

APLICACIÓN DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO DE CABRA



Martín Nicolás Buffa



Universitat
Autònoma
de Barcelona

**APLICACIÓN DE LAS ALTAS
PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LA
ELABORACIÓN DE QUESO DE CABRA**

MARTÍN NICOLÁS BUFFA

Centre Especial de Recerca
Planta de Tecnología dels Aliments (CERPTA)
Facultat de Veterinària
Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Universitat Autònoma de Barcelona

APLICACIÓN DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO DE CABRA

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

MARTÍN NICOLÁS BUFFA
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2003

ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Profesor Titular de Tecnología de los Alimentos, y BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ, Catedrático de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona,

HACEN CONSTAR: Que el licenciado en Bromatología Martín Nicolás Buffa ha realizado, bajo su dirección, el trabajo titulado "**Aplicación de las altas presiones hidrostáticas en la elaboración de queso de cabra**" que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 20 de Mayo de 2003.

Antonio José Trujillo Mesa

Buenaventura Guamis López

*Dedico este trabajo a mi familia toda,
y a vos Simona.*

AGRADECIMIENTOS

(o lo que es lo mismo, la página más leída de la Tesis)

A mis directores Toni y Ventura, por permitirme trabajar en la Unidad de Tecnología de los Alimentos y por velar todo este tiempo por mi financiación económica. Por su disponibilidad, accesibilidad, por sus consejos, ideas y apoyo permanente.

A Joan Miquel, por su ayuda, consejos, honestidad, por predicar con el ejemplo, y fundamentalmente por su amistad.

A Jordi Saldo (el Dr quesito I), por su colaboración, generosidad, tertulias, por formar un equipo y hacer del trabajo una “sana competencia”, pero principalmente por su amistad y la de su genial familia, Maite y Guillem.

A Marta Pavia, por sus enseñanzas y por su energía positiva. A Ramón Gervilla, por su generosidad y disponibilidad permanente. A Vicky y a Marta Capellas por su colaboración.

A TODOS los integrantes, pasados y presentes de la Unidad, en especial a los habitantes del VO-232 (“la rambla” de la Unidad): Lamya, Bibi, Isha, Pili (sin el teléfono), y a los que normalmente se encuentran “en tránsito”: Elena, Tomás, Sonia, junto a un interminable etcétera. A todos ellos gracias por su compañerismo, gracias por las risas, por las charlas, los cafés... han hecho más llevadero este trabajo.

A las superefactivas Laura y Julia, sin las cuales la burocracia se haría insopportable. A los compañeros de la Planta Piloto, Víctor y Ángel, por facilitarme el trabajo allí.

A mi familia en Barcelona, los Alvaritos (www.go.to/alvaritos), con los que comparto la vida (de día y de noche).

A mis incondicionales Mònica, Ita y Eduard, por estar siempre ahí, por sus risas, cines, cenas, viajes (a Ripoll), y por su sincera amistad.

A Olga y Marco, mis primeros amigos en España.

A todos ustedes, gracias por todo.

Este trabajo ha sido realizado con la financiación aportada por:

- ¤ La Agencia Española de Cooperación Iberoamericana, mediante su programa de becas de postgrado para estudiantes latinoamericanos (años 1998-2001).
 - ¤ La Unión Europea a través del proyecto de investigación FAIR-CT96-1113.
-

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	1
1.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	3
1.2. PLAN DE TRABAJO	7
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. CAMBIOS EN LA LECHE INDUCIDOS POR LA PASTEURIZACIÓN Y POR LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA	16
2.1.1. ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS	16
2.1.2. ACTIVACIÓN/INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE LA LECHE	19
2.1.2.1. Plasmina	20
2.1.2.2. Lipoproteín lipasa	21
2.1.2.3. Fosfatasa ácida	22
2.1.2.4. Fosfatasa alcalina	22
2.1.2.5. Catepsina D	23
2.1.2.6. Enzimas de la microbiota psicrótrofa	24
2.1.3. AGREGACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO	25
2.1.4. MODIFICACIONES EN LA MICELA DE CASEÍNA	26
2.1.5. MODIFICACIONES DEL EQUILIBRIO MINERAL Y PH	27
2.1.6. MODIFICACIONES EN LAS PROPIEDADES DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA	30
2.2. CONSECUENCIAS DE LA PASTEURIZACIÓN Y DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA EN LA MANUFACTURA Y MADURADO DEL QUESO	33
2.2.1. RENDIMIENTO QUESERO	33
2.2.2. COMPOSICIÓN GENERAL	34
2.2.3. MICROBIOTA DEL QUESO	36
2.2.4. PROTEÓLISIS	38
2.2.5. LIPÓLISIS	43
2.2.6. GLICÓLISIS	44

2.2.7.	PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN Y VOLÁTILES. CARACTERÍSTICAS SENSORIALES	45
2.2.8.	TEXTURA	47

3. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS **51**

3.1.	<i>RENNET COAGULATION PROPERTIES OF RAW, PASTEURIZED AND HIGH PRESSURE-TREATED GOAT MILK.</i>	53
3.2.	<i>MICROBIOLOGICAL CHANGES THROUGHOUT RIPENING OF GOAT CHEESE MADE FROM RAW, PASTEURIZED AND HIGH-PRESSURE TREATED MILK.</i>	59
3.3.	<i>PROTEOLYSIS IN GOAT CHEESE MADE FROM RAW, PASTEURIZED OR PRESSURE-TREATED MILK.</i>	69
3.4.	<i>LIPOLYSIS IN CHEESE MADE FROM RAW, PASTEURIZED OR HIGH-PRESSURE-TREATED GOATS' MILK.</i>	83
3.5.	<i>CHANGES IN TEXTURAL, MICROSTRUCTURAL, AND COLOUR CHARACTERISTICS DURING RIPENING OF CHEESES MADE FROM RAW, PASTEURIZED OR HIGH-PRESSURE-TREATED GOATS' MILK.</i>	91
3.6.	<i>CHANGES IN WATER BINDING DURING RIPENING OF CHEESES MADE FROM RAW, PASTEURIZED OR HIGH-PRESSURE-TREATED GOAT MILK.</i>	101
3.7.	<i>CHANGES IN ORGANIC ACIDS DURING RIPENING OF CHEESES MADE FROM RAW, PASTEURIZED OR HIGH-PRESSURE-TREATED GOATS' MILK.</i>	111
3.8.	<i>PER SE EFFECT OF HIGH-PRESSURE-TREATMENT OF MILK ON CHEESE PROTEOLYSIS.</i>	131

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **159**

4.1.	<i>PRIMERA EXPERIENCIA (PRODUCCIONES DE QUESOS DE PEQUEÑO FORMATO)</i>	163
4.1.1.	COMPOSICIÓN DE LAS LECHEZ Y SUEROS	163
4.1.2.	COAGULACIÓN ENZIMÁTICA	164
4.1.3.	RENDIMIENTO QUESERO Y COMPOSICIÓN	165
4.1.4.	MICROBIOLOGÍA	167
4.1.5.	PROTEÓLISIS	169

4.2. SEGUNDA EXPERIENCIA (PRODUCCIONES DE MAYOR FORMATO)	172
4.2.1. COMPOSICIÓN DE LAS LECHESES Y SUEROS	172
4.2.2. RENDIMIENTO QUESERO Y COMPOSICIÓN	173
4.2.3. LIPÓLISIS Y ANÁLISIS SENSORIAL	174
4.2.4. TEXTURA, MICROESTRUCTURA Y COLOR	175
4.2.5. GRADOS DE INTERACCIÓN DEL AGUA EN EL QUESO	177
4.2.6. ÁCIDOS ORGÁNICOS	178
4.2.7. PROTEÓLISIS	179
5. CONCLUSIONES	183
6. BIBLIOGRAFÍA	189
7. ANEXO I	203
8. ANEXO II	205

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Plan de trabajo de la primera experiencia	7
FIGURA 2. Plan de trabajo de la segunda experiencia	8
FIGURA 3: Rendimientos queseros de la primera experiencia	165

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Alimentos tratados por alta presión recientemente comercializados.	14
TABLA 2. Formas de calcio en la leche	28
TABLA 3. Modificaciones en el equilibrio mineral producidas por los tratamientos de alta presión	29
TABLA 4. Modificaciones en la coagulación enzimática producidas por los tratamientos de alta presión	31
TABLA 5. Influencia de la pasteurización o presurización de la leche en la proteólisis del queso	41
TABLA 6. Composición de las leches de cabra	163
TABLA 7. Composición de los sueros de quesería	164
TABLA 8. Composición de los quesos (día 1) elaborados a partir de leche cruda, pasteurizada y tratada por altas presiones	166
TABLA 9. Composición de los quesos elaborados a partir de leche cruda, pasteurizada y tratada por altas presiones	166
TABLA 10. Composición de las leches de cabra	172
TABLA 11. Composición de los sueros de quesería	172
TABLA 12. Composición de los quesos elaborados a partir de leche cruda, pasteurizada y tratada por altas presiones	174

1. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Antecedentes, objetivos y plan de trabajo _____

1.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La Unitat de Tecnologia dels Aliments y desde 1993 el Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) ha participado en dos proyectos europeos sobre alta presión, uno en el programa AIR (referencia AIR-CT92-0296) titulado "High hydrostatic pressure treatment; its impact on spoilage organisms, biopolymer activity, functionality and nutrient composition of food systems" y otro en el programa FAIR (referencia FAIR-CT96-1113) con título "High pressure treatment of liquid foods and derived". Las líneas generales de estos proyectos incluyeron los siguientes estudios:

- Características físico-químicas de la leche tratada por alta presión
- Eliminación de microorganismos en leche y queso
- Producción de queso a partir de leche tratada por alta presión
- Aceleración del madurado del queso
- Producción de yogur a partir de leche tratada por alta presión

Como parte del trabajo realizado en los años 1996-99 en el proyecto europeo FAIR CT96: 1113EU, el grupo investigador de la UAB realizó una serie de experiencias preliminares estudiando los efectos de los tratamientos de alta presión (TAP) sobre la leche de cabra abordando los siguientes aspectos: 1) características físico-químicas de leches pasteurizadas (PA) y tratadas por alta presión hidrostática (PR), 2) aptitud a la coagulación enzimática,

3) características físico-químicas de los quesos fabricados a partir de estas leches y 4) efectos del tratamiento de alta presión en algunos aspectos del madurado del queso.

