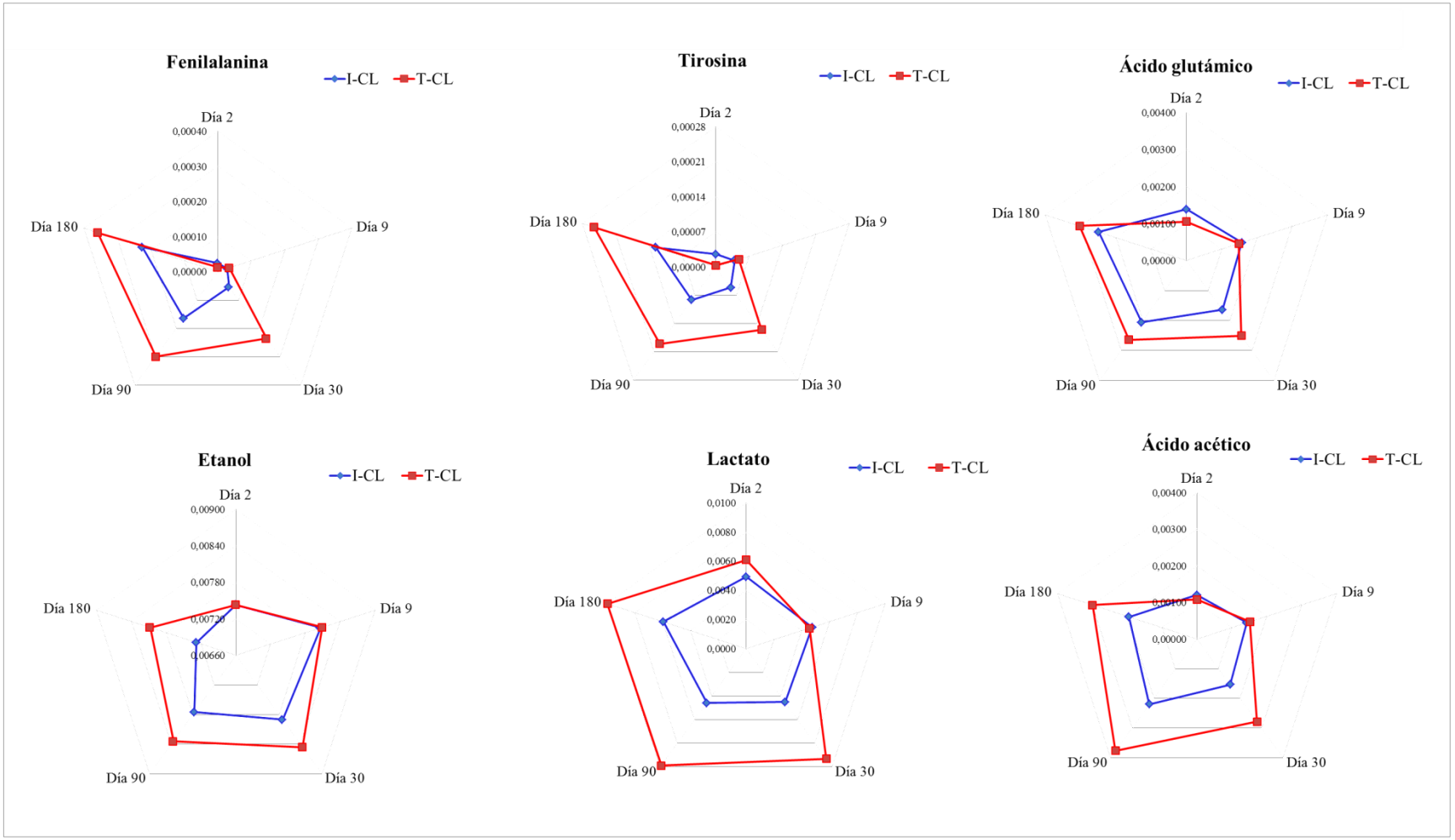


Figura IV.I.3.**3.11.** Principales diferencias entre queso de oveja Castellano de elaboración industrial (I-CL) y tradicional (T-CL) en distintos tiempos de maduración.

La producción artesanal o tradicional, frente a la fabricación a escala industrial, supone, en consonancia con las apreciaciones de otros autores (Carmona, 1994), la utilización de leche producida en explotaciones locales (con mucha menor variabilidad en relación a los pastos consumidos), la estacionalidad de la producción, el uso de cuajo natural y la disponibilidad de pequeñas instalaciones, con bajo o nulo nivel de automatización y control, así como el almacenamiento para la maduración en pequeños espacios. Todo ello facilitaría la permanencia de una microbiota autóctona o característica de cada instalación artesanal. Sin embargo, la elaboración industrial está orientada hacia el control de la microbiota nativa y conseguir una producción de queso de calidad más uniforme (Fox, 1993). Aunque los dos quesos Castellanos estudiados (I-CL y T-CL) se elaboraron con leche cruda, es habitual en la fabricación a escala industrial la aplicación de un tratamiento de termización (en torno a 68 ºC durante al menos 15 segundos) para minimizar el crecimiento de bacterias psicrótrofas durante el necesario almacenamiento de la leche (habitualmente a 4 ºC) hasta su utilización. Este tratamiento no suele realizarse en la producción en pequeñas instalaciones (T-CL) donde la leche se mantiene en refrigeración para proceder a la fabricación de queso dos o tres días a la semana. El efecto del tratamiento térmico, junto con las diferencias de la microbiota, podría explicar el distanciamiento de la fracción de aminoácidos libres de los quesos I-CL frente a los T-CL observada en los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS (**Figura** IV.I.3.**3.11**).

IV.I.3.**3.4. Conclusión**

Se han optimizado los parámetros de adquisición para la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Ángulo Mágico (^{1}H-RMN/HRMAS) de quesos de oveja de pasta prensada. Los mejores resultados se obtuvieron a una velocidad de giro de 6000 Hz y una temperatura de 25 ºC.

La ^{1}H-RMN/HRMAS permite obtener el perfil metabólico de la leche de oveja y del queso Castellano así como monitorizar los procesos de proteólisis, lipólisis y glucólisis acontecidos durante la maduración. Es posible identifica al menos 116 señales sobre los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS de estos quesos. Los principales cambios se presentan en las regiones espectrales asociadas a los aminoácidos, etanol y ácidos orgánicos.

Los quesos Castellanos de elaboración industrial y tradicional presentan perfiles y variaciones metabólicas similares durante el tiempo de maduración, aunque muestran

variaciones cuantitativas asociadas fundamentalmente al perfil de aminoácidos, etanol y ácidos orgánicos, con mayor concentración en los quesos de elaboración tradicional.

Los resultados obtenidos sugieren que la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS es una herramienta eficaz para monitorizar y caracterizar la maduración de quesos Castellanos elaborados con leche cruda de oveja. Esta metodología muestra un elevado potencial para la trazabilidad de este tipo de quesos, desde su proceso de elaboración, diferenciando quesos de fabricación tradicional e industrial, hasta su tiempo de comercialización.

IV.I.3.**3.5. Bibliografía**

Akalin, A.S., Gönc, S., and Akbaş, Y. (2002). Variation in Organic Acids Content during Ripening of Pickled White Cheese. *Journal of Dairy Science*, 85:1670-1676.

Andersen, L., Ardö, Y., and Bredie, W.LP. (2010). Study of taste-active compounds in the water-soluble extract of mature Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 20:528-536.

Argüelles, A., Castelló, M., Sanz, J., and Fito, P. (2007). Application of SAFES methodology in Manchego-type cheese manufacture. *Journal of Food Engineering*, 83:229-237.

Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Viñas, M.A., and Cabezas, L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17:249-255.

Banni, S, and Martin, J.C. (1998). Conjugated linoleic acid and metabolites. In: Sebedio J.L., and Christie, W.W (Eds).Trans fatty acids in human nutrition. (Ed): Oily Press, Somerset, England, pp 261-302.

Barcina, Y., Ibáñez, F.C., and Ordoñez, A.I. (1995). Evolution of free amino acids during Idiazábal cheese ripening. *Food Control*, 6:161-164.

Beckonert, O., Coen, M., Keun, H.C., Wang, Y., Ebbels, T., Holmes, E., Lindon, J., and Nicholson, J.K. (2010). High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols*, 5:1019.

Beckonert, O., Coen, M., Keun, H.C., wang, Y., Ebbels, T.M.D., Holmes, E., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (2010). High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols*, 5:1019-1032.

Bergamini, C.V., Wolf, I.V., Perotti, M.C., and Zalazar C.A. (2010). Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research*, 94:79-89.

Bhowmik, T., and Marth, E.H. (1990). Rote of Micrococcus and Pediococcus Species in Cheese Ripening: A Review. *Journal of Dairy Science*, 73:859-66.

Bills, D.D., Scanlan, R.A., Lindsay, R.C. and Sather, L. (1969). Free fatty acids and the Ravour of dairy products. *Journal of Dairy Science*, 52:134-1345.

Bintsis, T., and Robinson, R.K. (2004). A study of the adjunct cultures on the aroma compounds of feta-type cheese. *Food Chemistry*, 88(3):435-441.

Bisig, W., Eberhard, P., Collomb, M., and Rehberger, B. (2007). Influence of processing on the fatty acid composition and the content of conjugated linoleic acid in organic and conventional dairy products – A review. *Le Lait*, 87:1-19.

Boletín Oficial de Castilla y León (BOCyL) 2010, número 70. Orden AYG/473/2010, pp. 32379.

Bouzas, J., Kantt, C.A., Bodyfelt, F., and. Torres, J.A. (1991). Simultaneous determination of sugars and organic acids in Cheddar cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 56:276-278.

Buffa, M., Guamis, B., Saldo, J., and Trujillo, A. (2004). Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurised or highpressure-treated goats' milk. *LWT-Food Science and Technology*, 37:247-253.

Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S., and Palop, Ma.LL. (2007). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, 18:11-17.

Califano, A.N., and Bevilacqua, A.E. (1999). Freezing low moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. *Food Chemistry*, 64:193-198.

Califano, A.N., and Bevilacqua, A.E. (2000). Multivariate analysis of the organic acids content of Gouda type cheese during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13:949-960.

Carbonell, M., Núñez, M., and Fernandez-Garcia, E. (2002). Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Le Lait*, 82:683-698.

Carmona, X. (1994): "Recursos, organización y tecnología en el crecimiento de la industria española de conserva de pescado, 1900-1936", en J. NADAl Y J CATALÁN, La cara oculta de la industrialización española. La modernización de los sectores no líderes (siglos XIX y XX). (Ed): Alianza, Madrid-España, pp. 127-162.

Castejón, D., García-Segura, J.M., Escudero, R., and Herrera, A. (2005). María Isabel Cambero Metabolomics of meat e xudate: It's potential to evaluate beef meat conservation and aging. *Analytica Chimica Acta*, 901:1-11.

Castejón, D., García-Segura, J.M., Escudero, R., Herrera, A., and Cambero, M.I. (2015). Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging. Analytica Chimica Acta, 1-11.

Castejón, D., Villa, P., Calvo, M.M., Santa-Maria, G. Herraiz, M., and Herrara, A. (2010). ^{1}H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (Salmo salar). *Magnetic. Resonance in Chemistry*, 48:693-703.

Castejón, D., Villa, P., Miralles, B., Mengibar, M., and Herrera, A. (2008). Aplicación de la resonancia magnética nuclear de alta resolución con ángulo mágico (HRMAS) en el estudio de la maduración del queso. Alimentaria congresos, 1:68-69.

Cogan, T.M. (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc spp*.: effects on growth, substrates and products. *Journal of Applied Bacteriology*, 63:551-558.

Cogan, T.M., and Daly, C. (1987). Cheese starter cultures. In, Fox, P.E. (Ed). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, (Ed): Elsevier Applied Science, London, Uk, pp. 179-250.

Cogan, T.M., and Hill, C. (1993). Cheese starter cultures In: Fox P.F. (Ed). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, (Ed): Chapman and Hall, London, Uk, pp. 193-255.

Corzo, N., Villamiel, M., Arias, M., Jiménez-Pérez, S., and Morales, F.J. (2000). The Maillard reaction during the ripening of Manchego cheese. *Food Chemistry*, 71:255-258.

Cruz-Díaz, K., García-García, A-B., Escudero, R., Castejón, D., Romero de Ávila, M.D., and Cambero, M.I. (2014). .Use of ^{1}HRMAS-NMR for monitoring "Manchego cheese type" ripening. Kiel Food Science Symposium.

de Angelis-Curtis, S., Curini, R., Delfini, M., Brosio, E., D'Ascenzo, F., and Bocca, C. (2000). Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: a NMR study. *Food Chemistry*, 71:495-502.

Delgado-Goñi, T., Campo, S., Martín-Sitjar, J., Cabañas, M., San Segundo, B., and Arús, C. (2013). Assessment of a ^{1}H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy procedure for free sugars quantification in intact plant tissue. *Planta An International Journal of Plant Biology*, 238:397-413

Devoyod, J.J., and Poullain, F. (1988). The Leuconostocs. Characteristics: their role in dairy technology. *Le Lait*, 68:249-280.

Diana, M., Rafecas, M., Arco, C., and Quílez, J. (2014). Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35:94-100.

Drake, M.A. (2007). Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 90(11):4925-4937.

Driessen, F.M. (1984). Fermented Milks. IDF Bulletin No. 179, Inter. Dairy Federation, Bruselas, Belgica, p. 107.

Engelke, F. (1998). High Resolution Magic Angle Spinning Spectroscopy User Manual. Version 001. (Ed): Bruker Elektronik GMBH. Rheinstetten (Alemania).

Escriche., I. Fuentes., C. Gonzalez., C. and Chiralt, A. (2000). Development of Medium Volatility Compounds in Manchego-type Cheese as Affected by Salt Content and Salting Method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13:827-836

Farkye, N.Y., and Fox, P.F. (1990). Objective indices of cheese ripeing. *Journal of Food Science and Technology*, 1:37-40

Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., and Nuñez, M. (2004). Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. International Dairy Journal, 14:39-46.

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

Fox, P.F. (1989). Accelerated cheese ripening. *Food Biotechnology*, 1:133.

Fox, P.F., and McSweeney, P.LH. (1996). Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *International Dairy Journal*, 6:1117-1134.

Fox, P.F., and Stepaniak, L. (1993). Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal*, 3:509-530.

Fox, P.F., and Wallace, J.M. (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45:17-85.

Fox, P.F., Guinee, T.M., Cogan, T.M. and McSweeney, P.L.H. (2000). Biochemistry of Cheese Ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., and Guinee, T.P. (Eds). Fundamentals of Cheese Science. (Ed): Aspen Publishers, Springer-Verlag USA, pp. 20-587.

Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H., and Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In Fox P.F (Ed.). Cheese: chemistry, physics and microbiology, general aspects 2nd. (Ed): London: Chapman & Hall, pp. 415-417.

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

Fox, P.F., O'Connor, T., Mcsweeney, P., Guinee, T. and O' brien, Y. (1996). Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. In: Advances in Food and Nutrition Research. Vol 39. (Ed): Elsevier, London, Uk, pp 163-328.

Freitas, A.C., Macedo, A.C. and Malcata, EX. (1999). Review: Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International*, 6:351-370.

Galesloot, T.H.E., Hassing, F., and Veringa, H.A. (1968). Symbiosis in yoghurt. I. Stimulation of Lactobacillus bulgaricus by a factor produced by Streptococcus thermophilus. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 22:50-63.

Garde, S, Gaya, P., Arias, R., and Nuñes, M. (2012). Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of Clostridium spp. isolated from Manchego cheeses with late blowing defect. *Food Control*, 28:392-399.

Gaya, P., Fernández-García, E., Medina, M., and Nuñez, M. (2003). Seasonal variation in microbiological, chemical, textural and sensory characteristics during ripening of rawew es' milk Castellano cheese. *Milchwissenschaft*, 58:376-379.

Gómez-Ruiz, J.A., Ballesteros, C., González Viñas, M.A., Cabezas, L., and Martínez-Castrom, I. (2002). Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Le Lait*, 82:613-628.

Gómez-Torres, N., Garde, S., Peirotén, A., and Ávila, M. (2015). Impact of Clostridium spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control*, 56:186-194.

González de Llano, D., A. Rodrı´guez, and Cuesta. P. (1996). Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening-analysis by HPLC. *Journal of Applied Biotechnology*, 80:570-576.

González de Llano, D., Polo, C., Ramos, M., and Martín-Alvarez, P. (1991). Free and total amino acids in the non-protein fraction of an artisanal blue cheese during ripening. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 193:529.

González De Llano, D., Polo, M.C., and Ramos, M. (1995) .Study of Proteolysis in Artisanal Cheeses: High Performance Liquid Chromatography of Peptides. *Journal of Dairy Science*, 78:1018-1024.

Gripon, J.C. (1993). Mould-ripend cheese in: Fox P.F. (Ed). Cheese Chemistry, Physics and Micobiology. Vol. 2. (Ed): Chapman and Hall. London, Uk, pp.111-136.

Harbutt, J. (2009). World Cheese Book. (Ed): Dorling Ki ndersley Ltd, London, Uk, pp. 146-152

Hayaloglu, A.A., Tolu, C., Yasar, K., and Sahingil, D. (2013). Volatiles and sensory evaluation of goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen) and starter culture systems during ripening. *Journal of Dairy Science*, 96:2765-2780.

Horiuchi, H., and Sasaki, Y. (2012). Short communication: Effect of oxygen on symbiosis between Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophiles. *Journal of Dairy Science*, 95:2904-290.

Hu, F., Furihata, K., Ito-Ishida, M., Kaminogawa, S., and Tanokura, M. (2004). Nondestructive Observation of Bovine Milk by NMR Spectroscopy: Analysis of Existing States of Compounds and Detection of New Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:4969-4974.

Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Re*views, 12:165-178.

Irigoyen, A., Ortigosa, M., Juansaras, I., Oneca, M., and Torre, P. (2007). Influence of an adjunct culture of Lactobacillus on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewe's-milk cheese. *Food Chemistry*, 100:71-80.

Izco, J., and Torre, P. (2000). Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the `purge and trap' method and analysed by GC-MS. *Food Chemistry*, 70: 409-417.

Izco, J.M., Torre, P., and Barcina. Y. (2000). Ripening of Ossau-Iraty cheese: determination of free amino acids by RP-HPLC and of total free amino acids by the TNBS method. *Food Control*, 11:7-11.

Kalyankar, S.D., Sarode, A.R., Khedkar, C.D., Deosarkar, S.S., and Pawshe, R.D. (2016). Sheep: Milk. Encyclopedia of Food and Health, pp.758-763.

Kamaly, KM, Takayama, K., Marth, EH. (1990). Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of Streptococcus lactis, Streptococcus cremoris and their mutants. *Journal of Dairy Science*, 73:280-290.

Katz, M., Medina, R., Gonzalez, S. and Olivier, G. (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *Journal of Food Protection*, 65:1997-2001.

Kênia, T., Bezerra A., Ribeiro de Araujo, A., Santos do Nascimento, E., de Matos, J., Gadelha, C., Gadelha, T., Bertoldo, M., de Cássia,R., Gomes, M., and Madruga, S. (2016). Proteolysis in goat ''coalho" cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 196:359-366.

Kondyli, E., Katsiari, M.C., Massouras, T., Voutsinas, L.P. (2002).Free fatty acids and volatile compound of low-fat Feta-type cheese made with a commercial adjunct culture, *Food Chemistry*, 79:199-205.

Lião, L.M., Choze, R., Santos, S.C., Ferri, P.H., and Ferreira, A. G. (2010). Perfil químico de cultivares de feijão (Phaseolus vulgaris) pela técnica de high resolution magic angle spinning (HR-MAS). Química Nova, 33:634-638.

Lombardi, A.M., Bevilacqua, A.E., and Califano, A. (1994). Variation in organic acids content during ripening of Reggianito cheese in air-tight sealed bags. *Food Chemistry*, 51:221-226.

Lues, J. F. R., and A. Bekker. C. M. 2002. Mathematical expressions for organic acids in early ripening of a Cheddar cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15:11-17.

Luna, P., Juárez, M., and de la Fuente, M.A. (2007).Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheeses protected with designation of origin. *Food Chemistry*, 10:1465-1472.

Macedo, A.C., and Malcata, F.X. (1996). Changes in the major free fatty acids in Serra cheese throughout ripening. *International Dairy Journal*, 6:1087-1097.

Mannina, L., Sobolev, A.P., and Viel, S. (2012). Liquid state ^{1}H high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 66:1-39.

Marilley, L., and Casey, M.G. (2004). Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producingstrains. *International Journal of Food Microbiology*, 90:139-159.

Marsili, R.T. (1985). Monitoring chemical changes in Cheddar cheese during aging by high-performance liquid chromatography and gas chromatography techniques. *Journal of Dairy Science*, 68:3155-3161.

Martínez, S., Franco, I., Carballo, J. (2011). Spanish goat and sheep milk cheeses. *Small Ruminant Research*, 101:41-54.

Mazzei, P., and Piccolo, A. (2012). ^{1}H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*, 132:1620-1627.

McGregor, J.U., and White, C.H. (1990). Effect of enzyme treatment and ultrafiltration on the quality of low fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 73:571-578.

Mucci, A., Parenti, F., Righi, V., and Schenetti, L. (2013). Citron and lemon under the lens of HR-MAS NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 141:3167-3176.

Mundt, J.O. (1986). Lactic acid Streptococci. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and. Holt, J.G. (Eds). Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Vol. II. (Ed): Williams and Wilkins, Baltimore, USA, pp: 1065-1066.

Muñoz N., Ortigosa M., Torre P., and Izco J.M. (2003). Free amino acids and volatile compounds in an ewe's milk cheese as affected by seasonal and cheese making plant variations. *Food Chemistry*, 83:329-338.

Najera, A.I., de Renobales, M., and Barron, L.J.R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl2 and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: A multifactorial study. *Food Chemistry*, 80:345-352.

Nudda A, McGuire MA, Battacone G, and Pulina G. (2005). Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta. *Journal of Dairy Science*, 88:1311-1319

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

Nuñez, M., Medina, M., Gaya, P., Guillen, A.M., and Rodríguez-Marín, M.A. (1992). Effect of recombinant chymosin on ewes' milk coagulation and Manchego cheese characteristics. *Journal of Dairy Research*, 59:81-87.

Olivecrona, T. and Bengtsson-Olivecrona, G. (1991). Indigenous enzymes in milk, Lipases, In: Fox, P.F. (Ed). Food Enzymology, Vol. 1. (Ed): Elsevier Applied Science, London, Uk, pp.339-367.

Ordóñez, J.A. and Burgos, J. (1977). Étude de la variété de fromage Ulloa. III. Acides amines liberés pendant la maduration. *Le Lait*, 567:416.

Parodi, P.W. (1979). Stereospecific distribution of fatty acids in bovine milkfat triglycerides. *Journal of Dairy Research*, 46:75-81.

Picón, A., Gaya, P., Medina, M. and Nuñez, M. (1994). The effect of liposome encapsulation of chymosin derived by fermentation on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 77:16-23.

Piras, C., Cesare Marincola, F., Savorani, F., Engelsen, S.B., Cosentino, S., Viale., S., Pisano, M.B. (2013). A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chemistry*, 141:2137-2147.

Polo, C., Ramos, M., and Sánchez, R. (1985) Free amino acids by High Performance Liquid Chromatography and peptides by gel electrophoresis in Mah on cheese during ripening. *Food Chemistry*, 16:85.

Populin, T., Moret, S., Truant, S., and Conte, L.S., (2007). A survey on the presence of free glutamic acid in foodstuffs, with and without added monosodium glutamate. *Food Chemistry*, 104:1712-1717

Prandini A, Sigolo S, Tansini G, Brogna N, Piva G. (2007). Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:472-479.

Preininger, M., Warmke, R. and Grosch, W. (1996). Identification of the character impact flavour compounds of Swiss cheese by sensory studies of models. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 202:30-34.

Raynal-Ljutovaca, K., Lagriffoulb, G., Paccardb, P., Guilleta, I., and Chilliardc Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79:57-72.

Rijnen, L., Delacroix-Buchet, A., Demaiziéres, D., Le Quére, J.L., Gripon, J.C., and Yvon, M. (1999). Inactivation of lactococcal aromatic aminotransferase prevents the formation of oral aroma compounds from aromatic amino acids in semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 9:877-885.

Ritota, M., Casciani, L., Failla, S., and Valentini, M. (2012). HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterization. *Meat Science*, 92:754-761.

Ritota, M., Marini, F., Sequi, P., and Valentini, M. (2010). Metabolomic characterization of Italian sweet pepper (Capsicum annum L.) bymeans of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:9675-9684.

Rodrigues, D., Santos, C.H., Rocha-Santos, T., Gomes, A., Brian, A.M., Goodfellow, B.J., and Freitas, A. (2011). Metabolic Profiling of Potential Probiotic or Synbiotic Cheeses by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:4955-496.

Rukke, E.O., Sorhaug, T., and Stepaniak, L. (2011). Heat treatment of milk: Thermization of milk. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. (Eds.). Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd. (Ed): Elsevier, London, Uk, pp. 693-698.

Ruyssen, T., Janssens, M., Van Gasse, B., Van Laere, D., Van der Eecken, N., De Meerleer, M., Vermeiren, L., Van Hoorde, K., Martins, J.C., Uyttendaele, M., and De Vuyst, L. (2013). Characterisation of Gouda cheeses based on sensory, analytical and high-field ^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy determinations: Effect of adjunct cultures and brine composition on sodium-reduced Gouda cheese. *International Dairy Journal*, 33:142-152.

Sánchez-Pérez, E.M., García-López, J., Iglesias, M.J., López-Ortiz, F., Toresano, F., and Camacho, F. (2011). HRMAS-nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of tomato "flavor varieties" from Almeria (Spain). *Food Research International*, 44:3212-3221

Scano, P., Anedda, R., Melis, M. P., Dessi', M. A., Lai, A., and Roggio, T. (2011). ^{1}H- and ^{13}C-NMR Characterization of the Molecular Components of the Lipid Fraction of Pecorino Sardo Cheese. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88:1305-1316.

Shintu, L., Ziarelli, F., and Caldarelli, S. (2004). Is high resolution magic angles spinning (NMR) a practical speciation for cheese samples? Parmiggiano Reggiano as a case study. *Magnetic Resonance in Chemistry and Biology*, 42:396-401.

Stanton, C., Murphy, J., McGrath, E., ana Devery, R. (2003). Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. In Sébédio, J.L., Christie, W.W., and Adlof, R. (Eds.). Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Vol. 2. (Ed): The American Oil Chemists Societ, Oslo, Norway, pp. 23-143.

St-Gelais, D., Doyon, G., Rolland, J.R., and Goulet, J. (1991). Sugar and organic acid concentrations during ripening of Cheddar cheese-like products. *Milchwissenschaft*, 46:288-29.

Sundekilde, U.K, Lotte B., Larsen, L.B., and Bertram, H.C. (2013). NMR-Based Milk Metabolomics. A review. *Metabolites*, 3:204-222.

Suzuki, I., Kato, S., Kitada, T., Yano, N., and Morichi, T. (1986). Growth of Lactobacillus bulgaricus in milk. 1. Cell elongation and the role of formic acid in boiled milk. *Journal of Dairy Science*, 69:311-320.

Thomas, T.D., McKay, L.L., and Morris, H.A. (1985). Lactate metabolism by pediococci isolated from cheese. *Applied and environmental*, 49:908-913.

Tormo, M., and Izco, J. (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A*, 1033:305-10.

Upreti, P., McKay, L.L., and Metzger, L.E. (2006) .Influence of Calcium and Phosphorus, Lactose, and Salt-to-Moisture Ratio on Cheddar Cheese Quality: Changes in Residual Sugars and Water-Soluble Organic Acids During Ripening. *American Dairy Science Association*, 89:429-443

Urdaneta, D., Raffe, D., Ferrer, A., Sulbaran de Ferrer, B., Cabrera, L., and Perez, M. (1995). Short-chain organic acids produced on glucose, lactose, and citrate media by Enterococcus faecalis, Lactobacillus casei, and Enterobacter aerogenes strains. *Bioresource Technology*, 54:99-103

Varming, C., Andersen, L.T., Petersen, M.A., and Ardö, Y. (2013). Flavour compounds and sensory characteristics of cheese powders made from matured cheeses. *International Dairy Journal*, 30:19-28.

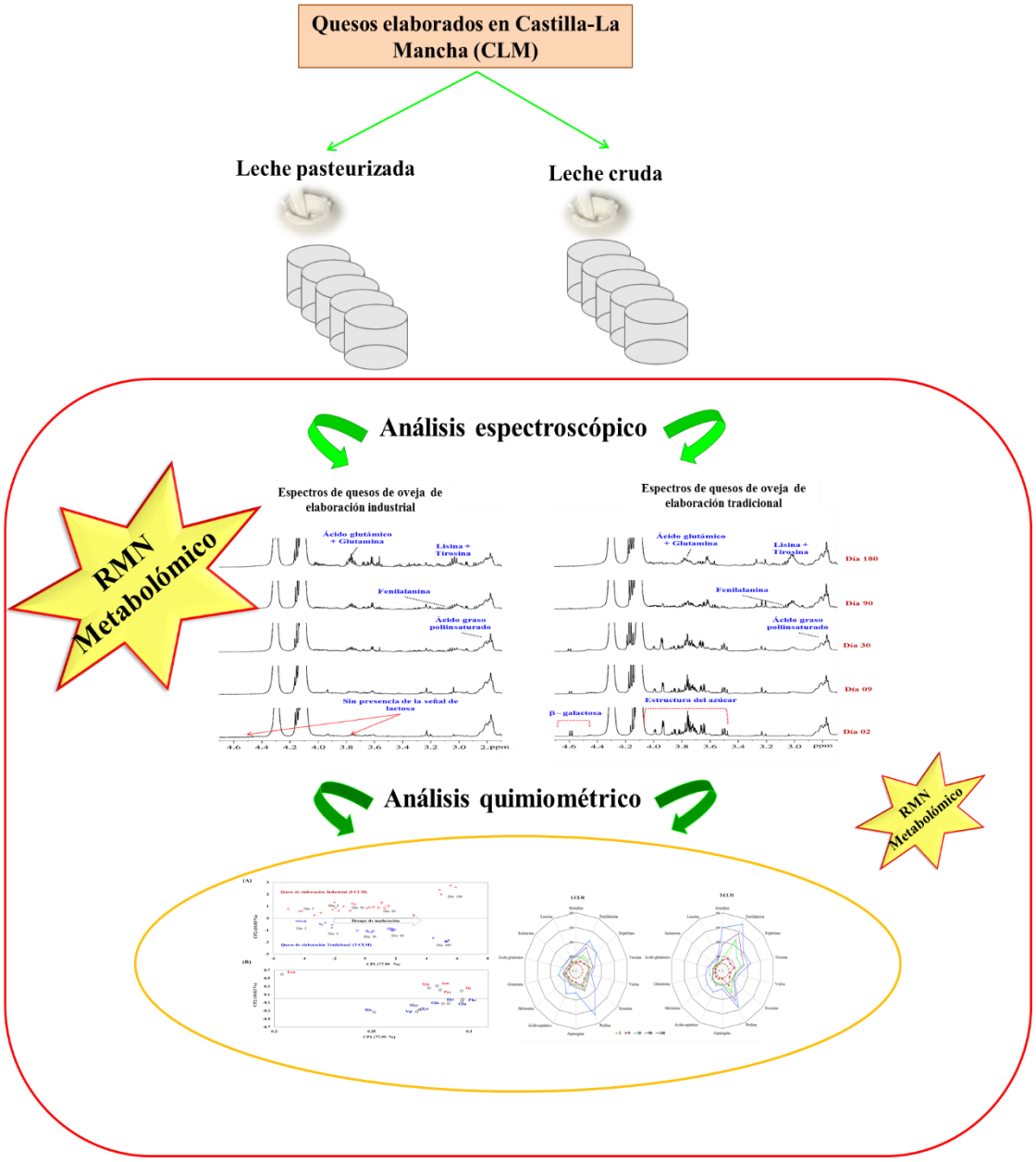
Woo, A.H., Kollodge, S., and Lindsay, R.C. (1984) Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 67:874-878.

Yvon, M., and Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11:185-201.

TRABAJO 4

ESTUDIO METABOLÓMICO MEDIANTE ^{1}H-RMN/HRMAS EN QUESOS DE OVEJA DE PASTA PRENSADA ELABORADOS EN CASTILLA-LA MANCHA

Resumen gráfico



Resumen

En este trabajo se han estudiado los cambios de la composición del queso de oveja producidos en Castilla-La Mancha (CLM) durante el proceso de maduración, elaborados de forman artesanal (con leche cruda) e industrial (con leche pasteurizada) de Denominación de Origen Manchego, empleando la espectroscopia de ^{1}H-RMN/HRMAS. El objetivo principal fue determinar el potencial de esta metodología para el estudio metabólomico de este tipo de quesos. El análisis de las muestras se realizaron en un espectrómetro Bruker AMX500 11,7 T (500,13 MHz) con una sonda de HRMAS siguiendo el protocolo desarrollado en el Trabajo 3. Mediante el estudio de los espectros se pudo seguir el proceso de glucólisis, proteólisis y lipólisis. El análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando los principales metabolitos identificados permitió clasificar los quesos de CLM por tipo de elaboración y tiempo de maduración. Se concluye que la metabolómica mediante RMN es una herramienta eficaz y rápida que permite la monitorización del proceso de maduración y distinguir el método de fabricación utilizado.

IV.I.3. **TRABAJO 4. Estudio Metabolómico Mediante ^{1}H-RMN/HRMAS de quesos de oveja elaborados en Castilla-La Mancha**

IV.I.3.**4.1. Introducción**

El término metabolómica fue inicialmente definido como la "medición cuantitativa de la respuesta metabólica y dinámica de los sistemas vivos a los estímulos o modificación genéticas" (Nicholson *et al.* 1999). El análisis metabolómico se ocupa del estudio del conjunto de metabolitos presentes en un medio biológico, lo que le convierte en una herramienta fundamental en diferentes campos, incluido la ciencia y tecnología de los alimentos (Schmidt, 2004; García-Cañas *et al*., 2012). Los datos metabólicos son obtenidos principalmente a través de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía de masas (EM) (Lindon *et al*., 2006). El fundamento de ambas técnicas se basa en las propiedades físicas de los compuestos, que no se ven influidas por factores externos y son, por lo tanto, reproducibles (Dunn *et al*., 2005). La EM tiene mayor sensibilidad que la RMN, pero generalmente requiere un paso previo de separación de los metabolitos, por lo que suele utilizarse acoplada a la cromatografía de gases o la cromatografía líquida. Otras técnicas también se han utilizado en estudios metabolómicos, como la electroforesis capilar o la espectroscopía de infrarrojos (Nicholson y Lindon 2008). En general estas técnicas requieren una extensa preparación de la muestra y son dirigidas a un grupo de compuestos. Sin embargo, la espectroscopía de RMN, frente a estas técnicas, presenta la gran ventaja de requerir una mínima preparación de las muestras, ser altamente reproducible, no destructiva y no selectiva, y permitir el análisis directo de muestras semisólidas mediante la sonda de HRMAS.

La RMN, junto a herramientas quimiométricas, recoge datos cuantitativos de los metabolitos presentes en las muestras con el fin de encontrar variaciones que puedan ser usadas como patrones discriminantes (Oliver *et al*., 1998; Piras *et al*., 2013). Esta técnica representa una herramienta fundamental para obtener la huella dactilar metabólica del alimento, y monitorizar las modificaciones de los perfiles metabolómicos ligados a las condiciones de elaboración y de almacenamiento (Consonni y Cagliani, 2008; Savorani *et al*., 2010; Cifuentes, 2009). Además, permite evaluar de una forma rápida aspectos esenciales en los alimentos, como el control del proceso de producción, la calidad, la seguridad, la trazabilidad, y el estado nutricional (Wishard, 2008; Cevallos-Cevallos *et al*.,

2009, Savorani *et al*., 2010; Locci *et al*., 2011; Mannina *et al*., 2012; Van den Berg *et al*., 2013).

La RMN se ha empleado en el estudio de ciertos quesos de considerable interés económico como *Fiore Sardo* (Piras *et al*., 2013), *Mozzarella* (Brescia *et al*., 2005; Gianferri *et al*., 2007; Mazzei y Piccolo, 2012), *Emmental* (Shintu y Caldarelli, 2006), *Parmesano Reggiano* (Shintu *et al*., 2005), pasta blanda (Lamanna *et al.*, 2008), *Danbo* (Lamichhane *et al*., 2014) y probióticos (Rodrigues *et al*., 2011). En el caso del queso manchego, sólo se ha encontrado un trabajo (Moreno *et al*., 2011) en el que se estudió el proceso de lipólisis y proteólisis en productos comerciales (3, 6 y 9 meses) mediante espectroscopia de RMN, tras la obtención de distintas fracciones de las muestras y sin incluir un análisis quimiométrico.

La producción de quesos de oveja en Castilla-La Mancha tiene gran importancia económica en España, por su elevada aceptación debida a las características sensoriales desarrolladas durante su maduración (Argüelles *et al*., 2007), siendo el queso Manchego de D.O. uno de los quesos españoles de mayor difusión internacional (Jiménez, 2016). En el presente trabajo, se ha realizado un análisis metabolómico mediante espectroscopia de RMN utilizando una sonda de HRMAS de quesos de leche de oveja de pasta prensada elaborados en Castilla-La Mancha. El estudio incluye quesos producidos de forma artesanal (T-CLM) e industrial (I-CLM). Esta metodología ha permitido el análisis directo de las muestras, sin ningún tipo de manipulación previa. El estudio se realizó a los largo del proceso de maduración, desde los 2 días tras la fabricación hasta los 180 días, en el afán de analizar los procesos de proteólisis, glucólisis y lipólisis. Se considera, que el estudio realizado es novedoso e innovador tanto por la metodología de análisis empleada (1H-RMN/HRMAS) como por la matriz analizada (quesos de Castilla-La Mancha).

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) monitorizar el proceso de maduración de quesos elaborados en Castilla-La Mancha de producción artesanal (T-CLM) e industrial (I-CLM) mediante la espectroscopia de ^{1}H-RMN/HRMAS; ii) evaluar el efecto del método de producción sobre el perfil metabolómico; y iii) clasificar los quesos en función del tiempo de maduración y/o del método de elaboración.

IV.I.3.**4.2. Material y Métodos**

IV.I.3.**4.2.1. Selección de las muestras**

Se analizaron quesos de oveja de elaboración industrial (I), con leche pasteurizada, siguiendo el procedimiento descrito en la Denominación de Origen Manchego y tradicional (T), con leche cruda, procedentes de explotaciones ubicadas en Castilla-La Mancha (CLM). Las características de los quesos estudiados, así como los tiempos de maduración (2, 9, 30, 90 y 180 días) a los que se realizó el estudio de RMN fueron los descritos en el **Punto** III.**3.1**. En cada tiempo de análisis se utilizaron cinco quesos de cada tipo [2 procesos de elaboración (I-CLM y T-CLM) x 5 tiempos x 5 quesos = 50]. En cada uno de ellos, y sin considerar la zona de la corteza (1 cm de la capa externa) y de la central (1 cm), se tomó una muestra utilizando una aguja para biopsia (Biopsy punch, Stiefel, de 3 mm de diámetro). Cada análisis se realizó por triplicado.

IV.I.3.**4.2.2. Análisis de ^{1}H-RMN/HRMAS**

Como se describió en el **Trabajo 3** (**Apartado** IV.I.3.**3.2.2)** todas las muestras fueron analizadas en un espectrómetro Bruker AMX500 (BrukerGmBH, Ettlingen, Alemania) que opera a 11,7 Teslas (frecuencia de resonancia del ^{1}H, 500,13MHz) equipado con una sonda de HRMAS siguiendo el protocolo optimizado en el **Trabajo 3**.

IV.I.3.**4.2.3. Análisis estadístico**

Un total de 50 1D espectros se utilizaron para llevar a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP), utilizando el software de AMIX (versión 3.9.11, Bruker BioSpin) para establecer diferencias en el metabóloma dependiendo del tipo de queso y tiempo de maduración. Como se describe en el **Punto** III.**5** del capítulo de Material y Métodos, antes de realizar este análisis, en cada espectro individual, se redujeron los datos a procesar dividiéndolo de forma arbitraría para establecer regiones espectrales (*buckets*) de ancho variable (9,00 - 0,70 ppm) para dar cuenta de las variaciones de desplazamiento químico debidas a trabajar con muestras de queso sin tamponar. Las regiones con artefactos espectrales, incluida la región del agua, fueron excluidas de las regiones espectrales (*bucketing*). Un total de 83 *buckets* fueron definidos e integrados. Finalmente se normalizaron considerando la suma de todas las integrales del espectro íntegro.

Para establecer diferencias en el metabóloma del queso manchego en función del tipo de elaboración y del tiempo de maduración se utilizaron un total de 50 espectros ^{1}H-

RMN. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando el programa de procesado de datos espectrales AMIX (versión 3.9.11, Bruker BioSpin, Alemania). Como se describe en el **Apartado III.5** de Materiales y Métodos, previo al análisis por ACP, cada espectro 1D (9,00 - 0,70 ppm) fue segmentado en regiones (*buckets*) de ancho variable. Un total de 83 regiones fueron seleccionadas y la integral de cada una de ellas fue normalizada respecto a la suma de todas las integrales del espectro. Para que cada variable (*bucket*) tuviera el mismo peso, independientemente del valor original de su integral, se empleó un escalado de los datos a varianza unidad.

Los demás análisis estadísticos se llevaron a cabo como se describe en el **Apartado** III.**5**.

IV.I.3.**4.3. Resultados y Discusión**

IV.I.3.**4.3.1 Análsisis mediante ^{1}H-RMN/HRMAS del queso Manchego (I-CLM)**

La **Figura** IV.I.3.**4.1** muestra un ejemplo de los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS (entre la región de 2,4 y 4,4 ppm) correspondiente a quesos I-CLM de 2 y 180 días de maduración. En esta zona del espectro, se observó que las señales asociadas a aminoácidos, como el ácido glutámico, la glutamina, la metionina, la tirosina, la lisina la fenilalanina o la valina, no se detectan en los quesos frescos de 2 días de fabricación. Sin embargo, al final de la maduración (180 días) fue manifiesta su presencia, lo cual refleja el desarrollo de la proteólisis, que influye directamente en el sabor del queso madurado (Poveda *et al*., 2004) y que han sido detectados, con otras metodologías, por diversos autores (Fernández-García *et al*., 1988).

Las señales del espectro del ^{1}H-RMN/HRMAS, al igual que en el estudio del queso Castellano (**Trabajo 3**, **Apartado** IV.I.3.**3.3.3**), se asignaron por comparación con los desplazamientos químicos descritos en la literatura y en la base de datos Human Metabolome Database (HMDB; http://www.hmdb.ca). La verificación de la identificación se realizó con el apoyo de experimentos 2D homonucleares, ^{1}H,^{1}H-COSY y ^{1}H,^{1}H-TOCSY (**Trabajo 3**, **Apartado** IV.I.3.**3.3**). Al igual que en los quesos Castellanos, se identificaron un total de 116 señales (véase **Trabajo 3**, **Tabla** IV.I.3.**3.2**) sobre los espectros ^{1}H-RMN de los quesos de Castilla-La Mancha (I-CLM y T-CLM) a distintos tiempos de maduración. La evolución en este periodo de los metabolitos presentes en el queso I-CLM fue similar a la descrita en el Trabajo 3 para los quesos Castellanos (**Apartado**

IV.I.3.**3.3.3**). No obstante, y a diferencia de estos últimos, en los quesos I-CLM frescos como no se detectaron señales relacionadas con los hidratos de carbono como seguidamente se explica.

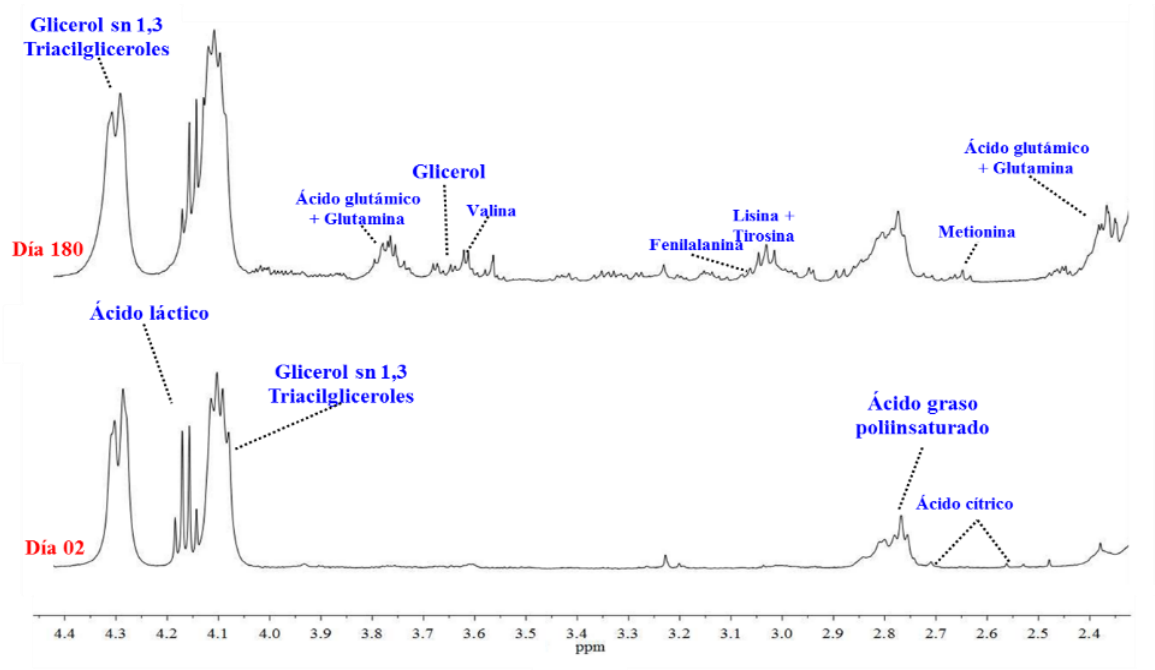


Figura IV.I.3.**4.1.** Ampliación del espectro ^{1}H-RMN/HRMAS (de 2,4 a 4,4 ppm) del queso I-CLM a 2 y 180 días de maduración, con los principales compuestos presentes.

IV.I.3.**4.3.2. Evolución de los metabolitos durante la maduración del queso manchego de fabricación industrial y tradicional**

En los quesos de leche de oveja de pasta prensada elaborados en Castilla-La Mancha, al igual que en los Castellanos, convergen eventos bioquímicos de glucólisis, proteólisis y lipólisis que derivan en el desarrollo del sabor, aroma y textura característicos del producto (Fox y McSweeney, 2004). La **Figura** IV.I.3.**4.2** muestra un ejemplo de los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS (en el rango de 2,5 a 5,7 ppm) de queso I-CLM y T-CLM durante el tiempo de maduración (2, 9, 30, 90 y 180 días). Seguidamente se analizan los cambios en distintos metabolitos detectados en el espectro ^{1}H-RMN/HRMAS.

a) Hidratos de carbono

En relación con los hidratos de carbono, en la **Figura** IV.I.3.**4.2**, la señal asociada a la β-galactosa, identificada a un desplazamiento químico de 4,6 ppm, en el caso de los quesos T-CLM presentó un descenso de su intensidad paralelo al incremento del tiempo de maduración. Así, aparece con mayor intensidad en los quesos de 2 y 9 días, es menos

manifiesta a los 30 días y no se detectó a los 90, ni a los180 días de maduración. Estos resultados coinciden con los obtenidos por varios autores (Corzo *et al*., 2000; Garde *et al*., 2012). Este proceso se debe al metabolismo de la lactosa residual, que es rápidamente transformada en los monosacáridos constituyentes (α y β-galactosa, α y β-glucosa) mediante la acción de la β-galactosidasa producida, fundamentalmente, por los cultivos estárter de bacterias ácido-lácticas (BAL) homofermentativos, como se ha comentado en el **Trabajo 3**.

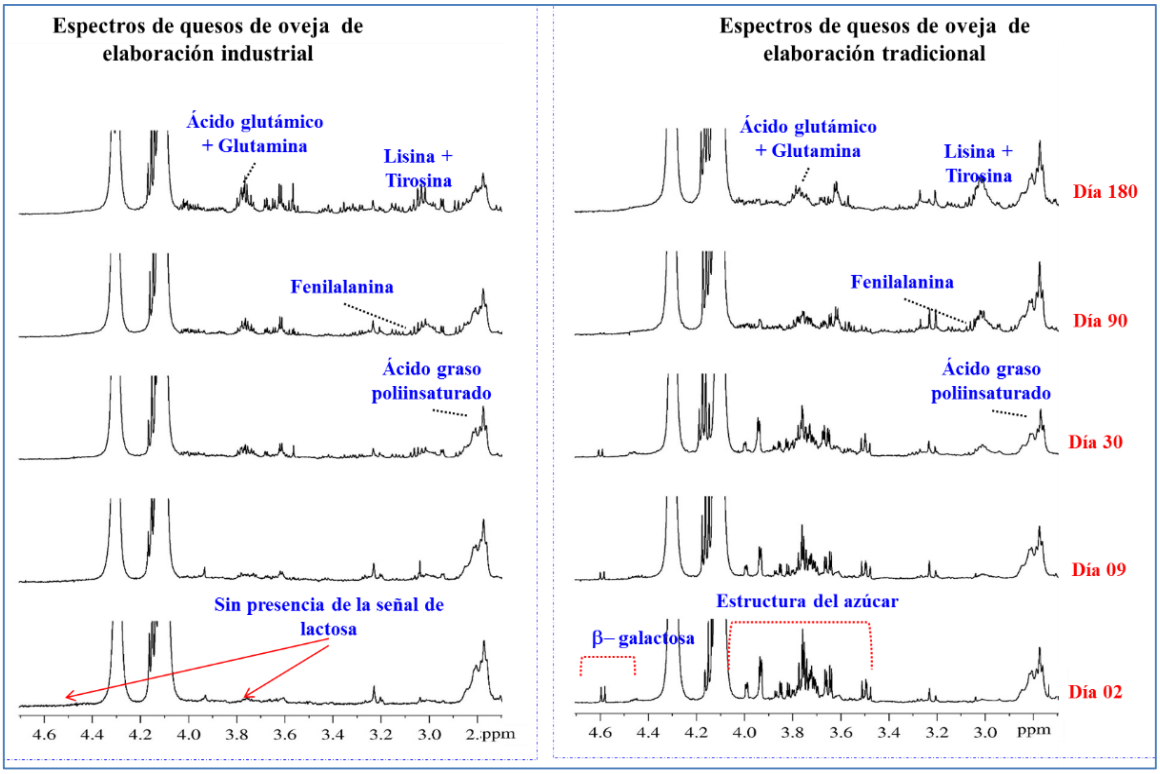


Figura IV.I.3.**4.2.** Evolución de los espectros de ^{1}H-RMN/HRMAS durante la maduración de queso de Castilla-La Mancha de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM) (en el rango de 2,5 a 5,7 ppm)

No obstante, en los espectros del queso I-CLM, las señales relacionadas con hidratos de carbono no fueron detectadas (**Figura** IV.I.3.**4.2**). Estas diferencias entre los distintos tipos de queso (I-CLM *versus* T-CLM) puedan estar relacionadas con las particularidades de su proceso de fabricación. Con respecto a este hecho, podemos suponer que la cuajada del queso I-CLM sufrió un lavado durante la fabricación, siendo está una práctica habitual en la fabricación industrial. El lavado de la cuajada implica cambiar el suero por agua durante la cocción / agitación (Hou *et al*., 2014). En la práctica, el lavado de la cuajada puede incluir algunas variaciones, como la cantidad de suero eliminado, calidad de agua añadida y temperatura del agua (Lee *et al*., 2011). Estos cambios dependen

de la variedad de queso y su tecnología de fabricación (Lolkema, 1994; Walstra *et al*., 1999; Fox y McSweeney, 2004; Hou *et al*., 2012; 2014). Con esta práctica se pretende controlar la concentración de lactosa residual, la formación de lactato y el pH (Fox y McSweeney, 2004; Lee *et al*., 2011; Hou *et al*., 2014) y evitar el posible riego de producción de un queso muy acido, pastoso, arenoso, de sabor muy fuerte y desagradable al paladar (Lee *et al*., 2011).

b) Aminoácidos

La evolución de diversos aminoácidos (tirosina, lisina, fenilalanina, glutamina o ácido glutámico) durante la maduración en los quesos de CLM, pueden apreciarse **Figura** IV.I.3.**4.2**. El progresivo incremento de los aminoácidos refleja la actividad de los agentes proteolíticos durante el proceso de la maduración (Poveda *et al*., 2004; 2015) y como es sabido tiene gran importancia para la calidad sensorial final de los quesos debido a su influencia, como precursores del sabor y el aroma (Marilley y Casey, 2004), en el desarrollo del *flavor*.