Basados en estudios previos realizados en nuestro laboratorio sobre el efecto de los TAP en la destrucción microbiana y en la desnaturalización de proteínas del suero (Felipe, Capellas y Law, 1997; Gerville, Capellas, Ferragut y Guamis, 1997a; Gerville, Felipe, Ferragut y Guamis, 1997b; Gerville, Mor-Mur, Ferragut y Guamis, 1999a; Gerville, Sendra, Ferragut y Guamis, 1999b; Gerville, Ferragut y Guamis, 2000) y comparándolos con un tratamiento de pasteurización (72°C 15 s), decidimos realizar los tratamientos de alta presión a 20°C y utilizando una presión de 500 MPa durante 15 min.

Los resultados de estas primeras observaciones (Trujillo, Royo, Ferragut y Guamis, 1999a; Trujillo, Royo, Guamis y Ferragut, 1999b) mostraron pocas diferencias en la composición general de las leches estudiadas. Sin embargo los valores de humedad y aminoácidos libres de los quesos elaborados con leche PR fueron mayores a los valores presentados en quesos de leche PA. Las diferencias encontradas en el contenido de aminoácidos libres indicaron una proteólisis mayor para los quesos de leche PR que los autores atribuyeron a: la microbiota residual de la leche tras los tratamientos tecnológicos (resistencia térmica y a la presión) y/o a las modificaciones físico-químicas de la leche debido al TAP que produce desintegración micelar y agregación de la proteína del suero, la cual es posteriormente incorporada a la cuajada produciendo quesos con una mayor humedad.

Basándonos en estos antecedentes, el **objetivo general** del presente trabajo ha sido el de **evaluar las consecuencias y posibles implicaciones del tratamiento de la alta presión en la leche de cabra para la elaboración de queso, estudiando además la maduración de estos quesos y comparándolos con los elaborados a partir de leche cruda o pasteurizada.**

Varios autores han puesto de manifiesto que los quesos elaborados a partir de leche cruda desarrollan una mayor proteólisis y un flavor más pronunciado durante el madurado, atribuyendo estas diferencias a la microbiota autóctona de la leche cruda (McSweeney, Fox, Lucey, Jordan y Cogan, 1993; Beuvier *et al.*, 1997; Demarigny, Beuvier, Buchin, Pochet y Grappin, 1997). Con el objeto de corroborar el efecto de la microbiota de la leche en el madurado de los quesos tratados por alta presión, nos planteamos en una primera experiencia la realización de producciones de quesos de pequeño formato (3250 g) con leche cruda (CR), PA y PR de cabra. En estas producciones se estudiaron con detenimiento las características microbiológicas de las leches y de los quesos producidos a partir de éstas.

También se estudiaron las propiedades de coagulación de estas leches durante la fabricación del queso, mediante el uso de técnicas no destructivas, empleando un coagulómetro (Gelograph NT) directamente en la cuba de quesería. Este estudio era

importante llevarlo a cabo, ya que hasta el momento sólo se habían realizado experiencias de aptitud a la coagulación enzimática a nivel de laboratorio (López-Fandiño, Carrascosa y Olano, 1996; Trujillo *et al.*, 1999b). Además se aprovecharon estas producciones para profundizar el estudio de la proteólisis primaria y secundaria desarrollada por estos quesos. En las experiencias preliminares Trujillo *et al.* (1999a) estudiaron la proteólisis primaria mediante comparación de los perfiles electroforéticos obtenidos por PAGE-SDS (estudio cualitativo) y la proteólisis secundaria por fraccionamiento de las fracciones nitrogenadas, cuantificación de aminoácidos libres totales y comparación de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC. Sin embargo en ese trabajo no se realizaron estudios cuantitativos de las caseínas residuales de los quesos durante el madurado o de los péptidos hidrofílicos o hidrofóbicos.

Adicionalmente, hemos estudiado la composición físico-química de las leches y quesos, así como el rendimiento obtenido con la finalidad de corroborar los resultados de otros autores.

En esta primera experiencia se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- **Caracterizar físico-química y microbiológicamente las leches CR, PA (72 °C 15 s) y PR (500 MPa, 20 °C, 15 min) de cabra**
- **Determinar *on line* la aptitud a la coagulación enzimática de estas leches**
- **Caracterizar físico-química y microbiológicamente los quesos de leche CR, PA y PR**
- **Estudiar la proteólisis primaria (electroforesis capilar de la fracción caseínica) y secundaria (determinación de las fracciones nitrogenadas, aminoácidos libres totales y cuantificación de los perfiles peptídicos de la fracción soluble en agua por HPLC).**

En estas producciones observamos que los quesos elaborados a partir de leche PR presentaron mayores valores de humedad y aminoácidos libres que aquellos elaborados con leche CR o PA. Las diferencias encontradas en el contenido de aminoácidos libres indicaron una proteólisis mayor para los quesos elaborados con leche PR. Sin embargo, el estudio de la microbiota de las leches y de los quesos demostró que las diferencias no podían atribuirse a la microbiota residual de la leche tras los tratamientos de pasteurización o alta presión, ya que fueron muy similares.

El contenido de humedad de los quesos influye en gran medida en el madurado de los mismos (Lawrence, Creamer y Gilles, 1987). Cuanto mayor es el contenido de humedad de los quesos mayor es la velocidad de hidrólisis proteica. Además, la humedad del queso influye en el desarrollo microbiano, y así en la producción de enzimas (Grappin y Beuvier, 1997).

Por otra parte la alta presión modifica la estructura de la leche (fragmentación micelar y agregación de las proteínas del suero), fenómeno que afectaría la estructura del queso a través de la creación de nuevas estructuras micelares diferentes en conformación y composición a las originales (Needs, Stenning, Gill, Ferragut y Rich, 2000) afectando también a la proteólisis.

Así, las diferencias en los valores de proteólisis que encontramos en los quesos elaborados a partir de leche PR podrían atribuirse a su mayor humedad y/o a las modificaciones producidas en la leche tras el TAP.

Para corroborar esta hipótesis nos planteamos una segunda experiencia consistente en la elaboración de unas nuevas producciones de queso, en donde estandarizamos el extracto seco inicial de los mismos. Para lograrlo, modificamos el protocolo de elaboración de los quesos incrementando el tiempo de prensado. Además pasamos de unos quesos de pequeño formato a quesos de mayor tamaño (aproximadamente 1,3 kg de peso cada queso). Este incremento de tamaño nos permitió realizar curvas de desecación, ensayos de textura y análisis organoléptico, ya que dispusimos de mayor cantidad de muestra.

El objetivo de esta segunda experiencia fue el de **estudiar diferentes aspectos de la maduración de los quesos elaborados a partir de leche cruda, pasteurizada y tratada por altas presiones hidrostáticas, estandarizando el contenido de humedad inicial de los quesos para eliminar el efecto de la humedad aportada por el TAP y en menor grado por el tratamiento de pasteurización**. Para alcanzar este objetivo se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la proteólisis primaria y secundaria desarrollada en estos quesos
- Determinar las propiedades mecánicas de los quesos, mediante la realización de ensayos de compresión uniaxial y de relajación al esfuerzo
- Caracterizar la microestructura de los quesos, mediante la observación con microscopio láser confocal
- Estudiar la lipólisis, mediante la determinación de la concentración y el perfil de ácidos grasos libres por cromatografía gaseosa
- Determinar la concentración de ácidos orgánicos mediante HPLC
- Evaluar los diferentes tipos de agua contenida en la matriz de los quesos durante la maduración
- Estudiar las características sensoriales y de color de los diferentes quesos

1.2. PLAN DE TRABAJO

En los estudios de esta tesis se emplearon dos formatos de queso. Inicialmente se realizaron cuatro mini-producciones (4 producciones × 3 tipos de queso cada una) de quesos de pequeño formato, aproximadamente 250 g cada uno. La figura 1 muestra el plan de trabajo que se siguió en las producciones de quesos realizadas para este estudio.

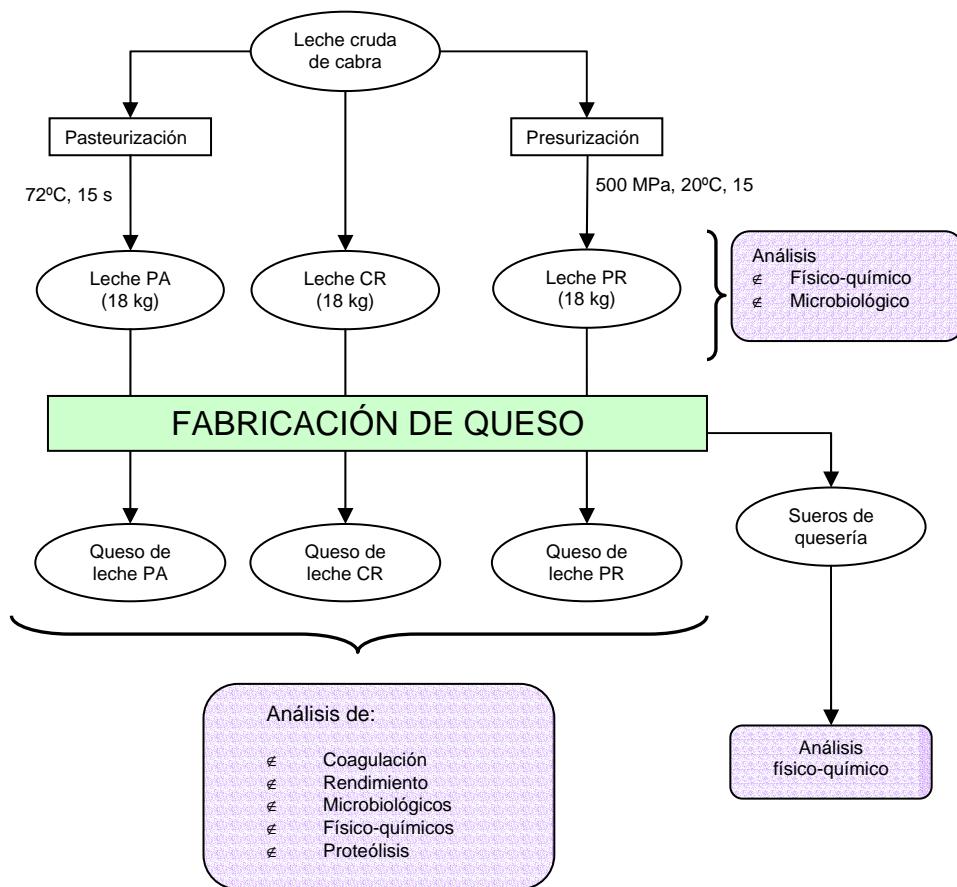


Figura 1. Plan de trabajo de la primera experiencia.