El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($P \leq 0{,}05$) durante la maduración y entre los dos tipos de quesos (**Tabla** IV.I.3.**4.1**). Los altos valores de asparagina y prolina presentados en el queso I-CLM se relacionan con el tratamiento térmico de la leche utilizada para la elaboración de este queso, siendo estos metabolitos indicadores de la pasteurización de la leche (Izco y Torres, 2000). Por otra parte, la mayor presencia de valina en el queso T-CLM está asociada al uso de leche cruda (Lau *et al*., 1991).

Con el fin de representar gráficamente la evolución del perfil de los aminoácidos durante el tiempo de maduración (**Figura** IV.I.3.**4.3**), se calculó el incremento de estos metabolitos a partir de los valores medios (***a***) (**Tabla** IV.I.3.**4.1**). En este caso, se consideró, el valor mínimo, detectado a los 2 días de fabricación, como el 100% del contenido y el incremento de cada aminoácido se calculó utilizando la expresión:

(i)

$$\text{Incremento de un determinado aminoácido (\%)} = a * 100 / \text{valor mínimo}$$

Los aminoácidos (**Figura** IV.I.3.**4.3**) que mostraron mayor incremento ($P < 0{,}05$) durante la maduración de ambos tipos de queso (I-CLM y T-CLM) fueron: la fenilalanina, el triptófano y la prolina, mientras que la histidina y la tirosina aumentaron sólo en el queso T-CLM. En general, el incremento de estos componentes fue, entre un 100 y un 300

%, más elevado en el queso T-CLM que en el I-CLM. Estas diferencias, sin duda se debieron a las variaciones en el proceso de fabricación utilizado. Diversos autores (McSweeney *et al*., 1994; Vélez *et al*., 2015) han tratado el efecto de los factores de producción en la intensidad y velocidad de la proteólisis. El empleo de leche tratada térmicamente, la temperatura de coagulación, el lavado de la cuajada y el pH son los principales factores que pueden condicionar la actividad de las enzimas coagulantes residuales y en menor grado de la plasmina, influyendo en la proteólisis primaria (McSweeney *et al*., 1994; Bansal *et al*., 2007). Esta primera hidrólisis origina péptidos de alto (insolubles en agua) y medio (solubles en agua) peso molecular, que son posteriormente degradados por las enzimas coagulantes y de la microbiota. La producción de péptidos de bajo peso molecular y de aminoácidos libres es finalmente causada, en una proteólisis secundaria, por las proteasas y peptidasas microbianas (Sousa *et al*., 2001; Hernández *et al*., 2009).

Es bien sabido, que la pasteurización de la leche afecta a la proteólisis durante la maduración del queso, fundamentalmente, a través de sus efectos en la microbiota autóctona (Gaya *et al*., 1990; McSweeney *et al*., 1993; Gomez *et al*., 1999) sin embargo ofrece la homogeneidad en la producción del queso y permite la producción de calidad más uniforme (Fox, 1993). Por otra parte, es conocido (Gomez *et al*., 1999; Poveda *et al*., 2015) que los quesos de leche cruda maduran más rápido que los quesos de leche pasteurizada, debido a su microbiota más compleja que da lugar a un grado de proteólisis más alto y contribuyen a producir quesos con aroma y sabor más intenso (Poveda *et al*., 2015). En esta misma línea, y al igual que en el presente trabajo, McSweeney *et al*., (1993) observaron que los quesos elaborados con leche cruda (que mantienen la microbiota endógena de la leche) presentaban mayor concentración de aminoácidos libres que los respectivos producidos con leche pasteurizada. Estos resultados se atribuyeron a la mayor actividad peptidásica en los quesos de leche cruda, originada por la microbiota endógena de la leche.

Tabla IV.I.3.**4.1.** Principales aminoácidos detectados mediante ^{1}H-RMN/HRMAS en los quesos de Castilla-La Mancha de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM)

δ (ppm)	Metabolito	Tipo de queso	Tiempo de maduracion (dias)				
			2	9	30	90	180
8,59	Histidina	I-CLM	$0,32 \times 10^{-4} \pm 0,08 \times 10^{-4}$ c, α	$0,37 \times 10^{-4} \pm 0,12 \times 10^{-4}$ bc, α	$0,45 \times 10^{-4} \pm 0,05 \times 10^{-4}$ b, α	$0,63 \times 10^{-4} \pm 0,19 \times 10^{-4}$ a, β	$0,70 \times 10^{-4} \pm 0,07 \times 10^{-4}$ a, β
		T-CLM	$0,26 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ c, α	$0,37 \times 10^{-4} \pm 0,12 \times 10^{-4}$ bc, α	$0,41 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ b, α	$0,94 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ a, α	$1,55 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ a, α
7,32	Fenilalanina	I-CLM	$1,25 \times 10^{-4} \pm 0,12 \times 10^{-4}$ c, α	$1,81 \times 10^{-4} \pm 0,78 \times 10^{-4}$ bc, α	$2,95 \times 10^{-4} \pm 0,50 \times 10^{-4}$ b, β	$4,43 \times 10^{-4} \pm 0,83 \times 10^{-4}$ a, β	$5,79 \times 10^{-4} \pm 1,85 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$0,86 \times 10^{-4} \pm 0,03 \times 10^{-4}$ d, β	$1,59 \times 10^{-4} \pm 0,06 \times 10^{-4}$ c, α	$4,12 \times 10^{-4} \pm 0,10 \times 10^{-4}$ b, α	$4,97 \times 10^{-4} \pm 0,12 \times 10^{-4}$ b, α	$6,17 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ a, α
7,21	Triptófano	I-CLM	$0,43 \times 10^{-4} \pm 0,14 \times 10^{-4}$ c, α	$0,69 \times 10^{-4} \pm 0,11 \times 10^{-4}$ c, α	$1,00 \times 10^{-4} \pm 0,27 \times 10^{-4}$ b, α	$1,18 \times 10^{-4} \pm 0,26 \times 10^{-4}$ ab, α	$1,71 \times 10^{-4} \pm 0,54 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$0,30 \times 10^{-4} \pm 0,04 \times 10^{-4}$ d, α	$0,47 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ c, β	$0,86 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ b, α	$1,25 \times 10^{-4} \pm 0,12 \times 10^{-4}$ a, α	$1,13 \times 10^{-4} \pm 0,03 \times 10^{-4}$ a, α
7,12	Tirosina	I-CLM	$2,15 \times 10^{-4} \pm 0,22 \times 10^{-4}$ c, α	$4,50 \times 10^{-4} \pm 0,09 \times 10^{-4}$ b, α	$4,65 \times 10^{-4} \pm 0,07 \times 10^{-4}$ b, β	$5,70 \times 10^{-4} \pm 0,08 \times 10^{-4}$ a, β	$6,23 \times 10^{-4} \pm 0,08 \times 10^{-4}$ a, β
		T-CLM	$2,01 \times 10^{-4} \pm 0,05 \times 10^{-4}$ d, α	$3,67 \times 10^{-4} \pm 0,03 \times 10^{-4}$ c, α	$5,87 \times 10^{-4} \pm 0,06 \times 10^{-4}$ b, α	$6,81 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ b, α	$9,00 \times 10^{-4} \pm 0,01 \times 10^{-4}$ a, α
3,61	Valina	I-CLM	$3,68 \times 10^{-4} \pm 0,61 \times 10^{-4}$ c, β	$6,40 \times 10^{-4} \pm 2,18 \times 10^{-4}$ b, α	$6,42 \times 10^{-4} \pm 0,90 \times 10^{-4}$ ab, β	$7,55 \times 10^{-4} \pm 0,47 \times 10^{-4}$ a, β	$8,92 \times 10^{-4} \pm 0,97 \times 10^{-4}$ a, β
		T-CLM	$4,54 \times 10^{-4} \pm 0,16 \times 10^{-4}$ c, α	$4,53 \times 10^{-4} \pm 0,12 \times 10^{-4}$ c, α	$9,00 \times 10^{-4} \pm 0,03 \times 10^{-4}$ b, α	$9,40 \times 10^{-4} \pm 0,24 \times 10^{-4}$ ab, α	$11,50 \times 10^{-4} \pm 0,15 \times 10^{-4}$ a, α
3,58	Treonina	I-CLM	$1,66 \times 10^{-4} \pm 0,69 \times 10^{-4}$ a, α	$2,73 \times 10^{-4} \pm 1,18 \times 10^{-4}$ b, β	$3,28 \times 10^{-4} \pm 0,35 \times 10^{-4}$ b, β	$379 \times 10^{-4} \pm 0,41 \times 10^{-4}$ b, β	$6,10 \times 10^{-4} \pm 0,72 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$2,28 \times 10^{-4} \pm 0,06 \times 10^{-4}$ d, α	$3,22 \times 10^{-4} \pm 0,08 \times 10^{-4}$ c, α	$4,27 \times 10^{-4} \pm 0,22 \times 10^{-4}$ b, α	$5,13 \times 10^{-4} \pm 0,08 \times 10^{-4}$ ab, α	$5,63 \times 10^{-4} \pm 0,06 \times 10^{-4}$ a, α
3,35	Prolina	I-CLM	$0,60 \times 10^{-4} \pm 0,06 \times 10^{-4}$ d, α	$1,40 \times 10^{-4} \pm 0,18 \times 10^{-4}$ c, α	$2,00 \times 10^{-4} \pm 0,25 \times 10^{-4}$ bc, α	$2,44 \times 10^{-4} \pm 0,07 \times 10^{-4}$ b, α	$4,12 \times 10^{-4} \pm 0,37 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$0,47 \times 10^{-4} \pm 0,12 \times 10^{-4}$ c, β	$1,07 \times 10^{-4} \pm 0,18 \times 10^{-4}$ b, β	$1,57 \times 10^{-4} \pm 0,33 \times 10^{-4}$ b, β	$2,18 \times 10^{-4} \pm 0,15 \times 10^{-4}$ a, β	$2,66 \times 10^{-4} \pm 0,11 \times 10^{-4}$ a, β
2,88	Asparagina	I-CLM	$2,08 \times 10^{-4} \pm 0,61 \times 10^{-4}$ c, α	$3,33 \times 10^{-4} \pm 0,49 \times 10^{-4}$ bc, α	$3,95 \times 10^{-4} \pm 0,46 \times 10^{-4}$ b, α	$4,69 \times 10^{-4} \pm 0,10 \times 10^{-4}$ b, α	$6,31 \times 10^{-4} \pm 1,02 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$1,92 \times 10^{-4} \pm 0,17 \times 10^{-4}$ c, α	$2,16 \times 10^{-4} \pm 0,21 \times 10^{-4}$ c, β	$3,26 \times 10^{-4} \pm 0,08 \times 10^{-4}$ b, β	$3,79 \times 10^{-4} \pm 0,08 \times 10^{-4}$ a, β	$4,88 \times 10^{-4} \pm 0,18 \times 10^{-4}$ a, β
2,60	Metionina	I-CLM	$1,38 \times 10^{-4} \pm 0,67 \times 10^{-4}$ d, α	$1,94 \times 10^{-4} \pm 0,41 \times 10^{-4}$ c, α	$2,08 \times 10^{-4} \pm 0,41 \times 10^{-4}$ bc, .α	$2,25 \times 10^{-4} \pm 0,10 \times 10^{-4}$ b, β	$3,02 \times 10^{-4} \pm 0,44 \times 10^{-4}$ a, β
		T-CLM	$1,40 \times 10^{-4} \pm 0,07 \times 10^{-4}$ d, α	$1,80 \times 10^{-4} \pm 0,32 \times 10^{-4}$ c, α	$2,79 \times 10^{-4} \pm 0,64 \times 10^{-4}$ bc, α	$2,61 \times 10^{-4} \pm 0,02 \times 10^{-4}$ b, α	$4,19 \times 10^{-4} \pm 0,33 \times 10^{-4}$ a, α
2,44	Glutamina	I-CLM	$4,11 \times 10^{-4} \pm 0,28 \times 10^{-4}$ c, α	$4,34 \times 10^{-4} \pm 0,63 \times 10^{-4}$ c, β	$5,78 \times 10^{-4} \pm 0,92 \times 10^{-4}$ bc, α	$6,17 \times 10^{-4} \pm 0,17 \times 10^{-4}$ b, β	$8,92 \times 10^{-4} \pm 0,11 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$3,67 \times 10^{-4} \pm 0,81 \times 10^{-4}$ a, α	$5,73 \times 10^{-4} \pm 0,68 \times 10^{-4}$ a, β	$6,91 \times 10^{-4} \pm 0,75 \times 10^{-4}$ a, α	$7,27 \times 10^{-4} \pm 0,55 \times 10^{-4}$ a, β	$10,10 \times 10^{-4} \pm 1,44 \times 10^{-4}$ a, α
2,38	Ácido glutámico	I-CLM	$12,44 \times 10^{-4} \pm 0,17 \times 10^{-4}$ c, α	$14,15 \times 10^{-4} \pm 0,86 \times 10^{-4}$ c, α	$17,47 \times 10^{-4} \pm 1,10 \times 10^{-4}$ b, α	18,47 x 10-4 ± $0,23 \times 10^{-4}$ b, α	$25,87 \times 10^{-4} \pm 0,56 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$13,52 \times 10^{-4} \pm 1,09 \times 10^{-4}$ d, α	$15,20 \times 10^{-4} \pm 1,69 \times 10^{-4}$ d, α	$18,46 \times 10^{-4} \pm 1,34 \times 10^{-4}$ c, α	20,59 x 10-4 ± $1,73 \times 10^{-4}$ b, β	$30,44 \times 10^{-4} \pm 3,63 \times 10^{-4}$ a, α
1,02	Isoleucina	I-CLM	$26,50 \times 10^{-4} \pm 2,49 \times 10^{-4}$ d, α	$28,08 \times 10^{-4} \pm 1,47 \times 10^{-4}$ d, α	33,81 x 10-4 ± $1,34 \times 10^{-4}$ c, β	$36,20 \times 10^{-4} \pm 1,04 \times 10^{-4}$ b, α	$48,10 \times 10^{-4} \pm 2,86 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$24,28 \times 10^{-4} \pm 0,64 \times 10^{-4}$ d, α	$26,65 \times 10^{-4} \pm 0,05 \times 10^{-4}$ c, α	30,90 x 10-4 ± $0,64 \times 10^{-4}$ b, α	$32,94 \times 10^{-4} \pm 0,04 \times 10^{-4}$ b, β	$43,84 \times 10^{-4} \pm 1,64 \times 10^{-4}$ a, β
0,97	Leucina	I-CLM	$70,69 \times 10^{-4} \pm 8,34 \times 10^{-4}$ d, α	$91,92 \times 10^{-4} \pm 28,90 \times 10^{-4}$ cd, α	$109,39 \times 10^{-4} \pm 6,33 \times 10^{-4}$ c, α	$123,11 \times 10^{-4} \pm 15,41 \times 10^{-4}$ b, α	$153,18 \times 10^{-4} \pm 26,68 \times 10^{-4}$ a, α
		T-CLM	$53,43 \times 10^{-4} \pm 2,54 \times 10^{-4}$ c, β	$60,27 \times 10^{-4} \pm 0,29 \times 10^{-4}$ b, β	$61,82 \times 10^{-4} \pm 0,29 \times 10^{-4}$ b, β	$82,66 \times 10^{-4} \pm 1,43 \times 10^{-4}$ a, β	$95,36 \times 10^{-4} \pm 0,51 \times 10^{-4}$ a, β

δ : desplazamiento químico (ppm).Valores medios en unidades arbitrarias (a.u) obtenidos del porcentaje del área de la señal con respecto del área total del espectro.
a, b, c, d, e: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tipo de queso y distintos tiempos de maduración con diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tiempo de maduración. α, β, χ: valores en la misma columna, para un mismo aminoácido, con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso.

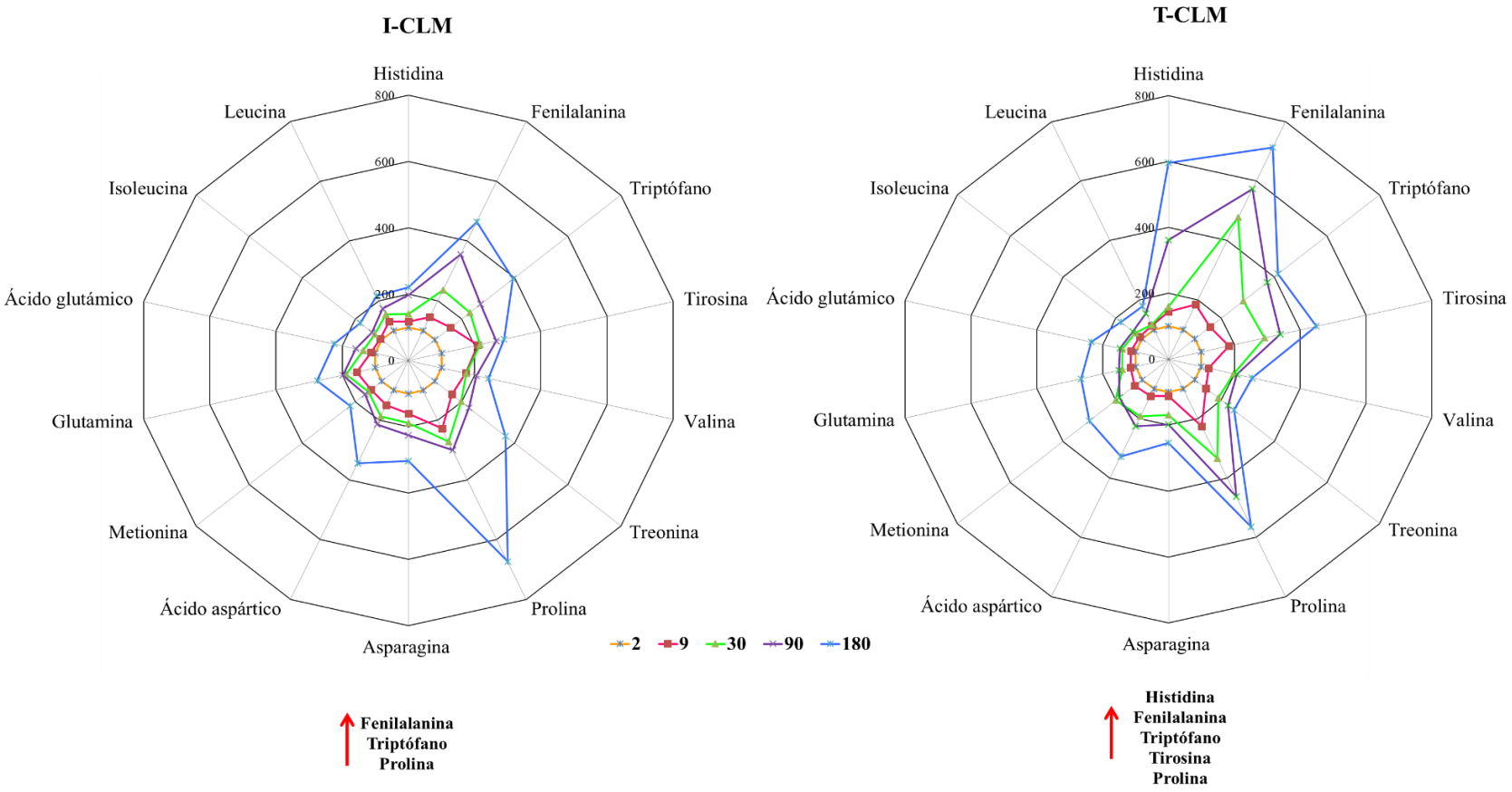


Figura IV.I.3.**4.3.** Evolución del perfil de los aminoácidos del queso I-CLM y quesos T-CLM durante el tiempo de maduración.

Las variaciones del perfiles de los aminoácidos se muestra como porcentaje del *incremento* durante el proceso de maduración [considerando como referencia (100%) el ***valor mínimo*** y el ***incremento*** (%) = ***a*** * 100 / ***valor mínimo***]. La cuantificación de cada aminoácido (***a***) se realizó a partir de los valores medios del porcentajes de área de la señal con respecto al área total del espectro (unidades arbitrarias) obtenidas de las regiones espectrales [8,59 (histidina); 7,32 (fenilalanina); 7,21 (triptófano); 7,12 (tirosina); 3,58 (treonina); 3,56 (glicina); 3,35 (prolina); 2,94 (asparagina); ácido aspártico (2,64) metionina (2,60); glutamina (2,44); ácido glutámico (2,38); 1,82 (lisina); 1,76 (argenina); alanina (1,49); valina (1,05); leucina (0,99); isoleucina (1,02)].

Este tratamiento térmico, además de afectar a la microbiota psicrotrofa e inhibir la actividad de sus enzimas, así como a enzimas endógenas de la leche, puede ocasionar en cierta medida la desnaturalización de las proteínas del suero, las cuales pueden interaccionar con las caseínas, a través de la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, y de esta forma incorporarse a la cuajada (Leaver *et al*., 1995). No obstante, el grado de desnaturalización de las proteínas del suero no puede ser muy elevado en la leche de quesería, ya que niveles superiores al 15% (como porcentaje del total de proteínas séricas) impediría la coagulación de la leche por el cuajo; esto sólo sucede con tratamientos térmicos intensos (por ejemplo de 80ºC, 15 segundos), que por ello no se emplean en la pasterización de la leche para elaborar quesos (Fox *et al*., 2000). De cualquier forma, este hecho dificulta la accesibilidad de las proteinasas (en particular de la quimosina) a las caseínas durante la maduración (Leaver *et al*., 1995; Lau *et al*., 1991). Por tanto, se considera que el efecto múltiple del tratamiento térmico, junto con el papel de la microbiota autóctona, explican el distanciamiento de la fracción de aminoácidos libres de los quesos I-CLM frente a los T-CLM observada en los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS.

En general, aunque se encontraron diferencias cuantitativas entre los aminoácidos presentes en los distintos tipos de queso (I-CLM y T-CLM), el perfil de los mismos coincide con el identificado en quesos de oveja por distintos autores (Fernández-García *et al*., 1988; Polo *et al*., 1985; González de Llano *et al*., 1991; Ballestero *et al*., 2006; Gómez-Ruiz *et al*., 2002) así como con el hallado en el queso castellano (véase **Trabajo 3**).

c) Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos contribuyen al sabor y el aroma de la mayoría de las variedades de queso (Fox *et al*., 1993) y puede contribuir a controlar el crecimiento bacteriano (Garde *et al*., 2012). El ácido cítrico se asocia al metabolismo bioquímico de la leche ovina mientras que por actividad bacteriana se produce el ácido láctico, acético, fórmico y butírico, fundamentalmente. Estos metabolitos se han utilizado como parámetros de clasificación de diferentes tipos de quesos y para obtener modelos matemáticos de predicción del tiempo de maduración (Buffa *et al*., 2004) puesto que son compuestos intermedios de varios procesos bioquímicos (Bevilacqua y Califano, 1992; Buffa *et al*., 2004).

En los espectros de RMN de los quesos de CLM se detectaron señales relacionadas con los ácidos orgánicos láctico, acético, cítrico y fórmico y con el ácido graso de cadena

corta, butírico. En general, el ácido orgánico mayoritario fue el ácido láctico, coincidiendo con los resultados obtenidos en quesos similares (Buffa *et al*., 2004; Tormo y Izco, 2004; Ballesteros *et al*., 2006).

En la **Figura** IV.I.3.**4.4** se muestra el perfil durante el tiempo de maduración de los mencionados ácidos orgánicos. La evolución del ácido láctico mostró diferencias significativas ($P \leq 0{,}05$) entre los distintos quesos (I-CL y T-CL). En general, el queso tradicional (T-CLM) presentó mayores valores que el industrial (I-CLM) (**Figura** IV.I.3.**4.4a**). Estos resultados serían compatibles con el mencionado proceso de lavado de la cuajada. Este procedimiento reduce el contenido de lactosa residual y la formación de ácido láctico a partir de su fermentación (McSweeney y Fox, 2.004; Bergamini *et al*., 2010).

El ácido cítrico durante la maduración mostró una tendencia a disminuir (**Figura** IV.I.3.**4.4b**), de forma similar a los observados por otros autores (Ballesteros *et al*., 2006) en queso Manchego y en otros tipos de queso, como por ejemplo por Lombardi *et al*. (1994) en el queso Reggianito. Esta disminución podría explicarse por la implicación del citrato en el ciclo Krebs o ciclo del ácido cítrico, donde actúa como sustrato y producto. Como se ha mencionado en el **Trabajo 3**, el citrato puede ser usado por algunos microorganismos, como *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, para producir ácidos pirúvico y acético (Adda *et al*., 1982; Akalin *et al*., 2002). Aunque la tendencia fue similar en los dos tipos de queso (I-CLM y T-CML), los de elaboración industrial (I-CLM) presentaron un contenido menor ($P < 0{,}05$) que los de elaboración artesanal (T-CLM) (**Figura** IV.I.3.**4.4b**).

En general, los quesos T-CLM presentaron mayor contenido de ácido acético que los I-CLM. En ambos quesos este ácido mostró una evolución variable a lo largo de la maduración (**Figura** IV.I.3.**4.4c**), aumentando hasta el día 90 y descendiendo ligeramente hasta el final del periodo de estudio considerado (día 180). Este comportamiento fue similar al encontrado en el queso Castellano (**Trabajo 3**) y puede atribuirse a su papel como intermediario en las rutas metabólicas de la lactosa (Piras *et al*., 2013).

El ácido fórmico presentó un comportamiento similar al del ácido acético. Se formó durante los primeros días de la maduración, detectándose un incremento hasta los 30 días y a partir de este punto se mantuvo, más o menos constante, hasta los 180 días (**Figura** IV.I.3.**4.4d**). En este caso no se detectaron diferencias significativas ($P > 0{,}05$)

entre ambos tipos de queso (I-CLM y T-CLM). Una tendencia similar se ha descrito en diversos tipos de queso (como Port Salut Argentino, Reggianito y Mozzarella) por varios autores (Bevilacqua y Califano, 1992; Lombardi *et al*., 1994; Califano y Bevilacqua, 1999). El aumento inicial del ácido fórmico se ha atribuido a la actividad de algunos microorganismos, como *Streptococcus salivarius ssp*. *Thermophilus*, que producen ácido fórmico a partir de la lactosa (Thomas, 1985; Akalin *et al*., 2002).

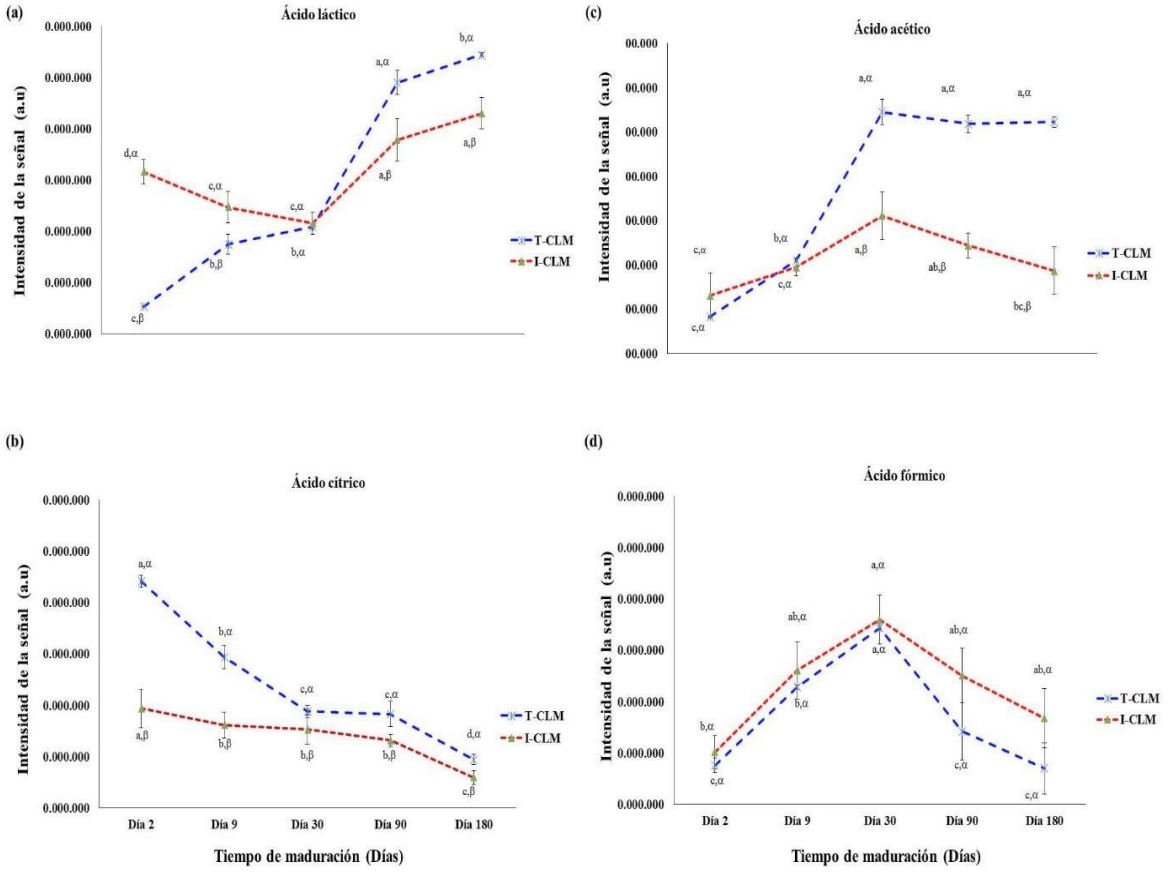


Figura IV.I.3.**4.4.** Evolución de los ácidos orgánicos a lo largo de la maduración de quesos de oveja Manchego de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM).

a, b, c, d, e: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tipo de queso y distintos tiempos de maduración con diferentes letras difieren significativamente (P< 0,05). α, β: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tiempo de maduración y distinto tipo de queso con diferentes letras difieren significativamente (P< 0,05). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tipo de queso

d) Ácidos grasos

La lipólisis consiste básicamente en la liberación de ácidos grasos a partir de la grasa del queso (Farkye y Fox, 1990; McSweeney y Sousa, 2000), los cuales contribuyen directamente al desarrollo de su sabor y aroma (Collins *et al*., 2003; Bergamini *et al*., 2010). La lipólisis durante la maduración de los quesos de CLM sería el resultado de la

actividad lipásica y esterásica de las lipasas microbianas nativas, de la leche y del cuajo.

En este tipo de quesos, de forma similar a como se indica en el **Trabajo 3** para los quesos de CL, esta actividad es muy moderada respecto a otras modalidades de queso, como en los de vena azul, que presentan una liberación de ácidos grasos intensa por la actividad de las lipasas extracelulares producidas por mohos (Gripon, 1993).

En los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS se detectaron los ácidos linoleico conjugado (a 5,90 ppm), caproleico (a 5,76 ppm), linoleico (a 2,85 ppm), linolénico (a 2,78 ppm) y el ácido butírico (a 0,94 ppm), aunque en este caso existió un cierto solapamiento con la señal de la isoleucina. El grado de la lipólisis, considerando los ácidos grasos libres detectados en el espectro, no presentó cambios significativos durante la maduración de los quesos de CLM. Sin embargo, la señal asociada al ácido butírico, afectada por la interacción de la isoleucina, mostró una evolución, con cambios significativos ($P \leq 0,05$) en su intensidad, debidos al tiempo de maduración y al tipo de queso (I-CLM y T-CLM). Con el fin de verificar, si estas diferencias se debían al ácido graso de cadena corta o al aminoácido, se realizó un experimento con filtro de difusión ("espectro lipofílico", véase **Trabajo 3**) para resolver el solapamiento de la señal de estos componentes.

La integración del ácido butírico en este experimento reveló dos tendencias opuestas durante la maduración de los dos tipos de quesos de CLM (**Figura** IV.I.3.**4**.**5**), dado que en el caso de los I-CLM disminuyó mientras que en los T-CLM aumentó. La menor concentración de ácido butírico encontrado en los quesos elaborados con leche pasteurizada (I-CLM) a los 180 días de maduración, en comparación con los quesos de leche cruda (T-CLM), se ha atribuido a la posible desnaturalización, al menos parcial, de las lipasas nativas presentes en la leche durante el tratamiento térmico de la leche y los agentes coagulantes utilizados no compensaron su actividad. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Buffa *et al*. (2001; 2004), quienes detectaron menos lipolísis en los quesos de leche pasteurizada. La leche presenta una lipasa muy activa, la lipoprotein-lipasa, que se inactiva completamente con un tratamiento térmico equivalente a 15 s a 78 ºC (Driessen, 1984).

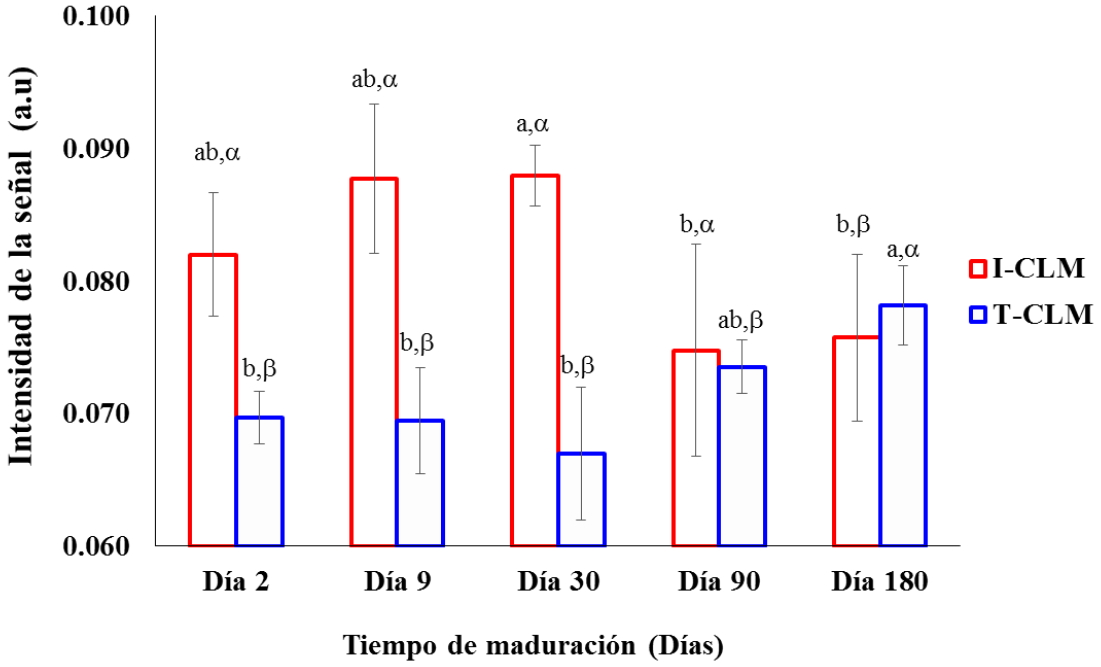


Figura IV.I.**4.5.** Evolución del contenido de ácido butírico durante la maduración de los quesos de oveja de pasta pensada de Castilla-La Mancha de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM).

a, b, c, d, e: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tipo de queso y distintos tiempos de maduración con diferentes letras difieren significativamente (P< 0,05). α, β: para un mismo metabolito, valores correspondientes al mismo tiempo de maduración y distintos tipo de queso con diferentes letras difieren significativamente (P< 0,05).

Como se ha mencionado en el **Trabajo 3**, este ácido graso de cadena corta tiene un importante papel en el desarrollo aromático de los quesos y su concentración de relaciona con la actividad lipolítica y proteolítica (Akalin *et al*., 2002; Najera *et al*., 2003).

IV.I.3.**4.3.3. Análisis metabolómico de los quesos de oveja I-CLM y T-CLM**

Para conocer el potencial de la espectroscopia^{1}H-RMN/HRMAS para la monitorización del tiempo de maduración de los quesos de CLM y la caracterización de estos quesos se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) no supervisado. Este análisis se llevó a cabo sobre la totalidad de los datos derivados del espectro ^{1}H-RMN/HRMAS de los quesos de CLM en distintos tiempo de maduración (2, 9, 30, 90 y 180 días). Para el procesado de los datos, cada espectro fue segmentado en regiones espectrales (*bucket*) de anchura variable (**Tabla** IV.I.3.**4.2**). El ACP fue aplicado a la matriz total de datos compuesta por 83 regiones espectrales. Como resultado el 96,18 % de la varianza se explicó por 10 Componentes Principales (CP). La **Figura** IV.I.3.**4.6** muestra

los dos primeros CP (CP1 y CP2) que en su conjunto explican el 65,96 % de la varianza total (46,13 % y 19,83 % respectivamente).

Como puede apreciarse en la **Figura** IV.I.3.**4.6**, en la que se representa la proyección de CP1 *versus* CP2, es posible un buen agrupamiento de las muestras, especialmente a lo largo del CP1en función del tiempo de maduración y a través de CP2 por el tipo de queso. Por tanto, mediante esta herramienta quimiométrica es posible definir la *trayectoria metabólica* (véase flecha de la **Figura** IV.I.3.**4.6**) del proceso de maduración de los quesos y discernir entre quesos de elaboración industrial (I-CLM, agrupados en la parte superior) y tradicional (T-CLM) en cualquier tiempo.

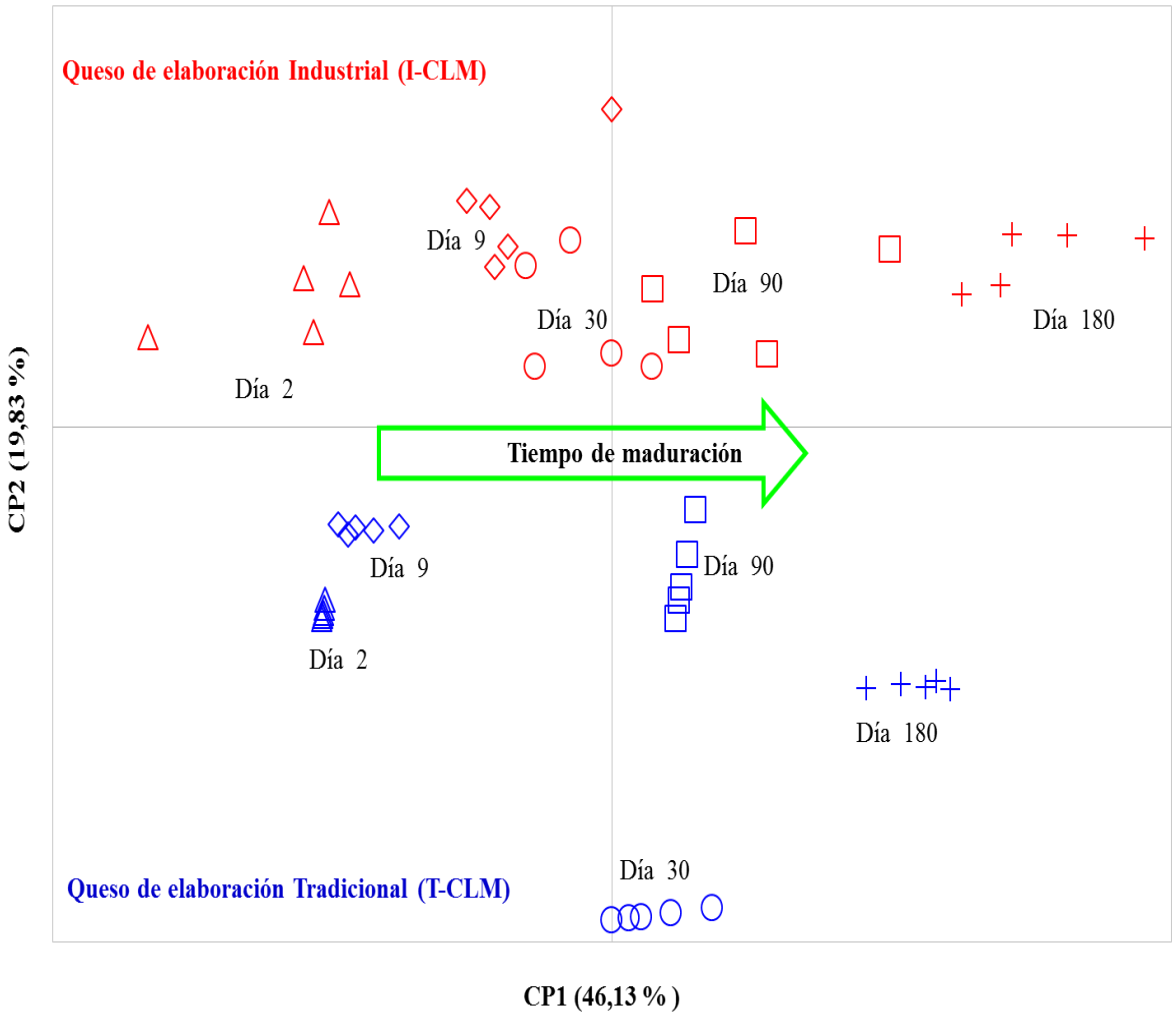


Figura IV.I.3.**4.6.** Distribución de las muestras de queso de oveja producidos en Castilla-La Mancha de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM) sobre los dos primeros Componentes Principales (CP1 y CP2) obtenidos en el Análisis de Componentes Principales no supervisado utilizando regiones espectrales de anchura variable de los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS (**Tabla** IV.I.3.**4.2**).

Tabla IV.I.3.**4.2.** Regiones espectrales (*bucket*) utilizadas en el Análisis de Componentes Principales (ACP). La Tabla incluye el punto medio de la región espectral y su anchura. Coeficientes de cada factor en los dos primeros Componentes principales (CP1 y CP2)

***Bucket* ppm**	**Anchura del *bucket* (ppm)**	**CP1**	**CP2**	**Metabolitos**
8,59	0,1259	0,0968	-0,1261	Histidina
8,45	0,0908	0,1170	-0,0024	Ácido fórmico
7,43	0,0657	0,1507	0,0312	Fenilalanina
7,38	0,0756	0,1449	-0,0075	Fenilalanina/histidina
7,32	0,0081	0,1473	-0,0250	Fenilalanina
7,27	0,0594	0,1011	-0,0191	
7,21	0,0689	0,1461	0,0208	Triptófano
7,12	0,1166	0,0870	-0,0475	Tirosina
6,91	0,0829	0,1484	-0,0376	
6,82	0,1056	0,1022	-0,1001	Tirosina
6,27	0,1463	0,0642	0,1141	Ácido linoleico conjugado
5,90	0,1291	0,0762	0,0878	Ácido linoleico conjugado
5,76	0,1377	0,0717	0,0090	Ácido caproleico
5,59	0,1330	0,0872	0,0901	Ácido linoleico conjugado
5,40	0,0915	0,0437	0,1831	Ácidos grasos insaturado trans
5,31	0,0916	0,0025	-0,1465	Ácidos grasos insaturado cis
5,21	0,1150	-0,0387	-0,1318	α-glucosa/β-galactosa/ácido linoleico conjugado/glicerol sn 2 triacilglicerol
5,04	0,0845	0,0246	-0,0845	Glicerol sn 1,2 triacilglicerol
4,98	0,0368	0,0258	-0,0626	Ácido caproleico
4,95	0,0383	0,0097	-0,0333	β-glucosa
4,89	0,0727	-0,0117	0,0263	Ácido caproleico
4,58	0,0720	0,0463	-0,1481	β-galactosa
4,43	0,1423	0,1315	-0,0895	
4,30	0,1174	0,0107	-0,1561	Glicerol sn 1,3 triacilglicerol
4,15	0,0626	0,1076	0,0618	Ácido láctico
4,08	0,0978	-0,0096	-0,2034	Glicerol sn 1,3 Triacilglicerol/colina/asparagina
3,99	0,0899	0,1255	-0,1267	Fenilalanina/α y β-galactosa/tirosina
3,89	0,1205	0,0302	-0,2017	Ácido aspártico/ metionina/α-glucosa/α-galactosa
3,77	0,1228	0,0633	-0,1661	Alanina/glutamina/ácido glutámico/lisina
3,68	0,0625	0,0242	-0,1909	Argenina/leucina/α-glucosa/isoleucina/glicerol-1,3 diacilglicerol/etanol

3,64	0,0274	0,0599	-0,1767	β-glucosa/β-galactosa/Glicerol en 1,2 diacilglicerol
3,61	0,0406	0,1411	-0,0938	Valina
3,58	0,0226	0,1213	-0,1192	Treonina
3,56	0,0258	0,1224	-0,1069	Glicina/a-glucosa
3,54	0,0211	0,0707	-0,1690	Colina
3,49	0,0736	0,0033	-0,1711	β-galactosa
3,42	0,0837	0,1463	-0,0103	Prolina
3,35	0,0626	0,1450	0,0042	Prolina
3,31	0,0297	0,1380	-0,0393	
3,25	0,0852	0,1441	-0,0495	β-galactosa/fenilalina/arginina
3,19	0,0438	0,1254	-0,0742	Colina/tirosina
3,15	0,0470	0,1567	-0,0160	Fenilalanina
3,11	0,0399	0,1533	-0,0171	
3,07	0,0438	0,1555	0,0006	Tirosina
3,00	0,0923	0,1509	-0,0340	Lisina/ácido gamma-aminobutírico
2,94	0,0422	0,1466	-0,0244	
2,91	0,0258	0,1319	-0,0390	Asparagina
2,88	0,0399	0,1542	0,0555	Asparagina
2,85	0,0399	0,1344	0,1228	Ácido linoleico
2,81	0,0422	0,0747	0,1689	
2,78	0,0470	0,0135	-0,0607	Ácido linolénico
2,74	0,0195	0,0122	-0,1837	
2,71	0,0532	0,0942	-0,0987	Ácido cítrico
2,67	0,0211	0,1543	-0,0153	
2,64	0,0524	0,1561	-0,0199	Ácido aspártico
2,60	0,0446	0,1372	-0,0625	Metionina
2,54	0,0806	0,1075	-0,0853	Ácido cítrico
2,48	0,0540	0,1515	0,0316	
2,44	0,0469	0,1546	0,0376	Glutamina
2,38	0,0736	0,1538	0,0181	Ácido glutámico
2,27	0,1517	-0,0989	-0,1755	Ácido gamma-aminobutírico/valina/ácidos grasos
2,14	0,0837	0,1458	0,0725	Metionina/glutamina/metionina /ácido glutámico
2,05	0,1064	0,0460	0,0178	Ácidos grasos insaturados cis y trans
1,98	0,0383	-0,0046	0,0114	Isoleucina
1,95	0,0235	0,0238	-0,1526	Ácido acético
1,90	0,0915	0,1410	-0,0180	Ácido gamma-aminobutírico/lisina/arginina
1,82	0,0892	0,1408	-0,0455	
1,76	0,0391	0,1562	0,0176	
1,70	0,0728	0,1556	0,0041	Leucina/lisina/argenina
1,60	0,1502	-0,1132	-0,1528	Ácidos grasos

1,49	0,0884	0,1460	0,0208	Alanina/isaoleucina/lisina
1,35	0,0767	0,0297	0,2232	Ácido láctico/treonina
1,41	0,0634	0,0789	0,1805	
1,28	0,0822	-0,0884	-0,1913	Ácidos grasos/isoleucina
1,17	0,1307	-0,0134	-0,1519	Etanol
1,05	0,0485	0,1472	0,0298	Valina
1,02	0,0297	0,1489	0,0003	Isoleucina
0,99	0,0282	0,1453	0,0874	
0,97	0,0289	0,1224	0,1505	Leucina
0,94	0,0454	0,0558	0,2118	Isoleucina/butírico
0,87	0,1150	-0,0899	-0,1806	Ácidos grasos
0,78	0,0822	-0,0035	-0,1117	
0,72	0,0509	-0,0098	-0,1045	Colesterol

El ACP, además clasificar las muestras, permitió identificar aquellas regiones que más contribuyeron a la discriminación de las muestras considerando el tiempo de maduración y tipo de fabricación. De acuerdo con la información obtenida, se seleccionaron los aminoácidos para realizar un nuevo ACP con el fin de incrementar el porcentaje de varianza representado por los CP. Con estos metabolitos, los dos primeros componentes (CP1 y CP2) englobaron el 88,83 % de la varianza total.

La **Figura** IV.I.3.**4.7** presenta la dispersión de las muestras en la proyección de CP1 (explica el 78,00% de la varianza) *versus* CP2 (recoge el 10,83 % de la varianza). Como puede observarse (**Figura** IV.I.3.**4.7a**) se obtuvo una agrupación similar a la lograda con todos los metabolitos identificados en el espectro de ^{1}H-RMN/HRMAS (**Figura** IV.I.3.**4.6**).

En la **Figura** IV.I.3.**4.7b** se muestra la distribución de los aminoácidos en la misma proyección de los CP1 y CP2. De acuerdo con la distribución de las muestras y de los aminoácidos, el ACP indica que asparagina, prolina, isoleucina, triptófano y leucina tuvieron mayor presencia en los quesos I-CLM; mientras que valina, treonina, histidina, metionina, fenilalanina, tirosina, glutamina y ácido glutámico alcanzaron mayor concentración en los quesos T-CLM. Estos resultados estarían relacionados con el ya el efecto del tratamiento térmico de la leche utilizada para la fabricación de los quesos (Lau *et al*., 1991; Izco y Torres, 2000).

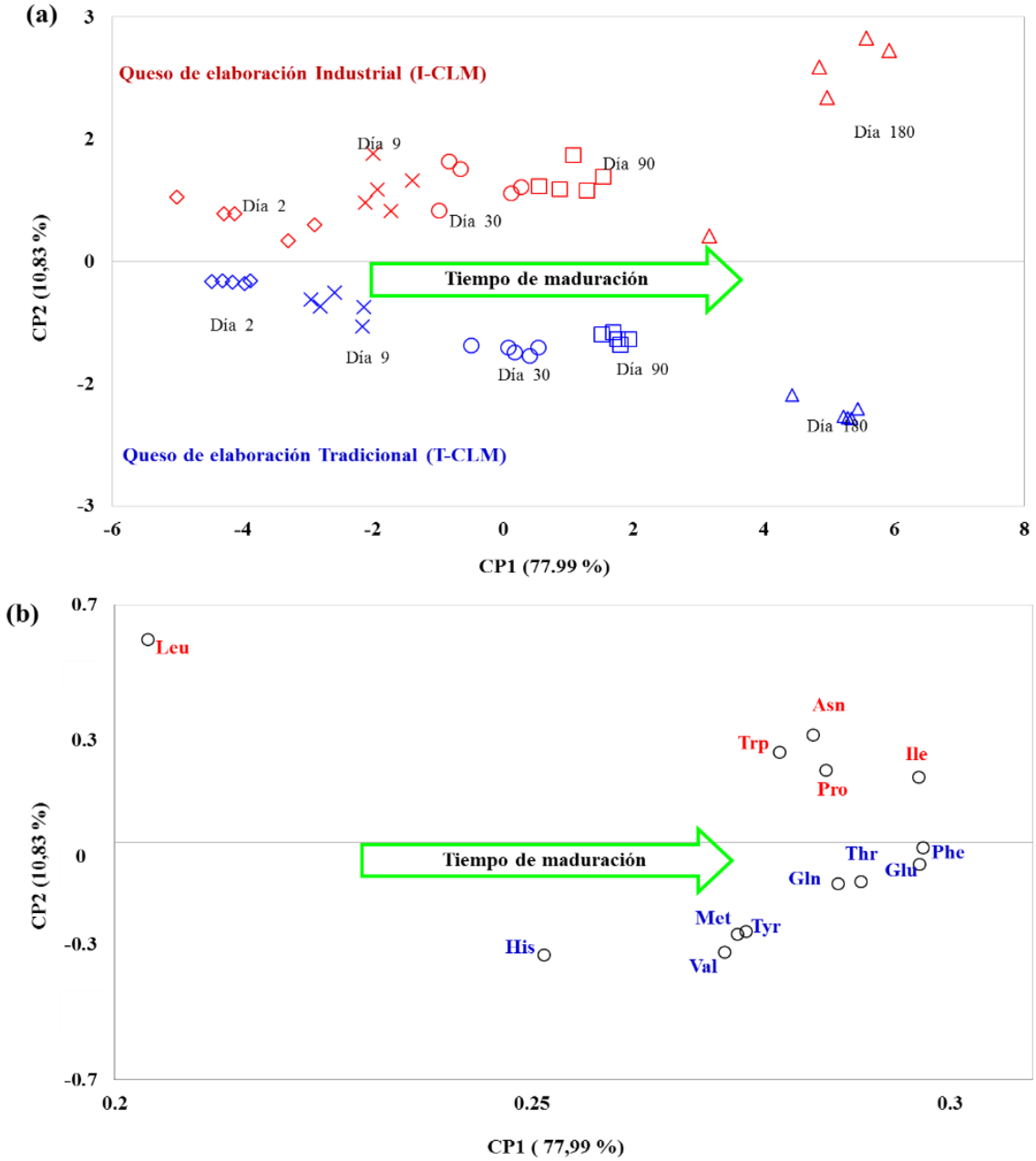


Figura IV.I.3**.4.7.** Distribución de las muestras (**a**) de queso de oveja de Castilla-La Mancha de elaboración industrial (I-CLM) y tradicional (T-CLM) con distintos tiempos de maduración y de los aminoácidos (**b**) sobre los dos primeros Componentes Principales (CP1 y CP2) obtenidos en el Análisis de Componentes Principales no supervisado utilizando regiones espectrales de los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS correspondientes a los aminoácidos (**Tabla** IV.I.3.**4.2**).

Asn: asparagina, Pro: prolina, Ile: isoleucina, Trp: triptófano, Leu: leucina, Val: valina, Thr: treonina, His: histidina, Met: metionina, Phe: fenilalanina, Tyr: tirosina, Gln: glutamina, Glu: ácido glutámico.
CP1= 0,25*Histidina + 0,30*Fenilalanina + 0,28*Triptófano + 0,27*Tirosina + 0,27*Valina + 0,29*Treonina + 0,29*Prolina +0,28*Asparagina + 0,28*Metionina + 0,29*Glutamina + 0,30*acido glutámico + 0,30*Isoleucina + 0,20*Leucina
CP2= -0,33*Histidina + 0,00*Fenilalanina + 0,27*Triptófano - 0,27*Tirosina - 0,32*Valina -0,11*Treonina + 0,21*Prolina +0,32*Asparagina - 0,26*Metionina -0,12*Glutamina- 0,06*acido glutámico + 0,19*Isoleucina + 0,60*Leucina

IV.I.3.4.4. Conclusión

La espectroscopia de ^{1}H-RMN/HRMAS permite, desde el análisis rápido y directo de muestras de queso, obtener un amplio perfil de sus metabolítos ("huella dactilar" de su metaboloma). La combinación de esta espectroscopia con métodos quimiométricos, como el Análisis de Componentes Principales, puede utilizarse para la caracterización de quesos de oveja de pasta prensada elaborados en Castilla-La Mancha y la monitorización del proceso de maduración. Para la clasificación de estos quesos, de acuerdo a su proceso de elaboración y tiempo de maduración, puede utilizarse el conjunto de metabolitos identificados o sólo los aminoácidos detectados en el espectro de ^{1}H-RMN/HRMAS.

IV.I.3.4.5. Bibliografía

Adda, J., Gripon, J.C., and Vassal. L. (1982). The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chemestry*, 9:115-129.

Akalin, S. Gönç, S., and Akbaş, Y (2002). Variation in Organic Acids Content during Ripening of Pickled White Cheese, *Journal of Dairy Science*, 85:1670-1676.

Argüelles, A., Castello, M., Sanz, J., and Fito, P. (2007). Application of SAFES methodology in Manchego-type cheese manufacture. *Journal of Food Engineering*, 83:229-237.

Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Viñas, M.A., and Cabezas L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17:249-255.

Bansal, N., Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. (2007). Factors affecting the retention of Rennet in cheese curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:9219-9225.

Bergamini, C.V., Wolf, I.V., Perotti, M.C., and Zalazar C.A. (2010). Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research*, 94:79-89.

Bevilacqua, A.E., and Califano, A.N. (1992). Changes in organic acids during ripening of Port Salut Argentino cheese. *Food Chemistry*, 43:345-349.

Brescia, M.A., Monfreda, M., Buccolieri, A., and Carrino, C. (2005). Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations. *Food Chemistry*, 89:139-147.

Buffa, M., Guamis, B., Pavía,M., and Trujillo, A.J. (2001). Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *International Dairy Journal*, 11:175-179.

Buffa, M., Guamis, B., Saldo, J., and Trujillo, A. (2004). Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 37:247-253.

Califano, A.N., and Bevilacqua, A.E. (1999). Freezing low-moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. *Food Chemistry*, 64:193-198.

Cevallos-Cevallos, J.M., Reyes-De-Corcuera, J.I., Etxeberria, E., Danyluk, M.D., and Rodrick, G.E. (2009). Metabolomic analysis in food science. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 557-566.

Cifuentes, A. (2009). Food analysis and foodomics. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7109.

Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., and Wilkinson, M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11):841-866

Consonni, R., and Cagliani, L.R. (2008). Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by ^{1}H NMR spectroscopy. *Talanta*, 76:205.

Corzo, N., Villamiel, M., Arias, M., Jiménez-Pérez, S., and Morales, F.J. (2000). The Maillard reaction during the ripening of Manchego cheese. *Food Chemistry*, 71: 255-258.

Driessen, F.M. (1984). Fermented Milks. IDF Bulletin No. 179, Inter. Dairy Federation, Bruselas, Belgica, 107.

Dunn, W.B., Bailey, N.J., and Johnson, H.E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, 130:606-625.

Farkye, N.Y., and Fox, P.F. (1990). Objective indices of cheese ripeing. *Journal of Food Science and Technology*, 1:37-40.

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

Fox, P.F., and. McSweeney, P.L.H. (2004). Cheese: An overview. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., and Guinee, T.P. (Eds). Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. 3rd ed. Vol. 1: General Aspects. (Ed): Elsevier Academic Press, London, UK, pp. 1-18.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., and McSweeney, P.L.H. (2000). Fundamentals of cheese science. (Ed): Aspen Publishers, Maryland, Gaithersburg, pp. 6-587

Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H., and Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In Fox P.F. (Ed.). Cheese: chemistry, physics and microbiology, general aspects 2nd ed. (Ed): Chapman & Hall, London, pp. 415-417.

García-Cañas, V., Simo, C., Herrero, M., Ibañez, E., and Cifuentes A. (2012). "Foodomics: A new omics for a new food era". In: Benkeblia, N. (Ed). Omics Technologies: Tools for Food Science, (Ed): CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 10150-10159.

Garde, S, Gaya, P., Arias, R., and Nuñes, M. (2012). Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of Clostridium spp. isolated from Manchego cheeses with late blowing defect. F*ood Control*, 28(2):392-399.

Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A. and Núñez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: The effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, 73:26-32.

Gianferri, R., Maioli, M., Delfini, M., and Brosio, E. (2007). A low-resolution and highresolution nuclear magnetic resonance integrated approach to investigate the physical structure and metabolic profile of Mozzarella di Bufala Campana cheese. *International Dairy Journal*, 17:167-176.

Gómez, M.J., Rodríguez, E., Gaya, P., Núñez, M. and Medina M. (1999). Characteristics of Manchego Cheese Manufactured from Raw and Pasteurized Ovine Milk and with Defined-Strain or Commercial Mixed-Strain Starter Cultures. *Journal of Dairy Science*, 82:2300-2307.

Gómez-Ruiz, J.A., Ballesteros, C., González Viñas, M.A., Cabezas, L., and Martínez-Castrom, I. (2002). Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Le Lait*, 82:613-628.

González de Llano, D., Polo, C., Ramos, M., and Martín-Alvarez, P. (1991). Free and total amino acids in the non-protein fraction of an artisanal blue cheese during ripening. Z. Lebens. Unters. Forsch.193, 529.

Gripon, J.C. (1993). Mould-ripend cheese in: Fox P.F. (Ed). Cheese Chemistry, Physics and Micobiology. Vol. 2. (Ed): Chapman and Hall. London, UK, pp: 111-136.

Hernández, I., Barrón, L., Virto, M., Pérez-Elortondo, F., Flanagan, C., Nájera, A.I., Albisu, M., and de Renobales, V. (2009). Lipolysis, proteolysis and sensory properties of ewe's raw milk cheese (Idiazabal) made with lipase addition. *Food Chemistry*, 116 (1):158-166.

Hou, J., Hannon, J.A., McSweeney, P.L.H., Beresford, T.P., and Guinee, T.P. (2012). Effect of curd washing on composition, lactose metabolism, pH, and the growth of non-starter lactic acid bacteria in full-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 25:21-28.

Hou, J., McSweeney, P.L.H., Beresford, T.P., and Guinee, T.P. (2014). Effect of curd washing on the properties of reduced-calcium and standard-calcium Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 97:5983-5999.

Izco, J., and Torre, P. (2000). Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the `purge and trap' method and analysed by GC-MS. Food Chemistry, 70: 409-417.

Jiménez, I. (2016). El queso manchego es uno de los más consumidos en España. El queso, de la Mancha. Castilla-La Mancha, revista de información de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. http://revista.jccm.es/index.php?option=com_content&id=1348&Itemid=1605.

Lamanna, R., Piscioneri, I., Romanelli, V., and Sharma, N.A. (2008). Preliminary study of soft cheese degradation in different packaging conditions by ^{1}H-NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46:828-831.

Lamichhane, S., Yde, C., Mielby, L.H, Kidmose, U, Møller, J.R, Hammershøj, M., and Bertram, H. (2014). High-resolution magic-angle spinning studies of semi-hard Danbo (30+) cheese-impact of processing conditions and relation to sensory perception. In: Capozzi, F., Laghi, L., and Belton, P. (Eds). Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance. (Ed): Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp: 171-179.

Lau, K., Barbano, D., and Rasmussen, R. (1991). Influence of Pasteurization of Milk on Protein Breakdown in Cheddar Cheese During Aging[1]. *Journal of Dairy Science*, 74:727-740

Leaver, J., Law, A. J. R., Horne, D. S. y Banks, J. M. (1995). Influence of heating regime and pH on the primary phase of renneting of whole milk. *International Dairy Journal* 5, 129-140.

Lee, M.-R., Johnson M.E., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J.J., and Lucey, J.A. (2011). Effect of different curd-washing methods on the insoluble Ca content and rheological properties of Colby cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 94:2692-2700.

Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2006). Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharmaceutical Research*, 23:1075-88.

Locci, E., Piras, C., Mereu, S., Cesare Marincola, F., and Scano, P. (2011). ^{1}H NMR metabolite fingerprint and pattern recognition of mullet (Mugil cephalus) bottarga. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59:9497-9505.

Lolkema, J.S., Enequist, H., and van der Rest, M.E. (1994). Transport of citrate catalyzed by the sodium-dependent citrate carrier of Klebsiella pneumoniae is obligatorily coupled to the transport of two sodium ions. *European Journal of Biochemistry*, 220:469-475.

Lombardi, A.M., Bevilacqua, A.E., and Califano, A.N. (1994). Variation in organic acids content during ripening of Reggianito cheese in air-tight sealed bags. *Food Chemistry*, 51:221-226.

Mannina, L., Sobolev, A.P., and Viel, S. (2012). Liquid state ^{1}H high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 66:1-39.

Marilley, L., and Casey, M.G. (2004). Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producingstrains. *International Journal of Food Microbiology*, 90:139-159.

Mazzei, P., and Piccolo, A. (2012). ^{1}H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*, 132:1620-1627.

McSweeney, P.L.H., and Fox, P.F. (1993). Cheese: methods of chemical analysis. In: Fox, P.F. (Ed.). Cheese: Chemistry, physics and microbiology (Vol. 1). (Ed): Chapman & Hall, London, pp. 341-389.

McSweeney, P.L.H., Walsh, E.M., Fox, P.F., Cogan, T.M., Drinan, F.D. and Castelo González, M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 33:183-192.

McSweeney, P.L.H., and Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80: 293-324.

McSweeney, P.L.H., and Fox, P.F. (2004). Cheese: methods of chemical analysis. In: Fox, P.F. (Ed.). Cheese: Chemistry, physics and microbiology (Vol. 1). (Ed.): Chapman & Hall, London: pp. 341-389.

Moreno, M., Moreno, A., Gómez, M.V., Poveda, J.M., and Cabezas L. (2011). Study of the Proteolytic and Lipolytic Processes in Manchego Cheese by NMR. In: Renou, J.P., Belton, P.S., Webb, G.A. (Eds). Magnetic resonance in food science: an exciting future. (Ed): Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 54-59.

Najera, A.I., de Renobales, M., and Barron, L.J.R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl2 and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: A multifactorial study. *Food Chemistry*, 80:345-352.

Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (2008). Systems biology – Metabonomics. *Nature*, 455:1054-1056.

Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica*, 29:1181-1189.

Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., and Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16:373-378.

Piras, C., Cesare Marincola, F., Savorani, F., Engelsen, S.B., Cosentino, S., Viale, S., and Pisano, M.B. (2013). A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chemistry*, 141:2137-2147.

Polo, C., Ramos, M., and Sánchez, R. (1985) Free amino acids by High Performance Liquid Chromatography and peptides by gel electrophoresis in Mah on cheese during ripening. *Food Chemistry*, 16:85.

Poveda, J.M., Cabezas, L., and McSweene, P.LH. (2004). Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chemistry*, 84:213-218.

Poveda, J.M., Chicón, R., and 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. *International Dairy Journal*, 47:94-101.

Rodrigues, D., Santos, C.H., Rocha-Santos, T.A.P., Gomes, A.M., Goodfellow, B.J., and Freitas, A.C. (2011). Metabolic profiling of potential probiotic or symbiotic cheeses by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:4955-4961.

Savorani, F., Picone, G., Badiani, A., Fagioli, P., Capozzi, F., and Engelsen, S.B. (2010). Metabolic profiling and aquaculture differentiation of gilthead sea bream by ^{1}H NMR metabonomics. *Food Chemistry*, 120:907-917.

Schmidt, S.J. (2004). Water and Solids Mobility in Foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 48:1-101.

Shintu, L., and Caldareli, S. (2005). High-Resolution MAS NMR and Chemometrics: Characterization of the Ripening of Parmigiano Reggiano Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4026-4031.

Shintu, L., and Caldarelli, S. (2006). Toward the determination of the geographical origin of emmental cheese via high resolution MAS NMR: A preliminary investigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4148-4154.

Sousa, M.J., Ardo, Y., and McSweeney, P.H.L. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11:327-345.

Thomas, T.D. (1985). Role of lactic acid bacteria and their improvement for production of better fermented animal products. *New Zeland Journal of Dairy Science and Technology*, 20:1-10.

Tormo, M., and Izco, J. (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A*, 1033(2):305-10.

Van den Berg, F., Lyndgaard, C.B., Sørensen, K.M., and Engelsen, S.B. (2013). Process analytical technology in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 31:27-35.

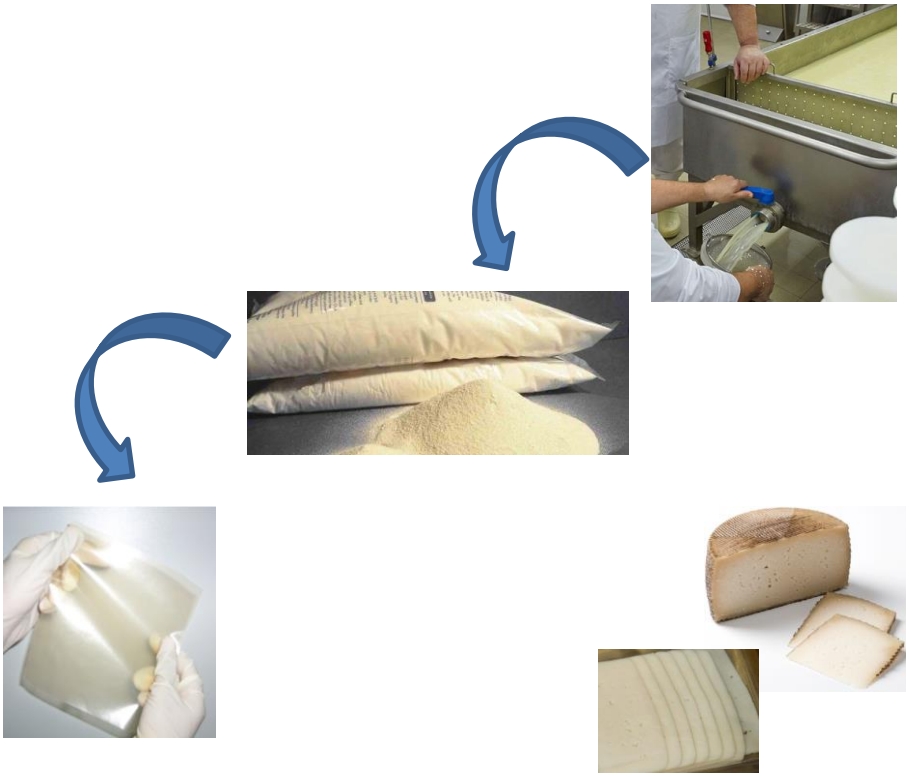
Vélez, M.A., Bergamini, C.V., Ramonda, M.B, Candioti, M.C., Hynes, E.R., and Perotti, C. (2015). Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 64:282-288.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., and Van Boekel, M.A.J.S. (1999). In: P. Walstra, T.J. Geurts, A. Noomen, A. Jellema, M.A.J.S. Van Boekel (Eds). Dairy Technology –Principles of milk properties and processes. (Ed): Marcel Dekker, New York, NY, pp. 485-515.

Wishard, D.S. (2008). Metabolomics: Applications to food science and nutrition research. *Trends in Food & Science Technology*, 19:482-493.

IV.II. EXPERIENCIAS EN PELÍCULAS COMESTIBLES

ALTERNATIVA A OTROS MATERIALES DE ENVASADO



Breve reseña del producto analizado. Planificación del estudio

Las películas comestibles están constituidas por polímeros naturales, siendo completamente biodegradables, no tóxicas para el consumo humano y seguro para el medioambiente. Se definen como una capa delgada de polímero que puede ser consumida y empleada en la superficie de un alimento, que puede aplicarse como capas continuas o utilizarse como cubierta durante su elaboración (Kowalczyc y Baraniak, 2011). Se pueden obtener a partir de biopolímeros que tengan la propiedad de formar películas como los polisacáridos, proteínas y lípidos, los cuales deberían ser previamente dispersos y disueltos en un disolvente, generalmente agua, para posteriormente ser vertidos y secados para obtener el material de envase (Montalvo *et al.*, 2012). Aunque las películas comestibles elaboradas con biopolímeros presentan en general buenas propiedades de barrera, se considera que las elaboradas con proteína son las más efectivas debido a la estructura compleja que se forma como resultado de la interacción de las moléculas proteicas las cuales, dependiendo de su naturaleza (hidrofóbica o hidrofílica), tendrán un efecto diferente en las propiedades de la película. Uno de los tipos de proteínas interesantes en este campo son las correspondientes al suero de quesería o lactosuero (Soininena *et al*., 2013; Kurek *et al*., 2014; Wakai y Almenar, 2015). Los biopolímeros de esta naturaleza que generan son transparentes, flexibles, no aportan sabor ni aroma y a sus propiedades de barrera se unen sus propiedades nutritivas y funcionales. Las proteínas del lactosuero son solubles e incluyen proteínas globulares tales como la β-lactoglobulina, α-lactoalbúmina e inmunoglobulinas (Davies y Law, 1980). En esta etapa de la Tesis Doctoral se estudiaron los siguientes aspectos:

1. *Condiciones de obtención de películas de lactosuero de leche de vaca.* Se analizó el efecto en la formación de los biopolímeros de distintos tratamientos (calor, ultrasonidos y adición de transglutaminasa, sola o combinada).

2. *Propiedades físicas y mecánicas de las películas*. El desarrollo de esta etapa permitió conocer el efecto de las condiciones de obtención de los biopolímeros en las características de los mismos.

3. *Análisis de la estructura de las películas de proteínas de lactosuero por relaxometría de RMN, mono y bidimensional*. Esta metodología ha aportado importante información sobre la estructura de la red proteica y la porosidad del biopolímero.

4. *Estudio de la correlación entre las propiedades físicas, mecánicas y de color de las películas con componentes de los tiempos de relajación transversal y longitudinal obtenidos en el análisis de relaxometría monodimensional*. Esta etapa permitió relacionar características estructurales con propiedades de las películas

5. *Análisis preliminar del potencial de aplicación de las películas de proteínas de lactosuero como material de envasado de quesos*. En esta etapa se estudió la posibilidad de utilizar películas comestibles como material de separación entre porciones de queso de oveja loncheadas para su comercialización como producto listo para su consumo (“ready to eat”, RTE).

Los resultados obtenidos constituyen el Capítulo 5 de esta Tesis Doctoral.

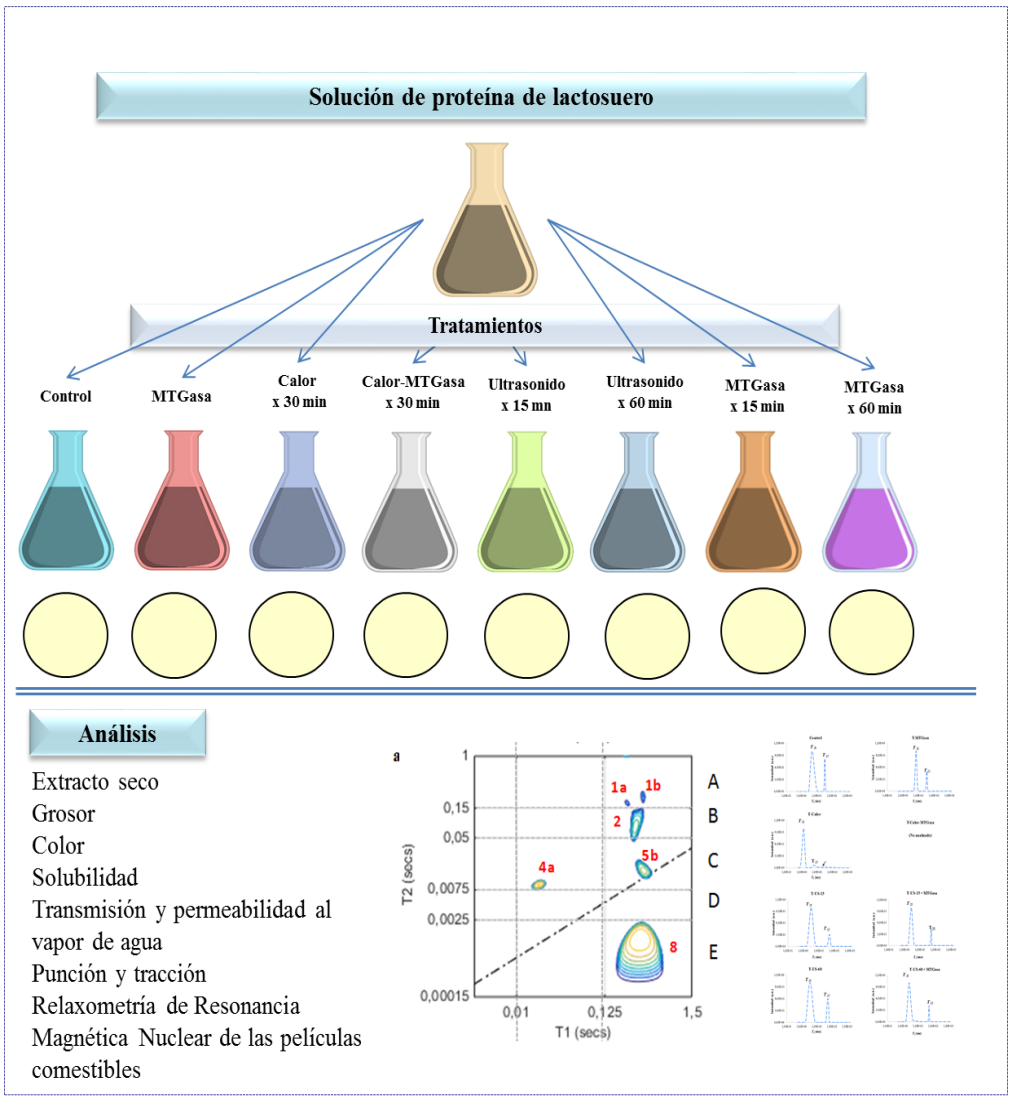
Nota de autor

Es preciso matizar que durante la discusión de los resultados obtenidos mediante relaxometría de RMN se hace referencia en muchas ocasiones a "los protones del agua". En algunas ocasiones esta referencia es un genérico, ya que protones de otras moléculas también contribuyen a la señal de resonancia aunque en menor medida de lo que lo hacen los del agua. Esto es debido a que el agua es el componente que se encuentra en mayor proporción en las películas de lactosuero elaboradas (alrededor del 30 %) y a que su tiempo de relajación transversal (T_2) es mayor (entre 2700-2800 ms para el agua libre) (Manic *et al*., 1998) que la de otros componentes, como el glicerol (alrededor de 10,7) (Frazier, 2006; Magat y Mandyam, 2004) o la grasa (en torno a 165 ms) (Atlas, 2009), por tanto contribución dominante en la señal de resonancia será la que proviene de los protones del agua.

TRABAJO 5

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO

Resumen gráfico



Control Calor Ultrasonidos MTGasa

Resumen

Se ha estudiado el efecto del tratamiento térmico (T-Calor, 82 ºC, 30 min) y de ultrasonidos (35 kHz, dos tiempos, 15 y 60 minutos, T-US-15 y T-US-60) con y sin adición de transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa, 0,75 %) sobre la formación de películas comestibles elaboradas con un concentrado de proteínas de lactosuero bovino (CPS) (80 % de proteína) y glicerol como plastificante (4 %), utilizando como referencia películas elaboradas sin ningún tratamiento (Control). Los preparados de CPS tratados con calor y adicionados con MTGasa presentaron una elevada viscosidad impidiendo su distribución homogénea para la formación de películas y fueron descartados para los posteriores análisis. En las películas se determinaron propiedades generales y mecánicas, atributos de color y se analizó su microestructura por relaxometría de RMN mono (1D) y bidimensional (2D). Las películas T-Calor presentaron los valores más bajos de solubilidad y la mayor resistencia en las pruebas de tracción y penetración así como flexibilidad (mayor capacidad de elongación y de deformación a la penetración). Las películas resultantes del tratamiento con ultrasonidos fueron las más finas, con menor permeabilidad al vapor de agua que las T-Calor y mayor resistencia mecánica que las Control. La incorporación de MTGasa en general produjo un incremento de la resistencia y de la capacidad de deformación en las pruebas de tracción. En el análisis comparativo de los atributos de color se observó que las películas T-Calor presentaron tonalidades con tendencia al rojo (mayor valor a^*) y azul (menor valor b^*), mientras que en las tratadas con ultrasonidos la tendencia fue hacia tonalidades verdosas (menor valor a^*) y amarillas (mayor valor b^*). La incorporación de MTGasa produjo una reducción de la luminosidad (menor valor L^*).

En el análisis de relaxometría monodimencional (1D) de RMN todas las películas presentaron un tiempo de relajación transversal (T_2) con comportamiento bimodal, con una componente de valores más cortos (T_{21}), asociado a los protones fuertemente unidos a la matriz de proteína, y otro con valores de relajación más largos (T_{22}) que corresponderían a protones con una mayor movilidad, y que podría relacionarse con el entorno de hidratación en los poros de la matriz. El tiempo de relajación longitudinal (T_1) de las películas mostró un comportamiento bimodal (T_{11} y T_{13}), con excepción de las T-Calor, en las que fue trimodal. Estas señales permitieron confirmar y complementar la información aportada por T_2. Los valores de T_1 más bajos (señal T_{11}) se relacionaron con los protones de las macromoléculas y de moléculas asociadas más pequeñas (como el agua o el glicerol). La señal T_{11} se situó en los límites de confianza de los parámetros de adquisición, lo que dificultó su uso en el análisis comparativo de las películas. La señal T_{13} correspondería a los protones de las capas de hidratación dentro de los poros de la matriz. Las películas T-Calor presentaron además una señal intermedia, T_{12}, asociada con los intercambios de magnetización en la superficie de los poros y estaría relacionado con las interacciones proteína-agua, proteína-glicerol, y proteína-agua-glicerol. Los parámetros de los distintos componentes de

relajación 1D (valor del máximo, medio y área de la señal) variaron dependiendo del tratamiento aplicado. Ha sido posible obtener coeficientes de determinación significativos ($P < 0,05$) entre los parámetros de RMN y propiedades (generales, mecánicas y de color) de las películas, lo que indicaría el potencial de la relaxometría RMN para estimar el comportamiento de las películas comestibles.

En conjunto, la relaxometría 2D de RMN ha permitido obtener información detallada de la microestructura de las películas comestibles a través de variaciones en el intercambio magnético de los protones de distintos compartimentos. Los mapas T_1-T_2 obtenidos permitieron la caracterización de las películas obtenidas con distintos tratamientos y calcular su porosidad relativa. Los resultados del presente estudio permiten concluir que, en general, las películas de proteína de lactosuero presentan una estructura porosa, constituida por una red proteica y espacios o poros con presencia de agua y glicerol, con distintos grados de interacción entre los componentes dependiendo del tratamiento previo aplicado. Las películas procedentes del tratamiento térmico presentaron la estructura más compacta, con mayor grado de interacción proteína-proteína, menor porosidad relativa y señales de RMN compatibles con la interacción proteína-plastificante. Las películas resultantes del tratamiento ultrasónico presentaron una porosidad relativa tanto mayor cuanto más largo fue el tratamiento aplicado. La incorporación de MTGasa produjo una reducción de la porosidad y un incremento de las interacciones de la red proteica.

No se han encontrado referencias de uso de la relaxometría de RMN para el análisis de películas comestibles o sistemas similares. Los resultados obtenidos indican el potencial de esta metodología, mono y bidimensional, para el análisis no destructivo de estas estructuras.

Por su menor solubilidad y mayor resistencia mecánica, las películas T-Calor podrían utilizarse en la comercialización de quesos loncheados como material de separación entre unidades. En ensayos preliminares realizados en este trabajo se probó la posibilidad del comportamiento de estas películas. El resultado fue similar al de materiales comerciales utilizados para este fin.

IV.II.1. **TRABAJO 5. Elaboración y caracterización de películas comestibles de proteínas de lactosuero**

IV.II.1.**5.1. Introducción**

El interés surgido por la elaboración de películas comestibles tiene sus raíces en los intentos de desarrollar envases fácilmente degradables y no agresivos con el medio ambiente, que contribuyan a incrementar la calidad de los alimentos y ofrezcan nuevos mercados para los materiales utilizados en su fabricación (Chen, 1995; Koelsch, 1994; Chambi y Grosso, 2006). Los biopolímeros derivados de productos naturales, especialmente de origen alimentario, ofrecen las mayores oportunidades dado que su biodegradación y su compatibilidad medioambiental están asegurados (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997). Con este fin, se han utilizado proteínas de diversos tipos y origen (Song *et al*., 2013; Condés *et al*., 2015; Xu *et al*., 2015; González *et al*., 2015; Nuanmano *et al*., 2015) incluyendo los lactosueros (Soininena *et al*., 2013; Kurek *et al*., 2014; Wakai y Almenar, 2015).

Las películas elaboradas con proteína pueden complementar el valor nutritivo de los alimentos (Gennadios y Weller, 1990). Sin embargo, la pobre resistencia al vapor de agua de estos biomateriales y su resistencia mecánica más baja que la de los polímeros sintéticos limitan su aplicación en el envasado de alimentos. Para mejorar las características de estas películas se han aplicado distintos tratamientos, como el calentamiento (Condés *et al*., 2013; Schmid *et al*., 2014) y los ultrasonidos (Wang *et al*., 2013; Fan *et al*., 2014).

El tratamiento térmico conduce a la desnaturalización parcial de las proteínas y favorece la interacción entre las cadenas polipeptídicas, incrementando la resistencia y la impermeabilidad a los gases de las películas resultantes. Otra estrategia utilizada para favorecer la formación de biopolímeros proteicos es la adición de transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa). Esta enzima permite el establecimiento de enlaces covalentes entre grupos glutamina y lisina, mediante una reacción de acil-transferencia entre el grupo γ-carboxiamida de un péptido con un residuo de glutamina (acil dador) y el grupo ε-amino de un péptido con un residuo de lisina (acil receptor), resultando una unión isopeptídica ε-(γ-glutamin)-lisina (Folk y Finlayson, 1977; Folk, 1980), lo que llevó a

pensar que la TGasa podía modificar el comportamiento de los sustratos proteicos (Whitaker, 1977; Nielsen, 1995; Weng y Zheng, 2015).

Para estudiar la estructura de las películas comestibles se ha utilizado fundamentalmente la microscopia electrónica de barrido (Xú *et al*., 2013). Sin embargo, la información aportada es limitada. En los últimos años se ha utilizado la relaxometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para obtener información de la microestructura de distintos sistemas proteicos o analizar el efecto de distintos tratamientos (Haiduc y Duynhoven, 2005; Hernández-Sánchez *et al*., 2007; Bertram *et al*., 2006). En este campo cabe mencionar su aplicación al estudio de la incorporación de transglutaminasa a proteínas miofibrilares de origen porcino (Han *et al*., 2009), al análisis del proceso de maduración, o de la salazón y cocinado (Wu *et al*., 2006) de la carne. Los tiempos de relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1) obtenidos en el análisis de relaxometría se han utilizado para investigar la movilidad del agua en el queso Mozzarella y en diversas matrices proteicas (Gianferri *et al*., 2007) y sistemas alimentarios (Chen *et al*., 1997; Ruan *et al*., 1997; Schmidt, 1990).

La relaxometría de RMN se considera además una herramienta muy útil en el estudio de medios porosos ya que proporciona información de la interacción entre la matriz y el fluido que llena los poros de dicho medio (Fantazzini, 2005). En este contexto, la porosidad se define como la relación existente entre el volumen que ocupan los poros y el volumen total de la muestra. En el caso de muestras no uniformes se puede definir una porosidad local como el volumen ocupado por los poros en una región de interés (ROI) frente al volumen total de dicha ROI. Sin embargo, puede ocurrir que dos regiones diferentes posean la misma porosidad local, es decir, los poros ocupen el mismo volumen por unidad de volumen, pero el tamaño de los poros sea muy diferente.

La relaxometría de RMN puede emplearse para distinguir estos dos tipos de porosidad debido a la conexión que existe entre el tamaño de los poros y los tiempos de relajación de RMN. La relaxometría de RMN, en combinación con la IRM, se ha empleado para calcular la microporosidad y su distribución espacial en manzanas y tomates (Musse *et al*., 2010). Aunque quizás el campo en el que la porosidad calculada mediante relaxometría de RMN ha encontrado su mayor aplicación es el estudio de diversos tipos de piedras (Borgia *et al*., 2001; Schoenfelder *et al*., 2008; López-Arce *et al*., 2010) y materiales cerámicos (Viola *et al*., 2006; Tudisca *et al*., 2011) y está establecida como una

medida estándar en petroquímica para la medida de la cantidad de agua y petróleo en los medios porosos (Edwards, 2011).

Recientemente se ha realizado un gran avance en las técnicas de relaxometría de RMN mediante el desarrollo de algoritmos rápidos para la resolución de la transformada inversa de Lapalace bidimensional (Song *et al*., 2002). Esto ha posibilitado la obtención de espectros de relaxometría de RMN bidimensionales T_1-T_2, los cuales permiten extender la información a un plano bidimensional. Mediante los mapas de relaxometría es posible ampliar la información de las distribuciones monodimensionales, por ejemplo, compartimentos que tienen los mismos valores T_2 podrían ser diferenciados en base a las diferencias en T_1 (Venturi y Hills, 2010). Esta extensión es de algún modo análoga a la extensión de los espectros de RMN 1D de alta resolución a la espectroscopía de RMN multidimensional.

El poder de resolución de un espectro T_1-T_2 de RMN es especialmente valioso en el estudio de sistemas complejos y heterogéneos, tanto en una escala macroscópica como microscópica (Venturi y Hills, 2010). La relaxometría 2D-RMN ha demostrado su eficacia en el análisis de la harinosidad de la manzana (Marigheto *et al*., 2008), la calidad del aguacate (Marigheto *et al*., 2005), el efecto del almacenamiento en atmósferas controladas en la calidad de la granada (Zhang y McCarthy, 2013), el pardeamiento interno de peras (Hernández-Sánchez *et al*., 2007) y la distribución de los gránulos de almidón en las patatas (Hills *et al*., 2005). Dada la novedad de relaxometría de RMN 2D, hasta donde el autor conoce, todavía no se ha utilizado para analizar la estructura de películas comestibles.

El objetivo del presente trabajo fue elaborar películas comestibles a partir de proteínas de lactosuero bovino utilizando distintos tratamientos (calor, ultrasonidos y MTGasa) y estudiar su microestructura mediante relaxometría de RMN (mono- y bidimensional) para establecer su relación con las características generales (permeabilidad, solubilidad etc.), comportamiento mecánico (resistencia y deformación a la punción y tracción) y atributos de color. Se pretende obtener películas comestibles que puedan utilizarse como material de envase para quesos, con una naturaleza similar a la del producto comercializado (proteínas de leche).

IV.II.1.5.2. Material y métodos

IV.II.1.5.2.1. Producción de películas comestibles con proteínas de lactosuero

Como se ha mencionado en el **Punto** III.**4.1**, para la elaboración de las películas comestibles se empleó el producto "Protarmor 800" (Armor Proteines, Saint-Brice en Coglès Francia), que es un concentrado de proteínas de suero lácteo bovino (CPS) con un contenido proteico del 80%. Los demás componentes fueron: 4% agua, 3,5% cenizas, 3,5% grasa y 9% lactosa. A partir de este CPS se preparó una dispersión con una concentración del 8% de proteína (p/p) y glicerol en proporción 2:1 proteína: plastificante, como se indica en el **Punto** III.**4.2** del **Apartado** de Material y Métodos.

Tabla IV.II.1.**5.1**. Condiciones de elaboración, denominación y comportamiento de las películas comestibles de proteínas de lactosuero.

Tratamiento aplicado a la solución de proteína de lactosuero*	**Adición de MTGasa** (g/100 g de solución*)	**Denominación**	**Comportamiento en la formación de película**	**Viabilidad para la fabricación de películas**
Sin tratamiento	**0**	**Control**	Películas fuertemente adherida al material de soporte	**Si**
	0,75	**T-MTGasa**		**Si**
Tratada con calor (82 ºC , 30 min)	**0**	**T-Calor**	Película resistente y fácil de desprender del material soporte	**Si**
	0,75	**T-Calor-MTGasa**	Líquido muy viscoso. Difícil de extender. No viable formación de	**No**
Ultrasonidos (25 ºC, 15 min)	**0**	**T-US-15**	Película resistente. Adheridas al material soporte pero es posible su separación	**Si**
	0,75	**T-US-15+MTGasa**		**Si**
Ultrasonidos (25 ºC, 60 min)	**0**	**T-US-60**	Película resistente. Adheridas al material soporte pero es posible su separación	**Si**
	0,75	**T-US-60+MTGasa**		**Si**

* Solución acuosa con un 8 % de proteína de lactosuero (concentrada al 80%) y 4% de glicerol
El tratamiento térmico se efectuó en baño de agua

La solución inicial se dividió en 8 lotes de 125 g de solución/lote, los cuales se sometieron a distintos tratamientos (sin tratamiento, calor, ultrasonidos durante 15 y 60 minutos y posterior adición o no de MTGasa) como se describe en el **Punto** III.**4.2** del **Apartado** de Material y Métodos de esta Memoria. La **Tabla** IV.II.1.**5.1** muestra los distintos procedimientos utilizados. Las soluciones (8,57 g) se extendieron en placas de Petri (de 9 cm de diámetro), utilizadas como material soporte, se secaron en una estufa por convección de aire a 35 °C durante 18 horas y posteriormente se mantuvieron en un

desecador con una humedad relativa (HR) de 50% durante 96 h (véase **Punto** III.**4.2**). Al cabo de este tiempo, las películas se cortaron y despegaron de las placas de Petri y se almacenaron durante 48 horas con 50 ± 5 % de HR. Todos los experimentos se realizaron por triplicado

V.II.1.5.2.2. Propiedades y características de las películas comestibles con proteínas de lactosuero

Como se indica en la **Tabla** IV.II.1.**5.2** en cada película se determinó el extracto seco (ES), el grosor y la solubilidad, siguiendo los procedimientos descritos en el **Punto** III.**4.3** del **Apartado** de Material y Métodos. Como propiedades de barrera (**Punto** III.**4.3.4**) se calcularon la transmisión (WVT) y la permeabilidad (WVP) al vapor de agua (Muñoz *et al*., 2012; Gontard *et al*., 1993; ASTM, 1993). Para valorar el comportamiento mecánico, en pruebas de punción se determinaron los parámetros de resistencia a la perforación o fuerza de punción y deformación a la punción, mientras que en ensayos de tracción se obtuvieron la fuerza de tracción al máximo o resistencia a la tracción en el máximo, y el porcentaje de elongación a la rotura. La forma de proceder, en todos los casos, se ajustó a las indicaciones que se encuentran en el **Punto** III.**4.3.5**.

Los atributos de color (**Tabla** IV.II.1.**5.2**) se determinaron utilizando un espectrofotómetro de esfera (X-rite Inc., modelo SP60, Michigan, EE.UU), cuyas características y forma de proceder se indican en el **Punto** III.**4.3.6**. En todas las películas se determinaron las siguientes coordenadas del espacio CIE L*a*b* (CIE, 1976) del color: *L** (luminosidad), *a** (tendencia al rojo-verde) y *b** (amarillo-azul). Asimismo se calcularon los valores *C** (croma o saturación), H* (tono angular o matiz) y de diferencias de color (ΔE*). También se determinó la opacidad de las películas.

Tabla IV.II.1.**5.2.** Características y propiedades determinadas en las películas comestibles de proteínas de lactosuero.

	Parámetro	Denominación	Unidades	Procedimiento
Propiedades Generales	Extracto seco	E.S	g/100g	Perdida de peso por desecación (105 ºC, 24 h).
	Grosor		micras	Medida con un micrómetro electrónico.
	Solubilidad		%	Procedimiento descrito por Muñoz *et al*., (2012).
	Permeabilidad	WVP	g mm /kPa h m^2	Método gravimétrico descrito por Muñoz *et al*. (2012), basado en el reseñado por Gontard *et al*. (1993) y éste en el procedimiento ASTM E96-93 (ASTM, 1993).
	Transmisión	WVT	g/h m^2	Método gravimétrico descrito por Muñoz *et al*. (2012), basado en el reseñado por Gontard *et al*. (1993) y éste en el procedimiento ASTM E96-93 (ASTM, 1993).
Propiedades Mecánicas	Carga máxima		N	Prueba de tracción Fuerza máxima registrada (Carneiro -da-Cunha *et al*., 2009; Osés *et al*., 2009).
	Resistencia a la tracción en el máximo. Fuerza tensil al máximo	TS	MPa	Prueba de tracción. Carga máxima / área de la sección transversal de la película.
	Porcentaje de elongación a la rotura. Elongación de rotura	EB	%	Prueba de tracción. Longitud final en el punto de rotura / longitud inicial de la muestra * 100.
	Resistencia a la perforación. Fuerza de punción	PS	MPa	Prueba de puntión. Fuerza máxima/ área de sección transversal de la película expuesta.
	Deformación a la punción	PD	%	Prueba de punción. De acuerdo con la ecuación descrita por Gontard*et al*. (1993).
Atributos de Color	Luminosidad	L*	s.d.	Determinado en un espectrofotómetro de esfera (X-rite Inc., modelo SP60, Michigan, EE.UU), Figura III.7.
	Tendencia al rojo-verde	a*	s.d.	Determinado en un espectrofotómetro de esfera (X-rite Inc., modelo SP60, Michigan, EE.UU), Figura III.7.
	Tendencia al marillo-azul	b*	s.d.	Determinado en un espectrofotómetro de esfera (X-rite Inc., modelo SP60, Michigan, EE.UU), Figura III.7.
	Diferencias de color	ΔE^*	s.d.	$\Delta E^*_{ab} = [\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2]^{1/2}$
	Opacidad		%	Opacidad (Y). Y (%) = (Y_b / Y_w) x 100
	Croma o Saturación	C*	s.d.	$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, Figura III.7.
	Tono o Matiz	H*	º	Ángulo del tono. H* = arco tangente (b*/a*), Figura III.7.

El procedimiento seguido para las distintas determinaciones se especifica en el **Punto** III.**4.3** del **Apartado** Material y Métodos de esta Tesis Doctoral.

IV.II.1.**5.2.3. Análisis de la microestructura de las películas comestibles mediante relaxometría de RMN**

Como se describe en los **Puntos** III.**3.3.1** y III.**4.4** del **Apartado III**, los experimentos de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker BIOSPEC 47/40 (BrukerGmBH, Ettlingen, Alemania) del CAI de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico de la UCM.

Para la obtención de las distribuciones monodimensionales de T_2 y T_1 se emplearon secuencias Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Carr y Purcell, 1958; Meiboom y Gill, 1958). Para la obtención del tiempo de relajación transversal T_2 se empleó una secuencia CPMG de múltiples ecos (Esquema A de la **Figura** IV.II.**5.1**). Para ello se fijó el tiempo de repetición (TR) a 6 s, el cual permite la relajación total de la señal de resonancia, y se adquirieron 512 ecos con un tiempo eco (TE) que varió linealmente desde 1 ms hasta 512 ms. En el caso del tiempo T_1 la secuencia CPMG fue precedida de un pulso de inversión (Esquema B de la **Figura** IV.II.**5.1**). En este caso se tomó un único eco en cada adquisición y se hizo variar el tiempo de inversión (TI) en cada una de ellas. Se fijó el TR a 6 s y el TE a 2 ms y se varió el TI desde 5 ms hasta 5s con una distribución logarítmica. En total se adquirieron 128 ecos con diferentes TI. Las curvas de distribución de T_2 y T_1 se calcularon empleando el programa Upenwin (Università di Bologna, Bolonia, Italia).

Para la obtención de los mapas bidimensionales (2D) de los tiempos de relajación T_1 y T_2 se empleó una secuencia CPMG de múltiples eco con un pulso de inversión previo a la secuencia (Esquema C de la **Figura** IV.II.**5.1**). En este experimento se hizo variar dos tiempos, el TE y el TI, de modo que para cada TI se adquirió una serie de ecos a diferentes TE. En nuestro caso para cada tiempo de inversión se adquirieron 512 ecos con un tiempo de eco entre cada eco de 2 ms. Se adquirieron en total 128 tiempos de inversión diferentes que fueron desde 5 ms hasta 5 s con una distribución logarítmica. Los datos así obtenidos se reordenaron en una matriz bidimensional y se aplicó una transformada inversa de Laplace 2D (Song *et al*., 2002; Callaghan *et al*., 2007) empleando un programa escrito en Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, Estados Unidos).

La porosidad de las muestras, definida como el volumen relativo que ocupan los poros frente al volumen total de la muestra, se calculó empleando las distribuciones de los tiempos de relajación obtenidos mediante la secuencia bidimensional. En este caso el volumen de los poros corresponden a la integral total del espectro T_1-T_2. Para obtener un valor comparable entre las películas, las curvas adquiridas mediante la secuencia IR-CPMG [esquema (C) de la **Figura** IV.II.1.**5.1**] se normalizaron a 1 antes de la realización de la transformada inversa de Laplace 2D.