En la primera experiencia se realizaron los ensayos de **coagulación**, directamente en la cuba de quesería. Se efectuaron además análisis de **composición general** (extracto seco, nitrógeno total, grasa, pH, sal), **microbiológicos** (bacterias mesófilas totales, *Enterobacteriaceae*, lactobacilos, enterococos, *Micrococcaceae* y estreptococos lácticos) y de **proteólisis primaria** (electroforesis capilar de la fracción caseínica) y **proteólisis secundaria** (determinación de las fracciones nitrogenadas, aminoácidos libres totales y perfiles peptídicos de la fracción soluble en agua por HPLC).

La humedad y la sal influyen en gran medida el madurado del queso. Como se verá en las secciones siguientes de este trabajo, los quesos elaborados en la primera experiencia tuvieron diferentes contenidos de humedad, haciendo más difícil su comparación. Por esta razón se intentó estandarizar el extracto seco de los quesos de la segunda experiencia para poder estudiar *per se* el efecto de la alta presión. De esta forma, se realizaron dos producciones (2 producciones × 3 tipos de queso cada una) con un formato de queso más grande, aproximadamente 1,3 kg, a los que se les estandarizó el extracto seco inicial (figura 2).

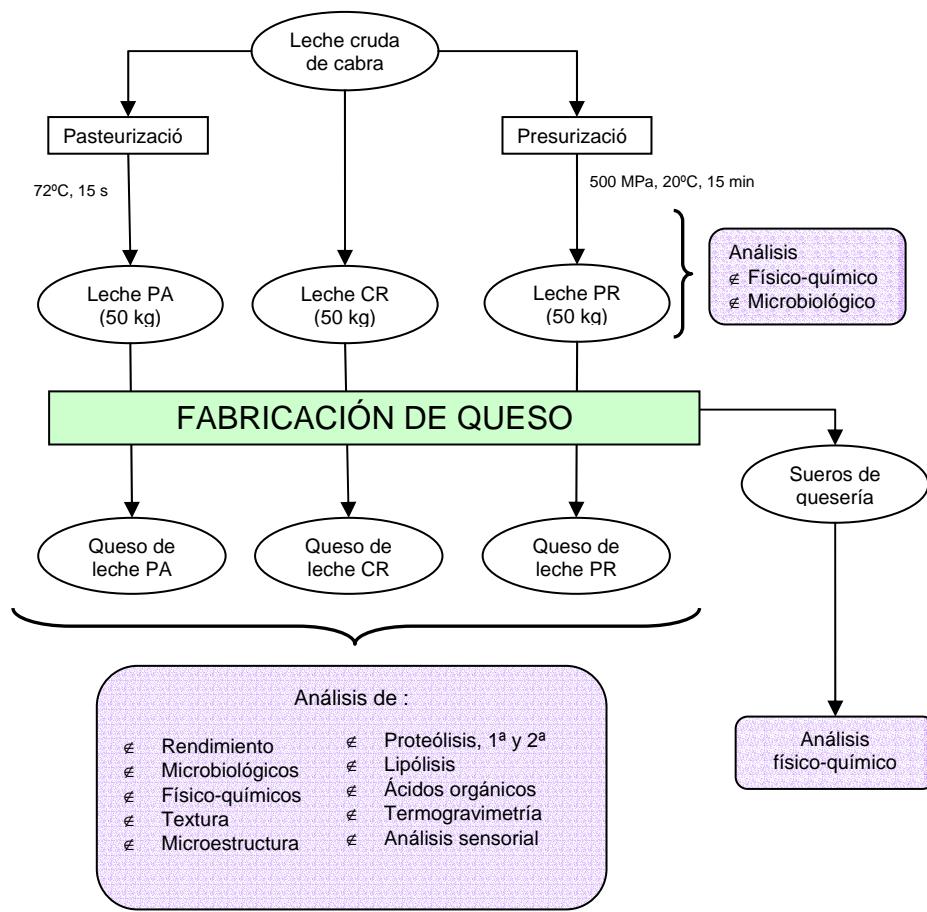


Figura 2. Plan de trabajo de la segunda experiencia.

Con estos quesos de mayor formato se realizaron determinaciones fisico-químicas para establecer su **composición general** (extracto seco, nitrógeno total, grasa, pH, sal), efectuando además estudios **microbiológicos** (bacterias mesófilas totales, *Enterobacteriaceae*, lactobacilos) y de **proteólisis primaria** (electroforesis capilar de la fracción caseínica) y

proteólisis secundaria (determinación de las fracciones nitrogenadas, aminoácidos libres totales y perfiles peptídicos de la fracción soluble en agua por HPLC).

Se evaluó la **lipólisis**, mediante la cuantificación de ácidos grasos libres por cromatografía de gases según el método de (Ha y Lindsay, 1990). Se determinó la concentración de **ácidos orgánicos** por cromatografía de intercambio iónico según el método de Lues *et al.* (1998). Se estudiaron también las **características mecánicas** de estos quesos (compresión uniaxial y relajación al stress) y se estudió su **estructura** mediante microscopía láser confocal. El **contenido de agua** de los quesos fue evaluado, cualitativa y cuantitativamente, por termogravimetría.

Finalmente se efectuó un **análisis sensorial**, donde se evaluaron diferentes atributos del flavor y de la textura de los quesos a los 60 días de madurado. El **color** de los quesos fue evaluado también de manera objetiva (valores L, a y b) mediante el uso de un espectrocolorímetro portátil HunterLab.

Antecedentes, objetivos y plan de trabajo _____

2. INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del aumento de la demanda de productos “idénticos a los frescos” con suficientes garantías sanitarias, la industria y la ciencia de alimentos están inmersas en el desarrollo de nuevas tecnologías de procesado y conservación. Una de las consecuencias de este proceso es la sustitución de los tradicionales tratamientos térmicos por nuevas técnicas de conservación. Dentro de estas nuevas tecnologías destacan los pulsos eléctricos o magnéticos, los ultrasonidos, las microondas, la alta presión hidrostática, los pulsos lumínicos, etc.. (Mertens y Knorr, 1992).

El procesado de los alimentos mediante tratamientos de alta presión (TAP) ofrece ventajas únicas sobre los tradicionales tratamientos térmicos, ya que los primeros provocan una disminución microbiana sin afectar, o haciéndolo mínimamente, las características sensoriales ni el valor nutritivo de los alimentos (Cheftel, 1992; Hendrickx, Ludikhuyze, Van den Broeck y Weemaes, 1998).

Se conoce por alta presión a la tecnología que utiliza presiones de trabajo comprendidas entre 100 y 1000 MPa¹. Esta tecnología se aplica en el campo de la ciencia de los materiales inorgánicos (producción de cerámicas, aleaciones metálicas, creación de materiales sintéticos, etc.) donde se combinan presiones de más de 100 MPa con temperaturas de aproximadamente 1000°C (Hoover, Metrick, Papineau, Farkas y Knorr, 1989).

Bert H. Hite y colaboradores en 1899 (citado por Hoover, 1993) aplicaron esta tecnología en el procesado de varios alimentos, pero los problemas tecnológicos a los que se enfrentó en aquella época fueron un freno para el desarrollo de la técnica. En 1989 la Universidad, industria y gobierno japonés, basándose en los logros alcanzados por las industrias metalúrgicas y cerámicas, iniciaron el desarrollo de la tecnología de altas presiones en el campo de la

¹ 1 MPa = 10 Bar = 9,869 atm = 10,196 kg/cm²

alimentación. A principios de los años 90 aparecen en el mercado japonés los primeros alimentos tratados por altas presiones. Desde entonces hasta la actualidad han aparecido en el mercado diferentes productos (Tabla 1).

El estudio e implementación de esta nueva tecnología se extendió a los EEUU y a Europa. La Unión Europea ha financiado hasta el momento varios proyectos de investigación en los cuales el CERPTA de la Universitat Autònoma de Barcelona ha participado activamente.

TABLA 1. ALIMENTOS TRATADOS POR ALTA PRESIÓN RECENTEMENTE COMERCIALIZADOS			
PRODUCTO	COMPAÑÍA	PAÍS	MAQUINARIA
Zumo de naranja	PAMPRYL	Francia	ACB
	K-SUN	Líbano	ACB
	ORTOGEL	Italia	
	JUMEX	México	ACB
Jamón cocido loncheado, tapas	ESPUÑA	España	ACB
Jamón cocido loncheado	CAMPOFRIO	España	AMAME
"Bio-yogur" con fresas y puré de frutas	ORCHARD HOUSE	UK	
Guacamole	AVOMEX	EEUU	AVURE (ex FLOW)
Ostras	MOTIVATIT SEAFOODS	EEUU	
	JOEY	EEUU	
	NISBET OYSTER	EEUU	
	ODWALLA	EEUU	AVURE
Zumo de frutas	FRUCABA	Portugal	
Arroz precocido en bolsitas	ECHIGO SEIKA	Japón	
Arroz precocido de baja alergenicidad	ECHIGO SEIKA	Japón	
Sopa de bonito	ECHIGO SEIKA	Japón	
"Roast beef" loncheado	ITOH HAM CORP. LTD.	Japón	
Margarina	KANEKA CORP.	Japón	

Según Cheftel (1992) existen dos principios generales en los que se basa la aplicación de las altas presiones: 1) la ley de la isostática y 2) el principio de Le Chatelier. De acuerdo con el primer principio, se establece que los cambios de presión son prácticamente constantes y uniformes, independientemente del volumen y la geometría de la muestra. El segundo principio postula que cualquier fenómeno que va acompañado de una disminución de volumen se ve favorecido por la presión, y viceversa.