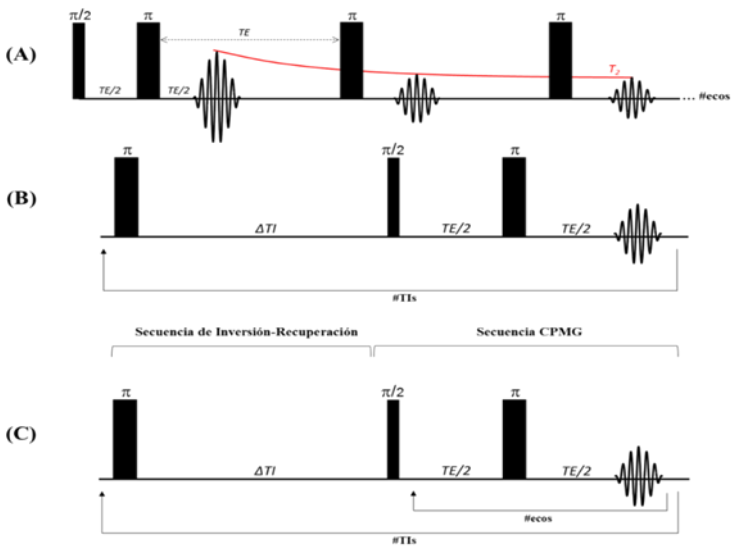


Figura IV.II.1.**5.1.** Representación de las secuencias Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) y de inversión-recuperación para el análisis de los componentes de los tiempos de relajación: (A) Secuencia CPMG de múltiples ecos para la obtención del T_2; (B) Secuencia de inversión-recuperación para la obtención de T_1; (C) secuencia de inversión-recuperación de múltiples ecos para los ensayos de relaxometría bidimensional.

IV.II.1.5.2.4. Análisis preliminar de películas comestibles como material de envasado para la comercialización de quesos

Como se indica en el **Punto** III.**4.5** de esta memoria se realizó un primer estudio de la viabilidad de uso de las películas de proteínas de lactosuero como material de separación entre lonchas de quesos para su comercialización como producto RTE. En este estudio preliminar se evaluó el comportamiento de 108 lonchas superpuestas con interposición de una película comestible (3 superficies superpuestas x 4 envases x 3 evaluadores x 3 experiencias) y los resultados se compararon con los obtenidos por un mismo número de lonchas separadas por un material comercial (véase **Punto** III.**4.5**). El estudio se realizó con queso Manchego de tres meses de maduración.

IV.II.1.5.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos relativos a las propiedades de las películas comestibles se efectuó con el programa estadístico SPSS versión 19.0.0 para Windows (2010; SPSS Inc., Chicago, USA). Las diferencias significativas entre los tratamientos se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía (véase **Punto** III.**5**). La comparación de medias de los datos obtenidos en los distintos tratamientos utilizados para la obtención de las películas comestibles (**Tabla** IV.II.1.**5.1**) se realizó mediante el test de Rango Múltiple

de Duncan. Las comparaciones de medias entre las muestras no tratadas (Control) y las tratadas por ultrasonidos (T-US), las muestras sin y con adición de transglutaminasa (MTGasa) y entre las películas tratadas con ultrasonidos a diferentes tiempos (15 y 60 min) se realizaron mediante un "t de student" (t-test) para muestras independientes, con unos niveles de significancia del 5, 1 y 0,1%.

El análisis de regresión lineal simple para obtener el coeficiente de determinación (R^2) entre los parámetros de relaxometría (véase **Figura** III.**2**) y las propiedades de las películas (**Tabla** IV.II.1.**5.2**) se realizó utilizando el test de Durbin-Watson, estableciendo un nivel de confianza del 95% (**Punto** III.**5**).

Los resultados se expresaron como valores medios de tres experimentos distintos con su desviación estándar.

IV.II.1.5.3. Resultados y discusión

IV.II.1.5.3.1. Elaboración de películas comestibles a partir de proteínas de lactosuero

De los ocho tratamientos aplicados a las soluciones de proteína de suero de leche de vaca (**Tabla** IV.II.1.**5.1**), sólo en el caso de las tratadas con calor y adicionadas con MTGasa (T-Calor-MTGasa) no fue posible su distribución homogénea en las placas de Petri utilizadas como material de soporte. La incorporación de la MGTasa (0,75 g/100 g de solución) produjo rápidamente un intenso incremento de la viscosidad que dificultó la extensión de la solución. Este hecho se debió a que, como es sabido, esta enzima cataliza el establecimiento de enlaces covalente entre grupos glutamina y lisina (Nielsen, 1995; Weng y Zheng, 2015) conduciendo a un incremento del entrecruzamiento entre las cadenas polipeptídicas y al consiguiente aumento de la viscosidad de la solución proteica impidiendo que fluyera adecuadamente, tal y como ya se ha descrito en aislados de proteínas de suero por otros autores (Schmid *et al.*, 2014). Para la formación de una película es necesario que la solución de partida fluya para que pueda ser aplicada a superficies planas (por vertido, rociado o paso por rodillos) para su posterior secado (Ghanbarzadeh *et al.*, 2007). Este hecho llevó a que se descartara el empleo del procedimiento T-Calor-MTGasa en las siguientes experiencias. Aunque es probable que la incorporación de inferiores concentraciones de MTGasa a las soluciones de proteína de lactosuero tratadas con calor llevara a un menor incremento de la viscosidad no se

contempló esta posibilidad dado que se pretendía comparar resultados con otros tratamientos (Control y US) con la misma adición de MTGasa.

IV.II.1.**5.3.2. Características, propiedades mecánicas y atributos de color de las películas comestibles de proteínas de lactosuero**

Las películas sin tratar (Control) fueron las más difíciles de despegar de las placas de Petri, mejorando este aspecto al añadir la enzima (T-MTGasa), al aplicar ultrasonidos (T-US) y con el tratamiento térmico (T-Calor). La aplicación de ultrasonidos no imposibilitó, en ningún caso, la realización de las determinaciones de las características mecánicas, en contraposición a las indicaciones de otros autores (Liu *et al*., 2004).

La **Tabla** IV.II.1.**5.3** muestra los resultados obtenidos en la determinación de la permeabilidad al vapor de agua, la solubilidad en agua, el grosor y el extracto seco de las películas del concentrado de proteínas de lactosuero bovino (CPS) sin tratar, sometidas a tratamiento térmico o de ultrasonidos, con y sin la adición de transglutaminasa (MTGasa).

No se observaron efectos significativos ($P > 0,05$) de los distintos tratamientos respecto a la transmisión de vapor de agua (WVT) de las películas. Sin embargo, sí existieron diferencias significativas en la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las muestras. En general, las películas procedentes de soluciones tratadas por calor (T-Calor) mostraron los valores más elevados ($P < 0,05$) mientras que las películas obtenidas con ultrasonidos presentaron los valores más bajos de permeabilidad. De acuerdo a este atributo las películas pueden ordenarse de mayor a menor valor como sigue: T-Calor ≥ T-MTGasa ≥ Control ≥ T-US-15 = T-US-15+MTGasa = T-US-60+MTGasa ≥ T-US-60.

Las películas obtenidas con tratamiento ultrasónico (con o sin MTGasa) mostraron una permeabilidad similar ($P > 0,05$). Cuando se comparó la permeabilidad de las películas sonicadas con el comportamiento de las muestras sin tratamiento (Control y T-MTGasa), sólo se hallaron diferencias ($P < 0,05$) respecto a las muestras T-MTGasa. Las muestras sonicadas durante 60 minutos sí se diferenciaron significativamente de todas las películas sin tratamiento. Cuando se compararon conjuntamente las películas sin tratar con las sonicadas, mediante el T-test, las diferencias fueron muy significativas ($P < 0,001$). En cambio, no se observó ninguna diferencia debida a la acción de la transglutaminasa en las películas respecto a este parámetro (sin MTGasa *versus* con MTGas, $P > 0,05$). Los valores de permeabilidad de todas las películas elaboradas en este trabajo fueron inferiores

a los citados por otros autores para películas de CPS tratadas térmicamente y mediante ultrasonidos (Banerjee *et al*., 1996; Krochta, 2002).

Respecto a otras películas de proteínas tratadas térmicamente, estas diferencias con los datos recogidos por Krochta (2002) pueden deberse a que las soluciones proteicas fueron tratadas térmicamente en distintas condiciones o a que los películas estaban elaborados con aislados de proteínas de suero, que poseen un contenido en lípidos más bajo que los concentrados; la presencia de lípidos en las películas proteicas disminuye su permeabilidad al vapor de agua. Las diferencias en permeabilidad de las películas de proteína tratadas con ultrasonidos pueden atribuirse a que otros autores (Banerjee *et al.*, 1996) emplearon ultrasonidos con mayores frecuencias y menor poder acústico, lo que pudo provocar cambios distintos en las moléculas proteicas.

La solubilidad en agua de las películas sólo se vio afectada por el tratamiento térmico, siendo significativamente inferior ($P < 0,05$) en las películas calentadas en relación a todas las demás. La desnaturalización térmica de las proteínas modifica su estructura tridimensional, exponiendo los grupos SH enterrados en el interior de las moléculas y permitiendo la formación de enlaces covalentes disulfuro intermoleculares; estos enlaces están relacionados con la insolubilidad de los película de proteínas de suero (Pérez-Gago y Krochta, 1999). La solubilidad en agua de las películas tratadas por el calor fue superior, y la de las películas no tratadas similar, a los valores citados por otros autores (Krochta, 2002). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la composición de los productos de proteínas de lactosuero utilizados (concentrados o aislados) y también con las condiciones del tratamiento térmico aplicado.

El grosor de las películas se vio influido por los distintos tratamientos. Así, las películas que mostraron un mayor grosor fueron las T-MTGasa y las T-Calor, aunque no se detectaron diferencias significativas entre éstas últimas y el Control. El tratamiento de ultrasonidos dio lugar a películas significativamente más delgadas que las demás sin que la incorporación de MTGasa modificara este aspecto.

Tabla IV.II.1.**5.3.** Transmisión al vapor de agua (WVT) y permeabilidad al vapor de agua (WVP), solubilidad, grosor y extracto seco de las películas comestibles elaboradas con lactosuero

Tratamiento aplicado*	**WVT** (g/h m2)	**WVP** (g mm/kPa h m2)	**Solubilidad** (%)	**Grosor** (micras)	**Extracto seco** (g/100 g)
Control	22,18 ± 2,3	1,03 ± 0,2 b,c	98,39 ± 3,6 a	108,80 ± 5,11 b	70,61 ± 0,90 d
T-MTGasa	21,86 ± 1,4	1,12 ± 0,1 a,b	97,01 ± 1,5 a	119,80 ± 5,36 a	72,39 ± 0,55 b,c
T-Calor	23,95 ± 2,1	1,21 ± 0,1 a	60,40 ± 14,2 b	111,90 ± 9,48 a,b	74,40 ± 0,53 a
T-US-15	24,41 ± 1,7	0,88 ± 0,1 c,d	99,90 ± 0,1 a	87,40 ± 2,85 c	72,58 ± 0,38 b,c
T-US-60	20,53 ± 0,8	0,74 ± 0,0 d	99,90 ± 0,1 a	88,15 ± 2,11 c	71,91 ± 1,26 c,d
T-US-15+MTGasa	22,53 ± 2,4	0,89 ± 0,1 c,d	99,80 ± 0,3 a	91,30 ± 0,58 c	74,22 ± 0,45 a
T-US-60+MTGasa	24,14 ± 1,9	0,88 ± 0,1 c,d	99,91 ± 0,2 a	85,80 ± 5,76 c	73,50 ± 1,01 a,b
Control *vs* T-US	ns	***	ns	***	*
Sin MTGasa *vs* Con MTGasa	ns	ns	ns	ns	**

* Denominación como se indica en la **Tabla** IV.II.1.**5.1**.

a, b, c, d: valores en la misma columna con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tratamiento aplicado.

Control vs T-US: Películas sin tratamiento *versus* películas resultantes de la aplicación de ultrasonidos.

Sin MTGasa *vs* Con MTGasa: Películas obtenidas sin adición de MTGasa *versus* Películas obtenidas con incorporación de MTGasa.

MTGasa: transglutaminasa de origen microbiano.

ns: no significativo ($P \geq 0,05$); *$P < 0,05$; **$P < 0,01$; ***$P < 0,001$

En cuanto al contenido en extracto seco, los valores más bajos se encontraron en las películas Control mientras que las T-Calor o tratadas con ultrasonidos y adicionadas con MTGasa presentaron los más altos. De acuerdo a su extracto seco, las películas elaboradas pueden ordenarse de mayor a menor valor como sigue: T-Calor = T-US-15+MTGasa = T-US-60+MTGasa ≥ T-MTGasa = T-US-15 ≥ T-US-60 ≥ Control. De acuerdo con los resultados de la comparación mediante t-test entre Control y T-US, el tratamiento de ultrasonidos incrementó significativamente el extracto seco de las películas respecto a las no tratadas, al igual que la adición de MTGasa (muestras sin MTGasa *versus* con MTGasa), independientemente de que las soluciones proteicas recibieran o no tratamiento.

Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento térmico y la adición de MTGasa producen un incremento del extracto seco de las películas obtenidas. El bajo extracto seco de las muestras Control podría estar relacionado con la escasa organización estructural de esta película, en la que el agua seguiría siendo el vehículo de suspensión de las proteínas, en una dispersión o solución hiperconcentrada durante el proceso de secado. Esta película presentaría más cantidad de agua por unidad de peso y en consecuencia menor porcentaje de extracto seco. Sin embargo, la aplicación del tratamiento, térmico o ultrasónico, y/o la adición de MTGasa, facilitaría, por la desnaturalización de las proteínas o por la acción enzimática, la estructuración de la matriz proteica estableciéndose interacciones proteína-proteína y proteína-agua. Durante el secado de estas películas se produciría la perdida de agua no ligada a la estructura y la forma final tendría menos agua que el Control y por tanto mayor extracto seco.

De forma similar, las modificaciones en los atributos de las películas anteriormente citados pueden relacionarse con diferentes características estructurales y químicas de sus componentes, principalmente de las proteínas, que afectan a su interacción con las moléculas de agua, y que se ven afectadas por los pre-tratamientos que puedan sufrir las soluciones. Los tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 70ºC producen desplegamientos de las cadenas proteicas, ocasionando diferentes grados de desnaturalización en función de su intensidad; esto hace que determinados grupos químicos de las proteínas globulares (SH, grupos hidrofóbicos) se expongan y sean capaces de reaccionar, dando lugar a enlaces inter- e intramoleculares durante la fase de secado de las películas. En el caso de las proteínas del lactosuero, como la β-lactoglobulina (la más abundante en los concentrados bovinos), grupos SH ocultos en la forma nativa se ven expuestos por los cambios inducidos por el calor y después forman enlaces disulfuro

durante la fase de secado (Shimada y Cheftel, 1989; McHugh y Krochta, 1994). Algo similar sucede en la formación de geles térmicos, en los que también se ha descrito el establecimiento de interacciones no covalentes, como enlaces hidrofóbicos, de hidrógeno e iónicos. (Havea *et al*., 2004). Por otra parte, las proteínas de lactosuero nativas tienen buenas propiedades para la formación de películas; incluso si no se aplican tratamientos térmicos y se mantiene su estructura globular (conservando la mayoría de los grupos hidrofóbicos y SH encerrados en el interior de la molécula), las fuerzas intermoleculares, principalmente enlaces de hidrógeno, promueven la formación y la cohesión de los las películas formadas (Perez-Gago y Krochta, 2002).

Como puede apreciarse en la **Tabla** IV.II.1.**5.3**, el tiempo de aplicación de los ultrasonidos (15 o 60 minutos) a las soluciones no afectó significativamente a ninguno de los atributos de las películas mencionados. El efecto de la aplicación de ultrasonidos en las propiedades de las películas proteicas comestibles ha sido relativamente poco estudiado (Banerjee *et al*., 1996; Liu *et al*., 2004; Marcuzzo *et al*., 2010), y el conocimiento de cómo inciden los ultrasonidos en las interacciones entre las proteínas y su funcionalidad también muestra ciertas lagunas y observaciones contradictorias, probablemente debidas a que los estudios se han realizado en proteínas de diversa naturaleza y aplicando tratamientos de ultrasonidos de frecuencia, intensidad y duración muy variados, en ocasiones combinados con tratamiento térmico.

Las películas de proteínas tratadas por el calor son bastante insolubles, mientras que las de las proteínas nativas forman películas solubles (Pérez-Gago, 2012). La formación de enlaces disulfuro se considera fundamental para las propiedades de las películas de proteínas de lactosuero, como las mecánicas y la insolubilidad. El calor produce el incremento de la concentración de grupos SH libres de las proteínas. Sin embargo, después del tratamiento con ultrasonidos, la concentración de estos grupos permanece invariable e incluso desciende. En consecuencia, se considera que no hay formación de enlaces S-S en el secado. El descenso de SH libres tras la sonicación se ha atribuido a la oxidación de los mismos debido a la formación de radicales libres que reaccionarían y formarían peróxido de hidrógeno en la fase gaseosa durante la cavitación (Gülseren *et al*., 2007). Respecto a la solubilidad de las películas tratadas por ultrasonidos, se ha apuntado que la sonicación la incrementaría, debido a la ruptura de enlaces disulfuro de las proteínas, que incluso podría despolimerizarlas, tal como ha sido observado en películas de gluten (Marcuzzo *et al*., 2010) y de proteína de cacahuete (Liu *et al*., 2004).

Otros tipos de interacciones más débiles, como puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas, tienen mucha menor importancia en la solubilidad, pero no así en la permeabilidad al vapor de agua, respecto a la cual se ha visto que la presencia de enlaces S-S intra- o intermoleculares en las películas tiene poca importancia (Pérez-Gago, 2012). La aplicación de ultrasonidos produce desplegamientos que ocasionan, según algunos autores, un incremento de la hidrofobicidad superficial de las proteínas (Gülseren *et al*., 2007; Arzeni *et al*., 2012); en cambio, otros afirman que exponen grupos hidrofílicos hacia el exterior de las moléculas y además producen un cierto grado de hidrólisis (Marcuzzo *et al*., 2010; Kresic *et al*., 2008; Jambrak *et al*., 2009, 2011). Por otro lado, el aumento de solubilidad de las proteínas del lactosuero tras el tratamiento con ultrasonidos se ha atribuido al incremento del número de grupos cargados de las proteínas, confirmado por el aumento de la conductividad eléctrica de las soluciones proteicas, lo que puede llevar a un incremento de las fuerzas electrostáticas y a una alta interacción de las moléculas de agua con las proteínas (Jambrak *et al*., 2008). La diversidad de resultados obtenidos por unos y otros autores se debería a las diferencias en el tipo de proteína, a la intensidad del tratamiento de ultrasonidos aplicado, y a la aplicación de un tratamiento térmico complementario o no.

Teniendo en cuenta los hallazgos de los autores mencionados anteriormente, cabe suponer que, en la películas obtenidas por ultrasonidos en el presente trabajo, la exposición de grupos hidrofílicos en la superficie de las proteínas sería responsable del incremento de la solubilidad, mientras que en la estructura interna el aumento de las interacciones hidrofóbicas produciría el descenso de la permeabilidad al vapor de agua. Este último efecto podría estar reforzado por una mejor distribución de los lípidos que contiene el CPS utilizado (3,5%) sobre la superficie hidrofóbica interna de las películas. La hipótesis planteada estaría relacionada con la mejora de la actividad emulsionante de las proteínas tras la aplicación de ultrasonidos. Este hecho se ha atribuido, entre otros factores, a la mejor orientación de las proteínas de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en la interfase agua-aceite (Jambrak *et al*., 2009). Como es sabido, los ultrasonidos pueden utilizarse para homogeneizar la leche y otros alimentos, con el objetivo de mejorar la distribución de los lípidos en el producto y disminuir el tamaño de los glóbulos de grasa (Villamiel y Jong, 2000). Por otra parte se ha visto que la presencia de lípidos en las películas proteicas comestibles disminuye la permeabilidad al vapor de agua de las mismas (Pérez-Gago, 2012).

La disminución del grosor de las películas de proteínas sonicadas podría atribuirse a la formación de una estructura más compacta, tal como ha sido observado en estudios de la estructura microscópica de geles térmicos de proteínas de lactosuero previamente sometidas a la acción de los ultrasonidos (Zisu *et al*., 2011). Banerjee *et al*. (1996) observaron también este cambio en la microestructura de películas de lactosuero, aunque no detectaron cambios en el grosor. Sin embargo hay que indicar que estos autores aplicaron el tratamiento de ultrasonidos después de calentar las soluciones proteicas, con lo que no pudo observarse un efecto aislado de los ultrasonidos en el grosor. El incremento significativo del extracto seco de las películas de proteínas tratadas por ultrasonidos respecto a las no tratadas, observado también por otros autores (Banerjee *et al*., 1996), podría también deberse a la formación de una red más densa en la que se retuvo menor cantidad de moléculas de agua. También la aplicación de ultrasonidos rompe agregados proteicos en soluciones formadoras de película de gluten (Marcuzzo *et al*., 2010) y de geles de proteínas de lactosuero (Zisu *et al*., 2011), lo cual podría facilitar la formación de enlaces entre las moléculas y la creación de una estructura más compacta y de menor grosor.

La adición de MTGasa sólo incrementó significativamente el contenido en extracto seco de las películas, en el caso de las películas tratadas con ultrasonidos como sin tratar. Tang *et al*. (2005) describen resultados similares, aunque no significativos, en películas de aislados de proteínas de soja; estos autores lo atribuyen a que el entrecruzamiento inducido por la MTGasa disminuye la capacidad de las proteínas de unir agua, puesto que los grupos amino de las mismas que participan en los entrecruzamientos, sobre todo los de los residuos de lisina, no están disponibles para unir moléculas de agua mediante enlaces de hidrógeno. Algunos autores han observado modificaciones en otros parámetros, como las propiedades de barrera al vapor de agua, el grosor y la solubilidad, en película de proteínas tratadas térmica o químicamente a las que se les añadió MTGasa (Tang *et al*., 2005; Chambi y Grosso, 2006; Di Pierro *et al*., 2006). La naturaleza química de las macromoléculas, la cristalinidad, masa molecular, orientación y grado de entrecruzamiento afectan a la permeabilidad de las películas (Yi *et al*., 2006). Los ultrasonidos no modificarían lo suficiente la estructura globular de las proteínas del lactosuero como para que los entrecruzamientos catalizados por la enzima afectaran a estas características de las películas.

La **Tabla** IV.II.1.**5.4** muestra los resultados obtenidos en la determinación de las propiedades mecánicas de las películas comestibles experimentales. Las películas obtenidas de soluciones proteicas tratadas por el calor (T-Calor) mostraron valores significativamente más elevados que los de las películas de soluciones no tratadas y tratadas con ultrasonidos, adicionadas o no de MTGasa. Esto se puede atribuir a la formación de numerosos enlaces covalentes disulfuro entre las cadenas proteicas (McHugh y Kroctha, 1994).

Tabla IV.II.1.**5.4.** Propiedades mecánicas de las películas comestibles de proteínas de lactosuero.

Tratamiento aplicado*	Resistencia a la tracción en el máximo (MPa)	Elongación a la rotura (%)	Resistencia a la perforación (MPa)	Deformación a la punción (%)
Control	0,68 ± 0,02 c	8,09 ± 1,21 c	0,45 ± 0,05 c	1,08 ± 0,07 b
T-MTGasa	0,76 ± 0,14 c	8,95 ± 1,00 c	0,60 ± 0,02 c	1,58 ± 0,10 b
T-Calor	4,10 ± 0,63 a	48,79 ± 10,90 a	4,54 ± 0,34 a	8,02 ± 2,03 a
T-US-15	0,88 ± 0,35 b,c	8,57 ± 0,55 c	0,96 ± 0,30 b	1,34 ± 0,14 b
T-US-60	0,91 ± 0,31 b,c	9,99 ± 1,61 b,c	1,12 ± 0,43 b	1,42 ± 0,28 b
T-US-15+MTGasa	1,31 ± 0,39 b	12,32 ± 2,02 b	1,16 ± 0,43 b	1,66 ± 0,34 b
T-US-60+MTGasa	1,13 ± 0,34 b	10,03 ± 1,00 b,c	1,30 ± 0,30 b	1,79 ± 0,18 b
Control *vs* T-US	**	ns	***	ns
Sin MTGasa *vs* Con MTGasa	ns	ns	ns	**

* Denominación como se indica en la **Tabla** IV.II.1.**5.1**.
a, b, c, d: valores en la misma columna con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tratamiento aplicado.
Control *vs* T-US: Películas sin tratamiento *versus* películas resultantes de la aplicación de ultrasonidos.
Sin MTGasa *vs* Con MTGasa: Películas obtenidas sin adición de MTGasa *versus* Películas obtenidas con incorporación de MTGasa.
MTGasa: transglutaminasa de origen microbiano.
ns: no significativo ($P \geq 0,05$); *$P < 0,05$; **$P < 0,01$; ***$P < 0,001$

La aplicación de ultrasonidos incrementó significativamente la resistencia a la tracción en el máximo y la resistencia a la perforación de las películas respecto a las no tratadas (Control), mientras que no afectó a la elongación a la rotura y a la deformación a la punción. Esto indica que el tratamiento incrementó la fuerza y resistencia de las películas, pero no su flexibilidad y elasticidad. El tiempo de aplicación de los ultrasonidos no afectó significativamente a las propiedades mecánicas de las películas. El incremento de la fuerza de tracción y de la fuerza de punción de las películas de soluciones de CPS tratadas con ultrasonidos respecto a las que no sufrieron tratamiento alguno ha sido también observado por Banerjee *et al*. (1996). Estos autores lo atribuyen al incremento del orden de las moléculas debido a la acción de los ultrasonidos y a una estructura más rígida de las películas. También observaron un mayor efecto del tratamiento en películas de caseinato sódico respecto a las de proteínas de lactosuero, las cuales fueron tratadas por el

calor previamente a la aplicación de ultrasonidos. En las películas de caseinato, las moléculas de caseína se encuentran unidas principalmente por enlaces de hidrógeno, electrostáticos e hidrofóbicos, mientras que en las películas de lactosuero, al haber sido tratadas por el calor, las uniones interproteicas son ante todo enlaces disulfuro.

En el presente estudio, en que las soluciones proteicas no se trataron previamente por el calor, es probable que los efectos significativos de los ultrasonidos en las propiedades mecánicas se deban a un incremento de los enlaces no covalentes. Como ya se mencionó anteriormente, diversos autores han señalado que puede haber un incremento de la exposición de grupos hidrofílicos e hidrófobos por efecto del desplegamiento de las cadenas proteicas tras el tratamiento de ultrasonidos, por lo que es posible que se vea incrementado el número de enlaces de los que dichos grupos puedan formar parte y afectar así a estas propiedades mecánicas de las películas. Además, el aumento del número de grupos cargados que, como se indicó en el apartado anterior, hacía posiblemente que mayor cantidad de moléculas de agua interaccionara con las proteínas (Jambrak *et al*., 2008), también podría favorecer el incremento de enlaces electrostáticos entre las cadenas proteicas.

Liu *et al*. (2004), sin embargo, observaron un efecto negativo de la aplicación de ultrasonidos en las propiedades mecánicas de las películas de proteínas de cacahuete. Estos autores lo atribuyen a la disociación de la estructura cuaternaria de estas proteínas y a la liberación de péptidos más pequeños, lo que estaría también relacionado con su alta solubilidad. No obstante, en estudios relacionados con el efecto de los ultrasonidos en la formación de geles y otras propiedades funcionales de proteínas de lactosuero (Zisu *et al*., 2011; Arzeni *et al*., 2012) no se ha observado una reducción de los pesos moleculares de las proteínas causada por ellos, sino roturas de agregados y el desplegamiento de las cadenas proteicas. Es posible que esta disparidad se deba a las diferencias en los tratamientos aplicados y al tipo de proteína empleada.

Respecto a la elongación a la rotura, propiedad relacionada con el grado de flexibilidad de las películas, no hubo un efecto claro del tratamiento con ultrasonidos. Sin embargo, otros autores que estudiaron el efecto de los mismos en las películas de proteínas lácteas y de cacahuete (Banerjee *et al*., 1996; Liu *et al*., 2004) apreciaron una reducción del porcentaje de elongación. El hecho de que en el presente trabajo no se observara esta disminución podría atribuirse a que el concentrado de proteínas empleado poseía un

contenido de lípidos mayor que los productos empleados por los otros autores. Los lípidos disminuyen las fuerzas de atracción intermolecular e incrementan la movilidad de las cadenas proteicas, aumentando la extensibilidad de las películas (Chambi y Grosso, 2006).

La adición de MTGasa no incrementó significativamente ($P < 0,05$) la deformación a la punción de las películas aunque al considerar de forma conjunta el efecto de esta enzima (sin MTGasa *versus* con MTGasa), así como los valores medios de la fuerza de tracción, de punción y de elongación a la rotura fueron superiores en las películas con enzima (**Tabla** IV.II.1.**5.4**). Bae *et al*. (2009) indican que un aumento del grado de entrecruzamiento en matrices poliméricas incrementa la rigidez de las moléculas de polímero y también aumenta el peso molecular. Se han descrito incrementos de la fuerza de tracción y la fuerza de punción en películas de proteínas de suero tratadas con ditiotreitol con transglutaminasa de origen animal (Yildirim y Hettiarachchy, 1998) y de proteínas de huevo y quitosano (Di Pierro *et al*., 2007), pero los tratamientos previos o la mezcla con otros componentes seguramente influyó en los resultados. Los resultados relativos a la elongación a la rotura respecto a la adición de transglutaminasa son también dispares, habiéndose observado un incremento de los valores (Chambi y Grosso, 2006) o un descenso (Tang *et al*., 2005; Di Pierro *et al*., 2006) en películas proteicas. Se ha apuntado que el efecto de la enzima esté fuertemente condicionado por el tipo de proteína empleada para formar las películas (Chambi y Grosso, 2006).

Respecto al efecto del tratamiento térmico, las películas procedentes de soluciones tratadas térmicamente se ven afectadas sus propiedades mecánicas en proporción al grado de desnaturalización proteica y desplegamiento que provoque el calentamiento y, como consecuencia, el grado y naturaleza del entrecruzamiento proteína-proteína. Así, se ha observado que la aplicación de calor incrementa la resistencia a la tracción en el máximo (fuerza de tracción) y la elongación a la rotura respecto a película procedentes de soluciones no tratadas térmicamente (Pérez-Gago, 2012).

Los resultados obtenidos en las determinaciones de los parámetros de color y de la opacidad de las películas de soluciones tratadas térmicamente, con ultrasonidos y sin tratar, sin y con adición de MTGasa, se muestran en la **Tabla** IV.II.1.**5.5**. Los valores de opacidad mostraron resultados dispares, con valores menores ($P < 0,05$) en las películas sonicadas que en las tratadas térmicamente. Esta propiedad no se vio afectada significativamente ($P > 0,05$) por la adición de enzima. La luminosidad (L^*) de las películas se redujo ($P < 0,05$)

con la incorporación de MTGasa. Las películas T-Calor mostraron valores de *a** (coordenada rojo-verde) más negativos (mayor tendencia al verde) mientras que los de *b** (coordenada amarillo-azul), *C** (croma o saturación) y *ΔE* fueron inferiores, y los de *H** (tono o matiz) superiores a los de las restantes películas ($P < 0,05$). Esto indica que estas películas presentaron mayor similitud con la placa blanca de referencia (valor de *ΔE*), y tonalidades más verdosas y menos amarillas que las demás. El tratamiento de ultrasonidos no afectó significativamente al color de las películas en relación a las muestras sin tratar (Control *versus* T-US). La ausencia de efectos de los ultrasonidos también ha sido observada por Liu *et al*. (2004) en películas de proteína de cacahuete. Sin embargo, la adición de MTGasa modificó significativamente los parámetros de color. La acción de esta enzima hizo a las películas menos luminosas, menos verdosas y más amarillentas, incremento la saturación (*C**) y disminuyó el valor del matiz (*H**). Asimismo, incrementó la diferencia de color (ΔE) respecto al patrón blanco.

Existe poca información sobre los cambios que la adición de esta enzima provoca en las películas proteicas. Tang *et al*. (2005) estudiaron el efecto de la transglutaminasa en la transparencia. De forma similar a como se ha observado en el presente trabajo, estos autores encontraron un aumento de la opacidad de las películas elaboradas con aislado de proteína de soja debido a la adición de enzima. Estos cambios en la transparencia de las películas se han atribuido al entrecruzamiento o la agregación inducida por la MTGasa, que haría que la dispersión fuera más turbia. Uresti *et al*. (2003), en geles de pescado, también señalaron que la adición de transglutaminasa induce entrecruzamientos entre proteínas adyacentes, causando de esta forma la formación de geles más fuertes y un sistema más estructurado. Este hecho se asoció a una disminución de la luminosidad de los geles de pescado. Estos entrecruzamientos entre proteínas explicarían el descenso de luminosidad observado en las películas de CPS elaboradas en el presente trabajo. Sin embargo, otros autores (Yi *et al*., 2006; Weng y Zheng, 2015) no observaron cambios significativos de luminosidad por la adición de transglutaminasa en películas de gelatina de pescado.

Tabla IV.II.1.**5.5.** Atributos de color de las películas comestibles de proteínas de lactosuero.

Tratamiento aplicado*	***L****	***a****	***b****	***C****	***H****	***ΔE***	**Opacidad (%)**
Control	94.00 ± 0.18 a,b	-0.51 ± 0.05 b	8.69 ± 1.17 b	8.59 ± 1.30 b	93.51 ± 0.49 b,c	7.35 ± 1.17 b,c	8.83 ± 0.63 a,b
T-MTGasa	93.70 ± 0.24 b,c	-0.41 ± 0.06 c	8.72 ± 0.77 b,c	8.73 ± 0.77 a,b	92.79 ± 0.21 c,d	7.46 ± 0.80 b	9.31 ± 1.50 a,b
T-Calor	94.30 ± 0.10 a	-0.66 ± 0.02 a	5.87 ± 0.78 d	5.91 ± 0.78 c	96.49 ± 0.92 a	4.63 ± 0.76 d	10.4 ± 1.21 a
T-US-15	94.50 ± 0.01 a	-0.53 ± 0.01 b	7.63 ± 0.17 b	7.65 ± 0.17 b	94.01 ± 0.03 b	6.22 ± 0.17 c	7.82 ± 0.53 b
T-US-60	94.40 ± 0.25 a	-0.52 ± 0.06 b	7.78 ± 0.28 b	7.80 ± 0.27 b	93.90 ± 0.51 b	6.39 ± 0.33 b,c	7.74 ± 1.34 b
T-US-15+MTGasa	93.20 ± 0.50 d	-0.37 ± 0.01 c	9.88 ± 0.38 a	9.89 ± 0.38 a	92.19 ± 0.06 d	8.76 ± 0.46 a	9.51 ± 0.47 a,b
T-US-60+MTGasa	93.20 ± 0.06 c,d	-0.36 ± 0.04 c	9.82 ± 0.14 a,c	9.83 ± 0.14 a	92.10 ± 0.24 d	8.64 ± 0.15 a	8.15 ± 1.33 a,b
Control *vs* T-US	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sin MTGasa *vs* Con MTGasa	***	***	**	**	***	***	ns

* Denominación como se indica en la **Tabla** IV.II.1.**5.1**.

a, b, c, d: valores en la misma columna con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Los distintos grupos Duncan indican el efecto del tratamiento aplicado.

Control *vs* T-US: Películas sin tratamiento *versus* películas resultantes de la aplicación de ultrasonidos.

Sin MTGasa *vs* Con MTGasa: Películas obtenidas sin adición de MTGasa *versus* Películas obtenidas con incorporación de MTGasa

MTGasa: transglutaminasa de origen microbiano.

ns: no significativo ($P \geq 0,05$); *$P < 0,05$; **$P < 0,01$; ***$P < 0,001$

Los efectos de la adición de transglutaminasa en los valores de *a** y *b** de las películas comestibles observadas por otros autores son muy variables. Yi *et al*. (2006) observaron, en películas de gelatina de pescado con sorbitol como plastificante, que la adición de MTGasa producía un descenso de los valores de *a** y un incremento en los de *b**. La adición de enzima produjo en estas películas un color más verdoso a diferencia de lo observado en la **Tabla** IV.II.1.**5.5**. Estos autores indican que la reacción catalizada por la MTGasa cambia la cristalinidad o la estructura molecular de la matriz proteica, dando lugar a una respuesta distinta a la luz. Ellos observaron que la opacidad de las películas se incrementaba y lo explicaron por el entrecruzamiento o agregación inducidos por la transglutaminasa. Weng y Zheng (2015), en películas de gelatina de tilapia, no observaron efectos de la adición de enzima en *b** y sí cierto descenso de los valores de *a**. Uresti *et al*. (2003) observaron en geles de pescado que los valores de *a** se incrementan en relación con la concentración de enzima añadida mientras que la evolución de los valores de *b** dependieron de la concentración de transglutaminasa (aumentando con baja concentración y disminuyendo con alta concentración del enzima). Estas discrepancias en el efecto de la adición de transglutaminasa en los atributos de color pueden deberse a las distintas proteínas utilizadas, a su diferente concentración y al empleo de diversos plastificantes (sorbitol o glicerol). Hay que tener en cuenta que las proteínas empleadas para la obtención de las películas mostraban una composición aminoacídica muy diferente. García y Sobral (2005) señalaron que los cambios de color en películas de proteína están muy relacionados con la concentración de proteína y la composición aminoacídica. El empleo de glicerol o sorbitol también podría afectar al color de las películas (Tang *et al*., 2005).

IV.II.1.**5.3.3. Estudio de la microestructura de las películas comestibles de proteínas de lactosuero mediante relaxometría de RMN**

La morfología de las distintas películas se estudió por relaxometría de RMN y se obtuvieron las distribuciones monodimensionales (1D) y bidimensionales (2D) de los tiempos de relajación longitudinal espín-red (T_1) y transversal espín-espín (T_2). Cabe indicar que esta tecnología, hasta donde el autor conoce, es la primera vez que se aplica para el análisis de películas comestibles y que se utilizaron los dos parámetros mencionados para maximizar la información que puede aportar la relaxometría sobre la microestructura de biomateriales. Este hecho ha dificultado el análisis de los datos obtenidos al no encontrarse referencias cercanas y se ha recurrido a trabajos realizados en

materiales claramente distintos, como piedras (Appolonia *et al*., 2001; Viola *et al*., 2006; López-Arce *et al*., 2010), frutas (Marigheto *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2012) y geles (Iuliano *et al*., 2010; Melado-Herreros, 2013). Es necesario tener en cuenta que en la mayoría de los estudios que se encuentran en la bibliografía, las muestras poseen gran cantidad de agua (entre el 60 y el 80%), como sucede en los alimentos analizados, o son saturadas con agua para su estudio, como en las muestras de piedras. En el caso de los análisis de relaxometría realizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, las películas se estudiaron sin ninguna manipulación, y las determinaciones corresponden al agua estructural. Este hecho complica notablemente el estudio dado que son matrices con escaso contenido acuoso, no superior al 30 %, y para su estudio es aconsejable utilizar campos magnéticos de más de 1 Tesla. En este trabajo se utilizó un espectrómetro que opera a 4,7 Teslas.

En las curvas normalizadas de relajación de los siete tipos de películas estudiados (**Tabla** IV.II.1.**5.1**) se analizaron las señales obtenidas considerando tres parámetros: valor del máximo, área y valor medio (**Figura** III.**2**).

IV.II.1.5.3.3.1. Análisis del tiempo de relajación transversal espín-espín (T_2)

La **Figura** IV.II.**5.2** muestra las distribuciones de los tiempos de relajación transversal (T_2) de las películas comestibles obtenidas con los distintos tratamientos aplicados. En todos los tratamientos se observó un total de 2 señales (T_{21} y T_{22}). Como se mencionó en el **Trabajo 2**, las distintas señales o componentes T_2 reflejan la influencia de los núcleos del entorno en cada protón del sistema (Karoui y De Baerdemaeker, 2007; Mulas *et al*., 2013). Mediante este procedimiento, el parámetro T_2 aporta importante información estructural. Las películas comestibles de CPS se pueden considerar un sistema en el que los protones del agua y de la proteína son los principales implicados en las señales de relajación espín-espín, además el componente graso del CPS (3,5 %) también podrían contribuir, aunque de una forma minoritaria dado su menor presencia. De acuerdo con la bibliografía existente, estas películas están formadas por una red proteica derivada del establecimiento de distintos tipos de interacciones proteína-proteína (como enlaces disulfuro, hidrofóbicos, de hidrógeno, iónicos, etc.) que pueden establecerse dependiendo de si se ha aplicado un tratamiento de desnaturalización proteica (como el calor o ultrasonidos) o no (control) (Shimada y Cheftel, 1989; McHugh y Krochta, 1994; Havea *et al*., 2004) y de la presencia o no de MTGasa para potenciar el establecimiento de enlaces

covalentes entre las cadenas polipeptídicas (lisina-glutamina) (Nielsen, 1995; Weng y Zheng, 2015). Aunque esta estructura se considera simple, puede presentar un carácter muy heterogéneo debido a la distribución del agua en poros de distinto tamaño y grado de interacción con las macromoléculas, así como a la presencia de grasa emulsionada o libre. Cabría añadir el papel del glicerol (4 %) en esta estructura. Como es sabido (Guerrero *et al*., 2010) este agente plastificante interactúa con la proteína modificando la respuesta de los protones del sistema. En conjunto, se considera que el elemento diferenciador en el análisis de relaxometría de RMN de las películas será la proteína del CPS. Los cambios estructurales de este componente modificaran las interacciones entre los protones de los distintos elementos del sistema y consecuentemente variarán los componentes de T_2 y la morfología y parámetros de las señales (anchura, área, valor del máximo). En conjunto, el análisis de T_2 proporciona importante información de la microestructura del sistema estudiado (Ruan *et al*., 1997; Kuo *et al*., 2001).

Los parámetros cuantitativos de las componentes de T_2 se muestran en la **Tabla** IV.II.1.**5.6**. La señal correspondiente a los tiempos de relajación más cortos (T_{21}) se asocia a los protones fuertemente unidos a la matriz de proteína (como agua y grasa), mientras que los valores de relajación más largos (T_{22}) corresponderían a protones con una mayor movilidad, como pueden ser aquellos que se encuentren formando capas de hidratación en los poros de dicha matriz (Zhang *et al*., 2012; Noronha *et al*., 2008). Bajos valores de T_{21} implican mayor interacción de los protones dentro de la matriz mientras que T_{22} inferiores se relacionan con estructuras más compactas, donde los protones tendrían menos movilidad (Kuo *et al*., 2001). En ninguna de las películas elaboradas se observan valores elevados de T_2 (P > 75 ms), lo que indicaría que la mayoría del agua libre se pierde durante el proceso de secado en la formación de las películas. Como puede observarse (véase Valor del Máximo en **Tabla** IV.II.1.**5.6**) los valores de los tiempos de relajación transversal de las películas elaboradas se encuentran en el intervalo entre 2 y 7 ms para T_{21} y entre 30 y 60 ms para T_{22}, excepto en las tratadas con calor (T-Calor). En este caso, los valores de ambas señales fueron considerablemente (P < 0,05) más bajos (T_{21} = 1,31±0,06 ms y T_{22} = 6,36±0,31 ms). Esta reducción de los valores de los componentes de T_2 se atribuye a una disminución de la movilidad de los protones del agua, tanto los que estarían unidos a las macromoléculas que forman la matriz (T_{21}) como los que se encontrarían formando las capas de hidratación o en los poros y microporos (T_{22}).

Estos resultados sugieren que el tratamiento térmico y el posterior secado de las soluciones de CPS favorecerían la reestructuración de las macromoléculas, dando lugar a una matriz con agua más ligada a las proteínas y la definición de pequeños poros en los que el agua estaría retenida por distintas fuerzas. Esta organización de las cadenas proteicas en un sólido poroso explicaría la baja solubilidad de esta película ($P < 0,05$) así como su mayor resistencia mecánica, tanto en los ensayos de tracción como de penetración (**Figuras** IV.II.1.**5.3** y IV.II.1.**5.4**, respectivamente). Estos resultados estarían en consonancia con el ya mencionado incremento de exposición de grupos tiol libres (-SH) en las proteínas del lactosuero (β-lactoglobulina, α-lactoalbúmina e inmunoglobulinas, fundamentalmente) tratadas con calor y el consiguiente establecimiento de enlaces disulfuro, intra o intermoleculares, y la formación de enlaces hidrofóbicos, iónicos y de hidrógeno, especialmente durante el secado de las soluciones proteicas para dar lugar a las películas comestibles (Shimada y Cheftel, 1989; McHugh y Krochta, 1994; Havea *et al*., 2004; Perez-Gago y Krochta, 2002). Estos hechos explican la conocida polimerización de las proteínas solubles de la leche cuando se calientan al menos a 80 ºC y su sucesiva gelificación, potenciado, en el caso de la formación de películas, por el secado de la estructura. La desnaturalización de la estructura globular de las proteínas del lactosuero implica la exposición de grupos ionizados y polares que favorecen la interacción con los protones del agua, y por consiguiente al descenso del componente T_{21} del tiempo de relajación espín-espín. En esta configuración el agente plastificante (glicerol) interactuaría con los grupos amino y ácido de la proteína (Guerrero *et al*., 2010) reduciéndose las fuerzas intermoleculares. Este hecho, se ha asociado (Jangchud y Chinnan, 1999) al incremento de la flexibilidad y a la reducción de la rigidez del sistema, lo que explicaría la mayor elongación y deformación a la punción de las películas T-Calor (**Tabla** IV.II.1.**5.4**). En el análisis de relaxometría de RMN, el glicerol, una molécula pequeña, es de magnetización rápida y al interaccionar con las proteínas contribuiría también a la reducción de los componentes de T_{21}, de forma similar a la grasa.

Respecto al valor de T_{21} las películas se pueden ordenar de mayor a menor (lo que implica una relación inversa respecto a la interacción con los protones del agua o de la grasa) de la siguiente forma (**Tabla** IV.II.1.**5.6**): T-TMGasa > Control > T-US-15 = T-US-60 > T-US-15+MTGasa = T-US-60+MTGasa > T-Calor. Una ordenación similar se tendría si se consideran los valores medios de este componente de T_2, debido a la regularidad y simetría de la señal **(Figura** IV.II.1.**5.2**). Sin embargo, la ordenación cambia

sustancialmente si se considera el valor T_{22}, en cuyo caso sería (de mayor a menor): T-US-60 = T-US-15+MTGasa = T-US60+MTGasa > T-US-15 > Control = T-MTGasa > T-Calor.

Estos resultados sugieren que, como era de esperar, la película Control es la menos estructurada. En las películas no tratadas (Control y T-MTGasa), al mantener las proteínas del lactosuero su estructura de tipo globular, los residuos hidrófobos se conservan incluidos en el seno de la molécula, lo que limita las asociaciones e interacciones con otras moléculas proteicas. En la proteína mayoritaria, la β-lactoglobulina, la presencia simultánea de dos uniones disulfuro y de un grupo tiol libre, impone a esta molécula una estructura especial rígida (Conti *et al*., 1980; Dalgleish, 1982). Todo ello contribuiría a que estas películas presenten baja interacción entre los protones proteína-proteína, proteína-agua o proteína-grasa, y por tanto T_{21} altos. No obstante, el grupo tiol libre de la molécula de esta proteína es accesible y puede participar en intercambios de uniones disulfuro que, junto al posible establecimiento de enlaces de hidrógeno durante el secado de las soluciones de las proteínas de lactosuero nativas, explica la formación de las películas T-Control, con poros de pequeño tamaño donde el agua estaría relacionada con la estructura proteica que constituye la matriz y agua de hidratación en torno a las proteínas (bajos T_{22}).

La incorporación de la MTGasa sobre la proteína nativa no tuvo un efecto manifiesto sobre las características de la microestructura de las películas Control (similares valores de T_{22}), probablemente debido a que su actividad se encuentra reducida por la estructura globular de las proteínas del lactosuero. No obstante, el mayor valor (en el máximo y medio) de T_{21} en las películas T-MTGasa frente a las Control, sugiere que el establecimiento de enlaces covalentes entre residuos lisina-glutamina intra e intermoleculares reduciría la interacción de los protones de las proteínas con los del agua. Por otra parte, el menor área ($P < 0,05$) de la señal T_{21} (**Tabla** IV.II.1.**5.6**), y más en concreto la reducción de la anchura del pico (**Figura** IV.II.1.**5.2**), observada al comparar los resultados de la película T-MTGasa *versus* Control, sugiere que la actividad de la enzima homogeniza la relación proteína-proteína y consecuentemente la relajación del sistema adicionado con la enzima. Sin embargo, el hecho contrario se observó en T_{22} (señal T_{22} más ancha, correspondiendo a mayor área, en T-MTGasa que en Control) lo que sugiere, en principio, una porosidad más heterogénea, en número y forma, en las muestras con enzima.

El tratamiento con ultrasonidos de las soluciones de CPS, independientemente del tiempo de aplicación (15 o 60 minutos) produjo una reducción de los valores del componente T_{21}, respecto a los obtenidos para las películas con la proteína nativa (Control y T-TMGasa), indicando un incremento de las interacciones entre los protones del sistema, potenciado por la adición de MTGasa (T-US-15+MTGasa y T-US-60+MTGasa) con valores aún más bajos de T_{21} aunque siempre superiores a los observados en las muestras T-Calor. Estos resultados parecen sugerir que el tratamiento con ultrasonidos favorece el establecimiento de interacciones. Considerando los hallazgos de otros autores, respecto al descenso de grupos SH libres tras la sonicación, y por tanto la carencia de uniones disulfuro (Gülseren *et al*., 2007), las interacciones serían hidrofóbicas o de hidrógeno (Pérez-Gago, 2012). Estas apreciaciones podrían relacionarse con el observado desplegamiento de las proteínas por el tratamiento de sonicación, exponiéndose residuos hidrofílicos, que favorecerían la interacción con los protones del agua, e hidrofóbicos, que facilitarían la relación con el componente lipídico (Gülseren *et al*., 2007; Arzeni *et al*., 2012, Marcuzzo *et al*., 2010; Kresic *et al*., 2008; Jambrak *et al*., 2009, 2011). En esta misma línea, se ha mencionado (Jambrak *et al*., 2009) un incremento de la capacidad emulsionante de las proteínas tratadas con ultrasonidos debido a la exposición de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Todo ello llevaría a una reducción de los valores de T_{21}, en la medida que se potencian las relaciones entre los protones del sistema, proteína-proteína, especialmente enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, proteína-agua y proteína-grasa. El despliegue de la estructura proteica facilitaría también la actividad de la MTGasa y una reducción el valor T_{21} respecto a las películas no adicionadas de enzima (T-US-15 y T-US-60).

En el caso del valor T_{22}, las películas sonicadas fueron las que presentaron los valores más elevados de este parámetro, lo que vendría a indicar que presentan la estructura más "abierta" o con mayor cantidad de agua embebida, rodeando la estructura proteica. Este hecho podría relacionarse con los resultados de varios autores (Jambrak *et al*., 2008, Marcusso *et al*., 2010, Liu *et al*., 2004; Gülseren *et al*., 2007; Arzeni *et al*., 2012) respecto al efecto de los últrasonidos en la estructura proteica. Jambrak *et al*. (2008) encontraron que este tratamiento aumenta la carga de las proteínas, lo que incrementaría la fuerza de repulsión entre las cadenas polipeptídicas, aumentando la apertura de la estructura y la entrada e interacción con el agua por fuerzas electrostáticas. En estas películas el glicerol interaccionaría menos con la estructura proteica y permanecería

alrededor a las proteínas, sin apenas modificar el comportamiento mecánico de las películas, al contrario de lo ocurrido en las películas T-Calor (**Tabla** IV.II.1.**5.3**). Esta presencia de glicerol en torno a las proteínas, pero sin interaccionar fuertemente con ellas contribuiría al incremento del valor de T_{22} (**Tabla** IV.II.1.**5.6**).

Otros autores (Marcusso *et al*., 2010, Liu *et al*., 2004) también han mencionado que el tratamiento con ultrasonidos puede llevar a la despolimerización de las proteínas o incluso a la separación de subunidades (McCLements, 1995) con la consiguiente pérdida de integridad de la estructura proteica, lo que contribuiría a explicar los mayores valores para T_{22} frente a las otras películas de CPS. Por otra parte, la amplitud del área de la señal T_{21} de las películas sonicadas (T-US-15 y T-US-60), y más en concreto el aumento de la anchura del pico (**Figura** IV.II.1.**5.2**), indicaría que la estructura de estas películas es como era de esperar bastante heterogénea, con zonas con mayor nivel de interacción entre los protones del sistema que otras (**Tabla** IV.II.1.**5.6**, **Figura** IV.II.1.**5.2**). Sin embargo, de los menores valores del área de la señal T_{22} de las películas con incorporación de MTGasa (T-US-15+MTGasa y T-US-60+MTGasa) se deduce que la distribución de los protones con menor relación con la estructura fue más uniforme, posiblemente debido a la mayor fijación de la estructura por el establecimiento de enlaces covalentes lisina-glutamina por la actividad de esta enzima.

En un análisis conjunto de los valores de relajación T_2 y en comparación con la película de proteína nativa (Control), cabe concluir que las película T-Calor presentaron una estructura compacta y cohesionada, sin duda debido al establecimiento de enlaces disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, en la que el agua y el glicerol interaccionan con las proteínas o se encuentran en espacios de pequeño tamaño, lo que explica que se muestren bajos valores de T_{21} y T_{22} y alta resistencia mecánica y baja solubilidad. Sin embargo, las películas obtenidas tras el tratamiento con ultrasonidos presentarían una estructura abierta, debido al desplegado, o incluso rotura de subunidades o despolimerización de la proteínas (McClements, 1995; Marcuzzo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2004), con posible formación de uniones hidrógeno, iónicas e hidrofóbicas entre las cadenas proteicas e interacciones con el agua y la grasa a través de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos. En esta estructura se ubicaría, en torno a la matriz proteica, agua de hidratación y el plastificante, lo que explicaría la presencia de valores T_{21} relativamente bajos frente a valores más altos de T_{22} y una baja resistencia mecánica y elevada solubilidad

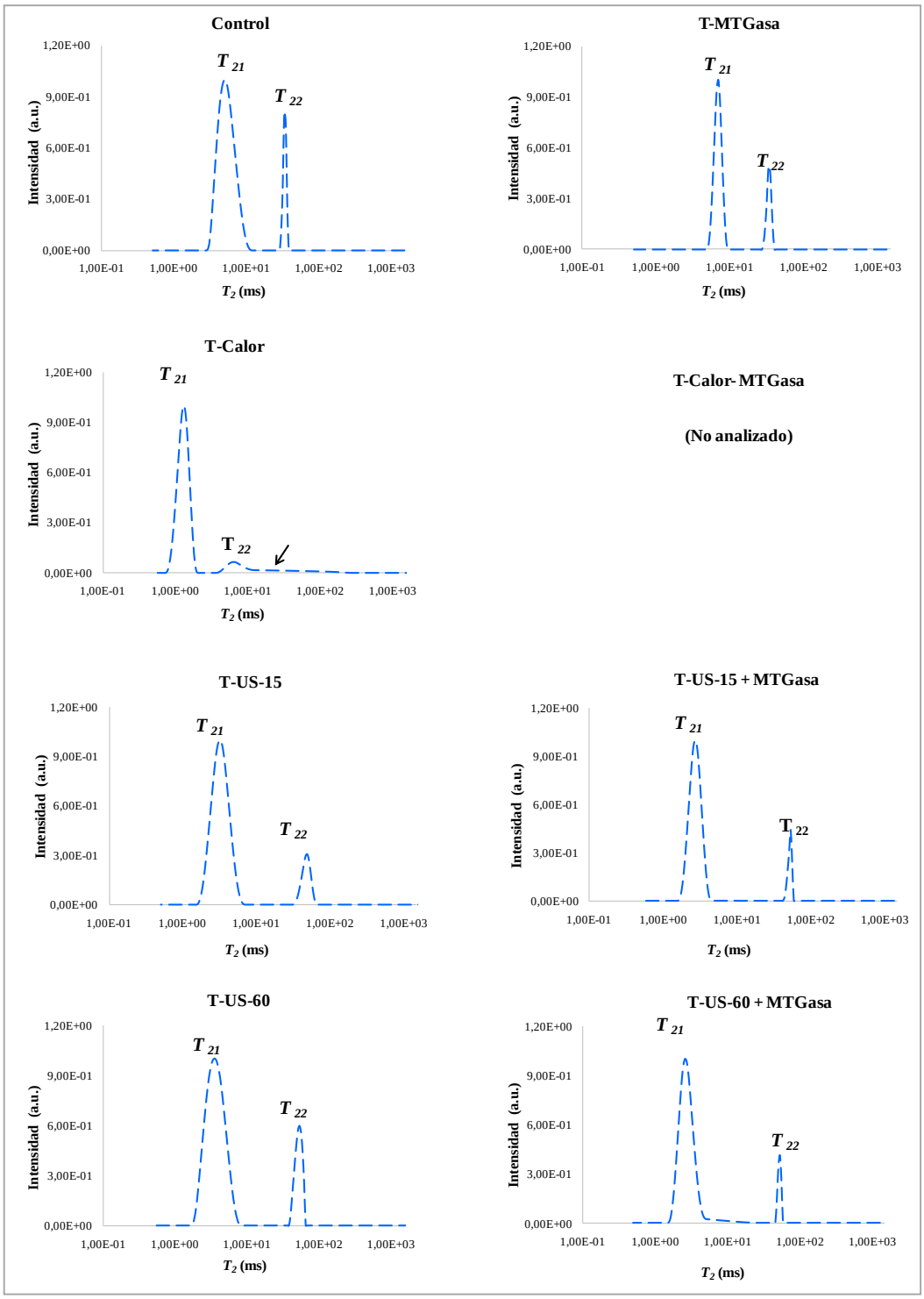


Figura IV.II.1.**5.2**. Distribuciones de los tiempos de relajación transversal espín-espín (T_2) derivados del análisis de relaxometría de RMN de las películas comestibles elaboradas con proteínas de lactosuero.

Control, T-MTGasa, T-Calor, T-US-15, T-US-15+MTGasa, T-US-60, T-US-60+MTGasa: corresponde a los tratamientos aplicados para la obtención de las películas comestibles como se indica en la **Tabla** IV.II.1.**5.1**.
La flecha indica una señal de mínima intensidad (analizada en el **Punto** IV.II.1.**5.3.3.4**).

Tabla IV.II.1.**5.6.** Componentes de los tiempos de relajación transversal espín-espín (T_2) y longitudinal espín-red (T_1) derivados del análisis de relaxometría de RMN de las películas comestibles elaboradas con proteínas de lactosuero.

Componente	Parámetros de la señal	Películas													
		Control		T-MTGasa		T-Calor		T-US-15		T-US-60		T-US-15+MTGasa		T-US-60+MTGasa	
T_{21}	Valor máximo	4,95±0,24	b	6,86±0,34	a	1,31±0,06	e	3,17±0,15	c	3,51±0,17	c	2,71±0,13	d	2,62±013	d
	Valor medio	5,21±0,28	b	6,82±0,30	a	1,27±0,08	e	3,18±0,24	c	3,57±0,27	c	2,69±0,19	d	2,79±0,15	c,d
	Área señal	0,85±0,04	a,b	0,75±0,04	c	0,86±0,04	a,b	0,87±0,04	a,b	0,80±0,03	b,c	0,88±0,04	a	0,90±0,05	a
T_{22}	Valor máximo	33,38±1,59	c	33,77±1,68	c	6,36±0,31	d	47,76±2,36	b	52,92±2,60	a	53,01±2,59	a	52,85±2,58	a
	Valor medio	33,33±1,76	c	33,50±1,73	c	14,41±1,70	d	46,62±2,68	b	51,40±2,53	a	51,82±2,85	a	51,51±2,51	a
	Área señal	0,14±0,01	c	0,23±0,01	a	0,14±0,01	c	0,13±0,01	c	0,19±0,01	b	0,12±0,01	d	0,09±0,01	e
T_{11}	Valor máximo	1,58±0,09	d	2,01±0,11	c	3,38±1,19	b	1,29±0,07	e	1,50±0,08	d,e	4,75±0,26	a	1,84±0,10	c
	Valor medio	1,62±0,11	d	3,24±0,18	b	3,36±0,60	a,b	4,71±0,41	a	1,52±0,11	d	4,14±0,23	a	2,20±0,31	c
	Área señal	0,23±0,01	c	0,14±0,04	d,e	0,18±0,01	d	0,29±0,02	b	0,39±0,02	a	0,10±0,02	e	0,16±0,03	d,e
T_{12}	Valor máximo	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	114,20±6,04	a	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b
	Valor medio	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	119,10±7,16	a	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b
	Área señal	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	0,12±0,01	a	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b
T_{13}	Valor máximo	234,50±12,95	d	242,90±12,90	d	333,70±17,94	b	461,80±24,86	a	239,70±12,95	d	299,30±16,10	c	228,62±12,27	d
	Valor medio	255,10±15,01	c	228,21±12,95	c	346,01±19,36	a	331,02±17,82	a	317,03±18,13	a	307,11±16,52	a,b	277,08±14,87	b,c
	Área señal	0,78±0,04	b	0,86±0,05	a	0,69±0,04	c	0,71±0,04	b,c	0,62±0,03	d	0,90±0,05	a	0,84±0,04	a

a, b, c, d, e: Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Indican diferencias entre tipos de películas comestibles para un determinado parámetros de RMN.

Parámetros de la señal: Como se indica en la **Figura** III.**2**. Valor del máximo: valor del tiempo de relajación del máximo de la señal (ms). Valor medio: tiempo de relajación promedio de la señal (ms). Área de la señal: valor de la integral de la señal expresada como fracción del área total [unidades arbitrarias (u.a) x ms].

IV.II.1.**5.3.3.2. Análisis del tiempo de relajación longitudinal espín-red (T_1)**

T_1 es un indicador de la facilidad de la cesión de energía de los espines al medio. Al igual que ocurre en los alimentos, en el sistema ahora estudiado la medida de T_1 dependerá fundamentalmente de la cesión de energía de los protones del agua a las macromoléculas (Herrero *et al*., 2007, 2009). En las curvas normalizadas de relajación longitudinal (T_1) (**Figura** IV.II.1.**5.3**), todas las películas derivadas de los distintos tratamientos aplicados (**Tabla** IV.II.1.**5.1**) mostraron un comportamiento bimodal, excepto en el caso de las obtenidas tras el tratamiento térmico (T-calor) donde se observó un comportamiento trimodal. Los parámetros cuantitativos de las componentes de T_1 se muestran en la **Tabla** IV.II.1.**5.6**.

Los valores de T_1 más bajos (señal T_{11}) oscilaron entre 1,29 y 4,75 ms. Esta señal puede relacionarse con los protones de las macromoléculas y de moléculas más pequeñas (como el agua o el glicerol) asociadas a estas. La señal de tiempos de relajación más altos (T_{13}), entre 234 y 462 ms, correspondería a los protones del agua que forman las capas de hidratación dentro de los poros de la matriz y su valor está relacionado con el fluido en el interior de los poros (McDonald *et al*., 2005) y por tanto aporta información sobre de la porosidad de las películas. En el caso de la película T-Calor esta señal se desdobló en dos claramente diferenciadas (T_{12}, 114,20±6,04 ms, y T_{13}, 333,70±17,94 ms). Los valores de los componentes T_1 permitieron corroborar y completar la información aportada por T_2 acerca de la microestructura de las películas. No obstante, cabe indicar que los componentes de T_1 han sido mucho menos utilizados que los de T_2 en el análisis de la microestructura de distintos sistemas por relaxometría.

Los valores de T_{11} de las distintas películas oscilaron en un margen estrecho de valores, lo que sugiere que la estructura de la matriz proteica es muy similar en todas las películas, entendiéndose que el sistema estaría constituido por una red de proteína, más o menos estructurada, con interacciones con moléculas más pequeñas, como el agua. Este componente de T_1 ofrece una información paralela a T_{21}. Sin embargo, en este caso debido a los bajos valores de T_{11}, es difícil hacer un estudio comparativo del comportamiento de las distintas películas de CPS (**Tabla** IV.II.1.**5.6**). Hay que tener en cuenta que todos los valores de T_{11} fueron inferiores a 5 ms, por debajo del límite de confianza considerando los parámetros de adquisición (véase **Punto** IV.II.1.**5.2.3**). Se trataría por tanto, de valores en un intervalo de incertidumbre, con escaso margen para aportar información diferenciada. No obstante, de acuerdo con las recomendaciones de Valckenborg *et al*. (2002) cuando los

gradientes de campos magnéticos internos del sistema son elevados (como en este caso), se utilizó el área de la señal como parámetro de comparación y pudo observarse (**Tabla** IV.II.**5.6**) que los valores más bajos corresponden a las películas T-Calor y las adicionadas con MTGasa (T-MTGasa, T-US-15+MTGasa y T-US-60+MTGasa). En estas tres películas es más probable el establecimiento de uniones covalentes entre las cadenas polipeptídicas; en el caso de las adicionadas con MTGasa mediante uniones lisina-glutamina (tras la desnaturalización por ultrasonidos) y en las películas T-calor, sobre todo por enlaces disulfuro. Teniendo en cuenta que cuando el agua está unida a macromoléculas disminuye el valor de T_1 por la pérdida de movilidad y la mayor facilidad para la liberación de energía (Gowland y Stevenson, 2003), estas películas presentarían una mayor interacción protón-protón.

La señal T_{13} presentó formas poco simétricas (**Figura** IV.II.1.**5.3**) lo que hizo que los valores del máximo y medio, así como del área, presentaran intensidades dispares (**Tabla** IV.II.1.**5.6**). Considerando el valor medio de esta señal las películas de CPS pueden ordenarse de mayor a menor intensidad como sigue: T-Calor =T-US-15 = T-US-60 ≥ T-US-15+MTGasa ≥ T-US-60+MTGasa ≥ T-TMGasa ≥ Control. El valor del componente T_{13} sería tanto mayor cuanto mayor sea el contenido de agua ubicada en la porosidad y por tanto puede relacionarse con el tamaño de los poros existentes en una determinada matriz (Fantazzini, 2005). No obstante, la relación del componente de T_1 con la porosidad es compleja y está modificada por diversos factores (Brownstein y Tarrm, 1979; Casieri *et al*., 2010; Marigheto *et al*., 2008). Como se ha mencionado este componente informa sobre la interacción del fluido entre sí y con las macromoléculas que enmarcan los poros. Por una parte, la mayor tortuosidad del sistema, es decir las conexiones, vueltas y rodeos de los poros o cavidades existentes en el seno de la matriz, intensificaría la señal T_{13}, de forma que poros pequeños conectados entre sí darían señales compatibles con poros grandes (Borgia *et al*, 2001). Por otra parte, la existencia en los poros de fluidos de distinta naturaleza cambiaría la respuesta dependiendo de los intercambios de magnetización que pudieran establecerse (Mitchell, 2014). Cabe indicar que existen pocas referencias de determinación de los componentes de T_1 y su relación con la porosidad, y las halladas se refieren a sistemas en cuyos poros se encontraba agua como único fluido (Borgia *et al*., 2001; Appolonia *et al*., 2001; Viola *et al*., 2006; Muñoz-García *et al*., 2012). En estas circunstancia, con un sólo fluido implicado en el sistema es posible realizar un cálculo aproximado de la porosidad del sistema (Davies y Packer, 1990). En general, valores altos

de T_1 se asocian a bajas relaciones de superficie/volumen en los poros (Fantazzini, 2005). Sin embargo, en las películas de CPS, entre la red proteica existiría un flujo constituido fundamentalmente por agua (componente mayoritario), glicerol y pequeñas cantidades de grasa que pueden modificar el valor de T_1. En este sistema se darían varias posibilidades de intercambio de magnetización tanto en el fluido (agua-agua, agua-glicerol, glicerol-glicerol, etc.) como en su dispersión en matriz proteica (proteína-agua, proteína-glicerol, proteína-glicerol-agua, etc.). Este hecho explicaría la amplitud de las señales de T_{13} y su asimetría. Esta situación impediría una relación fidedigna de T_1 con la porosidad del sistema, dado que en la señal de relaxometría se mezclarían la información de la existencia de distintos intercambios protón-protón. En consecuencia, la porosidad del sistema debe estudiarse mediante un análisis 2D-RMN, que permita desdoblar las señales de relajación, como se describe en el **Punto** IV.II.1.**5.3.3.4** de este trabajo.

Dada la fuerte diferencia entre los valores de T_1 del glicerol (alrededor de 12,8±9 ms) (Frazier, 2006; Magat y Mandyam, 2004) y del agua (en torno a 4200-4500 ms) (Manic *et al*., 1998), en estructuras con similar porosidad, la mayor presencia de glicerol en el componente fluido del sistema daría valores más bajos de los tiempos de relajación más largos, mientras que la presencia de agua produciría su incremento. De acuerdo con los valores medios de T_{13} (**Tabla** IV.II.1.**5.6**), las películas no tratadas (Control y T-MTGasa) presentarían mayor presencia de glicerol libre en la estructura porosa de la matriz (valores más bajos de T_{13}), mientras que en las tratadas por calor (T-Calor) y sonicadas (T-US-15, T-US-60, T-US-15+MTGasa y T-US-60+MTGasa) existiría una mayor relación del glicerol con la matriz y por tanto se reduciría la presencia de este componente libre en los poros y proporcionalmente existiría más agua libre (mayor T_{13}). Este hecho estaría relacionado con la mencionada interacción del plastificante con las proteínas del CPS tras el tratamiento térmico (Guerrero *et al*., 2010) y el efecto emulsionante de los ultrasonidos (Jambrak *et al*., 2009).

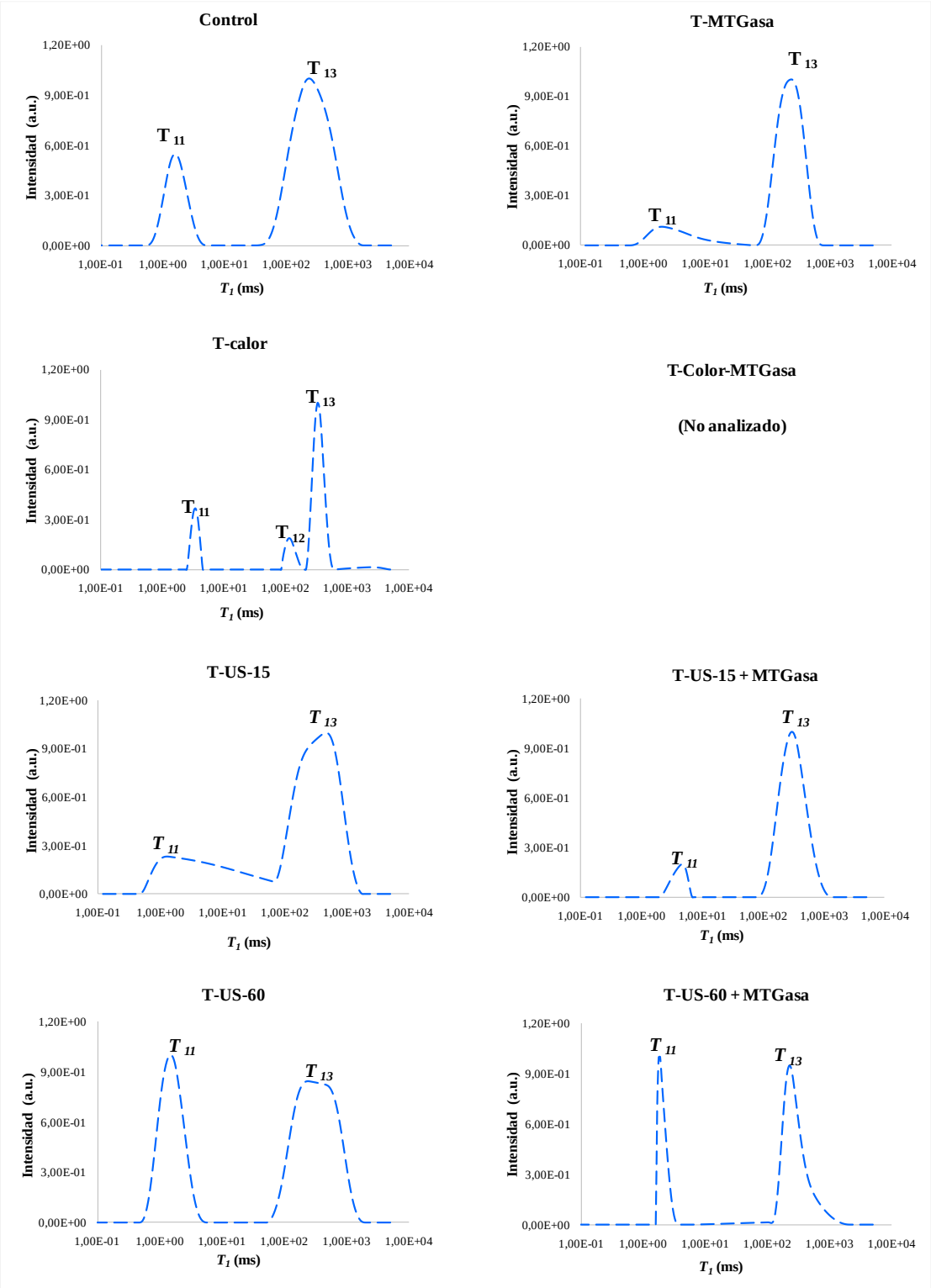


Figura IV.II.1.**5.3**. Distribuciones de los tiempos de relajación transversal espín-red (T_1) derivados del análisis de relaxometría de RMN de las películas comestibles elaboradas con proteínas de lactosuero.

Control, T-MTGasa, T-Calor, T-US-15, T-US-15+MTGasa, T-US-60, T-US-60+MTGasa: corresponde a los tratamientos aplicados para la obtención de las películas comestibles como se indica en la **Tabla** IV.II.**5.1.**

Estos resultados coinciden con los datos de los componentes T_2 y se asociarían con la mayor estructuración de estas películas derivada fundamentalmente por el establecimiento de enlaces disulfuro tras la desnaturalización proteica por el calor (Havea *et al*., 2004; Perez-Gago y Krochta, 2002). En estas películas esta señal se desdobló dando lugar a la señal T_{12}, correspondiendo a tiempos de relajación más cortos que T_{13}. Esta señal se ha relacionado con los intercambios de magnetización en la superficie de los poros. La aparición de esta señal sólo en las películas T-Calor sugiere que estaría relacionada con las interacciones proteína-agua, proteína-glicerol, proteína-agua-glicerol, probablemente por la mayor presencia de interacción proteína-plastificante tras la desnaturalización térmica de las proteínas del CPS (Shimada y Cheftel, 1989; McHugh y Krochta, 1994; Havea *et al*., 2004; Perez-Gago y Krochta, 2002) y el establecimiento de interacciones con los grupos amino y ácido de la proteína (Guerrero *et al*., 2010).

Para concluir este punto puede decirse que en el análisis monodimensional (1D) del tiempo de relajación longitudinal (T_1) de las películas se observan en todos los casos dos componentes, una correspondiendo a los valores más bajos (T_{11}) asociada a la interacción de macromoléculas con moléculas más pequeñas y otra (T_{13}) relacionada con el fluido existente en la matriz porosa. En las películas tratadas con calor (T-Calor) se presenta un tercer componente (T_{12}) que se asocia al intercambio de magnetización en la superficie de los poros e indicaría la relación entre el agua de los poros, el plastificante y las proteínas de lactosuero. La presencia de este componente sólo en las muestras de T-Calor indicaría en estas películas una interacción más íntima entre la matriz proteica y el glicerol, lo que se relaciona con la mayor resistencia mecánica y flexibilidad de estas películas frente a las obtenidas por otros procedimientos.

IV.II.1.**5.3.3.3.3. Relación de los parámetros de relaxometría monodimensional (1D) de RMN de las películas elaboradas con proteínas de lactosuero con sus características y propiedades**

En el análisis de regresión lineal simple entre características (**Tabla** IV.II.1.**5.2**) de las películas comestibles (**Tabla** IV.II.1.**5.1**) y los parámetros de las componentes de los tiempos de relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1) (**Tabla** IV.II.1.**5.6**) 1D se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) significativos ($P < 0,05$) (**Tabla** IV.II.1.**5.7**) tanto con propiedades generales y mecánicas como con los atributos de color (**Tabla** IV.II.1.**5.7**). Esta correlación era de esperar dada la relación de los parámetros de

relaxometría con la microestructura de diversas matrices (Chen *et al*., 1997; Ruan *et al*., 1997; Schmidt, 1990) y por tanto con su comportamiento físico y mecánico. Aunque estos R^2 significativos puedan considerarse bajos, especialmente en algunos casos en los que fueron inferiores a 0,5, este primer estudio indica la tendencia y la posibilidad de establecer relaciones entre el análisis de relaxometría y las propiedades de las películas. En futuras investigaciones se pretende establecer modelos de predicción, lineales y no lineales, para estimar el comportamiento de las películas a partir de parámetros de relaxometria de RMN y particularidades de su microestructura.

En este estudio se utilizaron los tres parámetros de cada señal procesados (valores del máximo y medio y el área). Como puede apreciarse en la **Tabla** IV.II.1.**5.7**, la mayor parte de los R^2 significativos ($P < 0,05$) se establecieron utilizando los valores del máximo y medio de los componentes de T_2. El componente T_{21} también se relacionó con las mismas propiedades mecánicas aunque con valores de R^2 inferiores ($P < 0,05$) así como con el extracto seco de las películas. Propiedades generales, como la permeabilidad al vapor de agua (WVP), solubilidad en agua y grosor se correlacionaron ($R^2 > 0,6$) con los valores del máximo y medio de T_{22}, al igual que propiedades mecánicas ($R^2 \geq 0,5$) como la resistencia a la tracción y perforación y medidas de flexibilidad (elongación de rotura y deformación por punción). El componente T_{21} también se relacionó con las mismas propiedades mecánicas aunque con valores de R^2 ($P < 0,05$) inferiores así como con el extracto seco de las películas. Los resultados obtenidos sugieren que en el comportamiento físico y mecánico de las películas juega un importante papel la estructura de la red proteica (reflejado sobre todo por T_{22}).

En general, las películas que mostraron mayor WVP presentaron valores más bajos de T_{22} (tanto del valor del máximo como medio). Este descenso ($R^2 > 0,8$) sería compatible con una reducción de los espacios con menor libertad de movimiento de los protones y estructuras más cerradas, lo que inicialmente parecería una contracción (poros más pequeños y sin embargo sistemas más permeables al vapor de agua). No obstante, el descenso de T_{22} puede deberse a la ubicación entre la estructura proteica del glicerol (con tiempos de relajación mucho más cortos que el agua) y el carácter hidrofílico de este plastificante favorecería la permeabilidad del vapor de agua. En esta línea, diversos autores han observado que la permeabilidad al vapor de agua en películas de hidrolizado de suero de leche (Sothornvit y Krochta, 2000) y proteína de chícharo (Kowalczyk y Baraniak,

2011) aumentaba progresivamente con la concentración de glicerol adicionado. Sin embargo, la adición de este plastificante no afectó a la solubilidad de estas películas (Kowalczyk y Baraniak, 2011) ni de calabaza (Popović *et al*., 2012), lo que estaría en consonancia con la relación positiva ($R^2 \geq 0,8$) hallada entre los valores de T_{22} y la solubilidad de las películas. El descenso de la solubilidad paralelo a la reducción de T_{22} estaría relacionado con la mayor organización de la red proteica como se ha mencionado en el **Punto** IV.II.1.**5.3.3.2**.

En general, la resistencia a la rotura tanto por tracción (coeficiente de correlación, R = 0,78 para la resistencia a la tracción y R = - 0,83 para la elongación) como por penetración (R = - 0,81 para resistencia a la penetración y R = - 0,83 para deformación por punción) se incrementó ($P < 0,05$) con el descenso de los valores de T_{22}. La misma tendencia se observó en el caso del componente T_{21}. En conjunto, las correlaciones halladas entre los componentes de relajación T_{22} y T_{21} y las propiedades mecánicas se pueden relacionar con los comentarios realizados respecto a las características estructurales de las películas así como las apreciaciones de diversos autores en relación con el grado de desnaturalización de distintos tipos de proteínas por tratamientos de sonicación y térmicos (Conti *et al*., 1980; Dalgleish, 1982; Marcuzzo *et al*., 2010; Jambrak *et al*., 2011; Pérez-Gago, 2012). Como se ha mencionado, el descenso de ambos componentes de relajación se asocia con una mayor organización e interacción de la red proteica y mayor compactación que explicaría la mayor resistencia de las películas.

Varios atributos de color se relacionaron ($P < 0,05$) con el componente T_{22} ($R^2 > 0,4$) y, con valores de R^2 más bajos ($R^2 < 0,4$), con T_{13}. Cabe destacar la relación ($R^2 > 0,5$) de la opacidad con los componentes T_{22} y T_{11} (área de la señal), sin duda reflejo de la relación existente entre la transparencia y el color de las películas con el grado de entrecruzamiento o de agregación existente en su estructura (Uresti *et al*., 2003; Tang *et al*., 2005). Este parámetro (R = -0,77), al igual que el tono o matiz (H^*) (R = - 0,79) se incrementó ($P < 0,05$) con el descenso de los valores de T_{22} y T_{13}. Al parecer, la tendencia a tonalidades verdosas (menor a^*) y azuladas (menor b^*) se incrementaría ($P < 0,05$) con la compactación de la matriz (menor T_{22}) ($R \geq 0,7$). Una tendencia similar se observó para la diferenciación (ΔE) y la saturación (C^*), ambos se reducirían ($R \geq 0,7$; $P < 0,05$) con la mayor estructuración de la película (valores T_{22} más bajos).

Tabla IV.II1.**5.7.** Coeficientes de determinación (R^2) significativos ($P < 0,05$) obtenidos en el análisis de regresión lineal simple realizado para determinar la relación entre características de la películas comestibles y los parámetros de los componentes de los tiempos de relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1) obtenidos mediante relaxometría de RMN.

Componentes de T_2 y T_1	Parámetro de la señal	Caracteristicas de las películas comestibles															
		Propiedades Generales					Propiedades Mecánicas				Atributos de color						
		Extracto seco (g/100g)	Grosor (micras)	Solubilidad (%)	Permeabilidad (g m m /kPa h m^2)	Transmisión (g/hm^2)	Resistencia a la tracción en el máximo (MPa)	Elongación de rotura (%)	Resistencia a la perforación (MPa)	Deformación por punción (%)	*L**	*a**	*b**	ΔE	Opacidad (%)	C*	H* (°)
T_{21}	Valor del máximo	0,41					0,41	0,34	0,47	0,31							
	Valor medio	0,44					0,43	0,36	0,4	0,34							
	Área señal		0,32			0,49											
T_{22}	Valor del máximo		0,61	0,87	0,83		0,60	0,68	0,66	0,69		0,47	0,47	0,43	0,59	0,5	0,62
	Valor medio		0,68	0,8	0,86		0,49	0,60	0,57	0,61		0,43	0,44	0,41	0,56	0,4	0,57
	Área señal		0,32														
T_{11}	Valor del máximo	0,42													0,52		
	Valor medio																
	Área señal		0,30		0,34										0,67		
T_{13}	Valor del máximo					0,36											
	Valor medio						0,35		0,35			0,33	0,31	0,30			0,37
	Área señal										0,40	0,31	0,3	0,32		0,30	0,30

R^2: 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0

Características y propiedades indicadas en la **Tabla** IV.II.1.**5.2**.
Parámetros de la señal: Como se indica en la **Figura** III.**2**. Valor del máximo: valor del tiempo de relajación del máximo de la señal ms). Valor medio: tiempo de relajación promedio de la señal (ms). Área de la señal procesada como la fracción del área total de la distribución (adimensional)

IV.II.1.**5.3.3.4. Estudio de la microestructura de las películas comestibles de proteínas de lactosuero mediante relaxometría bidimensional (2D) de** RMN

Los espectros de relajación 2D en un sistema dan como resultado un único perfil T_1-T_2 que actúa como una huella dactilar para la distribución de agua en el interior de un sistema (Venturi y Hills, 2010; Kirtil *et al*., 2014), generando información sobre el contenido de agua, las propiedades físicas del agua y la interacción del agua con las macromoléculas circundantes (Zhang y McCarthy, 2012). En el presente trabajo se ha utilizado esta metodología para profundizar en el estudio de la microestructura de las películas, en especial en el análisis del componente poroso existente entre la matriz proteica que constituye las películas de CPS. Está bien establecido que los tiempos de relajación en los medios porosos disminuyen respecto a los del agua libre debido a la interacción de ésta con la superficie de los poros (Fantazzini, 2005). Si el espacio ocupado por los poros no es homogéneo, es decir, existen poros de diferente tamaño, el agua presentará una distribución continua de tiempos de relajación (Borgia *et al*., 2001). En los medios porosos los tiempos de relajación disminuyen en proporción al aumento de la relación superficie-volumen (S/V) del espacio de los poros (Fantazzini, 2005).

Los mapas de correlación 2D (T_1-T_2) para las películas se muestran en la **Figura** IV.II.1.**5.4**. Con el fin de facilitar la observación de los componentes de relajación, en estos mapas sólo se representa la parte de los espectros calculados en la que aparecieron señales. Fuera de este marco no hubo hallazgos de relajación RMN, por tanto la **Figura** IV.II.1.**5.4** recoge totalmente la respuesta de las muestras en el análisis de relaxometría. Como ocurrió en el análisis monodimensional, no se detectó la presencia de agua libre, que correspondería a señales fuera del mencionado marco del mapa T_1-T_2, ni poros grandes, donde el agua daría señales compatibles con agua libre. Los valores del máximo y el área de cada una de las señales de estos espectros se muestran en la **Tabla** IV.II.1.**5.8**. Para facilitar el análisis de dichos espectros se ha divido el área seleccionada (de 0,001 a 1,5 s para T_1 y de 1,5 10^{-4} a 1 s para T_2) en intervalos, que se han denominado como **A**, **B**, **C**, **D**, **E** en el caso de T_2 y como **a**, **b**, **c** en T_1 (**Figura** IV.II.1.**5.4**). La combinación de los intervalos de T_2 y T_1 permite establecer las coordenadas en las que se ubica una determinada señal dentro del espectro calculado. Los límites de los mencionados intervalos (**a-c** y **A-E**) se muestran en la **Tabla** IV.II.**5.8**. Algunos de estos intervalos se pueden asociar, de forma aproximada, a las señales obtenidas en los espectros monodimensionales (**Figuras** IV.II.1.**5.2** y IV.II.1.**5.3**.). De este modo las señales identificadas como T_{21}

corresponderían a las halladas en el intervalo **D** y **E** y las señales identificadas como T_{22} estarían en el área **C**. Las señales del intervalo **B** y **A** (señales **2**, **1a** y **1b**) corresponden a valores mayores de T_2. Estas señales no se apreciarían en las distribuciones 1D debido a su menor intensidad respecto a las señales T_{21} y T_{22}. Respecto a T_1, los intervalos **b** y **c** corresponderían a las señales identificadas como T_{12} y T_{13}. Es necesario indicar que el intervalo **a** corresponde a señales en las que $T_1 < T_2$, condición termodinámicamente imposible (Tudisca *et al*., 2011), por lo que en dicho intervalo aparecerán las señales debidas al intercambio químico (Hills, 2009), es decir, no corresponden a tiempos de relajación de protones del sistema, sino a estados de intercambio protón-protón entre el agua y la proteína en la pared de los poros. Este es el caso de las señales del intervalo **C,a** (señales **3**) de las películas T-MTGasa y T-US-60-MTGasa (valores del máximo: T_1 = 4,89 ms y T_2 = 10,84 ms para T-MTGasa y T_1 = 5 ,49 ms y T_2 = 21,17 ms para T-US-60-MTGasa). También hay que incluir en este intervalo la señal etiquetada como **4a** en el espectro de la película T-US-60 (valores del máximo T_1 = 15,96 ms y T_2 = 20,22 ms). Es probable que estas señales apareciesen en los espectros restantes pero su baja intensidad quedaría enmascarada por las señales más intensas. Las señales T_{11}, como se dijo en el **Punto** IV.II.1.**5.3.3.2**, presentaron valores muy bajos (< 5 ms) y no se detectaron en el análisis 2D-RMN. Cabe indicar que su ubicación estaría por debajo del marco del mapa mostrado en la **Figura** IV.II.1.**5.4**.

Para facilitar el estudio de las señales obtenidas en el análisis 2D se ha elaborado la **Tabla** IV.II.1.**5.9,** en la que se ha intentado resumir la relación de los parámetros T_1 y T_2 con la porosidad y la distribución de los protones en cualquier sistema constituido fundamentalmente por una matriz estructurada y un fluido.

En los espectros bidimensionales T_1-T_2 es posible observar como la película tratada con calor (T-Calor) fue la que presentó mayores diferencias respecto al resto de las películas estudiadas (**Figura** IV.II.1.**5.4**, **Tabla** IV.II.1.**5.8**). La principal característica que se observa es la aparición de una señal (**8**) muy intensa (88,82% del área total del espectro) a valores de T_2 bajos (intervalo **E,c**; señal **8**; T_2 del máximo = 1,27 ms). Este cambio ya se pudo observar en los espectros monodimensionales en los que se apreció como dicha película presentaba los valores más bajos de T_2. Esta señal puede asociarse a tres efectos principales:

(1) la aparición de poros de menor tamaño debido a la compactación de la matriz proteica por la pérdida de la estructura globular durante el calentamiento y al establecimiento de múltiples interacciones proteína-proteína.

(2) a la interacción del glicerol con la estructura de la matriz

(3) el aumento de los gradientes de campo magnético internos de la película debido a la reducción del tamaño de los poros.

Además de la señal **8**, las películas T-Calor se caracterizaron por presentar señales con valores de T_2 más altos (intervalo **A**, **c**; señales **1a** y **1b**; T_2 del máximo 181,20 ms y 239,03 ms, respectivamente). Este efecto del tratamiento térmico fue también visible en la distribución monodimensional de T_2 (en la **Figura** IV.II.1.**5.2**, indicado con una flecha) en la que pudo observarse una mínima señal, casi imperceptible, a valores más altos del tiempo de relajación T_2. Estos valores corresponderían a agua con mayor grado de libertad que la que se encuentra atrapada en la estructura de la matriz (T_{21}) o la que está formando la capa de hidratación de los pequeños poros de las películas (T_{22}). Este agua podría corresponder a la que se encuentra en las zonas centrales de algunos poros de mayor tamaño y que por tanto presentan menor grado de relación con la estructura proteica y consecuentemente mayor T_2. El área de estas señales fue menor al 1% del área total de la curva, lo que indicaría que el número de protones que presentaban estos valores más altos de T_2 era pequeño en relación con el número de protones que tenían valores más bajos de T_2, correspondientes a las señales T_{21} y T_{22} observadas en los espectros monodimensionales.

Por otro lado, los mapas 2D de las películas T-Calor mostraron una señal (**4a,** T_2 del máximo 9,22 ms y T_1 18,98 ms) en el intervalo **C,b** a valores menores tanto de T_1 como de T_2. En este intervalo aparecen la señal de los protones que se encuentran formando parte de las capas de hidratación de los microporos (**Tabla** IV.II.1.**5.9**), por lo que la disminución de ambos tiempos de relajación podría estar relacionada con dos hechos: (1) la disminución del tamaño de los poros y (2) a la presencia del glicerol, tanto el unido a la proteína, y que por tanto haría disminuir el T_1 de los protones de las capas de hidratación, como el disuelto en el fluido que ocupa los espacios o poros, reduciendo los tiempos de relajación al presentar valores mucho más bajos que el agua (T_1 alrededor de 12,8 y 4000 ms, respectivamente) (Manic *et al*., 1998; Frazier, 2006).

En los mapas 2D de las películas T-Calor también se encontraron dos señales similares a las halladas en la películas Control: **2** (en el intervalo **B,c**) con valores T_2 inferiores al Control (114,19 ms en la proteína nativa y valores próximos a 75,37 ms en las películas con tratamiento térmico) y **5b** (en el intervalo **C,c**) desplazada hacía valores T_1 más bajos que los correspondientes al Control (480,51 ms en Control *versus* 381,46 ms en T-Calor). Estos cambios posiblemente se asocien a la interacción de la proteína desnaturalizada por el calor con el glicerol (Guerrero *et al*., 2010) y a la mayor organización de la matriz proteica en las películas T-Calor.

Respecto al efecto del tratamiento con ultrasonidos, al comparar los mapas 2D de las películas resultantes de este tratamiento (T-US-15, T-US-60, T-US-15+MTGasa y T-US-60+MTGasa) con las películas de CPS no tratadas (Control y T-MTGasa) (**Figura** IV.II.1.**5.4**) puede observarse que las señales del intervalo **D** (señales **6** y **7**) presentes en las películas Control aparecen desplazadas tras el tratamiento con ultrasonidos, fundamentalmente por reducción del valor de T_1 y un pequeño descenso del T_2, (en concreto del T_{21}); por ejemplo, en el caso de la señal **6**, los valores de T_2 próximos a 4,95 ms en las películas control se redujeron a valores por debajo de 4,4 ms en las películas sonicadas y en la señal **7** el cambio fue de 5,55 ms, en Control, a valores inferiores a 5 ms en las películas tratadas (**Tabla** IV.II.1.**5.8**). Estas señales corresponderían a los protones que interaccionan con la pared que delimita la estructura porosa de las películas. El distanciamiento de las señales **6** y **7** sugiere la mayor organización de las películas sonicadas frente a las de proteína nativa, debido a la mencionada desnaturalización proteica por ese tratamiento (Gülseren *et al*., 2007; Arzeni *et al*., 2012, Marcuzzo *et al*., 2010; Kresic *et al*., 2008; Jambrak *et al*., 2009, 2011) y a la aparición de poros de diferente tamaño bien definidos. Los resultados sugieren un incremento de los poros de menor tamaño en las películas T-US, dado que la diferenciación (Control *versus* T-US) se debió sobre todo al desplazamiento de la señal **6**, ubicándose en el intervalo asociado a microporos (**Tabla** IV.II.1.**5.9**); en concreto las películas Control presentaron valores de T_1 de 73,65 ms mientras que no se superaron los 47 ms en las sonicadas.

Otra característica diferencial de los mapas 2D de las películas tratadas con ultrasonidos fue la desaparición de la seña **4b**, sólo presente en las películas Control y relacionada con agua de hidratación en los poros. Este efecto de la sonicación probablemente es debido a que los protones aumentan su interacción con las proteínas, decreciendo el T_2 y coincidiendo con el de la señal **6**. Como se apreció en el análisis de

relaxometría 1D, el tratamiento con ultrasonidos aumentó el valor de T_{22} y disminuyó el correspondiente a T_{13}, en consecuencia la señal **5b**, apreciada en las películas Control y T-Calor, se encuentra desplazada dando lugar a la señal **5a** en las películas sonicadas. Este efecto se asocia a los ya mencionados cambios estructurales debidos al despliegue de las proteínas del CPS (Jambrak *et al*., 2009, 2011) con el tratamiento con ultrasonidos. Como ocurrió en el análisis monodimensional 1D no se observaron cambios sustanciales debidos al tiempo de sonicación (15 *versus* 60 min).

Respecto al efecto de la adición de MTGasa al CPS se observó un desplazamiento de la señal **6** (asociada al agua de hidratación cercana a las proteínas **Tabla** IV.II.1.**5.9**), debido a un aumento de T_1. En el caso de las películas sonicadas, T_1 pasó de valores entre 14 y 24 ms en las películas T-US-15 y T-US-60 a 36-46 ms en las películas adicionas con MTGasa (T-US-15+MTGasa y T-US-60+MTGasa). Este cambio puede relacionarse con la mayor estructuración de las películas adicionadas con MTGasa debido al incremento de la interacción proteína-proteína y el consiguiente desplazamiento del agua en las zonas donde se estableció el entrecruzamiento proteico (Whitaker, 1977; Nielsen, 1995; Weng y Zheng, 2015). En el caso de las películas elaboradas con proteína nativa con MTGasa el desplazamiento de la señal **6** llevó a su integración en la señal **7** (**Figura** IV.II.1.**5.4**).

Tras el análisis conjunto del estudio 1D y 2D RMN de las películas, es posible concluir que su microestructura estaría constituidas por una red proteica (de la que informa fundamentalmente el componente T_{21}) en cuyo seno se encuentran microespacios y poros (de los que informan especialmente T_{22} y T_{13}) en los que se ubica un fluido (agua y glicerol). El tamaño de estos poros se ha intentado cuantificar mediante la relaxometría de RMN partiendo de los antecedentes de diversos autores en distintos materiales (Musse *et al*., 2010; Schoenfelder *et al*., 2008; Hansen *et al*., 2005).

La porosidad puede ser evaluada mediante la relaxometría de RMN debido a que los tiempos de relajación de resonancia magnética varían por la interacción de los protones con la superficie de dichos poros (Davies y Packer, 1990). En estos medios, tanto el valor de T_1 como el de T_2 disminuyen cuando aumenta la relación superficie-volumen (S/V) del medio (Fantazzini, 2005), por lo que ambos podría ser empleados para calcular la porosidad (Schoenfelder *et al*., 2008). De hecho existe una relación directa entre los tiempos de relajación y el radio R del poro:

(i)

$$\frac{1}{T_{1,2}} = \frac{1}{T_{1b,2b}} + \rho_{1,2} \cdot \frac{1}{c \cdot R}$$

donde $T_{1,2}$ es el tiempo de relajación longitudinal o transversal. $T_{1b,2b}$ es el tiempo de relajación T_1 o T_2 del agua libre. Dado que este último valor es muy grande comparado con el tiempo de relajación en los poros $T_{1,2}$ la ecuación (i) podría escribirse:

(ii)

$$\frac{1}{T_{1,2}} = \rho_{1,2} \cdot \frac{1}{c \cdot R}$$

c es un factor dependiente de la forma de los poros (1/3 para poros esféricos, 2/3 para poros cilíndricos) y $\rho_{1,2}$ es la relaxividad superficial y tiene en cuenta el acoplamiento magnético en la interfaz fluido-pared del poro (Casieri *et al*., 2010). El valor es diferente para la relajación longitudinal y transversal, y depende de las moléculas del fluido y la superficie interna del poro. Este parámetro suele ser desconocido y es necesario realizar medidas de calibración para obtenerlo.

En el caso de una distribución continua de tiempos de relajación, el valor $T_{1,2}$ puede ser sustituido por dicha medida de modo que se obtendría una distribución del tamaño de poros. Sin embargo, en el caso de las películas estudiadas no fue posible esa medida por varias razones:

1) En los materiales porosos, como en las películas estudiadas, los cambios de susceptibilidad magnética entre la matriz proteica y el fluido en los poros producen pequeños campos magnéticos locales que se suman o restan al campo magnético principal, acelerando el desfase de la señal de resonancia, lo que disminuye los tiempos de relajación (Casieri *et al*., 2010). Este efecto se incrementa con el aumento de la intensidad del campo magnético (Hernández-Sánchez *et al*., 2007), por lo que considerando el elevado campo magnético al que se ha trabajado (4,7 teslas) la afectación de los tiempos de relajación puede ser muy considerable (Marigheto *et al*., 2008).

2) Por otro lado, como se ha mencionado no se ha detectado agua libre, debido a que la mayoría se habría evaporado en el proceso de secado y polimerización de las películas. En esta situación las moléculas de agua existente se encuentran unidas, en mayor o menor medida, a la matriz proteica y por tanto no difunden con facilidad, y los tiempos de relajación se encontrarían afectados por la lenta difusión de los protones del fluido (Casieri *et al*., 2010; Brownstein y Tarr, 1979).

3) Finalmente, hay que tener en cuenta que la equivalencia entre la distribución de los tiempos de relajación y el tamaño de los poros sólo se puede asegurar en el caso de que exista un único fluido en los poros, es decir, cuando hay un único parámetro de relaxividad superficial, $\rho_{1,2}$ (Mitchell, 2014). En el caso de las películas estudiadas, el fluido que llena los poros es agua acompañada por otros componentes como glicerol y grasa. La relación entre estos componentes dependerá del tratamiento aplicado (sin tratamiento, calor, ultrasonidos con o sin MTGasa), por lo que no es posible calcular un único valor de relaxividad para todas las películas.

Por las causas mencionadas, las distribuciones de los tiempos de relajación calculadas, tanto las monodimensionales como las bidimensionales, no pudieron emplearse para obtener una medida precisa del tamaño de los poros. En el caso del sistema estudiado, solamente los valores del máximo, de la media y la integral de las señales del espectro pueden emplearse para comparar los diferentes tratamientos empleados (Valckenborg, y Kopinga, 2002). Sin embargo, fue factible calcular la porosidad relativa definida como el *volumen relativo* que ocupan los poros respecto al volumen total de la muestra. Para ello se han empleado los mapas T_1 - T_2 debido a que éstos poseen mayor información y más detallada que las distribuciones monodimensionales. En las muestras de las películas, las señales de las distribuciones T_1-T_2 provienen de los protones de las moléculas del fluido que está rellenando los poros, es decir, la integral total de las señales de cada distribución es proporcional al volumen total de los poros de la muestra correspondiente. Para obtener un valor comparable entre las películas se normalizaron los datos antes de la realización de la transformada inversa de Laplace (**Punto** IV.II.1.**5.2.3**). Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla** IV.II.1.**5.8**. Hay que tener en cuenta que la porosidad calculada es una medida relativa y corresponde a un volumen total de todos los poros, e incluye poros pequeños y grandes, por lo que películas con porosidad similar pueden presentar distinto número o tamaño de poros. No obstante, es una medida que permite la comparación de la porosidad total de distintos sistemas.

Las películas T-Calor mostraron el valor más bajo de porosidad relativa (24,93 para T-Calor). Este resultado se debe a que estas películas mostraron los valores de T_2 más bajos (señales T_{21} y T_{22} de las distribuciones monodimensionales, en la **Figura** IV.II.1.**5.2** y la **Tabla** IV.II.1.**5.6**, y señal **8** de las distribuciones bidimensionales, en la **Figura** IV.II.1.**5.4** y la **Tabla** IV.II.1.**5.8**), mientras que la señal **2** (**Figura** IV.II.1.**5.4** y **Tabla** IV.II.1.**5.8**) de los espectros bidimensionales presentó el menor área. En consecuencia, el

volumen total que ocupan los poros en esta película fue menor que en el resto de las películas. Estos resultados, como se ha mencionado anteriormente, están en consonancia con la mayor probabilidad de establecimiento de enlaces disulfuro en las proteínas de lactosuero tratadas por calor (Shimada y Cheftel, 1989; McHugh y Krochta, 1994; Havea *et al.*, 2004; Perez-Gago y Krochta, 2002).