El comportamiento de las macromoléculas biológicas bajo presión, en especial de las proteínas, es importante para entender los efectos de los TAP en la leche. En su estado nativo, las proteínas se estabilizan por enlaces covalentes y por atracciones electrostáticas, enlaces puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Los enlaces covalentes tienen una baja compresibilidad y por lo tanto, no se ven afectados por presiones inferiores a 1000-2000 MPa, permaneciendo intacta la estructura primaria de las proteínas (Mozhaev, Heremans, Frank, Masson y Balny, 1994).

Los TAP producen cambios en la estructura secundaria de las proteínas; a bajas presiones la creación de enlaces puente de hidrógeno se ve favorecida debido a que se produce una pequeña reducción de volumen (Mozhaev *et al.*, 1994; Tauscher, 1995; Hendrickx *et al.*, 1998), pero en algunas ocasiones esta disminución de volumen puede ser compensada por medio de interacciones hidrofóbicas o de estructuras más voluminosas (Tauscher, 1995). Por otra parte, algunos autores han postulado que los enlaces puente de hidrógeno apenas se ven afectados durante los tratamientos de alta presión (Mozhaev *et al.*, 1994; Hendrickx *et al.*, 1998).

Los enlaces iónicos y las interacciones hidrofóbicas, responsables del mantenimiento de la estructura terciaria de las proteínas, son muy afectados por la presión (Hendrickx *et al.*, 1998). En general, las interacciones hidrofóbicas se ven desfavorecidas por el aumento de presión, ya que requieren un aumento de volumen (Heremans, 1982; Mozhaev *et al.*, 1994). Según Gross y Jaenicke (1994) los enlaces iónicos se desestabilizan bajo presión debido a que al aumentar la presión las moléculas de agua que rodean a cada ión se ordenan más densamente. Este empaquetamiento más denso del agua dificulta los enlaces entre iones.

Como regla general, las moléculas pequeñas tales como vitaminas, aminoácidos, azúcares simples o compuestos del flavor y aroma, no son afectados por los TAP (Balci y Wilbey, 1999).

2.1. CAMBIOS EN LA LECHE INDUCIDOS POR LA PASTEURIZACIÓN Y POR LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA

En esta sección se comentarán aquellos cambios en la leche que son consecuencia de los tratamientos de pasteurización y de alta presión (TAP), y que pueden influenciar la manufactura y madurado del queso.

2.1.1. Eliminación de microorganismos

La leche es un excelente medio de cultivo para muchos microorganismos, cuyo desarrollo ocasiona una pérdida de calidad pudiendo incluso llegar a niveles que la inutilicen para su consumo o transformación. Aunque es evidente que el objetivo principal de la pasteurización de la leche es la eliminación de microorganismos patógenos que ésta pudiese contener, un propósito secundario es la destrucción de otros microorganismos banales para salvaguardar la calidad del producto.

En el proceso de pasteurización de la leche los microorganismos patógenos, los coliformes y la mayoría de los psicrótrofos son destruidos, no así un gran grupo de mesófilos termorresistentes, conocidos todos ellos como termodúricos. Los microorganismos termodúricos que con más frecuencia se encuentran en la leche pertenecen a especies del género *Micrococcus* spp., algunos enterococcos (cepas termorresistentes de *Enterococcus faecalis* y de *E. faecium*), aerobios formadores de esporas (*Bacillus subtilis* y *B. cereus*) y algunos lactobacilos (*Lactobacillus casei*, etc.) (ICMSF, 1998). Es importante resaltar que la pasteurización no elimina totalmente a la microbiota endógena de la leche, y que ésta puede desarrollarse posteriormente en el queso de manera significativa.

Debido a razones higiénicas, la mayor parte de la leche que se utiliza actualmente para hacer queso es pasteurizada, lo que ha contribuido a incrementar los estándares de calidad del queso. El tratamiento de pasteurización que se utiliza con mayor frecuencia en la industria consiste en un calentamiento de la leche a 72°C durante 15 s, denominada por sus siglas en inglés HTST (high temperature short time). Este es el tratamiento que hemos usado en nuestros estudios y el que describiremos a lo largo de toda la memoria.

La resistencia de los microorganismos a los tratamientos de alta presión (TAP) es muy variable. Las células vegetativas en fase de crecimiento son las más sensibles mientras que las formas esporuladas son las más resistentes, siendo necesarias presiones mayores de 1000 MPa para destruirlas. Sin embargo, las esporas pueden ser germinadas a presiones relativamente bajas (50-300 MPa) para después ser eliminadas a presiones algo mayores

(Sale, Gould y Hamilton, 1969; Wuytack, Soons y Michiels, 1997). En general, las bacterias Gram positivas son más resistentes que las Gram negativas (Cheftel, 1992). Hongos y levaduras son muy sensibles siendo inactivados a presiones de 200-300 MPa (Smelt, 1998).

Con el aumento de la presión se observan diferentes cambios morfológicos en los microorganismos: compresión de vacuolas gaseosas, alargamiento celular, separación de la membrana de la pared celular, contracción de la membrana celular, modificación del núcleo y orgánulos intracelulares y liberación de material intracelular a espacios extracelulares (Cheftel, 1992). La inactivación por presión se ve acompañada por un aumento del ATP extracelular, y se ha descrito un descenso del pH intracelular después de la presurización. Estos datos sugieren que una alteración en las enzimas de membrana asociadas con el flujo de protones, puede ser al menos una de las causas de la inactivación microbiana por las altas presiones (Smelt, 1998). Las presiones comprendidas entre 30 y 50 MPa pueden influir en la expresión genética y en la síntesis de proteínas, pero la conformación de los ácidos nucleicos se muestra relativamente estable a más de 1000 MPa (Smelt, 1998).

Existen numerosos estudios sobre el efecto de los TAP en los microorganismos de la leche, que podemos agruparlos de la siguiente manera: 1) efecto de los TAP sobre los microorganismos presentes de forma natural en la leche, 2) efecto de los TAP sobre microorganismos inoculados en la leche y 3) evaluación del efecto combinado de los TAP y diversas sustancias antimicrobianas.

Mussa y Ramaswamy (1997) evaluaron el efecto de los TAP (200-400 MPa durante 5-120 min) sobre la destrucción de los microorganismos presentes de forma natural en la leche, sobre la enzima fosfatasa alcalina y en los cambios de color y viscosidad. Estos autores encontraron que la velocidad de destrucción microbiana fue mucho mayor que la inactivación enzimática o los cambios de color o viscosidad. Desde el punto de vista microbiológico, los TAP podrían usarse exitosamente para extender la vida útil de la leche, ya que se ha observado que después de 45 días en refrigeración, los recuentos de pseudomonas y bacterias psicrótrofas en leche tratada por altas presiones (PR) (400 MPa a 25°C durante 30 min) fueron menores que en leche cruda (CR) tras 15 días de almacenamiento (García-Risco *et al.*, 1998). Drake *et al.* (1997) estudiaron la calidad microbiológica de la leche (microorganismos totales, coliformes y psicrótrofos) tras un tratamiento de alta presión de 586 MPa en tres ciclos de un minuto, observando recuentos similares entre la leche pasteurizada (PA) y la PR. De la misma forma, Trujillo *et al.* (1999b) encontraron que un tratamiento de 500 MPa durante 15 min a 20°C aplicado a leche CR de cabra, lograba una calidad microbiológica similar a la obtenida por un procedimiento de pasteurización estándar (72°C, 15 s) en lo que se refiere a microorganismos totales y enterobacterias.

Se han realizado varios trabajos para estudiar el efecto de las altas presiones en leche inoculada con diferentes microorganismos con el objetivo de determinar la sensibilidad de la microbiota banal y patógena en la leche. Gerville *et al.* (1997a,b; 1999a,b), estudiaron la inactivación por alta presión de *Escherichia coli* (considerado como un buen índice de contaminación de origen fecal directa o indirecta), *Pseudomonas fluorescens* (indicador de *Pseudomonas* spp., mayor componente de la microbiota de las leches refrigeradas), *Listeria innocua* (indicador del patógeno *Listeria monocytogenes*), *Staphylococcus aureus* (mayor componente de la microbiota de las leches mamíticas), y *Lactobacillus helveticus* (microorganismo banal representante de la microbiota láctica) inoculados en leche de oveja. En general, la destrucción microbiana fue mayor para *P. fluorescens* > *E. coli* > *Listeria innocua* > *L. helveticus* > *S. aureus*. El efecto de la temperatura sobre los microorganismos fue diferente: *P. fluorescens*, *Listeria innocua* y *L. helveticus* mostraron mayor resistencia a los TAP a temperatura ambiente (25°C) que a temperaturas de refrigeración (4°C), mientras que *E. coli* y *S. aureus* mostraron menos resistencia a los TAP a temperatura ambiente que a bajas temperaturas.

Normalmente, la magnitud de la destrucción microbiana es directamente proporcional a la presión y tiempo de presurización, pero para conseguir una destrucción de más de 8 ciclos logarítmicos a temperatura ambiente de algunos patógenos, como *E. coli* O157:H7 o *S. aureus*, son necesarios 700 MPa durante 15 min (Patterson, Quinn, Simpson y Gilmore, 1995). Estas presiones tan elevadas alterarían la estructura y/o el color de los alimentos, además de resultar demasiado onerosas para su aplicación práctica en la industria (Kalchayanand, Sikes, Dunne y Ray, 1998; Alpas y Bozoglu, 2000; Masschalck, Houdt, Haver y Michiels, 2001).

Varios autores han estudiado el efecto combinado de los TAP y sustancias antimicrobianas, tales como nisin, pediocina, etc., en la inhibición de bacterias, hongos y esporas, observando en muchos casos un aumento en la eficacia de los TAP (Kalchayanand *et al.*, 1998; García-Graells, Masschalck y Michiels, 1999; Capellas, Mor-Mur, Gerville, Yuste y Guamis, 2000; Alpas y Bozoglu, 2000). Este tipo de sinergia evidencia interesantes posibilidades para incrementar la eficiencia de los TAP a temperatura ambiente en alimentos poco ácidos.