Teniendo en cuenta la porosidad relativa calculada las películas de CPS pueden ordenarse, de mayor a menor valor: T-US-60 > T-MTGasa > T-US-15-MTGasa ≥ T-US-60+MTGasa > Control > T-US-15 > T-Calor. En general, las películas elaboradas con proteína nativa (Control) fue muy similar a la de las películas sonicadas durante 15 minutos (T-US-15), mientras que en las tratadas durante 60 minutos (T-US-60) la porosidad relativa fue mucho mayor (34,22 para la película Control, 30,23 para la película T-US-15 y 68,27 para la película T-US-60). La proximidad de la porosidad en las películas Control y T-US-15 sugiere que, aunque se produzcan cambios en la microestructura de las películas sonicadas corto tiempo, como se deduce de las variaciones de T_{21}, T_{22} y T_{13} de ambas películas (**Tabla** IV.II.1.**5.6**), el tiempo del tratamiento no fue suficiente para modificar sustancialmente la porosidad total de la muestra. Sin embargo, el incremento de la porosidad en las película T-US-60 se relacionaría con la mayor desnaturalización provocada por la intensidad del tratamiento ultrasónico y la posterior reordenación proteica con el establecimiento de distinto tipo de interacciones (Gülseren *et al.*, 2007; Marcuzzo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2004).

La incorporación de MTGasa claramente redujo la porosidad en las películas tratadas con ultrasonidos (40,53 para T-US-15+MTGasa y 38,41 para T-US-60+MTGasa). Este resultado está en concordancia con la disminución del valor del área de la señal T_{22} de estas películas (**Tabla** IV.II.1.**5.6**) lo que implica una disminución en el número de poros y en la dispersión de tamaño a pesar de que el valor medio del tamaño no cambiaría. Estos hechos se deberían al potencial de esta enzima para formar enlaces covalentes (lisina-glutamina) (Gianferri *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 1997; Ruan *et al.*, 1997; Schmidt, 1990).

Al comparar los resultados de las películas Control y las adicionadas con MTGasa (T-MTGasa) se observó (**Tabla** IV.II.1.**5.8**) que la actividad de la enzima aumentó la porosidad relativa de las películas (34,22 para la película Control y 57,6 para la película T-MTGasa). Como se ha mencionado en el **Punto** IV.II.1.**5.3.3.1** y de acuerdo con los valores de T_{21} y T_{22} (**Tabla** IV.II.1.**5.6**), en las películas T-MTGasa el establecimiento de

enlaces covalentes reduciría la interacción de los protones de las proteínas con los del agua y la variación en la anchura de la señal T_{22} sugirió una porosidad más heterogénea, en número y forma, en las muestras adicionadas con enzima.

Aunque no se han encontrado referencias de análisis de relaxometria de RMN 2D de películas comestibles o sistemas similares, al igual que en células (Belton y Capozzi, 2011; Ersus *et al*., 2010; Kirtil *et al*., 2014) y distintos tejidos (Hills, 1998; Oztop *et al*., 2010; Kirtil *et al*., 2014), esta técnica ha permitido obtener información detallada de su microestructura a través de las variaciones en el intercambio magnético de los protones de distintos compartimentos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que, en general las películas de proteína de lactosuero están constituidas por una estructura organizada y caracterizada con una red proteica con mayor o menor grado de interacción proteína-proteína dependiendo del tratamiento de desnaturalización proteica aplicado (nativa, calor o ultrasonido) y de la presencia o no de transglutaminasa. Esta matriz proteica presentaría una estructura porosa, con espacios bien definidos donde coexistiría la presencia fundamentalmente de agua y glicerol, con mayor o menor grado de interacción con la proteína. En ningún caso se detecta la presencia de agua libre, ni poros grandes. La estructura más compacta con poros de menor tamaño, incluidos microporos, se presentó en las películas tratadas térmicamente. Sólo en estas películas se hallaron señales de relajación compatibles con interacción proteína-plastificante.

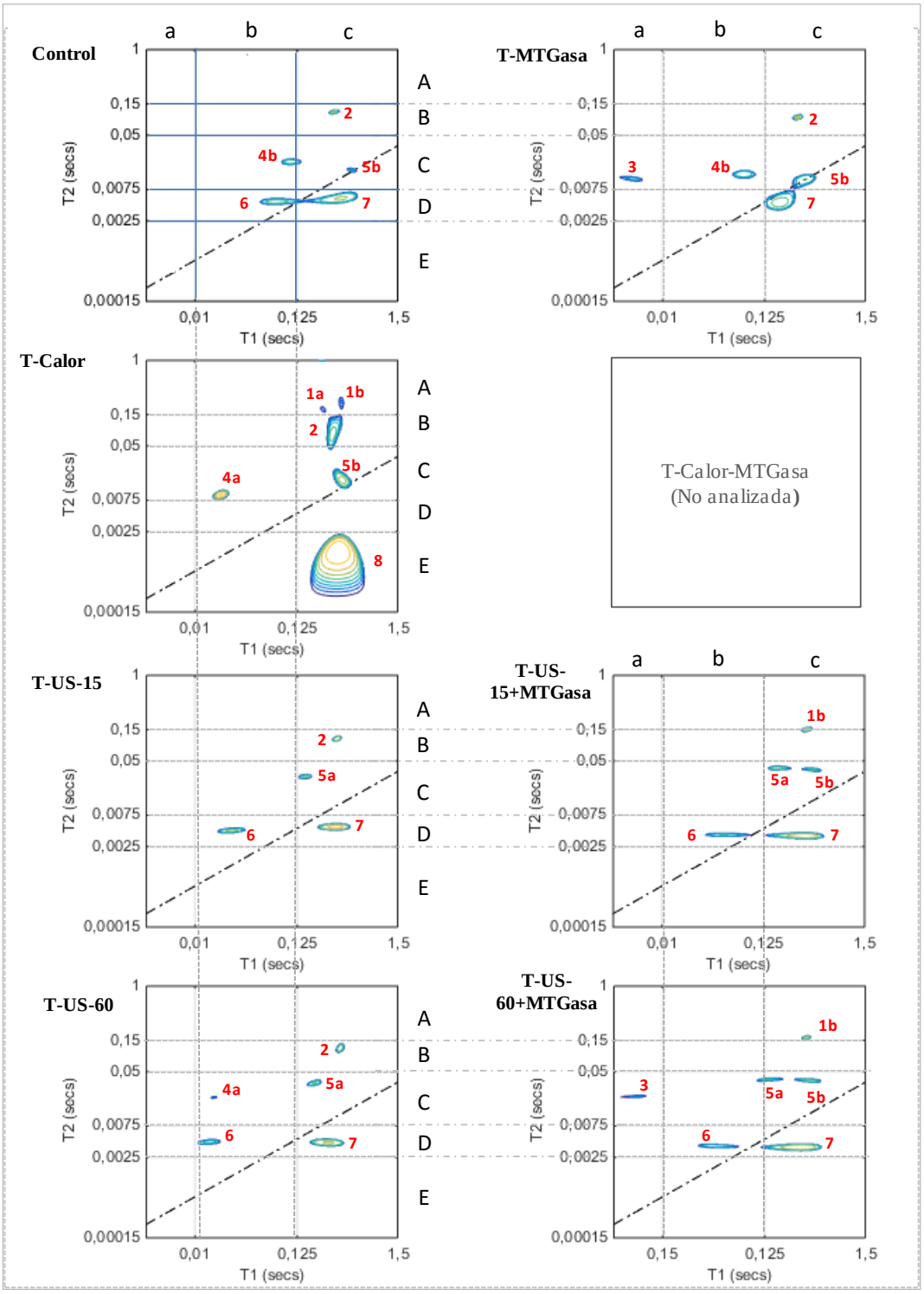


Figura IV.II.1.**5.4**. Mapas T_1-T_2 derivados del análisis de relaxometría de RMN bidimensional de las películas comestibles elaboradas con proteínas de lactosuero.

Control, T-MTGasa, T-Calor, T-Calor-MTGasa, T-US-15, T-US-15+MTGasa, T-US-60, T-US-60+MTGasa: corresponde a los tratamientos aplicados para la obtención de las películas comestibles como se indica en la **Tabla** IV.II.1.**5.1.**

Tabla IV.II.1.**5.8.** Parámetros de las señales obtenidas en el análisis de relaxometría de RMN bidimensional (2D) de las películas comestibles elaboradas con proteínas de lactosuero.

		Coordenadas de las señales de relaxometría 2D (Figura IV.II.1.4)															
Cuadrante		**Ac**		**Bc**		**Ca**		**Cb**		**Cc**		**Db**		**Dc**		**Ec**	
Intervalo de valores (ms)		T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1
		1000,0	125,0	150	125	50,0	1,0	50,0	10,0	50,0	125,0	7,5	10,0	7,5	125,0	2,5	125,0
		150,0	1500,0	50	1500	7,5	10,0	7,5	125,0	7,5	1500,0	2,5	125,0	2,5	1500,0	0,15	1500,0
Señal	**Porosidad**	**1a**	**1b**	**2**		**3**		**4a**	**4b**	**5a**	**5b**	**6**		**7**		**8**	
Películas																	
Control	34,22			Integral 3406,16 T_2 del max 114,19 T_1 del max 311,70 Area (%) 6,51					Integral 5253,56 T_2 del max 19,76 T_1 del max 107,17 Area (%) 10,00		Integral 454,40 T_2 del max 14,98 T_1 del max 480,51 Area (%) 0,90	Integral 9993,77 T_2 del max 4,95 T_1 del max 73,65 Area (%) 19,00		Integral 33600,92 T_2 del max 5,55 T_1 del max 370,61 Area (%) 63,70			
T-MTGasa	57,6			Integral 10458,78 T_2 del max 94,94 T_1 del max 285,85 Area (%) 10,78		Integral 1351,12 T_2 del max 10,84 T_1 del max 4,89 Area (%) 1,40			Integral 10601,34 T_2 del max 13,04 T_1 del max 73,65 Area (%) 10,90		Integral 18346,60 T_2 del max 10,84 T_1 del max 349,83 Area (%) 18,90			Integral 56288,81 T_2 del max 4,72 T_1 del max 180,15 Area (%) 58,00			
T-Calor	24,93	Integral 46,18 T_2 del max 181,20 T_1 del max 233,58 Area (%) 0,03	Integral 121,64 T_2 del max 239,03 T_1 del max 370,61 Area (%) 0,10	Integral 5130,01 T_2 del max 75,37 T_1 del max 302,83 Area (%) 3,39				Integral 6326,68 T_2 del max 9,22 T_1 del max 18,98 Area (%) 4,20			Integral 5392,10 T_2 del max 15,33 T_1 del max 381,46 Area (%) 3,50					Integral 135128,60 T_2 del max 1,27 T_1 del max 339,88 Area (%) 88,80	
T-US-15	30,23			Integral 2917,11 T_2 del max 109,04 T_1 del max 330,22 Area (%) 9,82						Integral 1846,96 T_2 del max 29,25 T_1 del max 151,51 Area (%) 6,20		Integral 4529,75 T_2 del max 4,41 T_1 del max 24,60 Area (%) 15,30		Integral 20387,33 T_2 del max 4,95 T_1 del max 320,82 Area (%) 68,70			
T-US-60	68,27			Integral 9840,21 T_2 del max 114,19 T_1 del max 360,07 Area (%) 13,71				Integral 118,77 T_2 del max 20,22 T_1 del max 15,96 Area (%) 0,20		Integral 5750,85 T_2 del max 33,60 T_1 del max 190,85 Area (%) 8,00		Integral 4334,80 T_2 del max 4,31 T_1 del max 14,22 Area (%) 6,00		Integral 51854,70 T_2 del max 4,21 T_1 del max 269,82 Area (%) 72,10			
T-US-15+MTGasa	40,53		Integral 4581,24 T_2 del max 150,64 T_1 del max 360,07 Area (%) 8,41							Integral 4216,53 T_2 del max 39,49 T_1 del max 170,05 Area (%) 7,70	Integral 1973,60 T_2 del max 36,85 T_1 del max 428,13 Area (%) 3,60	Integral 3944,29 T_2 del max 3,84 T_1 del max 46,42 Area (%) 7,20		Integral 39873,02 T_2 del max 3,66 T_1 del max 339,88 Area (%) 73,00			
T-US-60+MTGasa	38,41		Integral 3540,97 T_2 del max 165,22 T_1 del max 349,84 Area (%) 5,62			Integral 325,77 T_2 del max 21,17 T_1 del max 5,49 Area (%) 0,50				Integral 2349,90 T_2 del max 37,71 T_1 del max 131,16 Area (%) 3,70	Integral 3873,08 T_2 del max 36,85 T_1 del max 392,63 Area (%) 6,10	Integral 3700,96 T_2 del max 3,75 T_1 del max 36,85 Area (%) 5,90		Integral 49464,67 T_2 del max 3,58 T_1 del max 302,83 Area (%) 78,20			

Parámetros de la señal: Como se indica en la **Figura** III.**2**. Integral: valor de la integral de la señal (unidades arbitrárias x ms). T_1 del max y T_2 del máximo: valor del tiempo de relajación (transversal, T_2 o longitudinal, T_1) del máximo de la señal (ms). Área (%): Área de la señal procesada como el porcentaje de la fracción del área total de la distribución. La porosidad de las muestras, expresada como volumen relativo que ocupan los poros frente al volumen total de la muestra. Películas: como se indica en **Tabla** IV.II.1.**5.1.**

Tabla IV.II.1.**5.9.** Relación propuesta entre la microestructura de las películas comestibles elaboradas con proteínas de lactosuero y los componentes de los tiempos de relajación transversal (T_2) y longitudinal (T_1) derivados del análisis de relaxometría de RMN bidimensional (2D).

						- T_1 +				
						Ubicación del agua y grado de interacción con la microestructura				
							Microporos y agua ligada a las macromoléculas	Poros, de mayor o menor tamaño, con agua poco o medianamente relacionada		
+		**Agua ligada a las macromoléculas** (con distinto grado de interacción agua-macromoléculas)	Grado de interacción agua-proteina	----	**Poco ligada** a las proteínas (agua de hidratación,			Agua más libre atrapada en la microestructura o en los poros. **Señales 1a y 1b** *1 señal* **T-US-15+MTGasa**; **T-US-60+MTGasa**; *2 señales* **T-Calor**	**A**	**Coordenadas T_2 (Figura** IV.II.1.4**)**

				--				Agua poco relacionada, alejada de las macromoléculas **Señal 2** **Control**; **T-MTGasa**; **T-Calor**; **T-US-15**; **T-US-60**	**B**	
T_2				-	Agua alrededor de las proteína (agua de sucesivas capas de hidratación)	Señales de intercambio químico (de protones con la macromolécula) **señal 3** **T-MTGasa; T-US-60+MTGasa**	Agua de hidratación en microporos **Señales 4a y 4b** **Control**; **T-MTGasa**; **T-Calor**; **T-US-60**	Agua de hidratación en poros **Señales 5a y 5b** *1 Señal* **: Control**; **T-MTGasa**; **T-Calor**; **T-US-15**; **T-US-60**; *2 señales* **: T-US-15+MTGasa**; **T-US-60+MTGasa**	**C**	
				+			Agua de hidratación cercana a las proteínas **Señal 6** **Control; T-US-15**; **T-US-60**; **T-US-15-MTGasa**; **T-US-60+MTGasa**	Agua de hidratación cercana a las proteínas **Señal 7** **Control**; **T-MTGasa**; **T-US-15**; **T-US-60**; **T-US-15+MTGasa**; **T-US-60+MTGasa**	**D**	
				++	**Muy ligada** (incluida agua de la monocapa de					
				+++ ++++				Agua de la monocapa. Agua ligada en poros **Señal 8** **T-Calor**	**E**	
-						**a**	**b**	**c**		
						Coordenadas T_1 (Figura IV.II.1.**4**)				

Control, T-MTGasa, T-Calor, T-US-15, T-US-60, T-US-15+MTGasa, T-US-60+MTGasa: como se indica en **Tabla** IV.II.1.**5.1**. Control: película porosa en la predominaría el agua poco ligada a las proteínas y poros probablemente de gran tamaño. T-MTGasa: película porosa con poros de diferente tamaño, incluidos microporos, y agua integrada en la estructura con distintos grados de interacción. T-Calor: película en la predominaría el agua ligada a una estructura compacta, con escasos poros, y en la que queda agua libre atrapada. T-US-15: película porosa en la predominaría el agua poco ligada a las proteínas y poros amplios. T-US-60: película porosa con poros de diferente tamaño y agua integrada en ls estructura con distintos grados de interacción. T-US-15+MTGasa: película porosa con poros de diferente tamaño y agua integrada en la estructura con distintos grados de interacción. T-US-60+MTGasa: película porosa con poros de diferente tamaño, incluidos microporos, y agua integrada en la estructura con distintos grados de interacción.

IV.II.1.5.3.4. Análisis preliminar del potencial de las películas de proteína de lactosuero como material de envasado de quesos. Trabajo futuro

En un primer acercamiento al análisis del potencial de los biopolímeros de proteínas de lactosuero como material de envasado se utilizó únicamente las películas obtenidas por calor (P-T-Calor). Esta elección se hizo teniendo en cuenta que estas películas presentaron, como se ha mencionado, los valores más bajos ($P < 0,05$) de solubilidad (**Tabla** IV.II.1.**5.3**) y elevada resistencia mecánica (mayor resistencia a la tracción, elongación a la rotura, resistencia a la perforación y deformación a la punción, $P < 0,05$) en los ensayos de tracción y punción (**Tabla** IV.II.1.**5.4**). Estas películas T-Calor se utilizaron como material de separación entre lonchas de queso Manchego comercial (tres meses de maduración) para sustituir los materiales, plásticos o de papel, actualmente utilizados en la comercialización de quesos RTE. Como es sabido, uno de los problemas más comunes en la comercialización de los productos loncheados es la rotura de las unidades en el momento de la separación para su consumo, lo que produce la insatisfacción del consumidor ante la imposibilidad de obtener unidades integras y la dificultad de la separación de la loncha. Para solventar este problema comercial normalmente se recurre a la colocación, en el espacio entre lonchas, de láminas de plásticos o papeles, que no siempre tienen un comportamiento totalmente satisfactorio, ya que en muchos casos hay una fuerte adherencia de las porciones loncheadas al material de separación. Las películas comestibles pueden ser una buena alternativa para este fin, especialmente si se considera que se trata de un material de naturaleza similar al producto envasado.

La **Tabla** IV.II.1.**5.10** muestra los resultados obtenidos al comparar el comportamiento, en el momento de separación de lonchas de queso superpuestas, de las películas T-Calor con láminas comerciales (Cellophan de uso alimentario) utilizadas como material de separación. Como puede observarse, la separación de las lonchas fue igualmente viable (60 %) o incluso se presentó menor grado de adherencia, facilitando la adquisición de las lonchas (40 % de los casos) cuando se utilizó la película T-Calor frente al comportamiento del material comercial de referencia (REF). En ambos casos, en el proceso de separación de lonchas, el material de separación suele permanecer adherido a una de las superficies de la lonchas superpuestas (la que se retira o la que permanece en el bloque del producto loncheado); en el caso del empleo de las película T-Calor la separación de la superficie de la loncha fue más sencilla que cuando había que retirar la

lámina REF debido, entre otros factores, al mayor grosor de la película comestible y a su mayor flexibilidad y capacidad de deformación.

Tabla IV.II.1.**5.10.** Comportamiento de la película obtenida por tratamiento térmico de proteínas de lactosuero (P-T-Calor) como material de separación entre lonchas de quesos.

1. Facilidad de separación de las lonchas.

% de lonchas de queso con P-T-Calor evaluadas *más dificil de separar que la referencia* (REF)	% de lonchas de queso con P-T-Calor que presentó un comportamiento similar en la separación que la referencia	% de lonchas de queso con P-T-Calor evaluadas *más fácil de separar que la referencia* (REF)
0	60	40

2. Integridad de las lonchas en la separada.

Envases con P-T-Calor		**Envases con REF**	
% lonchas rotas	**% lonchas integras**	**% lonchas rotas**	**% lonchas integras**
25	75	20	80

3 Integridad en la separación del material entre lonchas.

Envases con P-T-Calor		**Envases con REF**	
% separador roto	**% separador integró**	**% separador roto**	**% separador integro**
15	85	0	100

%

calculado sobre el total de muestras evaluadas [% = (Numero de muestras que mostraron un determinado comportamiento / Número total de muestras analizadas)*100].

REF: Envases de referencia utilizando láminas comerciales (Cellophan de uso alimentario) como material de separación entre lonchas.

El número de lonchas rotas en la separación fue similar cuando se utilizó P-T-Calor o el material REF. (**Tabla** IV.II.1.**5.10**), sin embargo, hubo una pequeña incidencia de rotura de las películas T-Calor cuando se procedió a su separación de la superficie de las lonchas (15%) mientras que en ningún caso se perdió la integridad de las láminas de referencia. En las observaciones realizadas por los evaluadores cabe destacar que la utilización de ambos materiales de separación no afectó al color o al olor del queso. En pruebas adicionales en las que se consumieron lonchas de queso con película T-Calor

adherida no se detectaron cambios de sabor; no obstante la percepción de la película fue notable debido a su textura rígida y plástica.

Aunque hasta la conclusión de esta Tesis Doctoral, las pruebas realizadas son escasas (tres ensayos con un total de 108 lonchas de un sólo tipo de queso con película T-Calor y un número igual de producto con láminas REF) se considera que los resultados han sido muy satisfactorios y han permitido plantear una nueva línea de trabajo del equipo investigador, para la adecuación de películas elaboradas con proteínas de lactosuero como material de separación entre lonchas y para la protección de las superficies de corte cuando se comercializan porciones de queso. Esta aplicación constituye una nueva vertiente en la aplicación de materiales comestibles en el envasado de alimentos. Al contrario de los que ocurre en otros alimentos, todavía no se han diseñado envases comestibles comerciales para quesos, aunque en la bibliografía científica existen notables antecedentes, como los realizados para quesos Regional y Ricotta utilizando, respectivamente, galactomanano, agar y quitosano, combinados con lípidos (Souza *et al*., 2009, 2010) o quitosano junto con proteínas de lactosuero (Di Pierro *et al*., 2011), ya mencionados en la Introducción de esta Memoria. En general, las propuestas realizadas hasta la actualidad se refieren al uso de distintos materiales comestibles, incluidos proteínas de lactosuero (Pintado *et al.*, 2010) para el recubrimiento externo de piezas completas o trozos grandes de distintos tipos de quesos o bolsas para la inclusión de lonchas elaboradas con zeína (Ryu *et al*., 2005).

IV.II.1.**5.4. Conclusión**

Las características (generales, mecánicas y de color) y la microestructura de las películas elaboradas con glicerol como plastificante (4%) y un concentrado de proteína de lactosuero bovino (CPS) (80 % proteína) difieren dependiendo del grado de desnaturalización proteico ocasionado por el tratamiento previo aplicado (sin tratamiento, calor, ultrasonidos, con o sin adición de transglutaminasa de origen microbiano, MTGasa).

Las películas elaboradas con una solución de CPS sometida a tratamiento térmico (82 ºC, 30 min) son las más insolubles, resistentes y flexibles. Las películas resultantes del tratamiento con ultrasonidos (35 kHz, 15 ó 60 min a 25 ºC) son las más finas, presentan menor permeabilidad al vapor de agua que las tratadas con calor (T-Calor) y, en comparación con las películas elaboradas con proteína nativa (Control), poseen más resistencia a la tracción. La incorporación de MTGasa (0,75 %) a la solución de CPS sonicada aumenta su resistencia y flexibilidad. El color de las películas T-Calor muestran

tonalidades con tendencia a ser rojizas y azuladas, mientras que las tratadas con ultrasonidos resultan más verdosas y amarillas. La incorporación de MTGasa reduce la luminosidad de las películas.

La relaxometría mono (1D) y bidimensional (2D) de resonancia magnética nuclear (RMN) permite analizar la microestructura de las películas comestibles aportando información de distintos niveles de interacción de los protones de macromoléculas entre sí y con otras de pequeño tamaño (agua y glicerol). La relaxometría 2D de RMN permite además estimar la porosidad relativa de las películas. Es posible establecer correlaciones entre los distintos componentes de relajación RMN y las propiedades de las películas, en especial de los parámetros asociados a la porosidad con la resistencia mecánica de las películas. Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que, en general, las películas de lactosuero están constituidas por una estructura organizada y caracterizada con una red proteica, con mayor o menor grado de interacción proteína-proteína dependiendo del tratamiento de desnaturalización proteica aplicado y de la presencia o no de transglutaminasa. Esta matriz proteica presentaría una estructura porosa, con espacios bien definidos donde se encontrarían fundamentalmente agua y el plastificante (glicerol), con mayor o menor grado de interacción con la proteína. En ningún caso se detecta la presencia de agua libre. La estructura más compacta, con presencia de microporos y menor porosidad relativa, se halla en las películas T-Calor. Sólo en esta película se encuentran señales de relajación compatibles con interacción proteína-plastificante.

Por sus características generales y comportamiento mecánico, las películas elaboradas con proteínas de lactosuero tratadas con calor son una buena alternativa como material de separación de unidades en la comercialización de quesos en lonchas. Hasta donde los autores conocen, este estudio es pionero en cuanto al uso de la relaxometría de RMN para el estudio de la microestructura de películas comestibles. Esta tecnología como método no destructiva podría utilizarse para el análisis en la línea de producción (*on-line*) de biomateriales y servir de indicador de su comportamiento mecánico.

IV.II.1.5.5. Bibliografía

Appolonia, L., Borgia, G.C., Bortolotti, V., Brown, R.J.S., Fantazzini, P., and Rezzaro, G. (2001). Effects of hydrophobic reatments of stone on pore water studied by continuous distribution analysis of NMR relaxation times. *Magnetic Resonance imaging*, 19:509-512.

Arzeni, C., Martinez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O.E., and Pilosof, A.M.R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108:463-472.

ASTM, (1993). Standard test method for water vapor transmission of materials (E 96 -93), 701-708.

Atlas, S.W. (2009). Magnetic Resonance Imaging of the Brain and Spine. 4th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, PA. USA.

Bae, H.J., Darby, D.O., Kimmel, R.M., Park, H.J., and Whiteside, W.S. (2009). Effects of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin-nanoclay composite film. *Food Chemistry*, 114:180-189.

Banerjee, R., Chen, H., and Wu, J. (1996). Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. *Journal of Food Science*, 61:824-828.

Belton, P., and Capozzi, F. (2011). Magnetic resonance in food science-Meeting the challenge. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49:S1-S1.

Bertram, H.C., Kohler, A., Böcker, U., Ofstad, R., and Andersen, H.J. (2006). Heat-Induced Changes in Myofibrillar Protein Structures and Myowater of Two Pork Qualities. A Combined FT-IR Spectroscopy and Low-Field NMR Relaxometry Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:1740-1746.

Borgia, G.C., and Bortolotti, V. (2001). Changes of the local pore space structure quantified in heterogeneous porous media by ^{1}H magnetic resonance relaxation tomography. *Journal of Applied Physic*, 90:3.

Borgia, G.C., Bortolotti, V., Camaiti, M., Cerri, F., Fantazzini, P., Attridge, F. (2001). Performance evolution of hydrophobic treatments for stone conservation investigated by MRI. *Magnetic Resonance Imaging*, 19:513-516.

Brownstein, K.R. and Tarr, C.E. (1979). Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells. *Physical Review*, 19:2446-2453.

Callaghan, P.T., Arns, C.H., Galvosas, P., Hunter, M.W., Qiao, Y., and Washburn, K.W. (2007). Recent Fourier and Laplace perspectives for multidimensional NMR in porous media. *Magnetic Resonance Imaging*, 25:441-444.

Carneiro-da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Souza, M.P., Teixeira, J.A., and Vicente, A.A., (2009). Physical properties of edible coatings and película made with a polysaccharide from Anacardium occidentale L. *Journal of Food Engineering*, 95:379-385.

Carr, H.Y. and Purcell, E.M. (1958). Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review*, 94:630-638.

Casieri, C., De Luca, F., Nodari, L., Russo, U., and Terenzi, C. (2010). Detection of magnetic environments in porous media by low-field 2D NMR relaxometry. *Chemical Physics Letters*, 496:223-226.

Chambi, H., and Grosso, C. (2006). Edible película produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39:458-466.

Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible película made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 78:2563-2583.

Chen, P.L., Long, Z., Ruan, R., and Labuza, T.P. (1997). Nuclear magnetic resonance studies of water mobility in bread during storage. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 30:178-183.

Condés, M.C., Añón, M. C., Mauri, A.N., and Dufresne, A. (2015). Amaranth protein película reinforced with maize starch nanocrystals. *Food Hydrocolloids*, 47:146-157.

Condés, M.C., Añón, M.C., and Mauri, A.N. (2013). Amaranth protein película from thermally treated proteins. *Journal of Food Engineering*, 119:573-579.

Conti, A., Liberatori, J., and Napolitano, L. (1980). Isolation and preliminary physico-chemical characterization of human □-latoglobulin. *Milchewissenschaft*, 35:65-68.

Dalgleish, D.G. (1982). The enzymatic coagulation of milk. In: Fox, P.F. (Ed.). Developments in Dairy Chemistry - 1: Proteins. (Ed): Elsevier, New York, USA, pp. 157-187.

Davies, D.T., and Lawa, A. (1980). The content and composition of protein in creamery milks in south-west Scotland. *Journal of Dairy Research*, 47:83-90.

Davies, S., and Packer, K.J. (1990). Pore-size distributions from nuclear magnetic resonance spin-lattice relaxation measurements of fluid saturated porous media. I. Theory and simulation. *Journal of Applied Physics*, 67:3163-3170.

Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A.E., Masi, P., and Porta, R. (2006). Chitosan-whey protein edible película produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7:744-749.

Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Masi, P., and Porta, R. (2007). Transglutaminase-catalyzed preparation of chitosan-ovalbumin película. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:437-441.

Edwards, J.C. (2011). A Review of Applications of NMR Spectroscopy in the Petroleum Industry. In: Kishore, R.A (Ed). Spectroscopic Analysis of Petroleum Products and Lubricants. (Ed): ASTM International, USA, pp: 423-470.

Ersus, S., Oztop, M.H., McCarthy, M.J., and Barrett, D.M. (2010). Disintegration efficiency of pulsed electric field induced effects on onion (Allium cepa L.) tissues as a function of pulse protocol and determination of cell integrity by 1H-NMR relaxometry. *Journal of Food Science*, 75:444-452.

Fan, J-M., Ma, W., Liu,G-Q., Yin, S-W.,Tang, C-H., and Yang, X-Q. (2014). Preparación y caracterización de la proteína de haba de riñón aislado (KPI) -chitosan (CH) películas compuestas preparadas por el pretratamiento ultrasónico. *Food Hydrocolloids*, 36:60-69.

Fantazzini, P. (2005). Magnetic resonance for fluids in porous media at the University of Bologna. *Magnetic Resonance Imaging*, 23:125-131.

Folk, J.E. (1980). Transglutaminases. *Advances in Protein Chemistry*, 49:517-531.

Folk, J.E., and Finlayson, J.S. (1977). The epsilon-(gammaglutamyl) lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Advances in Protein Chemistry*, 31:l-133.

Frazier R. (2006). The Measurement of Relaxation Times in Mineral Oil and Glycerin Using Pulsed Magnetic Nuclear Resonance. http://frazier.home.cern.ch/frazier

García, F.T., and Sobral, P. (2005). Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of película based on muscle proteins of two varieties of tilapia. *Food Science and Technology*, 38:289-296.

Gennadios, A., and Weller, L. (1990). Edible película and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44:63-69.

Ghanbarzadeh, B., Musavi, M., Oromiehie, A.R., Rezayi, K., Rad, E.R., and Milani, J. (2007). Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein película. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 40:1191-1197.

Gianferri, R., Maioli, M., Delfini, M., and Brosio, E. (2007). A low-resolution and high-resolution nuclear resonance integrated approach to investigate the physical structure and metabolic profile of Mozzarella di Bufula Campana cheese. *International Dairy Journal*, 17:167-176.

Gontard, N., Guilbert, S., and Cuq, J-L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58:206-211.

González, A., Tártara, L.I., Palma, S.D., and Alvarez-Igarzabal, C.I. (2015). Crosslinked soy protein película and their application as ophthalmic drug delivery system. *Materials Science and Engineering*, 51:73-79.

Gowland, P.A., and Stevenson, V.L. (2003). T_1: The longitudinal relaxation time. In: Toofts P. (Ed.). Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease . (Ed): John Wiley and Sons, West Sussex, England, pp. 111-143.

Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N., de la Caba, K. (2010). Mechanical and thermal properties of soy protein película processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering*, 100:145-151.

Gülseren, I., Güzey, D., Bruce, B.D., and Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14:173-183.

Haiduc,A.M., and Duynhoven, J.V. (2005). Correlation of porous and functional properties of food materials by NMR relaxometry and multivariate analysis. *Magnetic Resonance Imaging*, 23:343-345.

Han, J.H., and Aristippos, G. (2005). Edible película and coatings: A review. In: Han, J.H. (Ed). Innovations in Food Packaging. (Ed): Academic Press, San Diego, USA, pp. 239-262.

Han, M., Zhang, Y., Fei, Y., Xu, X., and Zhou, G. (2009). Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. *European Food Research and Technology*, 228 (4):665-670.

Hansen, E.W., Fonnum, G., and Weng, E. (2005). Pore Morphology of Porous Polymer Particles Probed by NMR Relaxometry and NMR Cryoporometry. *Journal of Physical Chemistry*, 109:24295-24303.

Havea, P., Alistair, J.C., and Creamer, L.K. (2004). The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels. *Journal of Dairy Research*, 71:330-339.

Hernández-Sánchez, N., Hills, B.P., Barreiro, P., Marigheto, N. (2007) An NMR study on internal browning in pears. *Postharvest Biology and Technology*, 44:260-270.

Herrero, A.M., Cambero, M.I., ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero De Avila, M.D., and. De La Hoz, L. (2007). Magnetic Resonance Imaging, Rheological Properties, and Physicochemical Characteristics of Meat Systems with Fibrinogen and Thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:9357-9364.

Herrero, A.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero de Ávila, M.D., and Cambero, M.I. (2009). Magnetic resonance imaging studies of the cold-set gelation on plasma powder and meat systems. *Food Research International*, 42:1362-1372.

Hills, B.P. (1998). Magnetic Resonance Imaging. in Food Science. (Ed): John Wiley & Sons, New York, USA.

Hills, B.P. (2009). Relaxometry: Two-Dimensional Methods Encyclopedia of Magnetic Resonance. (Ed) John Wiley & Sons, Ltd.

Hills, B.P., Costa, A., Marigheto, N., and.Wright, K.M. (2005). NMR correlation studies of high-pressure-processed starch and potato tissue. *Applied Magnetic Resonance*, 28:13.

Iuliano, C., Piggott, R.B., Venturi, L., and Hills, B.P. (2010). A Two-Dimensional Relaxation Study of the Evolving Microstructure in a Mixed Biopolymer Gel. *Applied Magnetic Resonance*, 38:307-320.

Jambrak, A.R., Lelas, V., Kresic, G., Badanjak, M., Brncic, S.R., Herceg, Z., Batur, V., and Crcic, I. (2011). Rheological, functional and thermo-physical properties of ultrasound treated whey proteins with addition of sucrose or milk powder. *Mljekarstvo*, 61:79-91.

Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Kresic, G., and Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93:386-393.

Jambrak, A.R., Mason T.J., Lelas, V., Herceg, Z., Herceg, I.L. (2008).Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86:281-287.

Jangchud, A., and Chinnan, M.S. (1999). Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 32:89-94.

Karoui, R., and De Baerdemaeker, J.A. (2007). A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102:621-640.

Kirtil, E., Mecit H. Oztop, M.H., Sirijariyawat, A., Ngamchuachit, P., Barrett, D.M., and. McCarthy, M.J. (2014). Effect of pectin methyl esterase (PME) and CaCl2 infusion on the cell integrity of fresh-cut and frozen-thawed mangoes:An NMR relaxometry study. *Food Research International*, 66:409-416.

Koelsch C. (1994). Edible water vapor barriers: properties and promise. *Trends in Food Science & Technology*, 5:76-81.

Kowalczyk, D., and Baraniak, B. (2011). Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate película. *Journal of Food Engineering*, 105: 295-305.

Kowalczyk, D., and Baraniak, B. (2011). Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering*, 105:295-305.

Kresic, G., Lelas, V., Jambrak, A.R., Herceg, Z., and Brncic, S.R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 87:64-73.

Krochta, J.M. (2002). Proteins as raw materials for película and coatings: Definitions, current status, and opportunities. In: Gennadios, A. (Ed.), *Protein-based película and coatings*. (Ed): CRC Press: Boca Raton, USA, pp. 1-41.

Krochta, J.M., and De Mulder-Johnston, C.D (1997). Edible and biodegradable polymer película: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51:61-64.

Kuo, M.I., Gunasekaran, S., Johnson, M., and Chen, C. (2001). Nuclear magnetic resonance study of water mobility in pasta filata and non-pastafilata Mozzarella. *Journal of Dairy Science*, 84:1950-1958.

Kurek, M., Sabina Galus, S., and Debeaufort, F. (2014). Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite película based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life*, 1:56-67.

Kurek, M., Sabina Galus, S., and Debeaufort, F. (2014). Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life*, 1:56-67.

Liu, C.-C., Tellez-Garay, A.M., and Castell-Perez, M.E. (2004).Physical and mechanical properties of peatnut protein película. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 37:731-738.

López-Arce, P., Gomez-Villalba, L.S., Pinho, L., Fernández-Valle, M.E., de Buergo, A., and Fort, R. (2010). Influence of porosity and relative humidity on consolidation of dolostone with calcium hydroxide nanoparticles: Effectiveness assessment with non-destructive techniques. *Materials Characterization*, 61:168-184.

Magat, K., and Mandyam, V. (2004) A look at the utility of pulsed NMR. *Physics*, 173. https://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/pulsed_NMR_heme.pdf

Magat, K., and Mandyam, V. (2004) A look at the utility of pulsed NMR. *Physics*, 173.

Manic, V., Miljkovic, L., Stefanovic, M., and Kovacevic, R. (1998). A study of Na-Montmorillonite Additions Influence on Portland Cement Hydration by 1H T1 Relaxation. In: Colombet, P., Grimmer, A.R., Zanni, H., and Sozzani, P. (Eds). Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of Cement-Based Materials. (Ed) Springer, Milano. Italia, pp. 354-363.

Manic, V., Miljkovic, L., Stefanovic, M., and Kovacevic, R. (1998). A study of Na-Montmorillonite Additions Influence on Portland Cement Hydration by ^{1}H T_1 Relaxation. In: (Eds): Colombet, P., Grimmer, A.R., Zanni, H., and Sozzani, P. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of Cement-Based Materials. (Ed) Springer, Milano. Italia, pp. 354-363.

Marcuzzo, E., Perssini, D., Debeaufort, F., and Sensidoni, A. (2010). Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11:451-457.

Marigheto, N., Duarte, S., and Hills, B.P. (2005). An NMR relaxation study of avocado quality. *Applied Magnetic Resonance*, 29:2687-701.

Marigheto, N., Venturi, L., and Hills, B. (2008). Two-dimensional NMR relaxation studies of apple quality Postharvest *Biology and Technology*, 48:331-340.

McClements, D.J. (1995). Chapter 4 - Ultrasonics in Food Processing. *Food Processing*, pp: 59-70.

McDonald, P.J., Korb, J-P., Mitchell, J., and Monteilhet, L. (2005). Surface relaxation and chemical exchange in hydrating cement pastes: A two-dimensional NMR relaxation study. *Physical Revie*, 72:1-9.

McHugh, T.H., and J.M. Krochta. (1994). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion película. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71:307-312.

Meiboom, S. and Gill, D. (1958). Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. Review of Scientific Instruments, 29:688-691.

Melado-Herreros, A., Barreiro, P., Fernandez-Valle, M.E., Jimenez-Ariza, T., Correa, E.C., Campos, N., Diaz-Barcos, V., Rivas, E.M., Silóinz, M.I., and Hills, B. (2013). MRI and bidimensional relaxometry sequences for macro and microstructure assessment in food models. In: van Duynhoven, J., Peter S Belton, P.S., Webb, G., and As, H. (Eds). Magnetic Resonance in Food Science: Food for Thought. (Ed): The Roya Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 130-137.

Mitchell, J. (2014). Rapid measurements of heterogeneity in sandstones using low-field nuclear magnetic resonance. *Journal of Magnetic Resonance*, 240:52-60.

Montalvo, C., López-Malo, A., and Palou, E. (2012). Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6:32-46.

Mulas, G., Roggio, T., Uzzau, S., and Anedda, R. (2013). A new magnetic resonance imaging approach for discriminating Sardinian sheep milk cheese made from heat-treated or raw milk. *Journal of Dairy Science*, 96:7393-7403.

Muñoz, L., Aguilera, J.M., Rodriguez-Turienzo, L., Cobos a, A., and. Diaz, O. (2012). Characterization and microstructure of película made from mucilage of Salvia hispanica and whey protein concentrate *Journal of Food Engineering*, 111:511-518.

Muñoz-García, M.B., López-Arce, P., Fernández-Valle, M.E., Martín-Chivelet, J., Fort, R. (2012). Porosity and hydric behavior of typical calcite microfabrics in stalagmites. *Sedimentary Geology*, 265-266:72-86

Musse, M., De Guio, F., Quellec, S., Cambert, M., Challois, S., and Davenel, A. (2010). Quantification of microporosity in fruit by MRI at various magnetic fields: comparison with X-ray icrotomography. *Magnetic Resonance Imaging*, 28:1525-1534.

Nielsen, P.M. (1995). Reactions and potential industrial applications of transglutaminase: Review of literature and patents. *Food Biotechnology*, 9:119-156.

Noronha, N., Duggan, E., Ziegler, G.R., O'Riordan, E.D., and O'Sullivan, M. (2008). Investigation of imitation cheese matrix development using light microscopy and NMR relaxometry. *International Dairy Journal*, 18:641-648.

Nuanmano, S., Prodpran, T., and Benjakul, S. (2015). Potential use of gelatin hydrolysate as plasticizer in fish myofibrillar protein film. *Food Hydrocolloids*, 47:61-68.

Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S.A., Cruz-Orea, A., Maté, J.I. (2009). Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. Journal of Food Engineering, 92:56-62.

Oztop, M.H., Rosenberg, M., Rosenberg, Y., McCarthy, K.L., and McCarthy, M.J. (2010). Magnetic resonance imaging (MRI) and relaxation spectrum analysis as methods to investigate swelling in whey protein gels. *Journal of Food Science*, 75:508-515.

Pérez-Gago, M.B. (2012). Protein-based película and coatings. In: Baldwin, E.A., Hagenmaier, R., Bai J. (eds). Edible coatings and película to improve food quality, 2º. (Ed): CRC Press: Boca Raton, USA, pp. 13-77.

Pérez-Gago, M.B., and J.M. Krochta. (2002). Formation and properties of whey protein película and coatings. In: Gennadios, A. (Ed). Protein-based película and coatings. (Ed): CRC Press: Boca Raton, USA, pp. 159-180.

Pérez-Gago, M.B., and Kroctha, J.M. (1999). Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein película. *Journal of Food Science*, 64:1034-1037.

Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., and Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein película containing malic acid, nisin and natamycin. Food Control, 21:240-246.

Popović, S., Peričin, D., Vaštag,Z., Lazić, V., and Popović, L. (2012). Pumpkin oil cake protein isolate película as potential gas barrier coating. *Journal of Food Engineering*, 110: 374-379.

Ruan, R.R., Zou, C., Wadhawan, C., Martines, B., Chen, P.L., and Addis, P. (1997). Studies of hardness and water mobility of cooked wild rice using nuclear magnetic resonance. *Journal of Food Process and Preservation*, 21:91-104.

Ryu, S.Y., Koh, K.H., Son, S.M., Oh, M.S., Yoon, J.R., Lee, W.J., Kim, S.S. (2005). Physical and microbiological changes of sliced process cheese packaged in edible pouches during storage. Food Science and Biotechnology, 14: 694-697.

Schmid, M., Krimmel, B., Grupa U., and Noller, K. (2014).Effects of thermally induced denaturation on technological-functional properties of whey protein isolate-based película. *Journal of Dairy Science*, 97:5315-5327.

Schmid, M., Sängerlaub, S., Wege, L., and Stäbler, A. (2014). Properties of transglutaminase crosslinked whey protein isolate coatings and cast película. *Packaging Technology and Science*, 27:799-817.

Schmidt, S.J. (1990). Characterisation of water in foods by NMR. In Finley, J.W., Schmidt, S.J., and Serianui, A.S. (Eds.), NMR application in biopolymers. (Ed): Plenum Press, New York, USA, p. 415.

Schoenfelder, W., Gläser, H-R, Mitreiter, I., and Stallmach, F. (2008) Two-dimensional NMR relaxometry study of pore space characteristics of carbonate rocks from a Permian aquifer. *Journal of Applied Geophysics*, 65:21-29.

Shimada, K., and Cheftel, J.C. (1989). Sulfhydryl group disulfide bond interchange during heat induced gelation of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37:161-168.

Soininena, J.T., Heinämäkia, J., and Yliruusia J. (2013). From acacia honey monosaccharide content to a new external binary plasticizer applicable in aqueous whey protein película. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4):440-446.

Song, N-B., Song, H-Y., Jo, W-S., and Song, K.B. (2013). Physical properties of a composite film containing sunflower seed meal protein and its application in packaging smoked duck meat. *Journal of Food Engineering*, 116:789-795.

Song, Y.Q., Venkataramanan, L., Hurlimann, M.D., Flaum, M., Frulla, P. and Straley, C. (2002). T_1/T_2 Correlation Spectra Obtained Using a Fast Two-Dimensional Laplace Inversion. *Journal of Magnetic Resonance*, 154:261-268.

Sothornvit, R., and Krochta, J.M. (2000). Plasticizer effect on oxygen permeability of □□lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:6298-6302

Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Casariego, A., Lima, A.M.P., Teixeira, J.A., and Vicente, A.A. (2009). Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food Hydrocolloids*, 23:2110-2115.

Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Martins, J.T., Casariego, A., Teixeira, J.A., and Vicente, A.A. (2010). Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. *Food Hydrocolloids*, 24:330-335.

Tang, C.-H, Jiang, Y., Wen, Q.-B., and Yang, X.-Q. (2005). Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast película of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology*, 120: 296-307.

Tudisca, V., Casieri, C., Demma, F., Diaz, M, Piñol, L., Terenzi, C., and De Luca, F. (2011). Firing technique characterization of black-slipped pottery in Praeneste by low field 2D NMR relaxometry. *Journal of Archaeological Science*, 38:352-359.

Tudisca, V., Casieri, C., Demma, F., Diaz, M., Piñol, L, Terenzi, C., and De Luca, F. (2011). Firing technique characterization of black-slipped pottery in Praeneste by low field 2D NMR relaxometry. *Journal of Archaeological Science*, 38:352-359.

Uresti, R., Ramirez, J., Lopez-Arias, N., and Vazquez, M. (2003).Negative effect of combining microbial transglutaminase with lowmethoxylpectins on the mechanical properties and colour attributes of fish gels. *Food Chemistry*, 80:551-556.

Valckenborg, R.M.E., Pel, L., and Kopinga, K. (2002). Combined NMR cryoporometry and relaxometry. *Journal of Physics D: Applied Physic*, 35:249-256.

Venturi, L., and Hills, B. (2010). Spatially resolved multidimensional cross-correlation relaxometry. *Magnetic Resonance Imaging*, 28:171-177.

Villamiel, M., and Jong, de P. (2000).Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:472-478.

Viola, R., Tucci, A., Timellini, G., and Fantazzini, P. (2006). NMR techniques: A non-destructive analysis to follow microstructural changes induced in ceramics. *Journal of the European Ceramic Society* 26:3343-3349.

Wakai, M., and Almenar, E. (2015). Effect of the presence of montmorillonite on the solubility of whey protein isolate película in food model systems with different compositions and pH. *Food Hydrocolloids*, 43:612-621.

Wakai, M., and Almenar, E. (2015). Effect of the presence of montmorillonite on the solubility of whey protein isolate films in food model systems with different compositions and pH. *Food Hydrocolloids*, 43:612-621.

Wang, Z., Sun, X., Lian, Z.,Wang, X., Zhou, J., and Ma, Z (2013). The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the properties of soy protein isolate/microcrystalline wheat-bran cellulose film. *Journal of Food Engineering*, 114:183-191.

Weng, W., and Zheng, H. (2015). Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin película incorporated with soy protein isolate. *Food Chemistry*, 169:255-260.

Whitaker, J.R. (1977). Milk proteins. In: Feeney RE, Whitaker, J.R. (Eds.). Food proteins-improvement through chemical and enzymatic modification. (Ed): American Chemical Society, Washington, D.C., USA, pp:95-105.

Wu, Z., Bertram, H.C., Kohler, A., Böcker, U., Ofstad, R., and Andersen, H.J. (2006). Influence of Aging and Salting on Protein Secondary Structures and Water Distribution in Uncooked and Cooked Pork. A Combined FT-IR Microspectroscopy and ^{1}H NMR Relaxometry Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22):8589-8597.

Xu, F., Dong, Y., Zhang, W., Zhang, S., Li, L., and Li, J. (2015). Preparation of cross-linked soy protein isolate-based environmentally-friendly película enhanced by PTGE and PAM. *Industrial Crops and Products*, 67:373-380.

Yi, J.B., Kim, Y.T., Bae, H.J., Whiteside, W.S., and Park, H.J. (2006). Influence of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin película. *Journal of Food Science*, 71:376-383.

Yildirim, M., and Hettiarachchy, N.S. (1998). Properties of película produced by cross-linking whey proteins and 11s globulin using transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63:248-252.

Zhang, J., Liu, Y., Wang, N., and Ruan, R. (2012). NMR Technique Application in Evaluating the Quality of Navel Orange During Storage. *Procedia Engineering*, 37:234-239.

Zhang, L., and McCarthy, M.J. (2012). Black heart characterization and detection in pomegranate using NMR relaxometry and MR imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 67:96-101.

Zhang, L., and McCarthy, M.J. (2013). Effect of controlled atmosphere storage on pomegranate quality investigated by two-dimensional NMR correlation spectroscopy. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 54(1):302-306.

Zisu, B., Lee, J., Chandrapala, J., Bhaskaracharya, R., Palmer, M., Kentish, S., and Ashokkumar, M. (2011).Effect of ultrasound on the physical and functional properties of reconstituted whey protein powders. *Journal of Dairy Research*, 78:226-232.

V. DISCUSIÓN GENERAL

Preámbulo

En la presente Tesis Doctoral se han abordado dos líneas de trabajo en torno a la producción y comercialización más característica y extendida en España de quesos de oveja de pasta prensada, siguiendo en su desarrollo un mismo hilo conductor: el empleo de técnicas no destructivas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Estas metodologías permiten el análisis de matrices íntegras sin preparación previa lo que les confiere múltiples ventajas frente a otros procedimientos de análisis.

En la primera parte de la Tesis Doctoral, se han estudiado mediante imagen de resonancia magnética (IRM), relaxometría de RMN y espectroscopía de RMN con sonda HRMAS, los cambios estructurales y metabólicos producidos en la matriz de los mencionados quesos durante su proceso de maturación. Los objetivos buscados fueron: ampliar la información existente sobre este tipo de quesos e indagar el potencial de esas técnicas para la monitorización y trazabilidad de su producción. En una segunda parte de la Tesis, se han elaborado películas comestibles a partir de un concentrado proteico de suero de leche. El objetivo fue analizar su aplicación en el envasado de quesos con el fin de utilizar un material de similar naturaleza que la del alimento contenido. Las estructuras de estas películas se han estudiado por primera vez por relaxometría de RMN mono y bidimensional. Finalmente se ha propuesto su empleo como material de separación en la comercialización de quesos en lonchas o en porciones, siendo este uso una innovación en el empleo de materiales biológicos comestibles.

En este apartado de la memoria se discuten en conjunto las distintas experiencias realizadas, la conexión existente entre ellas y la relación entre los resultados obtenidos en los dos apartados de la Tesis Doctoral. Por último, se analizan las posibles aplicaciones industriales de los resultados y su proyección en futuras investigaciones.

V.I. En relación con el estudio de quesos de leche de oveja de pasta prensada

En la primera parte de la Tesis Doctoral se han estudiado quesos elaborados en Castilla-La Mancha [Manchego de DOP (MAPA, 1995) y artesanales de oveja] y producidos en Castilla y León, bajo la denominación de Calidad queso "Castellano" (artesanales e industriales) (BOCyL, 2010). Estos quesos, especialmente en el caso del queso Manchego de DOP, han sido objeto de diversos estudios (Gaya *et al*., 1990; Freitas y Malcata, 2000; Cabezas *et al*., 2007; Argüelles *et al*., 2007) con distintos fines como estudiar la bioquímica del proceso maduración y el desarrollo de volátiles. En la presente Tesis Doctoral, se han realizado un análisis integral de este tipo de quesos, en tres planos: macroestructura (mediante imagen de RMN), microestructura (a través de la relaxometría de RMN) y perfil metabolómico (por espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS). En este marco de estudio, se ha intentado desarrollar objetivos de interés científico y tecnológico, incluyendo aportaciones al conocimiento fisícoquímico de la matriz de los quesos, la adecuación y optimización de las técnicas utilizadas y el análisis de posibles usos a nivel industrial. La autora es consciente de que el trabajo realizado es sólo un paso más en la aplicación de técnicas no destructivas de RMN a matrices complejas, como son los alimentos, aunque cabe destacar que es el primer trabajo en el que se emplean las metodologías especificadas en el tipo de quesos analizados.

En el afán de ejemplarizar la producción de los citados quesos de oveja, se han estudiado en ambos orígenes, Castilla-La Mancha (CLM), y Castilla y León (CL), dos formas de elaboración: industrial (I) y artesanal o tradicional (T). En el caso de la elaboración industrial se tomaron muestras de la fabricación de dos empresas (por compromiso de confidencialidad no mencionadas) que figuran entre las más importantes del sector por su nivel de producción de quesos de oveja en las zonas de estudio (entre 25.000 y 2.000 Toneladas de queso de distintos tipos por año). En el caso de la elaboración artesanal, se eligieron dos empresas familiares (microempresas, con menos de 10 trabajadores), que utilizaban la leche de explotaciones ganaderas locales ajustándose a las razas de oveja establecidas por las normas correspondientes y con más de 75 años de experiencia en la elaboración artesanal de quesos. Para estandarizar las condiciones de estudio, todos los quesos a los que se refieren los resultados expuestos en esta Tesis se elaboraron en la primavera de 2013, aunque durante 2012 se hicieron estudios preliminares con el mismo tipo de quesos y para comprobar algunos datos también se han utilizados quesos producidos en 2014. Los quesos se fabricaron de acuerdo a las correspondientes normas y se estudiaron

desde la salida de sal (a los 2 días desde el inicio de la fabricación) hasta los tiempos habituales de comercialización (90 y 180 días). En la proyección futura de este trabajo cabe su extensión, tanto de lugar como de periodo de producción, que permita contrastar resultados, incrementar las referencias y crear una base de datos amplia de tiempos de relajación y de espectros de RMN para la caracterización de este tipo de quesos de oveja de pasta prensada.

Como una simple pincelada, para ubicar la producción de queso de oveja en España cabe mencionar que se produce aproximadamente el 17% de la leche de oveja de la UE. En esta producción, en primer lugar se encuentra Castilla y León, con valores en los últimos dos años cercanos a 400 millones de litros, seguida de Castilla-La Mancha con alrededor de 150 millones litros. Prácticamente el 10% de la leche de oveja se destina a la elaboración de quesos artesanales y el 90% restante pasa a la industria (Mercasa, 2015) (**Figura** V.I.**1**). En conjunto, se elaboran alrededor de 55.100 toneladas de quesos de leche de oveja, de los cuales aproximadamente el 62 % son producidos en Castilla y León, en su mayoría elaborado con leche cruda. Se considera que más del 51 % de esta producción corresponde a la denominación queso Castellano. En el caso de la elaboración de queso Manchego de D.O.P, aproximadamente el 39 % corresponde a la elaboración con leche cruda, mientras que el restante se elabora con leche pasteurizada.

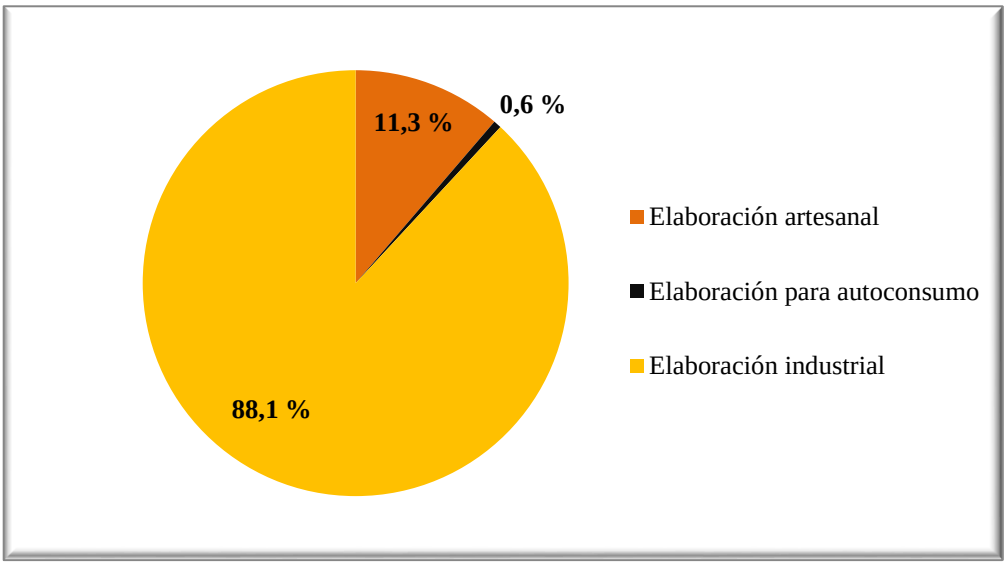


Figura V.I.**1.** Estimación del destino de la producción de leche de oveja en España

La producción global de queso en España supera las 213.731 toneladas/año, situándose en la decimonovena posición a nivel mundial (FAOSTAT, 2014), mientras que el consumo per cápita se encuentra en torno a los 8,2 kg/año (MAGRAMA, 2014).

Seguidamente se realiza un análisis del conjunto de los resultados obtenidos en las distintas etapas en las que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral.

V.I.1. Potencial de la imagen de resonancia magnética (IRM) y de la relaxometría de RMN para el análisis de la macro y microestructura de los quesos de oveja de pasta prensada españoles: Manchego y Castellano. Propuesta de aplicación industrial.

La Real Academia Española (RAE) define la "macroestructura" como "gran estructura que engloba a otras menores". Este término se puede considerar para aquellas estructuras que se encuentran por encima de 100 μm (Aguilera, 2005). La macroestructura, por tanto, está formada por numerosas pequeñas estructuras (microestructuras) que afectan a sus propiedades, como su comportamiento reológico o las propiedades de transporte, entre otras muchas. Algunos de estos "microelementos" son fibras, partículas en polvo, cristales de distintos tipos, gotas de grasa, burbujas de gas, cadenas proteicas, polímeros, etc. El análisis de la microestructura tiene especial relevancia para entender el papel del estado de componentes (estructura de geles, espumas, cristalizado, grado de polimerización, etc.) en las características de los alimentos e incluso en la biodisponibilidad de los nutrientes (Aguilera, 2005).

Las modificaciones de las variables de proceso, aun cuando su variación sea pequeña, afectan a la microestructura con la consiguiente repercusión en la macroestructura y en la percepción sensorial del producto. El análisis de la causa-efecto en este campo es de gran interés para la elaboración de alimentos y la industria alimentaria actual donde se requiere una estandarización y unificación del producto. Frente a otro tipo de producción, la industria alimentaria cuenta con la dificultad añadida de partir de una materia prima (leche, carne, frutas, etc.) con características que varían dependiendo de múltiples factores y que todavía existe un considerable desconocimiento del efecto de las variables de proceso en los componentes del alimento. Un ejemplo de la repercusión de la microestructura en la macroestructura y en la percepción sensorial de un producto, es la producción de vapor en el seno de un tejido, que acontece en un proceso de secado o de extrusión. La vaporización puede ocasionar la expansión y apertura del producto en varias direcciones, radial y axial, y con distinta intensidad. Este hecho afecta a la percepción visual, y en su comportamiento en boca modificará la percepción auditiva y táctil. Si aumenta el número de poros y se reduce el soporte de tejido en su entorno, dependiendo del tipo de producto, podría derivar en un producto más traslúcido y percibirse como estructura ligera y delicada e incrementar el

número de fracturas audibles en la ingesta. La relación macroestructura-percepción ha sido estudiada por diversos autores, especialmente en productos obtenidos por extrusión (Barrett, 2003) o en frutas y vegetales en general (Aguilera, 2012, Ho *et al*., 2011, López-Sánchez *et al*., 2011). Sin embargo, en muchos otros alimentos todavía es un campo poco explorado.

Como es sabido, la estructura de los geles lácteos está conformada por partículas caseínicas, las cuales juegan un importante papel en atributos físicos, como el comportamiento reológico y la apariencia visual, con elevada repercusión en su percepción sensorial y propiedades funcionales (Horne, 1998). La coagulación puede ser inducida por acción enzimática, por acidificación (véase **Apartado** I.**1.2.4**) y por calor o por combinación de alguno de estos procedimientos (Lucey *et al*., 2003). La formación del gel es una etapa crítica en la elaboración del queso y puede estar condicionada por múltiples factores. Aguilera y Stanley (1999) establecieron que la estructura de la mayoría de los quesos podría analizarse a dos niveles: (a) la microestructura, que corresponde a la formación de la matriz proteica desde los gránulos de cuajada, y (b) la macroestructura, que surge cuando los gránulos de cuajada son fusionados. En los **Trabajos 1** y **2** de la presente Tesis Doctoral se ha analizado la estructura de quesos de oveja de pasta prensada elaborados en España con el objetivo de contribuir a su caracterización mediante técnicas no destructivas. Para el estudio de la **macroestructura** se ha utilizado la **Imagen de Resonancia Magnética** (IRM) mientras que los parámetros de **microestructura** se han estudiado por **relaxometría de RMN** (**Figura** V.I.**2**). Los resultados han sido discutidos, y contrastados con la bibliografía existente, en los mencionados trabajos (**Apartado IV**); aquí se tratará la relación existente entre los resultados obtenidos por las distintas técnicas utilizadas.

Como se ha mencionado a lo largo de esta memoria, en el tipo de quesos estudiados la coagulación es inducida fundamentalmente por la acción enzimática y es afectada por factores como la raza de oveja de procedencia de la leche (Sakul y Boylan, 1992) y la alimentación del animal (Auldist, *et al*., 1998). El tipo de cuajo es otro factor a considerar (O'Callaghan y Guinee, 2004; Fallico *et al*., 2006). Los cuajos tradicionales empleados en la elaboración de queso son los de origen animal, y se obtienen del estómago de mamíferos lactantes. Su actividad se debe a su contenido en quimosina (EC 3.4.23.4) como principal enzima (80.90%) y pepsina (EC 3.423.1) (10-20%). Como se ha mencionado (véase **Apartado** I.**1.2.4.1**) la quimosina es una proteasa aspártica y su actividad proteolítica, comparada con la de otras proteinasas, es muy baja, pero es muy activa en la hidrólisis del enlace Phe_{105}-Met_{106} de la κ-caseina (Horne y Banks, 2004). La pepsina es una enzima muy

parecida a la quimosina aunque inespecífica. Se trata de una proteasa muy ácida, con un pH óptimo de actividad en torno a 2 y que se inactiva a pH superior a 6,6. La quimosina recombinante es una preparación enzimática obtenida de microorganismos modificados genéticamente como *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis* y *Escherichia coli*, a los que se les ha introducido el gen de la quimosina. Debido a la limitación en la producción de cuajo natural, al aumento de la producción de quesos y a la aprobación de la quimosina recombinante como GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos en los años 90, en la actualidad más del 50 % de los quesos fabricados en el mundo son elaborados con este tipo de quimosina (Kumar *et al*., 2010). En el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado quesos elaborados con cuajo natural (quesos tradicionales, T-CL y T-CLM) y quimosina recombinante (quesos elaborados a nivel industrial, ICL y ICLM). Con el análisis estructural se ha pretendido contribuir a la caracterización de los quesos en función de su origen (Castilla-La Mancha y Castilla y León) y forma de elaboración (industrial y artesanal).

Como se ha mencionado en el **Trabajo 1** del **Apartado** de **IV** de Resultados y Discusión de esta Tesis Doctoral, el empleo de la IRM para el análisis de los quesos en distintos momentos del proceso de maduración (2, 9, 30, 90 y 180 días) ha permitido observar la evolución de la matriz proteica así como sus particularidades dependiendo de la procedencia y procedimiento de fabricación (**Figura** IV.I.**1.2**). Las apreciaciones realizadas están en consonancia con las efectuadas por diversos autores (Mariette, 2006) respecto a la repercusión de los factores de producción en las características estructurales de los quesos elaborados. Es evidente que se trata de un hecho multifactorial, en el que además de las variables de proceso mencionadas cabe añadir el tipo y la concentración de cultivos iniciadores, la temperatura de coagulación, el corte de la cuajada, el prensado (prensa y tiempo), la forma de salazón (procedimiento y tiempo) y el tiempo de maduración (Buffa *et al*., 2001); cualquier cambio puede modificar la microestructura y jugar un importante papel en las características finales del queso (Pereira *et al*., 2009). El conjunto contribuye a que cada queso tenga unas particularidades, que podrían ser definidas y caracterizadas para su identificación y autentificación si se dispone de la técnica adecuada. La IRM y la relaxometría de RMN son técnicas no destructivas que podrían utilizarse con este fin así como para la monitorización del proceso de maduración y para su trazabilidad así como para evaluar el impacto de cualquier modificación del proceso en la estructura del queso.

Los datos de IRM adquiridos permitieron la obtención de los mapas de los tiempos de relajación transversal espín-espín, (T_2) y longitudinal espín-red (T_1) (**Figuras** IV.I.**1.2**, IV.I.**1.3**, respectivamente). Frente a otras técnicas que permiten la visualización de la estructura de una determinada matriz, la IRM ofrece la posibilidad de obtener parámetros cuantitativos, como son los valores medios de T_2 y T_1 (**Tabla** IV.I.**1.3**), que permiten el procesado estadístico y establecer relaciones entre atributos estructurales y distintas variables y características fisicoquímicas (véase **Tablas** IV.I.**1.4** y IV.I.**1.6**).

Los mapas obtenidos en $\boldsymbol{T_2}$ (**Figura** IV.I.**1.2**) aportan mucha **información estructural.** En ellos, las tonalidades oscuras corresponden a bajos valores de T_2, estando, en este caso, el negro asociado a la presencia de cavidades vacías. Las demás tonalidades (desde grises oscuros hasta blanco brillante) indican un incremento de este parámetro, tanto más elevados cuanto más clara se presenta la zona de estudio, indicando diferentes grados de interacción de los protones del sistema sobre los protones del agua y la grasa. Consecuentemente, las señales más intensas se manifiestan con color blanco brillante, y se asocian a la presencia de agua libre, mientras que la grasa libre se relaciona con zonas claras pero menos brillantes (McRobbie *et al*., 2006).

Los mapas obtenidos de T_1, contribuyen a clarificar la estructura apreciada en los derivados de T_2 puesto que, facilitan la observación de los **límites entre diferentes sistemas biológicos**. T_1 es una medida de la facilidad con la que los protones, especialmente del agua, ceden su energía a moléculas del entorno, sobre todo a macromoléculas (Gowland y Stevenson, 2003; Herrero *et al*., 2007, 2009). De esta forma T_1 es un parámetro que permite el seguimiento del agua y de la grasa. En los mapas de T_1 (**Figura** IV.I.**1.3**), los colores más claros y brillantes indican valores más elevados de este tiempo de relajación asociado a un mayor contenido de agua libre, con elevada movilidad y dificultad para ceder su energía al medio. La asociación del agua a macromoléculas produce una reducción del T_1, lo que se manifiesta en tonalidades grisáceas, más o menos oscuras cuanto menor es el valor de T_1. De forma similar la pérdida de agua dará lugar a un oscurecimiento de las zonas (grises-negro) en proporción al descenso del valor de T_1.

En conjunto, se ha observado que los mapas T_2 permiten el análisis de la macroestructura de los quesos mientras que los obtenidos en T_1 facilitan el seguimiento de la pérdida de agua y del proceso de maduración de los quesos. Los resultados obtenidos indican claramente que los cambios estructurales (seguidos mediante las variaciones de T_1 y T_2) a través del tiempo de maduración dependen del tipo de queso de oveja (procedencia

geográfica y forma de elaboración) (véase **Tablas** IV.I.**1.2** y V.I.**1**), lo que permitiría su caracterización.

En general, tanto en los mapas obtenidos de T_2 como de T_1 (**Figuras** IV.I.**1.2** y IV.I.**1.3**) se pudo observar que los quesos de CLM se caracterizaron por una imagen más homogénea y compacta que los de CL (**Tabla** V.I.**1**). Los mapas obtenidos en T_1 (**Figura** IV.I.**1.3**) mostraron un progresivo oscurecimiento paralelo al avance de la maduración, el consiguiente descenso del contenido de humedad y la sucesiva ocupación de los espacios de la matriz por aire y grasa. Estas apreciaciones están en consonancia con la relación de T_1 con el contenido de agua (Herrero *et al*., 2009; Altan *et al*., 2011) y los cambios durante el proceso de maduración de la matriz de caseína, con diferentes niveles de hidratación (McMahon *et al*., 2009).

En los quesos más frescos (de 2 a 9 días de fabricación), en los mapas obtenidos en T_1 se puede apreciar el predominio de los colores claros correspondientes a matrices hidratadas, con menor extracto seco (**Tabla** IV.I.**1.1**) y la presencia en algunos poros de residuos de suero (blanco brillante), especialmente en los quesos de elaboración artesanal. Después de este periodo, y como puede apreciarse en la **Figura** IV.I.**1.3**, la matriz de caseína en el queso CLM fue deshidratándose progresivamente con el avance del tiempo de maduración, manteniéndose una estructura homogénea, en la que estaría distribuida uniformemente la grasa, y sólo interrumpida por algunos orificios y cavidades vacías (negros). Los quesos de CL mostraron una matriz más heterogénea, en la que, sobre un fondo gris claro, se apreciaron zonas más oscuras, que se han atribuido a la acumulación de grasa y espacios negros correspondientes a los orificios y cavidades. Las diferencias en la estructura (**Figura** IV.I.**1.2**) de los quesos de distinta procedencia geográfica se incrementaron con el progreso de la maduración, presentando los quesos de CLM a los 180 días cavidades más pequeñas y más espaciadas que los quesos de CL, especialmente en el caso de los quesos de elaboración industrial (I-CLM).

Las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) corroboraron estas características a nivel de la microestructura de los quesos (**Figura** IV.I.**2.3**), con una matriz proteica más abierta e interrumpida, con mayor frecuencia de orificios o cavidades, en los quesos de CL frente a los elaborados en CLM especialmente manifiesta al final del proceso de maduración considerado (**Trabajo 2**). Esta técnica permitió apreciar la pérdida del carácter globular nativo de las micelas y la consolidación de la matriz proteica con el avance de la maduración, como se describe en el **Punto** IV.I.**2.3.2**.

Los quesos jóvenes T-CLM, T-CL y I-CL más frescos mostraron una estructura constituida por una red proteica tridimensional formada por interacciones de las micelas de caseína. Dichas interacciones fueron incrementándose con el avance de la maduración y la consiguiente pérdida de humedad. El queso I-CLM sin embargo presentó desde los primeros días de su elaboración una matriz proteica homogénea y compacta.

Entre otros factores, las diferencias halladas en las distintas variedades de queso pueden atribuirse al tratamiento térmico aplicado a la leche utilizada para su fabricación. Los quesos con estructura más compacta fueron los elaborados con leche previamente pasteurizada (I-CLM). Este hecho se relaciona con la reducción de la fusión de las micelas de caseína consiguiente a la formación de un complejo entre β-lactoglobulina (β-LG) y κ-Caseína (κ-CN) tras el tratamiento térmico y a los menores niveles de calcio soluble (Singh y Waungana, 2001). La menor fusión micelar conlleva un mayor desarrollo superficial en la matriz proteica facilitando la acción de las proteinasas y la proteólisis primaria. Esto explicaría la estructura de los quesos I-CLM, con una estructura caracterizada por cavidades en menor número y tamaño y una matriz proteica con escasos cambios durante la maduración (**Figura** IV.I.**1.2**).

Los quesos elaborados con leche cruda (T-CLM, I-CL y T-CL) mostraron una estructura más abierta con cavidades irregulares. Los quesos T-CLM se caracterizaron por mostrar, con el avance del proceso de maduración, una matriz más compacta, reduciéndose el número de poros o cavidades, aunque su tamaño fue generalmente mayor (**Figura** IV.I.**2.3**) especialmente a los 180 días. Estas modificaciones están en consonancia con las apreciaciones recogidas en estudios de la estructura de otros tipos de quesos elaborados con leche cruda de oveja, como el queso Roncal (Leiva *et al*., 2009), en los cuales se indica que conforme avanza el proceso de maduración, la matriz proteica se compacta, se reduce la porosidad y se pierde el carácter globular nativo de las micelas.

Los quesos I-CL se caracterizaron por presentar una matriz proteica con abundantes espacios u oquedades (**Figura** IV.I.**1.2**). Este carácter se mantuvo, o se incrementó ligeramente, con el avance de la maduración, de forma que los quesos a los 180 días presentaron una microestructura claramente porosa (**Tabla** V.I.**1**), con una menor relación matriz proteica/cavidades (abundantes poros rodeados de escasa matriz proteica) que los quesos I-CLM (**Figura** IV.I.**2.3**).

Los quesos de elaboración artesanal de la misma procedencia geográfica (T-CL) mostraron un incremento muy manifiesto del tamaño de las oquedades, al final del periodo de maduración, (**Figuras** IV.I.**1.2** y IV.I.**2.3**), de forma similar a la evolución de los quesos tradicionales de CL, aunque en estos últimos la relación matriz proteica/cavidades fue mayor (cavidades de menor tamaño rodeadas por una matriz más abundante) (**Figura** IV.I.**2.3**). Estos hechos se relacionan con las apreciaciones de otros autores (como Fallico *et al*., 2006) que han comparado, en distintos tipos de queso, la elaboración industrial y tradicional. La superficie suave del perímetro de las cavidades apreciada mediante MEB (**Figura** IV.I.**2.3**) de los quesos de CL se ha relacionado con la difusión de la grasa coincidiendo con los antecedentes publicados por Bhaskaracharya y Shah (2000).

En el presente estudio, como se indica en los **Trabajos 1** y **2**, los cambios estructurales que ocurren con el avance de la maduración, se han relacionado con una mayor o menor contracción de la matriz proteica, que causaría el cierre, el mantenimiento o la apertura de la estructura, en cuyos poros o cavidades fluiría la grasa al final de la maduración en lugar del suero que los ocuparía en los periodos iniciales. La microestructura (**Figura** IV.I.**2.3**) ampliamente porosa de los queso de CL puede relacionarse con los hallazgos de los mapas de IRM de en T_1, que sugieren que en este tipo de quesos el agua y la grasa fluyen con mayor grado de libertad que en la matriz de los quesos de CLM, donde habría mayor grado de interacción (menores valores de T_1, **Tabla** IV.I.**1.3**).

La mayor concentración del componente enzimático o de cuajo natural y la menor temperatura (34 - 41 ºC) favorece el incremento del tamaño de los poros (Madadlou *et al*., 2005; 2006) y podría explicar las diferencias observadas entre las distintas variedades de queso (Etayo *et al*., 2006; Nuñez *et al*., 1992). El mayor tamaño y la morfología irregular de las cavidades o espacios mostrados por la matriz de los quesos tradicionales pueden relacionarse con la manipulación manual de la cuajada, especialmente durante el moldeado y la menor presión aplicada. Cabe destacar la imagen del queso Catellano (T-CL), fabricado en una empresa con bajo nivel de producción y manipulación totalmente manual, donde se observaron, en general, las cavidades de mayor tamaño, seguido del queso de Castilla-La Mancha de elaboración igualmente artesanal (T-CLM). Las cavidades o poros redondeados o esféricos se atribuye a la producción de CO_2 por diversos microorganismos (como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Ln. paramesenteroides* y *Ln. lactis*) de los starter o

asociados a la microbiota autóctona que acompaña a la elaboración artesanal (Mariette, 2006).

Los resultados obtenidos en el estudio realizado en la presente Tesis Doctoral indican el potencial de la IRM para el análisis y caracterización de la estructura de los quesos con similar proceso de fabricación así como para el seguimiento de su proceso de maduración. Es posible obtener amplia y complementaria información mediante la adquisición de mapas de T_2 y de T_1. La IRM de los quesos muestra una estructura compleja, con diversas microestructuras, con distintos tiempos de relajación transversal y longitudinal, como se ha mencionado a lo largo de la interpretación de las imágenes. En el afán de profundizar en el estudio de la microestructura de los quesos, se recurrió al análisis de relaxometría de RMN para determinar los componentes T_2 (**Trabajo 2**). Esta técnica permite diferenciar poblaciones de agua con valores de tiempos de relajación próximos y por tanto evaluar diferencias sutiles de la estructura de determinados tejidos.

Como se ha mencionado, el tiempo de relajación transversal (T_2) de RMN es una medida de las interacciones espín-espín, que aporta información estructural debido a que cada protón está influenciado por los núcleos de los diferentes componentes (agua, grasa, proteínas) de su entorno (Ruan *et al*., 1998; Kuo *et al*., 2001; Mulas *et al*., 2013). Este hecho conduce a que en sistemas complejos aparezcan diversos tiempos de relajación para T_2 dependiendo del estado de los protones.

En los cuatro tipos de quesos se detectaron dos componentes (**Figuras** IV.I.**2.4** y IV.I.**2.5**), coincidiendo con lo descrito en otros tipos de quesos por diversos autores (Kuo *et al*., 2001; Gianferri *et al*., 2007; Noronha *et al*., 2008; Luo *et al*., 2013; Mulas *et al*., 2013). El componente correspondiente a la relajación más corta (T_{21}) se ha asociado con el agua "atrapada" en la red tridimensional de la matriz de caseína. Su valor depende especialmente del grado de interacción del agua con las proteínas, y se encuentra afectado por la intensidad de los fenómenos de difusión y de intercambio proteína-agua. Este componente puede utilizarse para obtener información sobre la evolución de la red proteica del queso a lo largo de su proceso de maduración, dado que a medida que éste progresa se producen pérdidas por evaporación de agua, con la consiguiente deshidratación de la matriz proteica, que facilita el establecimiento de interacciones entre las cadenas polipeptídicas y su reestructuración y el descenso de la solubilidad de las caseínas, oponiéndose a los procesos de difusión. En esta línea, y como se ha descrito por diversos autores (Lucey *et al*., 2003), durante la proteólisis

del queso y en la hidrólisis de péptidos se liberan grupos cargados (NH_3^+/COO^-), los cuales compiten por el agua, favoreciéndose la reducción del contenido de agua de la matriz durante la maduración. Todo ello lleva a un descenso de la señal T_{21} que se apreció, en mayor o menor intensidad, en todos los quesos estudiados.

El otro componente (T_{22}), con una relajación más larga, se ha relacionado, en los primeros estadios tras la elaboración de los quesos (2-9 días), con los protones del agua libre (del suero de leche) en los poros o cavidades que interrumpen la matriz proteica del queso. A medida que avanza la maduración, este agua se va perdiendo por la progresiva deshidratación, y los poros y espacios libres van siendo ocupados por aire o por grasa. Los protones asociados a esta última fase van paralelamente incrementando su protagonismo en la intensidad de este componente de relajación. De esta forma, el componente T_{22} aporta información de la distribución del componente lipídico, la porosidad y de la densidad de la matriz del queso (véase **Apartado** IV.I.**2.3.3**). Cuanto mayor es el volumen del espacio ocupado por el fluido mayor es la libertad de movimiento de los protones (Noronha *et al*., 2008; El-Bakry *et al*., 2011) y menor el nivel de interacción en las interfases grasa-agua y agua-proteína, y por consiguiente mayor es el componente T_{22}.

La información de los dos componentes de relajación transversal (T_{21} y T_{22}) se ha procesado considerando dos parámetros de cada una de las señales registradas: el valor del máximo (que es la medida habitualmente utilizada) y la *anchura* (véase **Figura** III.**2** del **Apartado III**). Este último parámetro depende de la homogeneidad del entorno físico de los protones. El incremento de la anchura de la señal de relaxometría se debe a la coexistencia de distintos grados de confinamiento y retención del agua o de la grasa; es reflejo, por tanto, de la heterogenidad del comportamiento de relajación asociada a microestructuras no uniformes. El valor máximo indica directamente la intensidad de la señal de acuerdo a la relajación de los protones, como se ha comentado anteriormente, respecto a los distintos medios en los que se ubican.

Como se ha mencionado en el **Apartado IV** del **Trabajo 2**, contrariamente a lo que cabía esperar, los quesos de elaboración industrial mostraron mayor amplitud de ambos componentes T_2 que los tradicionales (**Figura** IV.I.**2.4**), aunque, como se puede observar en la micrografías por MEB (**Figura** IV.I.**2.3**) y en el análisis de IRM (**Figura** IV.I.**1.2**), los primeros presentaron una estructura más homogénea, especialmente en el caso de los quesos I-CLM. Esta aparente falta de sincronía sería debida a los distintos niveles de la estructura que analizan cada una de las técnicas utilizadas. La relaxometría de RMN expresa la

heterogeneidad de los microespacios en los que se mueven los protones y es claro que en el caso de los quesos tradicionales el comportamiento de relajación es más uniforme, probablemente debido a que la estructura es más abierta, es decir la matriz proteica rodea poros y cavidades frecuentes y escasa variaciones en el tamaño de los poros. Mientras que, en los de elaboración industrial, especialmente en el caso de I-CLM, en un microespacio se encontrarían distintos grados de interacción agua-agua, agua-proteína y grasa proteína dado que la estructura es más compacta.

Respecto al valor máximo de T_{22} (**Tabla** IV.I.**2.1**), su inversa evolución con la maduración de los quesos dependiendo de la zona geográfica de procedencia, (positiva en el caso de los quesos de CL y negativa en los de CL) confirmaría las observaciones y atribuciones realizadas en el análisis de IRM y de las micrografías por SEM. El progresivo incremento de T_{22} en los quesos de Castilla y León indicaría el aumento paralelo del espacio de poros o cavidades en los que la grasa difundiría con un alto grado de libertad (**Tabla** V.I.**1**). Sin embargo, en los quesos manchegos se produjo una reducción del valor de T_{22} con el incremento del tiempo de maduración, lo que se considera debido a la reducción del espacio de cavidades y poros y a la menor difusión de la grasa.

Los componentes T_{21} y T_{22} han permitido establecer modelos de regresión lineal simple (**Tabla** IV.I.**2.2**) para la estimación del tiempo de maduración de los quesos así como para valores relacionados con el contenido acuoso (como la a_w y contenido de extracto seco) (**Figura** V.I.**2**). Este hecho se considera un primer paso para la valoración de la relaxometría de RMN como herramienta de control y de seguimiento del proceso de elaboración del tipo de quesos estudiado a nivel industrial. De forma similar, los valores medios de T_2 y T_1 obtenidos en el análisis de IRM pueden utilizarse con el mismo fin (véase **Trabajo 1**). Estos parámetros, como exponentes de la estructura de los quesos, han permitido además obtener modelos de predicción de los atributos de textura de los quesos (**Tabla** IV.I.1.**6** y IV.I.1.**7**), especialmente dureza (N), cohesividad (adimensional) y elasticidad (m). Cabe indicar que el trabajo realizado ha sido, hasta donde los autores han podido indagar, el primer intento de estimación del comportamiento reológico de los quesos desde atributos estructurales obtenidos por RMN (**Figura** V.I.**2**). Los resultados obtenidos son muy prometedores para futuras aplicaciones de estas técnicas de estudio para la estimación de la calidad sensorial de los quesos.

Otro de los parámetros determinados por IRM fue el **coeficiente de difusión aparente** (CDA), como medida de la movilidad, especialmente del agua, dentro de una

determinada matriz biológica (Sener, 2001). En los mapas obtenidos utilizando el *CDA* las zonas donde hay mayor difusión de agua se muestran con tonalidades claras y brillantes (Herrero *et al.*, 2007; 2009), tanto más cuanto mayor es el *CDA*, mientras que las estructuras densas y organizadas, con bajo *CDA*, aparecen oscuras. Los cuatro tipos de quesos estudiados se caracterizaron por presentar un *CDA* bajo (véase **Tabla** IV.I.**1.3**), al menos dos magnitudes inferior al descrito en matrices alimentarias constituidas por tejidos animales o vegetales (Herrero *et al.*, 2007; 2009). Este valor de *CDA* indica que estos quesos presentan una estructura con mayor compartimentación de agua y grado de interacción agua-macromoléculas (Sener, 2001) que los tejidos mencionados. Este valor fue, además, reduciéndose con el avance de la maduración debido a la progresiva pérdida de agua y compactación de la matriz proteica: Por todo ello, los mapas correspondientes (**Figura** IV.I.**1.4**) fueron muy oscuros y apenas permiten la percepción del entramado de la red que constituye la matriz proteica del queso (**Figura** V.I.**2**). Sólo en los primeros días de fabricación (2-9 días), se observan en los mapas correspondientes (**Figura** IV.I.**1.4**) cavidades o zonas con tonalidades brillantes, reflejo del suero atrapado. Tras esta etapa, únicamente se aprecian algunas zonas con tonalidades grisáceas que reflejarían el agua residual retenida en torno a la red proteica y el fluir de la grasa, en los quesos de CL mientras que los elaborados en CLM mostraron, en general, imágenes más oscuras.

En conjunto, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral indican el potencial de las técnicas de RMN, y más en concreto de la determinación de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (valor medio de T_2 y de sus componentes T_{21} y T_{22}) para monitorizar el proceso de maduración, los cambios estructurales y del contenido acuoso de los quesos de oveja de pasta prensada. Es posible también la caracterización de estos quesos de acuerdo a su procedencia y tiempo de fabricación (**Tabla** V.I.**1**). Cabe de nuevo resaltar que los valores medios de los parámetros T_1 y T_2 permitirían establecer modelos de regresión lineal para estimar el comportamiento reológico de los quesos. Sería necesario incrementar el número de unidades analizadas para obtener modelos más robustos así como realizar los requeridos ajustes, para cada tipo de queso, para una mayor aproximación de los datos experimentales y calculados. No obstante, se estima que los resultados obtenidos abren una importante vía de aplicación de la RMN para el control, estimación de la calidad y trazabilidad de la producción de queso de oveja de elevada calidad y valor añadido. Como futura línea de investigación se plantea profundizar en la relación de los parámetros estructurales de RMN y la percepción sensorial del queso.

En relación con la aplicación de la RMN, cabe indicar que el avance de los equipos permite en la actualidad disponer de modelos de bajo campo de sobremesa, muy útiles para aplicaciones en la industria, que podrían en un futuro utilizarse para el control en líneas de producción o de distribución de productos.

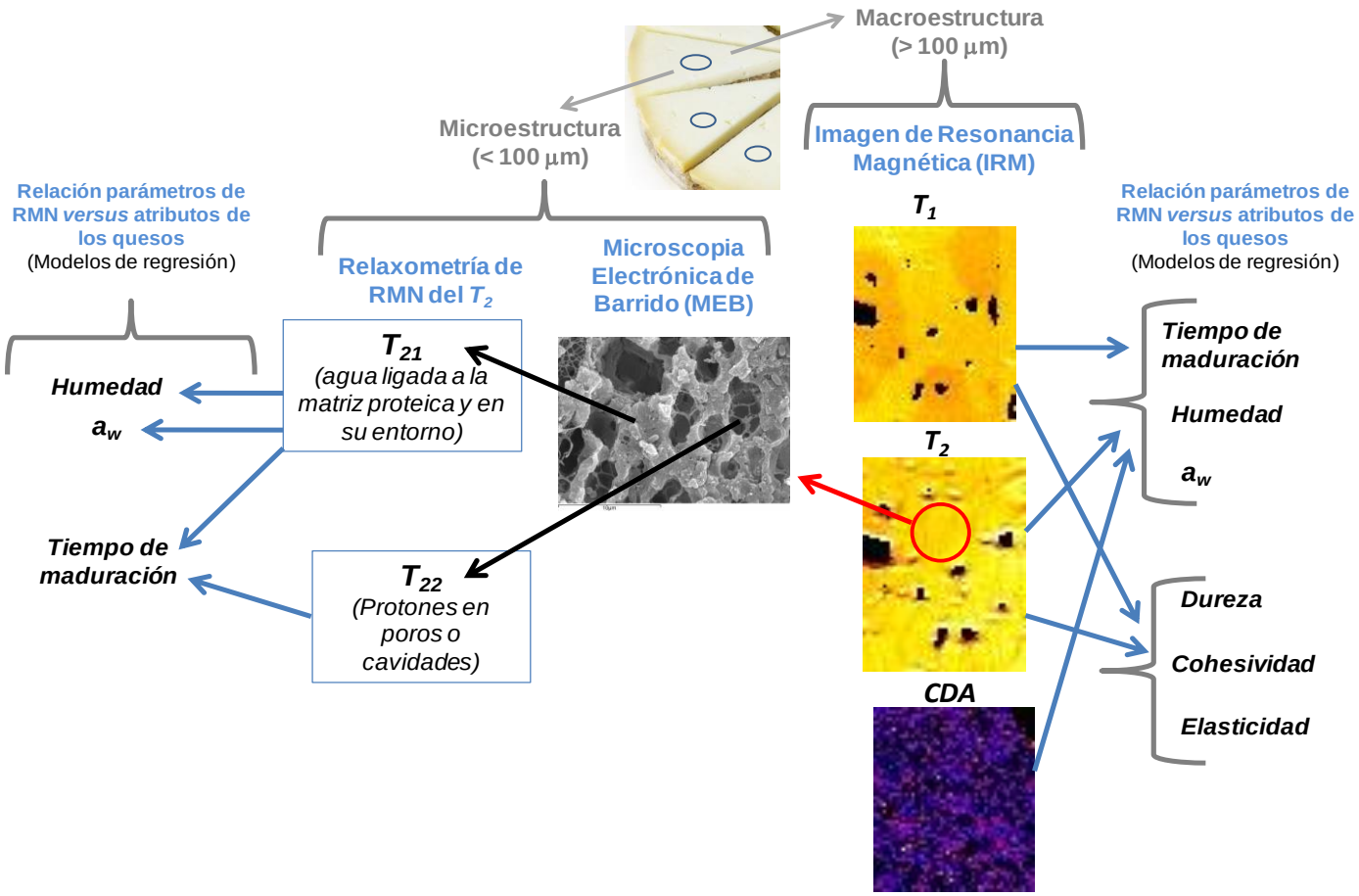


Figura V.I.**2.** Resumen esquemático del estudio de la estructura de los quesos de leche de oveja de pasta prensada estudiados (las imágenes corresponden a queso *Castellano* de elaboración industrial a los 30 días de fabricación).

Quesos elaborados en Castilla-La Mancha (de elaboración industrial, I-CLM, y artesanal, T-CLM)

IRM (T_2 y T_1) de I-CLM: Matriz homogénea y compacta que evoluciona con una reducción del número de cavidades y poros. Los quesos madurados presentan una matriz homogénea y uniforme con escaso número de cavidades o poros.	**IRM** (T_2 y T_1) de T-CLM: Matriz homogénea que evoluciona manteniéndose o incrementándose la presencia de poros o espacios. Los quesos más madurados presentan una matriz amorga interrumpida por cavidades de pequeño tamaño.

***T_{21}*:** Desciende con el tiempo de maduración. Relacionado con la pérdida de humedad, incremento de las interacciones proteína-proteína y la consolidación de la matriz proteica.
***T_{22}*:** Desciende con el tiempo de maduración. Relacionado con la reducción del tamaño y número de cavidades en la matriz proteica.
T_1 (valor medio): Desciende progresivamente con el avance del tiempo de maduración. Relacionado con la pérdida de agua y la escasa movilidad de la grasa.
CDA: Descenso progresivo con el tiempo de maduración por la deshidratación de la matriz y el incremento de las interacciones proteína-proteína. Valores bajos, relacionados con matrices compactas y compartimentadas con elevada interacción agua-proteína.

Quesos elaborados en Castilla y León (de elaboración industrial, I-CL, y artesanal, T-CL)

IRM (T_2 y T_1) de I-CL: Matriz que evoluciona manteniéndose o incrementándose la presencia de poros o espacios. Los quesos madurados presentan una matriz amorfa con una distribución heterogénea de la grasa e interrumpida por amplias cavidades.	**IRM** (T_2 y T_1) de T-CL: Matriz que evoluciona incrementándose el tamaño de poros o espacios. Los quesos más madurados presentan una matriz amorfa con una distribución heterogénea de la grasa e interrumpida por amplias cavidades y poros.

***T_{21}*:** Desciende con el tiempo de maduración, relacionado con la pérdida de humedad y la consolidación de la matriz proteica.
***T_{22}*:** Aumenta con el tiempo de maduración, relacionada con el incremento o mantenimiento del volumen del espacio de las cavidades que interrumpen la matriz proteica y con la difusión en ellas de la grasa.
T_1 (valor medio): Moderado descenso con el avance del tiempo de maduración, relacionado con el mantenimiento de la difusión y distribución libre del agua y de la grasa en el entorno de la matriz proteica.
CDA: Valores bajos, relacionados con matrices compactas y compartimentadas con elevada interacción agua-proteína. Descenso progresivo con el avance de la maduración por la deshidratación de la matriz y el incremento de las interacciones proteína-proteína.

Tabla V.I.**1.** Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la estructura de los quesos de leche de oveja por Imagen de Resonancia Magnética (IRM) y relaxometría de RMN.

V.I.2. Análisis metabolómico de los quesos de oveja de pasta prensada mediante espectroscopía de 1H-RMN/HRMAS. Potencial para la caracterización y monitorización del proceso de maduración.

El mercado actual en los países desarrollados demanda productos de calidad garantizada y diferenciados, que ha hecho surgir distintos regímenes y definiciones de calidad de los productos agrícolas y alimentarios (como Indicación Geográfica Protegida, IGP, Denominación de Origen Protegida, DOP, etc.) así como marcas (por ejemplo, Tierra de Sabor, queso Castellano) y sellos de calidad (por ejemplo, elaboración artesanal), con los que los productores se comprometen a ofrecer productos con ciertos atributos y valor añadido. Para la caracterización de estos productos y asegurar una producción de calidad estandarizada, se requiere del conocimiento profundo de los componentes y de las características de estos alimentos, así como del efecto de los factores de producción en sus atributos. En este marco, para facilitar el control de calidad y la autentificación de los productos, es necesario el desarrollo de metodologías de análisis avanzadas, que aporten información global, rápida y fiable, mediante tecnologías asequibles a distintos niveles (industrial, laboratorios de control, etc.). En este contexto sería conveniente el uso de métodos de análisis no destructivos, que permitan monitorizar la evolución de distintos componentes de los alimentos durante su elaboración y almacenamiento, así como el establecimiento de relaciones entre las características fisícoquímicas de los alimentos y la percepción sensorial. En los **Trabajos 3** y **4** de esta Tesis Doctoral (**Apartado** IV.I.3.**3** y IV.I.3.**4**) se ha utilizado la espectroscopía de ^{1}H-RMN y la sonda de HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*) para el análisis de los principales componentes de quesos de leche de oveja de pasta prensada con distintas calificaciones comerciales y contrastada calidad sensorial. Como se ha mencionado a lo largo de esta memoria, la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS cumple las condiciones mencionadas: (i) es rápida, (ii) permite el análisis de muestras intactas, sin fraccionamiento y con una mínima manipulación, y (iii) proporciona información, en un mismo espectro, de distintos componentes.

Como se ha mencionado en la introducción de esta Tesis Doctoral, la espectroscopía ^{1}H-RMN/HRMAS permite el análisis de muestras semisólidas utilizando la metodología empleada en el estudio de matrices sólidas mediante RMN. El empleo del giro con ángulo mágico (θ = 54,7º), combinado con la tecnología utilizada en las sondas de alta resolución de RMN de muestras líquidas, proporciona un medio fácil de obtener espectros de alta resolución de modelos heterogéneos que no son ni sólidos ni líquidos. La alta velocidad de

giro de la muestra, típicamente 4-6 kHz, junto con la posición del ángulo mágico proporciona una reducción de los efectos de la anchura de línea típicos de muestras sólidas (causados por la heterogeneidad de la muestra y las interacciones anisotrópicas). Tales efectos son normalmente promediados en muestras líquidas, donde las moléculas giran isótropa y rápidamente.

La metodología de HRMAS permite analizar directamente, sin manipulación, una muestra o tejido o alimento intacto. Se consigue así la identificación simultánea de los metabolitos polares y apolares presentes y, por tanto, la caracterización completa de todo el contenido metabólico de un tejido/alimento intacto, evitando largos tiempos de manipulación y la posible alteración de la muestra.

Hasta donde la autora conoce, los trabajos realizados por el equipo investigador, en el que se ubica el desarrollo de esta Tesis Doctoral, son los primeros en los que se ha aplicado esta metodología al análisis de quesos españoles. En consecuencia, la labor inicial, llevada a cabo en el **Trabajo 3**, fue la de optimizar los principales parámetros (temperatura, tiempo de eco, velocidad de giro, intensidad de gradiente y anchura espectral) para obtener espectros de ^{1}H-RMN/HRMAS de adecuada resolución (**Tabla** IV.I.**3.1**) para este tipo de quesos. En el contexto de desarrollo de este trabajo se analizó la leche cruda de oveja utilizada en la elaboración artesanal de queso Castellano y el producto resultante (T-CL), así como quesos fabricados de forma industrial (I-CL). Ambos quesos Castellanos (I-CL y T-CL) se analizaron en distintos momentos de su maduración (2, 9, 30, 90 y 180 días). De esta forma, se ha intentado conocer el potencial de esta metodología para el estudio de los metabolitos, tanto de la materia prima como del producto resultante y las posibilidades de uso para monitorizar la glucólisis, proteólisis y lipólisis que caracterizan el proceso de maduración de estos quesos. Para ello, y al igual que en el **Trabajo 4**, en el que se analizaron los quesos de oveja de Castilla-La Mancha, se ha realizado un estudio exhaustivo de identificación de los metabolitos presentes mediante experimentos monodimencionales (1D) y bidimensionales (2D) (**Figura** IV.I.**3.7**).

La interpretación de los espectros de ^{1}H-RMN/HRMAS puede ser compleja dado el gran número de metabolitos que pueden mostrar y al amplio rango de concentraciones en el que se pueden presentar. Por ello, se utilizaron secuencias de pulsos, o experimentos de RMN, para simplificar el espectro, mediante el filtrado de algunas de las señales presentes. Así, un *filtro* T_2 (basado en las secuencias de pulsos CPMG Carr-Purcell-Meiboom-Gill)

permitió eliminar señales con valores de tiempo de relajación transversal (T_2) bajos (Mazzei y Piccolo, 2012), como ocurre con los ácidos grasos. Por otro lado, en experimentos con filtro de difusión se eliminaron del espectro aquellas señales correspondientes a metabolitos de bajo peso molecular, como aminoácidos y ácidos orgánicos. Gracias al empleo de estas secuencias se pudo simplificar los espectros y así obtener de forma "artificial" el espectro ^{1}H correspondiente al extracto lipofílico (filtro de difusión) y al extracto acuoso (filtro T_2).

En conjunto, a través de los espectros de ^{1}H-RMN/HRMAS (**Figuras** IV.I.3.**3.5**, IV.I.3.**3.6**, IV.I.3.**3.8**, IV.I.3.**4.2**), adquiridos en pocos minutos, se obtuvo información de distintos compuestos, tanto mayoritarios como minoritarios, (aminoácidos, ácidos grasos, derivados de la lactosa, ácidos orgánicos, colesterol, fosfolípidos, triglicéridos, etc.) en las dos matrices analizas leche y queso. Estos resultados se han contrastado con los obtenidos por diversos autores con distintas técnicas de análisis (por ejemplo, Fernández-García *et al*., 1988; Fox *et al*., 2000; Raynal-Ljutovac *et al*., 2008; Bergamini *et al*., 2010; Garde *et al*., 2012), lo que indica que esta metodología puede utilizarse para el análisis rápido del perfil metabolómico de la leche de oveja y de los quesos. Se considera que los resultados obtenidos abren muchas perspectivas para las aplicaciones de la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS en el control y trazabilidad de quesos de alto valor añadido como son los quesos de oveja de pasta prensada. En total se han identificado 116 señales correspondientes a distintos metabolitos (**Tabla** IV.I.3.**3.2**); entre ellos se encuentran algunos relacionados con el desarrollo sápido y aromático (como diversos aminoácidos y ácidos orgánicos), por lo que esta espectroscopía podría utilizarse para una rápida estimación de la calidad sensorial del queso. Esta es una línea en la que podría proyectarse el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral en futuras investigaciones. El amplio perfil de metabolitos detectados permite afirmar que la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS es una técnica idónea para el seguimiento de procesos complejos, como la maduración de los quesos, en la que se encuentran implicados distintas rutas metabólicas en torno al contenido proteico, lipídico y de hidratos de carbono, interrelacionadas entre sí.