Alpas y Bozoglu (2000) combinando altas presiones (345 MPa, 50°C, 5 min) y bacteriocinas (nisina y pediocina) en leche, lograron una disminución de más de 8 ciclos logarítmicos en las poblaciones de cepas resistentes de *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*. Un tratamiento de alta presión menos severo (345 MPa, 25°C, 5 min) combinado con pediocina también logró 8 reducciones decimales para *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Serratia liquefaciens* y *P. fluorescens*, mientras que para *E. coli* O157:H7,

Listeria monocytogenes y *L. sake* la letalidad fue de aproximadamente 4 Log (Kalchayanand *et al.*, 1998).

El efecto de combinar diferentes sustancias antimicrobianas (tales como lisozima o nisin) con la presión, sensibilizan a *E. coli* y otros microorganismos Gram negativos que normalmente no se verían afectados por éstas (García-Graells *et al.*, 1999). Bajo presión, *E. coli*, *P. fluorescens*, *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* han mostrado una mayor inactivación (entre 1 y 2,5 Log más) en presencia de lisozima, mientras que el desarrollo de *Salmonella enteritidis* no fue afectado (García-Graells *et al.*, 1999; Masschalck *et al.*, 2001).

El efecto aditivo de la nisin en la destrucción microbiana bajo presión (500 MPa, 25°C, 30 min) ha sido evaluado sobre los recuentos totales y de esporas en queso fresco de cabra, encontrando incrementos en la letalidad de 0,3 y 1,3 Log para los recuentos totales y las esporas, respectivamente (Capellas *et al.*, 2000).

La habilidad de las sustancias antimicrobianas de afectar a los microorganismos Gram negativos bajo presión puede deberse a que los TAP inducirían una permeabilización de la membrana para estos compuestos (García-Graells *et al.*, 1999; Masschalck *et al.*, 2001).

2.1.2. Activación/inactivación de enzimas endógenas de la leche

La leche contiene más de 60 enzimas endógenas, algunas de las cuales tienen importantes aplicaciones tecnológicas relacionadas con el flavor, la textura y la estabilidad de los productos lácteos (Farkye y Imafidon, 1995).

Aunque tradicionalmente la leche se trata térmicamente para garantizar la seguridad microbiológica, los tratamientos térmicos también influyen en la actividad de las enzimas endógenas. De la misma forma, los TAP pueden provocar una activación o inactivación enzimática reversible o irreversible, parcial o completa dependiendo del tipo de enzima, de la presión aplicada, de la temperatura y la duración del tratamiento (Hara, Nagahama, Ohbayashi y Yashi, 1990; Asaka y Hayashi, 1991).

Dentro del contexto de este trabajo consideraremos sólo las enzimas con importancia en el madurado del queso que vean modificada su actividad por la pasteurización y/o los TAP. Este grupo de enzimas comprende el complejo plasmina/plasminógeno, el complejo de la proteasa ácida (catepsina/procatepsina), las fosfatasas alcalina y ácida, y la lipoproteín lipasa. Consideraremos también otras enzimas endógenas, cuya producción está asociada con la

presencia de microorganismos, como las fosfatasas y las proteasas o lipasas de las bacterias psicrótrofas.

2.1.2.1. Plasmina

La plasmina es la principal enzima proteolítica de la leche, y muestra sobre las caseínas una actividad óptima a pH alcalino (aproximadamente 7,5) (Fox, Law, McSweeney y Wallace, 1993). Uno de los efectos más importantes de esta enzima durante el madurado del queso es la degradación de la η_4 caseína (η_4 CN) a ν_4 CN. La plasmina también hidroliza la ζ_{s2} -CN y más lentamente la ζ_{s1} -CN (Fox *et al.*, 1993), produciendo una serie de péptidos, que en la leche formarían parte de la fracción proteosa-peptona. La η -lactoglobulina (η -LG) y la ζ -lactoalbúmina no son hidrolizadas por la plasmina; de hecho la η -LG, especialmente cuando está desnaturalizada, inhibe la acción de la plasmina, probablemente debido a interacciones a través de puentes disulfuro entre ambas (Fox y Stepaniak, 1993).

La plasmina está presente en la leche como enzima activa y en forma de zimógeno inactivo, el plasminógeno. Sin embargo, la actividad de la enzima depende de las actividades de los inhibidores de la plasmina y de los activadores del plasminógeno, los cuales se encuentran interrelacionados (Richardson y Pearce, 1981).

La pasteurización de la leche disminuye entre un 10 y un 30% la actividad de la plasmina (Richardson, 1983; Beuvier *et al.*, 1997), debido a la formación de puentes disulfuro entre ésta y la η_4 LG desnaturalizada por el tratamiento térmico (Grufferty y Fox, 1986; Fox y Stepaniak, 1993). Sin embargo, un almacenamiento posterior de la leche PA provoca un incremento en la actividad de la plasmina, posiblemente a causa de la inactivación de los inhibidores de la plasmina y/o al incremento de la actividad de los activadores del plasminógeno, el cual se transforma en plasmina (Richardson, 1983).

Beuvier *et al.* (1997) y Ginzinger *et al.* (1999b) observaron que los quesos tipo Suizo elaborados a partir de leche PA mostraron entre un 18 y 63% más de actividad de la plasmina que aquellos elaborados con leche CR. Este aumento de la actividad de la plasmina por efecto de la pasteurización puede originar un incremento de la proteólisis primaria en el queso, así como modificaciones de sus características sensoriales (Farkey y Landkammer, 1992).

La baroestabilidad de la plasmina se ha estudiado de forma directa, mediante ensayos específicos de actividad enzimática, y de forma indirecta, es decir incubando la leche tras el TAP y analizando los productos de la proteólisis. Utilizando el primer método, Trujillo *et al.*, (1997) investigaron la actividad de la plasmina en leches presurizadas de vaca, oveja y cabra,

no encontrando diferencias con sus correspondientes leches control. De igual forma, Scollard *et al.* (2000a) investigaron los efectos de la actividad de la plasmina en leches tratadas con presiones de 300 a 800 MPa. En este trabajo se pudo observar que la plasmina y el plasminógeno exhibieron una gran baroresistencia, siendo necesarios 500 MPa para lograr una inactivación enzimática de aproximadamente un 20%. García-Risco *et al.* (2000) utilizaron tratamientos de 400 MPa durante 15 min, encontrando que la plasmina resistía los TAP a temperatura ambiente, pero que temperaturas más altas aumentaban la inactivación del enzima (390% a 60°C).

Aunque los TAP no producen un incremento en los niveles de plasmina en la leche, algunos autores han observado un aumento en los índices de proteólisis en la leche, tales como un aumento de los valores de nitrógeno soluble a pH 4,6 o una mayor degradación de las caseínas $\eta_{43}\zeta_{s2}$ - y ζ_{s1} , tras el TAP (García-Risco *et al.*, 1998; Scollard, Beresford, Needs, Murphy y Kelly, 2000b). Este hecho podría deberse a la baroestabilidad de la plasmina que, combinado con los intensos cambios en las micelas de caseína provocados por la presión, facilitarían la acción de las enzimas proteolíticas (Scollard *et al.*, 2000b).

2.1.2.2. Lipoproteín lipasa

La lipoproteín lipasa (LPL) es la principal enzima lipolítica de la leche y actúa hidrolizando las posiciones 1 y 3 de los tri, di y monoglicéridos generando ácidos grasos libres. Este proceso de hidrólisis sólo ocurre cuando la membrana de los glóbulos grados se rompe (agitación, homogeneización o congelación de la leche), y la grasa queda accesible al enzima.

Muchos de los ácidos grasos libres generados durante la lipólisis son precursores de importantes compuestos del flavor del queso, tales como metilcetonas, alcanos, ésteres alifáticos y aromáticos, etc. (Nájera, Barrón y Barcina, 1993). Aunque la lipólisis es un fenómeno deseable para el correcto desarrollo del flavor en diferentes variedades de queso, la producción excesiva de estos compuestos puede ocasionar notables alteraciones en el mismo, tales como sabores jabonosos y potenciación de la rancidez (Grappin y Beuvier, 1997).

La LPL es considerada una enzima relativamente termolábil, que puede ser completamente inactivada por un tratamiento térmico de 78°C durante 10 s (Driessens, 1989). Sin embargo, esta enzima parece ser menos sensible a los TAP que a los térmicos. Seyderhelm *et al.* (1996) observaron una reducción del 40% en la actividad de la LPL en tampón tris-(hidroximetil)-aminometano (pH 7) tras un tratamiento de 600 MPa, a 20°C durante

10 min. Solamente tras enérgicas condiciones de tratamiento (700 MPa, a 45 °C durante 10 min), se consiguió una inactivación completa del enzima.

De igual forma, Trujillo *et al.* (1999b) observaron actividad lipásica en leche de cabra tratada por altas presiones (500 MPa, 15 min a 20°C), mientras que en leche pasteurizada no se detectó actividad de la enzima.

2.1.2.3. Fosfatasa ácida

La fosfatasa ácida hidroliza monoésteres de ácido fosfórico a pH ácido, mostrando su mayor actividad en torno a pH 5 (Farkye y Imafidon, 1995).

Durante la maduración del queso, las caseínas son hidrolizadas por las enzimas coagulantes, plasmina y proteasas bacterianas generando diferentes fosfopéptidos. Según Fox y Stepaniak (1993) sólo tras la acción conjunta de proteasas y fosfatases puede obtenerse una degradación completa de las caseínas. Aunque la fosfatasa ácida se sitúa en la fase acuosa de la leche, perdiéndose gran parte de ella en el suero de quesería, podemos detectar alguna actividad de esta enzima en el queso. De esta forma la fosfatasa ácida, que defosforila las caseínas hidrolizadas por las enzimas proteolíticas en el queso, podría tener una función importante en el madurado y desarrollo del flavor del queso (Fox y Stepaniak, 1993).

La fosfatasa ácida es muy estable en el intervalo de temperatura de 65-80°C, manteniendo por completo la actividad enzimática tras un tratamiento de pasteurización convencional (Griffiths, 1986). Sin embargo, esta enzima es mucho menos resistente a la presión que la fosfatasa alcalina, como veremos a continuación. Balci *et al.* (2002) estudiaron la inactivación enzimática de la fosfatasa ácida en leche entera y desnatada y en suero ácido y dulce de quesería, encontrando que un TAP de 600 MPa por 10 min a 10°C lograba una inactivación de al menos 75% en todos los casos.