En el **Trabajo 3**, tras la optimización de las condiciones de análisis por ^{1}H-RMN/HRMAS, se estudió el queso de oveja elaborado en Castilla y León con un enfoque *descriptivo* de su metaboloma. Con la experiencia adquirida se planteó el **Trabajo 4**, en el que se estudiaron quesos elaborados en Castilla-La Mancha y se incorporó la aplicación de técnicas *quimiométricas* para el análisis del *metaboloma*. En ambos trabajos se indica el

origen y el papel de los componentes identificados en los quesos de oveja, se han contrastado los resultados obtenidos con la bibliografía científica y se han discutido las diferencias en el metaboloma entre un tipo de queso y otro (I-CL *versus* T-CL y I-CLM *versus* T-CL) y sus posibles causas. Los resultados obtenidos en estos trabajos ponen de manifiesto el potencial de la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS para la caracterización de los quesos y monitorizar el proceso de maduración (**Figuras** IV.I.3.**3.11**, IV.I.3.**3.9**, IV.I.3.**4.3** y IV.I.3.**4.4**), especialmente cuando se suma el uso de técnicas multivariantes, como el Análisis de Componentes Principales (ACP), que permiten el procesado conjunto de la evolución del metaboloma (**Figura** IV.I.3.**4.6**). Estos resultados están en consonancia con lo obtenidos por Mazzei *et al.* (2012). Estos autores utilizaron la RMN metabolómica para el estudio de la producción de *Mozzarella di Bufala Campana* (MBC), que se encuentra protegida bajo la correspondiente DOP. Su producción posee una alta relevancia en la economía agroalimentaria de la región de Campania (Italia). Este trabajo reveló que la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS permite la rápida caracterización del perfil metabólico de las muestras de MBC intactas y su clasificación tanto por su origen geográfico como por su frescura.

Como se menciona en el **Trabajo 4**, el Análisis de Componentes Principales (ACP), no supervisado utilizando como criterio de asociación el metaboloma completo, permitió agrupar los quesos de Castilla-La Mancha de acuerdo al tiempo de maduración y al método de fabricación (**Figura** IV.I.3.**4.6**). Para este análisis cada espectro fue segmentado en regiones espectrales, o *buckets* (83), de anchura variable. Estas regiones, *de ancho variable*, fueron seleccionadas para evitar las variaciones de desplazamiento químico como consecuencia de que se estudiaron muestras de queso íntegras, no tamponadas.

Los métodos estadísticos multivariantes no supervisados permiten evaluar la variabilidad de los datos sin tener en cuenta su clasificación dentro de ningún grupo. Estos métodos son de gran utilidad para la identificación de patrones y/o tendencias dentro de las muestras estudiadas. Entre las técnicas estadísticas no supervisadas más utilizadas se encuentra el análisis de componentes principales (ACP) y el análisis de conglomerados o *clustering*.

El ACP constituye una de las técnicas exploratorias más comunes en el análisis metabolómico (Dunn *et al.*, 2005) ya que permite representar los datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad. Como resultado de este análisis, los datos extraídos de una

matriz (*X*) con *k* dimensiones, donde *k* corresponde al número de variables, son reducidos a un espacio definido por unos pocos componentes principales (CPs), capaces de explicar la mayor variabilidad entre las muestras (Halouska *et al.*, 2012).

El primer componente principal (CP1) consistirá en una combinación lineal de todas las variables espaciales ponderadas para explicar el máximo de la varianza total del espacio original; el segundo componente principal (CP2) será ortogonal al primero y explicará el máximo de la varianza residual, y así con el resto hasta que la varianza total quede explicada. Como los CPs son ortogonales entre sí, la representación gráfica de los datos en el espacio bidimensional definido por dos CPs (p. ej., CP1 *versus* CP2), proporciona una proyección, gráfico de puntuaciones de las muestras o *score plot*, donde cada uno de los puntos representa el espectro de una muestra (**Figuras** IV.I.3**.4.6** y IV.I.3.**4.7a**). En el gráfico de puntuaciones se pueden apreciar las principales agrupaciones y tendencias entre las muestras analizadas. De manera análoga, el gráfico de puntuaciones de las variables o *loading plot*, define las relaciones entre las *k* variables que integran la matriz de datos original (*X*), lo que permite identificar, de forma gráfica, cuáles son las variables (*buckets*) responsables de las tendencias o agrupaciones observadas (**Figura** IV.I.3.**4.7b**).

En el análisis inicial de componentes principales (**Figura** IV.I.3.**4.6**), llevado a cabo en el desarrollo del **Trabajo 4**, se procesaron los *buckets* (variables) de los metabolitos identificados en el espectro de ^{1}H-RMN/HRMAS de los quesos de CLM (obteniéndose una matriz de 83 *buckets* x 50 espectros). Estos *buckets* presentan una gran variabilidad, dado que incluyen metabolitos con una gran intensidad de señal (como los ácidos grasos) y otros con una intensidad mucho menor (como la lactosa). Para homogenizar el valor de las variables, y amortiguar el efecto de las diferencias de intensidad, se realizó una transformación (véase **Punto III.5**) de los *buckets*. Los mejores resultados se obtuvieron con un escalado de varianza unitaria **(Punto III.5**). Este procedimiento convierte todas las concentraciones en fluctuaciones en torno a cero, en lugar de alrededor de la media de intensidades de cada segmento o *bucket*. Mediante esta transformación, se consigue focalizar los resultados sobre las diferencias entre muestras y no sobre la variabilidad global y está dirigido a ajustar las diferencias en las fluctuaciones entre los distintos metabolitos. De esta forma, la matriz se construyó con los datos de los *buckets* transformados y su procesado se realizó utilizando el software de AMIX (versión 3.9.11, Bruker BioSpin) (**Punto III.5**). Como se ha mencionado, este procedimiento permitió alcanzar el objetivo de discernir los

quesos de CLM de acuerdo al proceso de elaboración (I-CLM y T-CLM) y el tiempo de maduración (**Figura** IV.I.3**.4.6**), aunque la varianza explicada, por los dos primeros componentes, se limitó al 66 %. Para incrementar este porcentaje, en un nuevo ACP se utilizaron los *buckets* correspondientes a los aminoácidos, puesto que estos metabolitos fueron los que presentaron mayor variabilidad entre los distintos quesos estudiados. Para el procesado de estos *buckets* no fue requerido ningún escalado, dado que se encuentran en un orden de magnitud similar, y se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE.UU.) para Windows, de mayor difusión y disposición que el mencionado software AMIX, lo que facilitaría el tratamiento de los datos. Los dos primeros componentes obtenidos con este procedimiento explicaron el 89 % de la varianza de los resultados (**Figura** IV.I.3.**4.7**) y ofrecieron una agrupación similar a la obtenida con el procesado del conjunto del metaboloma. Este hecho, permite asumir que es suficiente con considerar los datos de los aminoácidos derivados del espectro ^{1}H-RMN/HRMAS para conseguir la diferenciación de muestras de queso de oveja de CLM, de acuerdo a los criterios indicados, simplificando notablemente el procesado de datos. Por otra parte, los resultados obtenidos en el **Trabajo 4** (**Figuras** IV.I.**4.6** y IV.I.**4.7**) han demostrado que el empleo del ACP no supervisado es suficiente para distinguir las variaciones entre los grupos de queso de CLM estudiados (distintos tiempos de maduración y proceso de elaboración) en función de sus diferencias metabólicas.

Los resultados derivados del **Trabajo 3** (relativo a los quesos I-CL y T-CL) y **4** (correspondiente a los quesos I-CLM y T-CLM), se han procesado conjuntamente en un ACP (**Figura** V.I.**3**) utilizando los *buckets* de los aminoácidos, de forma similar a como se realizó en el desarrollo del **Trabajo 4**. Los dos primeros CPs explican el 89,2 % de la varianza (CP1: 67 % y CP2: 22,2 %) de las muestras. El gráfico de puntuaciones de las muestras de queso analizadas pone de manifiesto la evolución paralela y diferenciada de ambos tipos de queso (CL y CLM) a lo largo del proceso de maduración (**Figura** V.I.**3**). Estos resultados de nuevo indicarían el potencial de la espectroscopía ^{1}H-RMN/HRMAS para la monitorización del proceso de maduración de los quesos así como para la diferenciación de quesos de oveja de pasta prensada en función de su origen geográfico.

En el análisis detallado de esta distribución de las muestras (**Figura** V.I.**3**) se observó una agrupación diferenciada de las muestras de los quesos de CLM procedentes de la elaboración industrial (por debajo) y tradicional (por encima). Una distribución similar se

observa en los quesos de CL, aunque el distanciamiento entre las muestras de distinto proceso de elaboración (I-CL y T-CL) fue mucho menor que en el caso de los quesos de CLM. La diferenciación de las muestras de queso de CLM, teniendo en cuenta el proceso de elaboración (I-CLM *versus* T-CLM) (**Figura** V.I.**3**), potenciada cuando las muestras se proyectaron sobre los CPs obtenidos procesando sólo los datos de los aminoácidos de queso de este origen (I-CLM *versus* T-CLM) (**Figura** IV.I.3.**4.7**), se ha atribuido (véase **Trabajo 4**) fundamentalmente, al uso de leche pasteurizada (I-CLM) o cruda (T-CLM) para la fabricación de los quesos. Como es sabido, los cambios causados en la leche por la pasteurización incluyen la inactivación de enzimas, ligera desnaturalización de las proteínas del suero, y destrucción de microbiota termolábil. McSweeney y Fox. (1993) mencionan que la destrucción de la microbiota de la leche, principalmente las bacterias lácticas que no forman parte de los cultivos estárter, probablemente sea el factor más influyente en el proceso de maduración. La mayor proximidad de los datos correspondientes a los quesos de CL de elaboración industrial (I-CL) y artesanal (T-CL) sin duda se deben a que ambos quesos se elaboraron con leche cruda. Las diferencias, en este caso, pueden relacionarse con la microbiota nativa y al uso de cuajo natural de ovino en el queso de elaboración artesanal (**Punto III.3**).

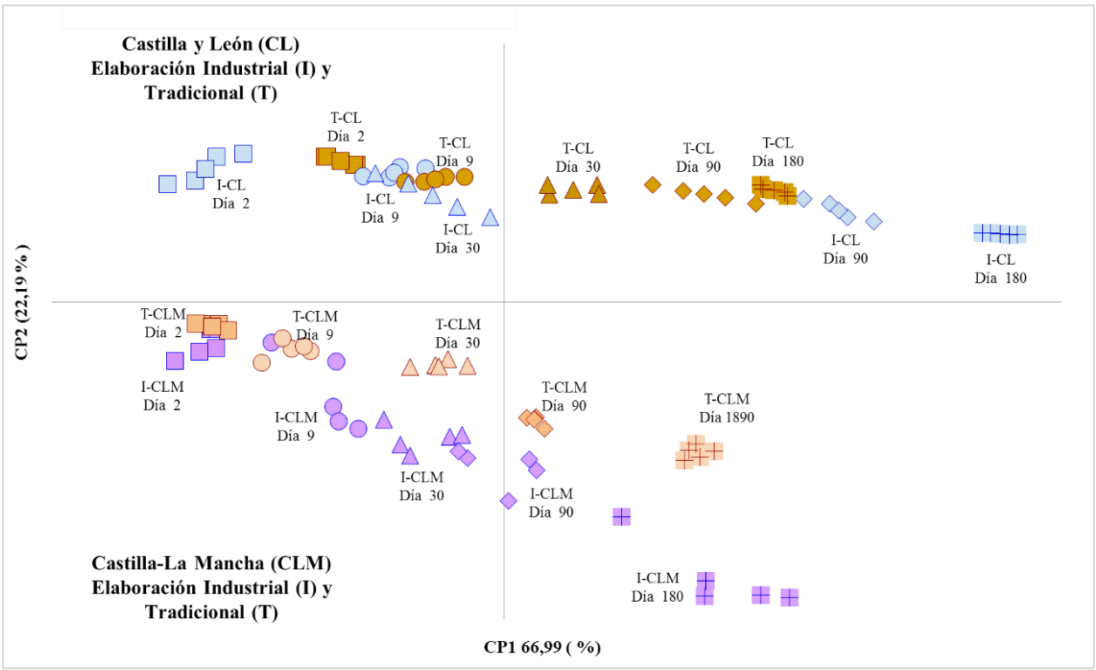


Figura V.I.3. Distribución de las muestras de queso de oveja de Castilla y León (CL) y de Castilla-La Mancha (CLM) de elaboración Industrial (I) y Tradicional (T) con distintos tiempos de maduración (días) sobre los dos primeros Componentes Principales (CP1 y CP2) obtenidos en el

Análisis de Componentes Principales no supervisado utilizando las regiones espectrales de los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS correspondientes a los aminoácidos.

El calificativo de elaboración artesanal o tradicional generalmente suscita en el consumidor la idea de un producto con singulares características de sabor y aroma. En los quesos tradicionales sus comprobados atributos sensoriales se han asociado a la actividad de la microbiota autóctona presente en la leche cruda (Skeie *et al*., 2000). En la elaboración tradicional se utilizaba leche cruda, sin fermentos lácticos añadidos. Sin embargo, la microbiota láctica de la leche cruda es bastante inconstante (Gónzalez *et al*., 2003), lo que puede ocasionar problemas como una acidificación lenta, insuficiente para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes, y falta de uniformidad en la producción. Por todo ello, en la actualidad los fabricantes de queso utilizan cultivos estárter comerciales, asegurándose la producción aunque con un considerable desplazamiento de las cepas salvajes responsables de atributos característicos de los algunos quesos (González *et al*., 2003). Por otra parte, los quesos elaborados con leche cruda de oveja sólo pueden consumirse después de 60 días de maduración (Real Decreto 1679/1994, de 22 de julio), tiempo suficiente para la destrucción de los microorganismos patógenos que eventualmente pueden estar presentes en la leche.

El tratamiento de pasteurización de la leche permite obtener productos lácteos más seguros y homogéneos al destruirse la microbiota patógena y gran parte de la alterante. Sin embargo, el uso de leche pasteurizada para la elaboración de quesos se ha asociado con un menor desarrollo sápido y aromático (Gaya *et al*., 1990; McSweeney y Fox., 1993; Beuvier *et al*., 1997; Gómez-Ruiz *et al*., 2002; Fernández-García *et al*., 2004). Diversos autores han indicado que la utilización de leche pasteurizada y fermentos lácticos autóctonos ayuda a obtener productos con características similares a los elaborados con leche cruda (Centeno *et al*., 1996; Medina *et al*., 2001). Este hecho ha llevado a que exista un gran interés por el estudio de los fermentos lácticos autóctonos, para su utilización a escala industrial en la fabricación de quesos que conserven las características típicas de los elaborados de forma tradicional, asegurando a la vez una producción más segura y homogénea (Herreros *et al*., 2003; Pérez *et al*., 2003).

Para continuar el estudio estadístico no supervisado de los datos obtenidos por espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS se ha realizado un análisis de conglomerados o *clustering*, utilizando los metabolitos que mostraron señales aisladas y claras, que fueron

asignadas a componentes concretos, y que más contribuyeron a la agrupación de las muestras en el ACP (**Figura** V.I.**4**). De acuerdo con estos criterios, se procesaron los datos de 26 *buckets* sin escalado. Las clases o *clusters* derivadas de este análisis se caracterizan por aquellas variables que presentan, en cada una de ellas, una media superior o inferior a la media global. Este análisis permitió corroborar los resultados obtenidos en el ACP.

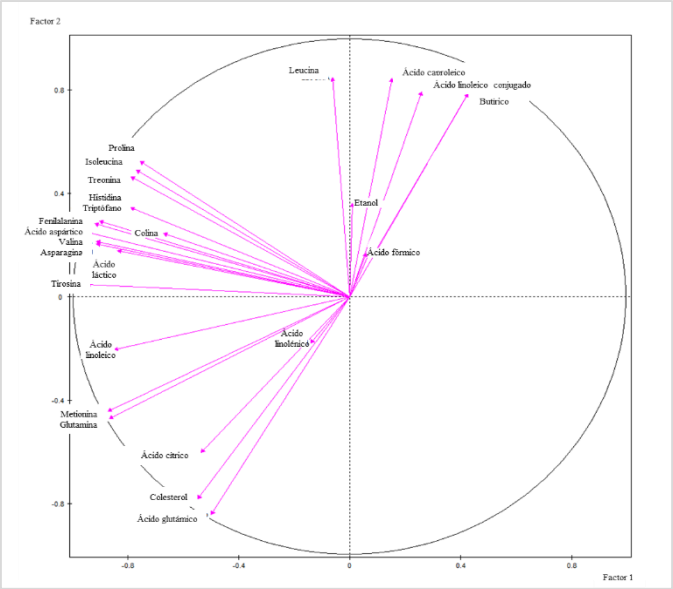


Figura V.I.**4.** Distribución de las variables correspondientes a las regiones espectrales de los espectros ^{1}H-RMN/HRMAS utilizadas en el análisis de conglomerados o de *cluster* de las muestras de queso de oveja de Castilla y León (CL) y de Castilla-La Mancha (CLM).

En la **Figura** V.I.**5** se muestra la distribución de las muestras en tres *clusters*, este proceder fue elegido debido a que permite la caracterización de los quesos de las dos zonas geográficas consideradas. El 100% de las muestras de los quesos de CLM se agruparon en el *cluster* 2 (**Tabla** V.I.**2**) mientras que los quesos de CL se distribuyeron en el *cluster* 1 (caracterizado por los quesos elaborados a nivel industrial con menos de 180 días) y 3 (quesos artesanales con más de 30 días de elaboración e industriales al final de la maduración). Este estudio indica que los quesos de CLM (*cluster* 2) presentan mayor contenido de los ácidos butírico y acético, así como de leucina y menor presencia de ácido glutámico, glutamina y metionina, entre otros aminoácidos. Los quesos de CL de elaboración artesanal y mayor tiempo de maduración (T-CL y I-CL) (*cluster* 3) se caracterizan por una mayor presencia de aminoácidos libres y de ácido linoleico así como de la mayoría de los metabolitos considerados, con excepción de los ácidos grasos de cadena corta (butírico y caproleico) que se presentaron con menor contenido que en la media (**Tabla** V.I.**2**). En la **Figura** V.I.**5** también se muestra la distribución de los centroides, o centro de gravedad, de

las muestras a los distintos tiempos de maduración, pudiéndose observar su alineación con el avance de este proceso.

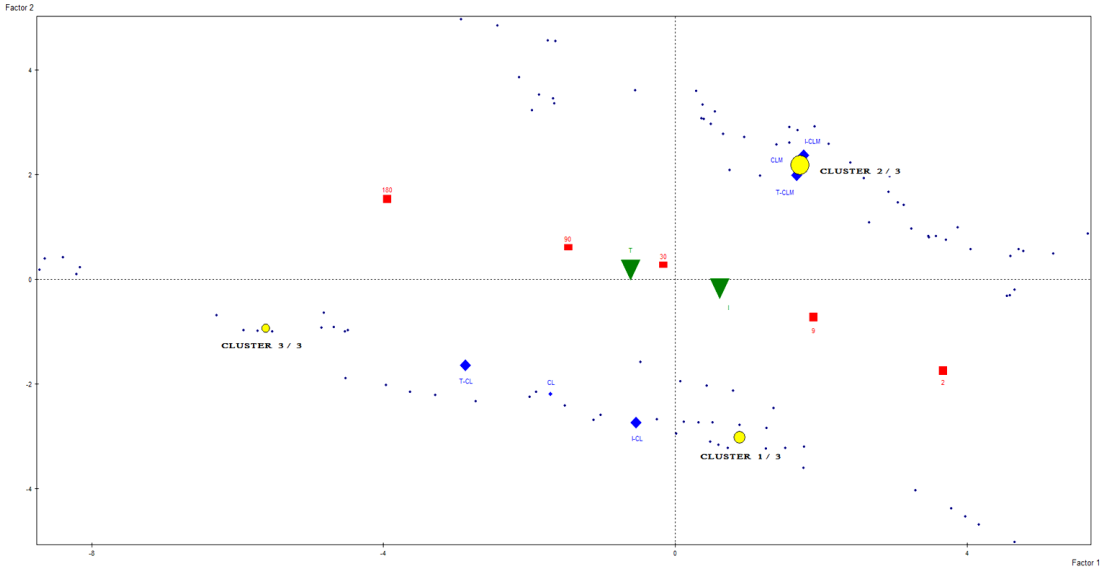


Figura V.I.**5.** Distribución de las muestras de queso de oveja de Castilla y León (CL) y de Castilla-La Mancha (CLM) de elaboración Industrial (I) y Tradicional (T) con distintos tiempos de maduración (días) y representación de los centroides en los tres grupos (*cluster*) obtenidos de las regiones espectrales del espectro ^{1}H-RMN/HRMAS. Las características de los grupos se muestran en la **Tabla** V.I.**2**.

Como se ha mencionado en esta memoria, las diferencias apreciadas entre los distintos tipos de queso de leche de oveja se relacionan con modificaciones de las diversas variables de su proceso de elaboración, como la microbiota asociada al uso de leche cruda o pasteurizada (Gaya *et al*., 1990; Fallico *et al*., 2006), tipo de cuajo (Sousa y Malcata, 1997), tipo de cultivo estárter utilizado (Metzger *et al*., 2001), la presencia de una microbiota autóctona o nativa (Ballesteros *et al*., 2006), la concentración de sal (Freitas y Malcata, 2000), etc.

En conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS es una técnica rápida y eficaz para el análisis directo y no destructivo del metaboloma de leche y de quesos de oveja de pasta prensada. Esta técnica, ligada al análisis multivariante de los resultados obtenidos, permite monitorizar los cambios producidos durante su maduración. Por otro lado, la espectroscopía de ^{1}H-RMN/HRMAS es una herramienta idónea para diferenciar y caracterizar quesos dependiendo de su origen y proceso de fabricación.

Tabla V.I.**2.** Características de los grupos (*cluster*) obtenidos en el análisis de conglomerados (*clustering*) a partir de las regiones espectrales (*buckets*) del espectro ^{1}H-RMN/HRMAS (**Figura** V.I.**4**) de quesos de Castilla y León (CL) y Castilla-La Mancha (CLM) de elaboración Industrial (I) y Tradicional (T) de distintos tiempos de maduración (2, 9, 30, 60, 180 días)

			Cluster 1				Cluster 2				Cluster 3			
Característica			**Característica**	**% de la categoría en el grupo**	**Valor del t-Student**	**Probabilidad (*P*)**	**Característica**	**% de la categoría en el grupo**	**Valor del t-Student**	**Probabilidad (*P*)**	**Característica**	**% de la categoría en el grupo**	**Valor del t-Student**	**Probabilidad (*P*)**
Geografía			CL	100	6.79	0.0001	CLM	100	11.28	0.0000	CL	100	5.22	0.0000
			CLM	0	-6.97	0.0000	CL	0	-11.28	0.0000	CLM	0	-5.22	0.0000
Tipo			I-CL	66.7	5.93	0.0001	T-CLM	50	6.1	0.0000	T-CL	75	5.18	0.0000
							I-CLM	50	6.1	0.0000				
Tiempo de maduración (días)			180	0	-3.43	0.0001					180	50	3.22	0.001
											2	0	-2.48	0.007
											9	0	-2.48	0.007
Metábolito	**Valor medio global**	**Desviación estándar del valor medio global**	**Media del cluster**	**Desviación estándar del cluster**	**Valor del t-Student**	**Probabilidad (*P*)**	**Media del cluster**	**Desviación estándar del cluster**	**Valor del t-Student**	**Probabilidad (*P*)**	**Media del cluster**	**Desviación estándar del cluster**	**Valor del t-Student**	**Probabilidad (*P*)**
Ácido aspártico	0.0003	0.0002	0.0003	0.0001	-3.4549	0.0003	0.0003	0.0001	-2.4731	0.0067	0.0006	0.0001	7.0495	0.0000
Ácido glutámico	0.0188	0.0169	0.0358	0.0010	6.5192	0.0000	0.0019	0.0006	-9.9411	0.0000	0.0357	0.0003	4.9577	0.0000
Asparagina	0.0004	0.0002	0.0004	0.0001	-2.4876	0.0064	0.0004	0.0001	-2.9566	0.0016	0.0006	0.0000	6.5457	0.0000
Fenilalanina	0.0004	0.0002	0.0002	0.0001	-3.9648	0.0000					0.0007	0.0001	7.1066	0.0000
Glutamina	0.0013	0.0008					0.0006	0.0002	-8.2071	0.0000	0.0027	0.0002	8.2419	0.0000
Histidina	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	-5.1925	0.0000					0.0001	0.0000	6.6514	0.0000
Isoleucina	0.0033	0.0007	0.0029	0.0003	-4.1080	0.0000					0.0039	0.0003	4.3854	0.0000
Leucina	0.0068	0.0033	0.0037	0.0008	-6.0491	0.0000	0.0090	0.0032	6.6859	0.0000				
Metionina	0.0004	0.0003					0.0002	0.0001	-8.0185	0.0000	0.0008	0.0001	7.6561	0.0000
Prolina	0.0002	0.0001	0.0001	0.0000	-4.1270	0.0000					0.0003	0.0001	4.1025	0.0000
Tirosina	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	-3.3130	0.0005	0.0001	0.0000	-3.9128	0.0000	0.0002	0.0000	8.6866	0.0000
Treonina	0.0004	0.0002	0.0003	0.0001	-4.1312	0.0000					0.0005	0.0002	4.6800	0.0000
Triptófano	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	-3.6459	0.0001					0.0002	0.0000	6.6877	0.0000
Valina	0.0008	0.0003	0.0006	0.0001	-3.6326	0.0001	0.0007	0.0002	-2.5991	0.0047	0.0013	0.0002	7.4105	0.0000
Acido acético	0.0040	0.0024	0.0015	0.0003	-7.0440	0.0000	0.0059	0.0017	8.2407	0.0000				
Ácido cítrico	0.0005	0.0002	0.0006	0.0001	3.0169	0.0013	0.0004	0.0001	-7.5405	0.0000	0.0008	0.0001	5.9694	0.0000
Ácido láctico	0.0048	0.0013	0.0042	0.0008	-3.1572	0.0008	0.0045	0.0008	-2.4370	0.0074	0.0065	0.0014	6.6632	0.0000
Etanol	0.0080	0.0005	0.0078	0.0004	-3.2882	0.0005	0.0082	0.0005	3.0032	0.0013				
Colina	0.0003	0.0001	0.0002	0.0001	-3.1532	0.0008					0.0004	0.0001	4.9108	0.0000
Colesterol	0.0010	0.0004	0.0013	0.0001	5.5490	0.0000	0.0006	0.0001	-9.4532	0.0000	0.0013	0.0001	5.4593	0.0000
Ácido bútirico	0.0315	0.0231	0.0093	0.0014	-6.2615	0.0000	0.0524	0.0138	8.9918	0.0000	0.0126	0.0007	-4.0664	0.0000
Acido caproleico	0.0001	0.0000	0.0001	0.0000	-2.7537	0.0029	0.0001	0.0000	5.1125	0.0000	0.0001	0.0000	-3.2360	0.0006
Ácido linoleico conjugado	0.0001	0.0000	0.0001	0.0000	-5.4451	0.0000	0.0001	0.0000	7.7723	0.0000	0.0001	0.0000	-3.4772	0.0003
Linoleico	0.0012	0.0002					0.0010	0.0001	-6.2813	0.0000	0.0015	0.0001	7.2087	0.0000

V.II. En relación con la elaboración y estudio de las películas comestibles elaboradas con proteínas de suero de leche de vaca

En la segunda parte de la Tesis Doctoral se ha indagado la posibilidad de obtener películas comestibles para la comercialización de quesos de oveja con distinto grado de maduración. En el mercado actual existe una creciente demanda de productos listos para su consumo (*ready-to-eat*, RTE) que se presentan en envases con un contenido adecuado al consumo de distintas unidades familiares (habitualmente entre 50-300 g). Este hecho ha conducido a que la comercialización de productos en grandes piezas enteras (como jamones, quesos, embutidos, etc.) se halle considerablemente reducida frente al avance de la oferta del producto loncheado o cortado en porciones. Sin embargo, la facilidad de consumo que ofrecen los productos RTE se encuentra en muchos casos contrarrestada por la pérdida de la calidad sensorial frente al producto recién cortado o preparado. En el caso particular de los quesos de oveja, la oferta comercial de RTE se centra en el envasado de lonchas, o precortados similares, y de pequeñas porciones (cuñas de 100 a 300 g generalmente). En el **Trabajo 5** se han elaborado películas comestibles a partir de un concentrado comercial de proteínas de lactosuero de vacuno con el objetivo de proponer materiales alternativos de envasado para abordar problemas que afectan a la aceptación o nivel de satisfacción del consumidor, derivados de la comercialización de quesos de oveja, con distinto grado de maduración, como RTE. En el caso de los productos loncheados y precortados, las principales deficiencias surgen de la ruptura de estas unidades por una excesiva fragilidad y/o por la elevada adhesión entre superficies superpuestas. En la comercialización de estos quesos en porciones, en un consumo fraccionado, las pérdidas de calidad sensorial se producen por deshidratación y liberación de compuestos aromáticos desde las superficies expuestas al exterior, tras la apertura de los envases y al cabo de un cierto tiempo. Para paliar estos problemas, se han elaborado películas con proteínas de lactosuero recurriendo a distintas estrategias (sin tratamiento, calor, ultrasonidos, con o sin adición de transglutaminasa de origen microbiano) (véase **Tabla** IV.II.**5.1**) para ofrecer un material de envasado de naturaleza próxima a la del producto comercializado: queso. Estos *biomateriales* podrían utilizarse como material de separación entre lonchas o para cubrir las superficies de corte de quesos comercializados en porciones y reducir las pérdidas de humedad.

En el **Trabajo 5** se muestran las características mecánicas, de permeabilidad y de color, así como particularidades de la microestructura, de las películas elaboradas con un

concentrado de proteínas de lactosuero bovino (80 % de proteína) utilizando glicerol como plastificante (4 %) (**Tablas** IV.II.**5.3**, IV.II.**5.4**, IV.II.**5.5**, IV.II.**5.9**). En este trabajo se discuten los resultados obtenidos y se contrastan con la bibliografía existente, por ello en este apartado sólo se hace mención a los resultados más relevantes. Cabe mencionar que, hasta donde se ha podido indagar, se trata del primer estudio en el que se aplica la relaxometría de RMN, mono (1D) y bidimensional (2D), para el estudio de películas comestibles. Otra novedad considerada en este estudio ha sido el análisis de los distintos parámetros que caracterizan la señal de relaxometría (valor del máximo, medio y área) y su relación con las propiedades físicas (incluida la permeabilidad al vapor de agua), mecánicas (resistencia a la solicitación de distintas fuerzas) y de color (medidas instrumentales) de las películas (**Tabla** IV.II.**5.7**). Este procedimiento ha permitido establecer distintos grados de correlación lineal entre resultados del estudio de relaxometría y el comportamiento y características de las películas de proteínas de lactosuero, siendo el valor del máximo de la señal de relaxometría el parámetro más adecuado para este fin (**Tabla** IV.II.**5.7**). Estos resultados indican el potencial de esta técnica de RMN para analizar la microestructura de materiales y explicar su comportamiento y propiedades. En esta línea, en futuras investigaciones, sería posible establecer modelos de predicción del comportamiento de películas de proteínas de lactosuero. El análisis completo de los tiempos de relajación (T_2 y T_1) obtenidos en el estudio 1D y 2D ha permitido la estimación del grado de interacción proteína-proteína que caracteriza su estructura, la porosidad relativa y las interacciones agua-proteína, agua-plastificante, proteína-plastificante y proteína-grasa (véase **Punto** IV.II.**5.3.3** del **Trabajo 5**).

Como se menciona a lo largo del **Trabajo 5**, las propiedades y características estructurales de las películas son un reflejo de los cambios producidos en las proteínas del lactosuero por los tratamientos aplicados [calor (82 ºC, 30 min) y ultrasonido (35 kHz, dos tiempos, 15 y 60 minutos)]. En general, las películas están formadas por una red proteica y espacios o poros con presencia de agua y glicerol. El tratamiento térmico dio lugar a películas con una estructura más compacta, con mayor grado de interacción proteína-proteína y menor porosidad relativa. Las películas resultantes del tratamiento ultrasónico presentaron una porosidad relativa tanto mayor cuanto más largo fue el tratamiento aplicado. Sin embargo, la combinación de este tratamiento con la adición de transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa, 0,75 %) produjo una reducción de la porosidad y un incremento de las interacciones de la red proteica, con intensificación de la resistencia y de la capacidad de

deformación de las películas, así como una reducción de su luminosidad. La incorporación de esta enzima a los concentrados de lactosuero tras el tratamiento térmico dio lugar a un elevado incremento de la viscosidad, impidiendo la extensión de la mezcla para la formación de películas uniformes, por lo que este procedimiento (calor + MTGasa) fue desechado del estudio. Los cambios producidos en las proteínas del lactosuero durante los distintos tratamientos aplicados, así como su relación con la microestructura y las características de las películas obtenidas, han sido expuestos a lo largo del **Trabajo 5** (véase **Puntos** IV.II.**5.3.2** y IV.II.**5.3.3**). Gran parte de las características de las películas se asocian al establecimiento de enlaces disulfuro entre las cadenas proteicas facilitados por los cambios estructurales promovidos por el tratamiento térmico (Shimada y Cheftel, 1989; McHugh y Krochta, 1994), así como a la reorientación, en las proteínas del lactosuero, de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, derivada de los tratamientos ultrasónicos, lo que modificaría sustancialmente las interfases proteína-agua-otros componentes de las películas (Jambrak *et al*., 2009; Gülseren *et al*., 2007; Arzeni *et al*., 2012); estos cambios básicos explicarían la mayor resistencia mecánica de las películas tratadas por calor y la menor permeabilidad al vapor de agua de las obtenidas con ultrasonidos. La incorporación de MTGasa potencia el establecimiento de enlaces covalentes entre grupos glutamina-lisina de distintas cadenas polipeptidicas, (Weng y Zheng, 2015) lo que explica la mayor la estructura más compacta de las películas resultantes.

Teniendo en cuenta el comportamiento mecánico (mayor resistencia a la tracción y a la penetración, capacidad de elongación y de deformación así como flexibilidad) y su menor solubilidad (**Tablas** IV.II.**5.3** y IV.II.**5.4**), las películas derivadas del tratamiento térmico de las proteínas de lactosuero se seleccionaron para su uso como material de separación entre lonchas de queso como alternativa a las láminas de diversos plásticos o papeles parafinados utilizados en la actualidad. Los resultados derivados de las pruebas preliminares realizadas en este campo de aplicación (**Tabla IV.**II.**5.10**) han sido muy satisfactorias, lo que permite proponer este material para su empleo en la comercialización de quesos en lonchas.

Las películas obtenidas por ultrasonido (especialmente aquellas tratadas durante 60 minutos, con o sin incorporación de MTGasa), por su menor permeabilidad (**Tabla** IV.II.**5.3**), serían aconsejables para cubrir las superficies de corte de porciones de queso y protegerlas de las pérdidas de humedad y el consiguiente acortezado. Estas películas podrían utilizarse para envolver las porciones de queso que habitualmente se comercializan para su

consumo fraccionado y que una vez abierto el envase externo principal (plástico, cartón-papel con diversos revestimientos, etc.) quedan expuestos al aire.

En un trabajo futuro, se pretende utilizar proteínas de lactosuero ovino, (que no fue posible emplear en esta primera experiencia al no encontrarse una distribución comercial de concentrados de esta naturaleza), y ensayar distintas aplicaciones de las películas comestibles obtenidas en el campo de la puesta en el mercado de quesos de oveja de pasta prensada, con distintos tiempos de maduración, como productos RTE.

V.III. Bibliografía

Aguilera, J., and Stanley, D. (1999) Microestructural principles of food processing and engineering. 2th (Ed): Aspen, Maryland-USA. p 450.

Aguilera, J.M. (2005). Why food microstructure?. *Journal of Food Engineering* 67:3-11.

Aguilera, J.M. (2012). The engineering inside our dishes. *International Journal of Castronomy and Food Science*, 1:31.36.

Altan, A., Oztop, M.H., McCarthy, K.L., and McCarthy, M.J. (2011). Monitoring changes in feta cheese during brining by magnetic resonance imaging and NMR relaxometry. *Journal of Food Engineering*, 107:200-207.

Argüelles, A., Castelló, M., Sanz, J., and Fito, P. (2007). Application of SAFES methodology in Manchego-type cheese manufacture. *Journal of Food Engineering*, 83:229-237.

Arzeni, C., Martinez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O.E., and Pilosof, A.M.R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108:463-472.

Auldist, A., Walsh, B.J., and Thomson, N.A (1998). Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research*, 65(03):401-411.

Auldist, A., Walsh, B.J., and Thomson, N.A (1998). Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research*, 65(03):401-411.

Ballesteros, C., Poveda, J.M., González-Viñas, M.A., and Cabezas L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17:249-255.

Barrett, A.H. (2003). Characterization of Macrostructures in Extruded Products. In: Gonul, K., and Kenneth, J.B. (Ed.). Characterization of Cereals and Flours: Properties, Analysis anda Aplication. (Ed): Marcel Dekker, New York-USA.

Bergamini, C.V., Wolf, I.V., Perotti, M.C., and Zalazar C.A. (2010). Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research*, 94:79-89.

Bhaskaracharya, R., and Shah, N. (2000). A simplified method for examination of microstructure of Mozzarella cheeses with scanning electron microscopy. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55: 28-32

Buffa, M., Trujillo, A.J., Pavia, M., and Guamis, B. (2001). Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treatedgoats' milk. *International Dairy Journal*, 11:927-934.

Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S., and Palop, Ma.LL. (2007). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, 18:11-17.

Centeno, J.A., Menendez, S. and Otero, J.L.R. (1996) Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 307-313.

Dunn, W.B., Bailey, N.J., and Johnson, H.E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, 130:606-625.

El-Bakry, M., Duggan, E., O'Riordan, E.D., and O'Sullivan, M. (2011). Effect of chelating salt type on casein hydration and fat emulsification during manufacture and post-manufacture functionality of imitation cheese. *Journal of Food Engineering*, 102:145-153.

Etayo, I., Peréz-Elortondo, F.J., GIL, P.F., Albisu, M., Virto, M., Conde, S., Rodríguez-Barron, L.J., Najera, A.I., Gomez-Hidalgo, M.E., Delgado, C., Guerra, A., and 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.

Fallico, V., Tuminello, L., Pediliggieri, C., Horne, J., Carpino, S., and Licitra, G. (2006). Proteolysis and Microstructure of Piacentinu Ennese Cheese MadeUs ing Different Farm Technologies. *Journal of Dairy Science*, 89:37-48.

FAOSTAT. (2014). http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx

Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., and Nuñez, M. (2004). Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, 14:39-46.

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

Fox, P.F. (2000). Fundamentals of cheese science. (Ed.): Springer Science-Business Media, Gaithersburg-US, pp. 3-587.

Freitas, A.C., Macedo, A.C. and Malcata, EX. (2000). Review: Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International*, 6:351-370.

Freitas, C., and Malcata, F.X. (2000). Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appe´lation d'Origine Protegée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *Journal of Dairy Science*, 83:584-602.

Garde, S, Gaya, P., Arias, R., and Nuñes, M. (2012). Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of Clostridium spp. isolated from Manchego cheeses with late blowing defect. F*ood Control*, 28:392-399.

Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A. and Núñez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: The effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, 73:26-32.

Gaya, P., Medina, M., Rodriguez-Marin, M.A., and Nuñez, M. (1990). Accelerated Ripening of Ewes' Milk Manchego Cheese: The Effect of Elevated Ripening Temperatures. *Journal of Dairy Science*, 7:26-32.

Gianferri, R., Maioli, M., Delfini, M., and Brosio, E. (2007). A low-resolution and high-resolution nuclear magnetic resonance integrated approach to investigate the physical structure and metabolic profile of Mozzarella di Bufala Campana cheese. *International Dairy Journal*, 17:167-176.

Gómez-Ruiz, J.A., Ballesteros, C., González Viñas, M.A., Cabezas, L., and Martínez-Castrom, I. (2002). Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Le Lait*, 82:613-628.

González, J., Mas., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I, Rebollo, J.E., and Caceres,P. (2003). Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorialcharacteristcs of Ibores goat`s milk cheeses.Lait, 83:193-202.

Gowland, P.A., and Stevenson, V.L. (2003). T_1: The longitudinal relaxation time. In: Toofts P. (Ed.). Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease. (Ed): John Wiley and Sons, West Sussex-UK, pp. 111-143.

Gülseren, I., Güzey, D., Bruce, B.D., and Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14:173-183.

Halouska S, Fenton RJ, Barletta RG, and Powers R. (2012). Predicting the in vivo mechanism of action for drug leads using NMR metabolomics. *Journal of the American Chemical Society*,7:166-171

Herrero, A.M., Cambero, M.I., ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero De Avila, M.D., and. De La Hoz, L. (2007). Magnetic Resonance Imaging, Rheological Properties, and Physicochemical Characteristics of Meat Systems with Fibrinogen and Thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:9357-9364.

Herrero, A.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero de Ávila, M.D., and Cambero, M.I. (2009). Magnetic resonance imaging studies of the cold-set gelation on plasma powder and meat systems. *Food Research International*, 42:1362-1372.

Herreros, M.A., Fresno, J.M., González, M.J., and Tornadijo, M.E. (2003). Technological chacterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheece (a Spanish goat´s milk cheese). *International Dairy Jounal*, 13:469.479.

Horne, D. S. 1998. Casein interactions: Casting light on the Black Boxes, the structure in dairy products. Journal of Dairy Science, 8:171-177.

Horne, D.S., and Banks, J.M. Rennet-induced coagulation of milk. in: Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology. Vol. 1. 3rd ed. Elsevier Applied Science, Amsterdam, the Netherlands; 2004:47–70 (General Aspects).

Hot, Q.T., Verboven, P., Verliden, B.E., Herremans, E., Wevers, M., Carmeliet, J., and Nicolai, B. (2011). A Three-Dimensional Multiscale Model for Gas Exchange in Fruit, *Frontiers in Plant Science*, 155:1158-1168.

Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Kresic, G., and Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93:386-393.Kuo, M.I., Gunasekaran, S., Johnson, M., and Chen, C. (2001). Nuclear magnetic resonance study of water mobility in pasta filata and non-pastafilata Mozzarella. *Journal of Dairy Science*, 84:1950-1958.

Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., and Batish, V.K. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30:243-258

Leiva, J., Magariños, H., Romero, A., and Figueroa, H. (2009). Caracterización estructural mediante análisis de imagen del queso Chanco elaborado en la provincia de Osorno. *Agro Sur*, 37:26-33.

Lopez-Sanchez, P., Nijsse, J., Blonk, H. C. G., Bialek, L., Schumm, S., & Langton, M. (2011). Effect of mechanical and thermal treatments on the microstructure and rheological properties of carrot, broccoli and tomato dispersions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91:207-217.

Lucey, A., Johnson, M.E., and HorneInvited, D.S. (2003). Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. Journal of Dairy Science, 86:2725-2743.

Luo, J., Pan, T., Gou, H.Y., and Ren, F.Z. (2013). Effect of calcium in brine on salt diffusion and water distribution of Mozzarella cheese during brining. *Journal of Dairy Science*, 96:824-831.

Madadlou, A., Khosroshahi, A., and Mousavi, M.E. (2005). Rheology, Microstructure, and functionality of low-fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet. *Journal of Dairy Science*, 88(9):3052-3062.

Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi S.M., and Djome, Z.E. (2006). Microstructure and rheological properties of Iranian white cheese coagulated at various temperatures. *International Dairy Journal*,89:2359-2364.

Mariette, F. (2006). NMR Relaxation of Dairy Products. In: Webb G. (Ed). Modern Magnetic Resonance, Part 3: Applications in Materials Science and Food Science. (Ed) Royal Society of Chemistry, London, UK, pp.1801.

Mazzei, P., and Piccolo, A. (2012). ^{1}H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*, 132:1620-1627.

McHugh, T.H., and J.M. Krochta. (1994). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion película. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71: 307-312

McMahon, D.J., Motawee, M.M., and McManus, W.R. (2009). Influence of brine concentration and temperature on composition, microstructure, and yield of feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 92:4169-4179.

McRobbie, D.W., Moore, E.A., Graves, M.J., and Prince, M.R. (2006). MRI from Picture to Proton, 2edn, Cambridge University Press.

McSweeney, P.L.H., and Fox, P.F. (1993). Cheese: methods of chemical analysis. In: Fox, P.F. (Ed.). Cheese: Chemistry, physics and microbiology (Vol. 1). (Ed): Chapman & Hall, London, pp. 341-389.

Medina, R., Katz, M., Gonza´lez, S. and Oliver, G. (2001) Characterization of lactic acid bacteria in ewes' milk and cheese from Northwest Argentina. *Journal of Dairy Science*, 58, 137-145.

Mercasa. (2015). Alimentación en España. Producción, industria, distribución y consumo http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion_2015/pdfs/AE2015_WEB.pdf

Metzger, L.E., Barbano, D.M., Kindstedt, P.S., and Guo, M.R. (2001). Effect of Milk Preacidification on Low Fat Mozzarella Cheese: II. Chemical and Functional Properties During Storage. *Journal of Dairy Science*, 84:1348-1356.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA.). (2014). Producción anual y destinos de la leche (todas las clases de leches) en las industrias lácteas:http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuadro_b_2014_tcm7-405076.pdf

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion (MAPA). (1995). Reglamento de la Denominación de Origen Queso Manchego y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial del Estado, 295:35548.

Mulas, G., Roggio, T., Uzzau, S., and Anedda, R. (2013). A new magnetic resonance imaging approach for discriminating Sardinian sheep milk cheese made from heat-treated or raw milk. *Journal of Dairy Science*, 96:7393-7403.

Noronha, N., Duggan, E., Ziegler, G.R., O'Riordan, E.D., and O'Sullivan, M. (2008). Investigation of imitation cheese matrix development using light microscopy and NMR relaxometry. *International Dairy Journal*, 18:641-648

Nuñez, M., Medina, M., Gaya, P., Guillen, A.M., and Rodríguez-Marín, M.A. (1992). Effect of recombinant chymosin on ewes' milk coagulation and Manchego cheese characteristics. *Journal of Dairy Research*, 59:81-87.

O'Callaghan, D.J., and Guinee, T.P. (2004). Rheology and texture of cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1:511-540.

Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., and Malcata, F.X. (2009). Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. Trends in Food Science and Technology, 20:213-219.

Pérez, G., Cardell, E., and Zarate, V. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife Cheese. *International Jounal of Food Science and Technology*, 38:537-546

Raynal-Ljutovaca, K., Lagriffoulb, G., Paccardb, P., Guilleta, I., and Chilliardc Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79:57-72.

Ruan, R., Chang, K., Chen, P.L., Fulcher, R.G., and Bastian, E.D. (1998). A magnetic resonance imaging technique for quantitative mapping of moisture and fat in a cheese block. *International Dairy Journal*, 80:9-15.

Sakul, H., and Boylan, W.J. (1992). Lactation curves for several U.S. sheep breeds. *Animal Production*, 54: 229-233.

Sener, R.N. (2001). Diffusion MRI: apparent diffusion coefficient (*ADC*) values in the normal brain and a classification of brain disorders based on *ADC* values *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 25:299-326

Shimada, K., and Cheftel, J.C. (1989). Sulfhydryl group disulfide bond interchange during heat induced gelation of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37:161-168.

Singh H., and Waungana A. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheese making properties. International Dairy Journal 11:543–551.

Skeie, S., Narvhus, J.A., Ardö, Y., Thorvaldsen, K. and Abrahamsen, R. K. (1997). The effect of reduced salt content on the function of liposomeencapsulated neutrase and heat-treated lactobacilli in rindless low-fat cheese. *Le Lait*, 77:575-585.

Sousa, M.J. and Malcata, EX. (1997). Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical, and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:74-81.

Weng, W., and Zheng, H. (2015). Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin película incorporated with soy protein isolate. *Food Chemistry*, 169:255-260.

VI. CONCLUSIONES

1. La Imagen de Resonancia Magnética a través de los mapas obtenidos de T_1 (tiempo de relajación longitudinal), T_2 (tiempo de relajación transversal) y *CDA* (Coeficiente de Difusión Aparente) aporta información detallada y complementaria de la macroestructura de los quesos de oveja de pasta prensada permitiendo su caracterización e identificación de acuerdo a su procedencia (Castilla y León o Castilla-La Mancha), proceso de obtención (industrial o tradicional) y tiempo de maduración (días).

2. Es posible obtener modelos de regresión lineal a partir de los valores promedios de T_1 (tiempo de relajación longitudinal), T_2 (tiempo de relajación transversal) y *CDA* (Coeficiente de Difusión Aparente) derivados de la Imagen de Resonancia Magnética para estimar el contenido acuoso, la actividad de agua y el tiempo de maduración de los quesos de oveja.

3. Las características de textura de los quesos, como la dureza, la cohesividad y la elasticidad pueden predecirse a partir de modelos de regresión múltiple utilizando los valores promedio de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2), con una aceptable aproximación de los datos predichos y los valores observados.

4. El tiempo de relajación transversal (T_2) de quesos de oveja de pasta prensada presenta un comportamiento bimodal con dos componentes: uno de relajación más corta (T_{21}) asociado a los protones del agua fuertemente ligada a las macromoléculas y otro de relajación más larga (T_{22}) atribuido a los protones de la fase grasa. Estos componentes de relaxometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permiten la monitorización del proceso de maduración de los quesos de oveja y la estimación del contenido acuoso, actividad de agua y tiempo de maduración.

5. La evolución de la microestructura de los quesos de oveja durante el proceso de maduración varía dependiendo del origen de los mismos. En los quesos de Castilla-La Mancha se produce una compactación de la microestructura, en la que la grasa estaría restringida en pequeños poros o cavidades. Sin embargo, en los quesos de Castilla y León hay una mayor tendencia a la coalescencia de las cavidades y a la aparición de estructuras abiertas con menor compartimentación de la grasa.

6. La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón (^{1}H-RMN), junto con la sonda de alta resolución de ángulo mágico (HRMAS, *High Resolution Magic*

Angle Spinning) permite el análisis de muestras íntegras de queso, permitiendo la monitorización de los procesos de glucólisis, proteólisis y lipólisis que caracterizan su maduración.

7. La RMN metabolómica permite clasificar los quesos de oveja dependiendo del tiempo de maduración (desde los 2 a 180 días), procedencia y forma de elaboración.

8. Las películas obtenidas mediante tratamiento térmico (82 ºC, 30 min) de concentrados de proteínas de lactosuero bovino presentan bajos valores de solubilidad y elevada resistencia mecánica y pueden utilizarse como material alternativo para el envasado de quesos en porciones especialmente como material de separación entre lonchas.

9. La relaxometría de RMN mono y bidimencional de las películas elaboradas a partir de concentrados de proteínas de lactosuero permite el análisis de su microestructura, su caracterización y la estimación de sus caracterísiticas fisicoquímicas y comportamiento mecánico.

Conclusión final

Las distintas técnicas de Resonancia Magnética Nuclear tienen un elevado potencial para el análisis de la estructura y composición de matrices complejas constituidas por proteínas de origen lácteo, como el queso de oveja y las películas elaboradas con proteínas de lactosuero, utilizando muestras íntegras, sin manipulación previa.