2.1.2.4. Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina hidroliza monoésteres de ácido fosfórico a pH alcalino, siendo el pH óptimo de acción entre 9,8 y 9,9. Esta enzima es relativamente termolábil pues su resistencia a los tratamientos térmicos es un poco mayor que la de los microorganismos patógenos no formadores de esporas que pudiesen estar presentes en la leche (Farkye y Imafidon, 1995). Tradicionalmente la determinación de la actividad de esta enzima ha servido para comprobar si

el tratamiento térmico de pasteurización se ha realizado correctamente.

De los resultados obtenidos por diferentes autores se deduce que la fosfatasa alcalina es muy resistente a los TAP. López Fandiño *et al.* (1996) no observaron inactivación enzimática tras un tratamiento de 400 MPa durante 60 min a 20°C. Por otra parte, Rademacher *et al.* (1998) lograron sólo un 50% de inactivación tras 90 min a 500 MPa, mientras que su inactivación completa sólo se consiguió aplicando un TAP de 800 MPa durante 8 min.

Felipe *et al.* (1997) trabajando con leche de cabra, observaron una inactivación total de la fosfatasa alcalina tras una pasteurización convencional (72°C 15 s), mientras que la aplicación de 500 MPa durante 10 min a 25 o 50°C no disminuyó la actividad enzimática.

Ludikhnyze, Caléis y Hendrickx (2000) realizaron un estudio sobre la cinética de inactivación de la fosfatasa alcalina por efecto de la temperatura (25-63°C) y presión (0,1-725 MPa), observando que la inactivación de esta enzima por la presión podía ser descrita, al igual que su inactivación térmica, a través de una cinética de primer orden.

La fosfatasa alcalina se concentra principalmente en el glóbulo graso de la leche y así puede quedar incluida en el queso producido a partir de leche CR o PR, no así en los quesos elaborados con leche PA ya que es inactivada. Sin embargo, el pH de la mayoría de las variedades de queso podría limitar su acción.

2.1.2.5. Catepsina D

La catepsina D es una proteasa ácida que muestra actividad máxima en torno a pH 4, y que se localiza en los lisosomas de todas las células de los mamíferos (Hurley, Larsen, Kelly y McSweeney, 2000b). La catepsina D se encuentra en la leche debido posiblemente a la presencia de células somáticas (Hurley *et al.*, 2000b). McSweeney y Fox (1995) observaron que la catepsina D actúa sobre las caseínas $\zeta_{s1}4$, $\zeta_{s2}4\#$ $\eta4$ con una especificidad similar a la quimosina, siendo la $\zeta_{s1}4CN$ mejor substrato que la $\eta4CN$.

Esta enzima está presente mayoritariamente en el suero de la leche (Larsen, Benfeldt, Rasmussen y Petersen, 1996), aunque en el queso quedan retenidas pequeñas concentraciones. En quesos elaborados mediante técnicas de ultrafiltración toda la enzima queda retenida, y consecuentemente podría desempeñar un papel más importante en el madurado de este tipo de quesos (Wium, Kristiansen y Qvist, 1998). Hurley *et al.* (2000a) determinaron la actividad de la catepsina D en quesos Quarg elaborados a partir de leche CR, PA o ultrafiltrada, demostrando que esta enzima contribuye a la proteólisis durante el almacenamiento de los mismos.

La catepsina D es bastante estable en la leche, y conserva más del 50% de su actividad tras un tratamiento de 72°C durante 15 o 60 s (Larsen *et al.*, 2000). En los quesos de pasta cocida las enzimas del cuajo son inactivadas por la temperatura, por lo que la catepsina D puede influir de manera importante en el madurado de estos quesos, fundamentalmente a través de la hidrólisis de la $\zeta_{s1}4CN$ y producción de su producto de degradación $\zeta_{s1}4I$.

La actividad de esta enzima no ha sido estudiada en leche tratada por altas presiones. Jung *et al.* (2000) evaluaron el efecto de los TAP sobre la catepsina D en tampón acético-acetato (pH 3,7), encontrando que presiones de 500 MPa durante 5 min a 10°C disminuyeron la actividad enzimática cerca de un 30%.

2.1.2.6. Enzimas de la microbiota psicrótrofa

Además de la plasmina y de la catepsina D, la leche puede contener importantes niveles de proteasas y lipasas provenientes de la microbiota endógena, principalmente de microorganismos psicrótrofos como *Pseudomonas fluorescens* (Guamis, Huerta y Garay, 1987b; Grappin y Beuvier, 1997), los cuales pueden producir proteasas, lipasas y fosfolipasas C termorresistentes (Stepaniak y Sorhaug, 1995).

Las proteasas de los microorganismos psicrótrofos hidrolizan las caseínas η - y ρ -, mientras que las proteínas del suero son resistentes a la hidrólisis (Shah, 1994). Como consecuencia de una degradación importante de la ρ -CN podría producirse la agregación de la caseína de forma análoga a la que provocaría la acción de la quimosina (Shah, 1994). La mayoría de las proteasas son termorresistentes, pudiendo soportar tratamientos de pasteurización de 72°C 15 s, o equivalentes, e incluso tratamientos de esterilización UHT (138°C, 2 s) (Guamis, Huerta y Garay, 1987a; García, Sanz y García-Colla, 1989).

Aunque la degradación lipolítica de la leche no es tan frecuente como la degradación proteolítica, las lipasas producidas por las bacterias psicrótrofas pueden causar rancidez y sabores amargos. De acuerdo con Shah (1994) las lipasas son producidas mayoritariamente por *Pseudomonas* spp., aunque también las producen otras especies como *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp. y *Flavobacterium* spp.

La influencia de las proteasas de las bacterias psicrótrofas en la leche tratada térmicamente está bien documentada, pero su papel en el madurado del queso es menos claro (Grappin y Beuvier, 1997). Cousin y Marth (1977) elaboraron queso Cheddar a partir de leche preincubada con *Pseudomonas* spp. o *Flavobacterium* spp., observando que después de 6 meses de madurado los quesos desarrollaron rancidez. En varios estudios se ha observado

una disminución del rendimiento quesero cuando se utilizaba leche con elevados recuentos de microorganismos psicrótrofos. Hicks *et al.* (1986) observaron una disminución del rendimiento en la fabricación de queso Cheddar de aproximadamente 0,5% por día de almacenamiento de la leche a 4°C. Las disminuciones en el rendimiento quesero pudieron deberse a la mayor proteólisis y lipólisis de la leche por la acción de las enzimas procedentes de bacterias psicrótrofas, que provocaron pérdidas de nitrógeno y de ácidos grasos en el suero de quesería (Hicks, Onuorah, O'Leary y Langlois, 1986; Shah, 1994).

No hay datos disponibles sobre el efecto de las altas presiones en las actividades proteolíticas o lipolíticas de las enzimas producidas por la microbiota psicrótrofa de la leche.

2.1.3. Agregación de las proteínas del suero

En la leche encontramos principalmente dos tipos de proteínas, las proteínas del suero y las caseínas. Las proteínas del suero son globulares con una apretada estructura terciaria. La η 4LG y la ζ 4lactoalbúmina (ζ 4LA) son las proteínas séricas mayoritarias de la leche, representando en leche de cabra aproximadamente el 55 y 25%, respectivamente. En este medio también encontramos la seroalbúmina (SA), las inmunoglobulinas (IGS) la lactoferrina y diferentes enzimas.

Según Law (1995) el tratamiento térmico causa desnaturización de las proteínas del suero de la leche de cabra en el siguiente orden: IGS# SA/lactoferrina > η 4LG > ζ 4LA. Se conoce que con las condiciones de pasteurización de la leche (72°C 15 s o tratamientos equivalentes), aproximadamente un 7% de las proteínas del suero se desnaturizan (Lawrence, 1991a). Las proteínas séricas desnaturizadas se depositan sobre la micelas de caseína e interaccionan con éstas mediante la formación de un complejo que implica principalmente a la p4CN y a la η 4LG, y tal vez a la ζ 4LA (Jelen y Rattray, 1995; Lucey, 1995).

Felipe *et al.* (1997) estudiaron los efectos de los TAP en las proteínas séricas de la leche de cabra. De las proteínas del suero, la η 4LG es la proteína más fácilmente agregada por los TAP. El nivel de agregación de la η 4LG aumenta constantemente hasta los 150-200 MPa y a partir de estas condiciones experimenta un incremento notable en la velocidad de agregación. A 500 MPa el 80% de la η 4LG y el 55% de las proteínas totales del suero son desnaturizadas. Es importante destacar que se ha encontrado un efecto sinérgico entre la temperatura y la presión sobre la desnaturización de la η 4LG (López-Fandiño *et al.*, 1996; Gaucheron *et al.*, 1997).

Por otra parte, se ha mostrado que la cantidad de η 4LG desnaturalizada por la presión disminuye cuando la leche se acidifica desde pH 6,7 a pH 5,5 o 6 y que aumenta cuando los TAP son aplicados en una leche a pH 7, en comparación a otra a pH 6,7 (Arias, López-Fandiño y Olano, 2000). Según estos autores, el incremento en la cantidad de η 4LG desnaturalizada a pH 7 puede deberse a la mayor reactividad del grupo sulfhidrilo libre de la η 4LG a este pH.

Numerosos autores han observado que la ζ 4LA, en comparación con la η 4LG, es mucho más resistente a la desnaturalización por la presión, soportando tratamientos de hasta 500 MPa sin desnaturalizarse (López-Fandiño *et al.*, 1996; Felipe *et al.*, 1997; Gaucheron *et al.*, 1997). Según Huppertz *et al.* (2002) las diferencias de baroestabilidad entre η 4LG y ζ 4LA pueden estar relacionadas con la estructura más rígida de la ζ 4LA, causada parcialmente por el número de enlaces disulfuro intramoleculares, y por la ausencia de grupos sulfhidrilo libres.

2.1.4. Modificaciones en la micela de caseína

La caseína es un complejo de fosfoproteínas y glicoproteínas asociados en estructuras micelares que forman una dispersión coloidal. Las micelas de caseína contienen cuatro proteínas diferentes: ζ_{s1} 4, ζ_{s2} 4, η 4# y p4CN. En la estructura micelar, las caseínas se agrupan formando un núcleo hidrófobo y una superficie polar hidrófila que permite la dispersión coloidal en la fase acuosa del sistema. A su vez, la estructura se ve estabilizada por la presencia de un complejo mineral compuesto por fosfato cálcico.

Por lo general las temperaturas comprendidas entre 70 y 150°C pueden provocar en las micelas de caseína fenómenos de agregación, defosforilación, proteólisis, modificaciones covalentes y diferentes interacciones con las proteínas del suero (Singh, 1995). Sin embargo, los tratamientos de pasteurización convencionales sólo causan cambios menores en ellas (Law, Horne, Banks y Leaver, 1994).

Las micelas de caseína caprina, respecto a las bovinas, presentan un grado de dispersión y diámetro medio más grandes, una mineralización más elevada y un nivel de hidratación inferior, lo que explicaría en gran parte la mayor sensibilidad de éstas a los tratamientos térmicos (Ono y Creamer, 1986).

En contraste con lo que ocurre durante los tratamientos de pasteurización, los TAP causan importantes modificaciones en las características de la micela. Un cambio que puede ser observado en la leche tras un TAP es que ésta se torna más translúcida, hecho que se debe a la fragmentación micelar producida por la presión (Payens y Heremans, 1969). Según

Desobry-Banon *et al.* (1994) la distribución del tamaño micelar es función de la presión aplicada pudiéndose observar diferentes comportamientos. Presiones de hasta 230 MPa no producen cambios de tamaño en las micelas, aunque algunos autores han descrito un ligero incremento (aproximadamente 9%) después de un tratamiento a 200 MPa (Needs *et al.*, 2000). Entre 230 y 430 MPa se produce una disminución del tamaño pasando de aproximadamente 180-190 nm hasta los 130 nm, y por último entre 430 y 700 MPa se ha observado una gran disminución en el tamaño de partícula (110-120 nm). Needs *et al.* (2000) observaron mediante microscopía electrónica de transmisión que a presiones de 400 y 600 MPa las micelas se encuentran completamente disgregadas en pequeñas partículas. Esta fragmentación de las micelas conlleva un aumento progresivo, según la presión empleada, de la caseína soluble en el suero. En la leche de vaca, el paso de caseínas desde las micelas a la fase acuosa de la leche ocurre en el orden $\eta-$ > $\rho-$ > $\zeta_{s1}-$ > $\zeta_{s2}-CN$, mientras que en las especies caprina y ovina el orden es $\rho-$ > $\eta-$ > $\zeta_{s1}-$ > $\zeta_{s2}-CN$ (López-Fandiño, De la Fuente, Ramos y Olano, 1998).

Hay que destacar que, al igual que ocurre con las proteínas séricas, el efecto de los TAP sobre el tamaño micelar es dependiente de la temperatura. Gaucheron *et al.* (1997) estudiaron el efecto combinado de la temperatura (4, 20 y 40°C) y los TAP (250, 450 y 600 MPa, 30 min) en las características físico-químicas de la leche desnatada. Mientras que un TAP de 250 MPa a 20°C no produjo cambios en el tamaño de las micelas, los tratamientos a 40°C produjeron un aumento en el tamaño micelar, y los tratamientos a 4°C dieron lugar a una disminución. Sin embargo, a 450 y 600 MPa se produjo una disminución del diámetro medio de partícula, independientemente de la temperatura de tratamiento. Según Huppertz *et al.* (2002), a bajas temperaturas podría haberse solubilizado parte del calcio coloidal, mientras que a temperaturas más elevadas el incremento de tamaño de las micelas podría deberse a interacciones, que serían análogas a las provocadas por los tratamientos térmicos, entre las proteínas del suero desnaturizadas y las caseínas.

Finalmente, además de la temperatura e intensidad de la presión, la disociación de las caseínas por los TAP se ve afectada por el pH. En general, el nivel de caseína soluble aumenta en leches con pH ajustado a 5,5 o 7,0 en relación con leche a pH 6,7 (Arias *et al.*, 2000).

2.1.5. Modificaciones del equilibrio mineral y pH

El término equilibrio mineral de la leche hace referencia a la solubilidad y al estado de ionización de los minerales disueltos en ésta, tal como se muestra en la Tabla 2. El equilibrio mineral, principalmente de los cationes divalentes Ca y Mg, y del fosfato, se ve afectado por los

cambios de composición que ocurren en la leche como consecuencia de los tratamientos tecnológicos (De la Fuente, 1998). De esta forma, pequeñas alteraciones en el equilibrio mineral pueden ocasionar importantes efectos en la estabilidad micelar y en las propiedades de agregación, coagulación y estructura de la cuajada.

TABLA 2. FORMAS DE CALCIO EN LA LECHE*

Calcio total	Es la concentración total de calcio en la leche.
Calcio coloidal (CaC)	El asociado directamente a las moléculas de caseína en ausencia o no de grupo fosfato.
Calcio soluble (CaS)	Es el calcio presente en la fase soluble como calcio iónico oacomplejado (principalmente por citrato o fosfato). Representa ~33% del calcio total en leche de vaca.
Calcio iónico (Ca^{+2})	Es la forma iónica del calcio (~8-10% del calcio total).

* Adaptado de De la Fuente (1998) y Huppertz *et al.* (2002).

Los tratamientos térmicos causan una disminución de la solubilidad del Ca y Mg y del fosfato solubles, que aumenta proporcionalmente con la intensidad del calentamiento (De la Fuente, Olano, Casal y Juárez, 1999).

En la Tabla 3 se resumen algunos de los trabajos realizados sobre el efecto de los TAP en el equilibrio mineral de la leche. En general y como consecuencia de los TAP, se produce un incremento de los minerales solubles. Sin embargo, este aumento no se traduce en un importante incremento de los niveles de Ca^{+2} .

Numerosos autores (Payens y Heremans, 1969; Shibauchi, Yamamoto y Sagara, 1992; Law *et al.*, 1998; Needs *et al.*, 2000) han sugerido que la disrupción de las micelas de caseína debidas a los TAP, produce una redistribución de minerales y proteínas entre los estados soluble y coloidal. Esta desintegración micelar en pequeñas unidades ricas en caseína y calcio coloidal, aumentarían el calcio soluble y levemente la concentración de Ca^{+2} , mejorando las propiedades de coagulación de la leche (De la Fuente, 1998; Arias *et al.*, 2000) como veremos a continuación.

Sin embargo, otros autores no han observado grandes diferencias en los niveles de Ca^{+2} o de calcio y fosfato coloidales en las leches PR, por lo que sugirieron que el equilibrio mineral rápidamente se regenera una vez que la presión es liberada, promoviendo la formación de nuevas estructuras micelares (Johnston, Austin y Murphy, 1992; Law *et al.*, 1998). Esta reagrupación daría lugar a micelas de caseína con estructuras diferentes a las iniciales.

TABLA 3. MODIFICACIONES EN EL EQUILIBRIO MINERAL PRODUCIDAS POR LOS TRATAMIENTOS DE ALTA PRESIÓN		
REFERENCIA	ÁMBITO DE ESTUDIO	CONCLUSIONES
Johnston <i>et al.</i> (1992)	Efecto de TAP en leche desnatada	No hay cambios en pH o Ca^{+2} tras TAP de 200 a 600 MPa.
Buchheim <i>et al.</i> (1995)	Efecto de TAP en leche desnatada esterilizada	TAP aumentan pH y regeneran los niveles de CaS que habían disminuido tras un tratamiento de esterilización (118°C, 15 min).
Gaucheron <i>et al.</i> (1997)	Efecto combinado de TAP y temperatura en leche desnatada	Ligera solubilización de Ca y P coloidales con la presión, no relacionada con la solubilización de caseínas individuales. No hubo efecto de la temperatura.
Law <i>et al.</i> (1998)	Comparación de TAP y térmico sobre las micelas de caseína en leche de cabra	Calentamiento (70-90°C) provoca ligero aumento de CaC. Los TAP no incrementan significativamente los niveles de CaC y Pi
López-Fandiño <i>et al.</i> (1998)	Efecto de TAP en leche de vaca, oveja y cabra	Aumento de Ca, Mg y P solubles con los TAP, y pequeños incrementos de Ca^{+2} . No se detectaron cambios de pH. Los cambios de concentración de minerales solubles fueron más notables en leche de oveja.
De la Fuente <i>et al.</i> (1999)	Efecto de TAP y temperatura en leche de cabra	Aumento de Ca, Mg y P solubles debidos a los TAP, pero inapreciables cambios de pH o Ca^{+2} . Elevadas temperaturas (85°C) disminuyen minerales solubles.
Arias <i>et al.</i> (2000)	Influencia del pH sobre los efectos de TAP en leche	Pequeños incrementos de Ca^{+2} debidos a la presión. Acidificación favorece actividad Ca^{+2} , mientras que la alcalinización la perjudica.

Ca⁺²: calcio iónico; **CaS:** calcio soluble; **CaC:** calcio coloidal; **Pi:** fosfato inorgánico

El tratamiento térmico disminuye el pH de la leche, debido a la expulsión de CO₂, a ajustes en el equilibrio de los iones, a precipitaciones de fosfato de calcio y, cuando la temperatura supera los 90°C, a la degradación de la lactosa (Holt, 1995). En la mayoría de los trabajos de alta presión no se describen diferencias en los valores de pH de la leche, aunque también se ha descrito un ligero incremento (Buchheim, Schrader, Morr, Frede y Schutt, 1995).

2.1.6. Modificaciones en las propiedades de coagulación enzimática

El proceso de formación de la cuajada ocurre en dos etapas: la primera etapa, de naturaleza enzimática, consiste en la hidrólisis de la p4CN por las enzimas coagulantes y la segunda etapa (no enzimática) comprende la agregación de las micelas modificadas.

Un calentamiento severo de la leche perjudica las propiedades de coagulación enzimática, provocando un aumento del tiempo de coagulación y disminución de la sinéresis y firmeza de la cuajada (Lucey, 1995). Cuando se calienta la leche, la η 4LG desnaturalizada o bien complejos de η 4LG/ ζ -LA interaccionan con la p4CN por medio de puentes disulfuro, dificultando la acción de las enzimas coagulantes sobre la p4CN y retardando su acción (Lucey, 1995). Sin embargo, y según diferentes autores, es la etapa de agregación de las micelas el factor limitante sobre el tiempo total de coagulación (Hooydonk, Koster y Boerrigter, 1987). Esta etapa también se ve retardada debido posiblemente a que las proteínas del suero desnaturalizadas, que se depositarían sobre la superficie de las micelas, impiden estéricamente o enlentecen la agregación de las micelas, aumentando así el tiempo total de coagulación (Lucey, 1995).

Por otra parte, si el calentamiento no es muy severo, las propiedades de coagulación de la leche pueden restaurarse mediante la adición de CaCl_2 (Richard *et al.*, 1990; Lucey, 1995). Asimismo, se ha comprobado que la pasteurización mejora las propiedades de coagulación enzimática de leches que han sido almacenadas largos períodos en refrigeración (Fox, 1969).

Beuvier *et al.* (1997) en queso tipo Suizo y Lau *et al.* (1990) en Cheddar no encontraron diferencias en los parámetros de coagulación de los quesos elaborados a partir de la leche PA con relación a los elaborados con leche RA. Por el contrario, López *et al.* (1997) observaron tiempos más largos de coagulación (316%) en leche PA (65°C , 30 min) de cabra en comparación al obtenido en leche CR.

Los TAP causan importantes cambios en la leche: tamaño de las micelas de caseína, desnaturalización de las proteínas del suero, solubilización de minerales de las micelas, etc., modificaciones que afectan a las propiedades de coagulación enzimática de la leche. La Tabla 4 resume las conclusiones obtenidas en diferentes trabajos sobre el efecto de los TAP y la coagulación enzimática de la leche. Varios autores han descrito aumentos en el tiempo de floculación² en la leche PR que, al igual que en el tratamiento térmico, podría deberse a un enlentecimiento de la fase enzimática y/o de la fase de agregación micelar.

² El tiempo de floculación es considerado, en este contexto y en su sentido físico-químico, como el tiempo que transcurre entre la adición del enzima y la aparición de los primeros flóculos. En el caso del coagulómetro Gelograph-NT se detecta como un cambio de transmisión y se calcula a través del máximo de la primera derivada obtenida en la caída de transmisión en la muestra durante el proceso de coagulación.

TABLA 4. MODIFICACIONES EN LA COAGULACIÓN ENZIMÁTICA PRODUCIDAS POR LOS TRATAMIENTOS DE ALTA PRESIÓN

REFERENCIA	ÁMBITO DE ESTUDIO	CONCLUSIONES
Desobry-Banon <i>et al.</i> (1994)	Estudio de la coagulación en leche PR	RCT \leftrightarrow >150 MPa, y se estabiliza y por encima de los 230 MPa.
López-Fandiño <i>et al.</i> (1996)	Efecto de TAP sobre las proteínas séricas y aptitud quesera	RCT \leftrightarrow hasta los 150 MPa, pero luego \Rightarrow aumentar la presión alcanzando valores similares a los de la leche control.
López-Fandiño <i>et al.</i> (1997)	Efecto de TAP en leche	La fase enzimática de la coagulación, evaluada mediante la liberación de CMP, es inhibida por TAP. A 200 MPa \leftrightarrow el RCT, mientras que a 400 MPa \Rightarrow La presión favorece la fase de agregación y la firmeza de la cuajada.
López-Fandiño y Olano (1998a)	Efecto de TAP en la aptitud quesera de leche de cabra y oveja	TAP no mejoran las propiedades de coagulación. Cabra: RCT \Rightarrow 300-400 MPa. La firmeza de la cuajada \Rightarrow Oveja: RCT \leftrightarrow 100 MPa, \Rightarrow 200 y 300 MPa y \leftrightarrow 400 MPa
López-Fandiño y Olano (1998b)	Efecto combinado de TAP y temperaturas moderadas en leche	RCT \leftrightarrow ligeramente a bajas presiones para luego \Rightarrow a mayores presiones. Liberación de CMP \leftrightarrow con la intensidad del TAP (300 MPa a 25, 40 y 50°C). Temperaturas >40°C afectan coagulación: a > temperatura > RCT.
Trujillo <i>et al.</i> (1999b)	Influencia de TAP en leche y queso de cabra	RCT \Rightarrow en leche PR, al igual que la velocidad de agregación y la firmeza de la cuajada.
Needs <i>et al.</i> (2000)	Efectos de TAP sobre la estructura micelar y la coagulación	RCT \leftrightarrow hasta 200 MPa pero luego \Rightarrow la presión. La liberación de GMP no es afectada por TAP, pero sí se afecta la segunda fase de coagulación. Sinéresis \leftrightarrow 600 MPa.
Arias <i>et al.</i> (2000)	Influencia del pH sobre los efectos de TAP en leche	RCT \leftrightarrow 200 MPa, a 400 MPa el RCT es similar al control. La acidificación de la leche \leftrightarrow RCT y alcalinización lo \Rightarrow

CMP: caseinomacropéptido; **RCT:** “rennet clotting time” (tiempo de floculación); **GMP:** glicomacropéptido

López-Fandiño *et al.* (1997) estudiaron las propiedades de coagulación enzimática utilizando cuajo animal en leche PR encontrando que la velocidad inicial de la fase de coagulación, determinada por la liberación del caseinomacropéptido, se veía disminuida bajo ciertas condiciones de presión y temperatura (400 MPa, 40-60°C). Estos autores concluyeron que los TAP disminuyen la susceptibilidad de la β -CN a la hidrólisis enzimática. El incremento del tiempo de floculación observado, según estos autores, está relacionado con la interacción entre la η -LG desnaturizada y la β -CN por efecto de los TAP, fenómeno que dificultaría la acción de las enzimas del cuajo (López-Fandiño *et al.* 1997; López-Fandiño y Olano, 1998b). Sin embargo, Felipe *et al.* (1997), trabajando con leche PR de cabra, observaron que la η -LG tiende a formar agregados que precipitan a pH 4.6. Así, es también posible que estos agregados se depositen en la superficie de las micelas e interfieran en la hidrólisis de la β -CN.

La disminución del tamaño medio de las micelas de caseína tras la fragmentación micelar, fenómeno causado por los TAP, podría favorecer la etapa de agregación de las

micelas. La reducción de tamaño micelar aumentaría la superficie de caseína susceptible de interaccionar entre sí (López-Fandiño *et al.* 1997; Trujillo *et al.* 1999b). Además el aumento del número de pequeñas partículas supone un incremento en la probabilidad de colisión, favoreciendo consecuentemente la agregación micelar (Desobry-Banon, Richard y Hardy, 1994). Sin embargo, Needs *et al.* (2000) demostraron que la velocidad de liberación de glicomacropéptido es constante, por lo que aparentemente sólo la fase de agregación de las micelas estaría afectada por el TAP. Según estos autores hay dos mecanismos opuestos que controlan la velocidad de agregación micelar en las leches PR. El primero sería el efecto directo de la presión sobre las micelas de caseína que provocaría una fragmentación en unidades menores, lo que resultaría en una rápida agregación, y el segundo efecto daría lugar a un incremento en la desnaturalización de la η -LG disminuyendo progresivamente la velocidad de agregación micelar.

Algunas de las características de los geles obtenidos por coagulación enzimática, como la firmeza o la capacidad de retención de agua, son parámetros importantes en la fabricación del queso y afectan al rendimiento, contenido de humedad y atributos texturales (Pandey, Ramaswamy y St-Gelais, 2000). Un defecto en la firmeza del gel ocasionará pérdidas de grasa y finos de quesería, mermando el rendimiento quesero, mientras que una escasa capacidad de retención de agua afectará el contenido de humedad del queso, y así a la textura y madurado del mismo. López-Fandiño *et al.* (1997) observaron que, independientemente de la adición o no de CaCl_2 , la firmeza del gel obtenido tras la coagulación enzimática de leche PR aumenta con la intensidad del TAP (hasta 400 MPa). Trujillo *et al.* (1999b) observaron que la leche PR (500 MPa, 15 min a 20°C) de cabra producía geles mucho más firmes que los obtenidos a partir de leche PA (72°C, 15 s). Este fenómeno fue atribuido por los autores a un menor tamaño micelar en la leche PR que facilitó una agregación más compacta.

En cuanto a la sinéresis, Needs *et al.* (2000) no encontraron diferencias en geles enzimáticos obtenidos a partir de leche CR o con leches presurizadas a 200 o 400 MPa durante 15 min a 20°C. Sin embargo, leches tratadas a 600 MPa presentaron una menor sinéresis que las control, probablemente debido a la estructura de la red proteica (más fina) y a la mayor inclusión de proteínas del suero. Por otra parte, Pandey *et al.* (2000) estudiaron la capacidad de retención de agua de geles enzimáticos en función de la presión (200-400 MPa), la temperatura (3-21°C) y el tiempo de tratamiento (10-110 min) aplicado a la leche. Estos autores observaron que, en general, una disminución en la presión, temperatura o tiempo de tratamiento origina una disminución en la capacidad de retención de agua de las cuajadas.

2.2. CONSECUENCIAS DE LA PASTEURIZACIÓN Y DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA EN LA MANUFACTURA Y MADURADO DEL QUESO

En esta sección se comentará la influencia de los tratamientos de pasteurización y de alta presión en el rendimiento quesero y características físico-químicas del queso, así como en el crecimiento microbiano y en las modificaciones bioquímicas que tienen lugar durante el madurado. Estos factores están directamente relacionados con el flavor, textura y otros atributos de calidad e identidad del queso.

2.2.1. Rendimiento quesero

Desde el punto de vista económico, el rendimiento quesero es una de las variables más importantes, ya que una recuperación ineficiente de la proteína o grasa durante la manufactura del queso puede ocasionar grandes pérdidas económicas para el fabricante.

En el monográfico de la IDF (Lawrence, 1991b) sobre rendimiento quesero, se describen diferentes factores que afectan el rendimiento durante el procesado de la leche de quesería (almacenamiento, estandarización, tratamiento térmico, homogenización, etc.) y su transformación en queso (adición de CaCl_2 , coagulante utilizado, firmeza del gel, tipo de cuba).

Con respecto al tratamiento térmico, Lau *et al.* (1990) estudiaron la influencia de la pasteurización sobre la recuperación de proteína y grasa durante la fabricación de queso Cheddar. Estos autores concluyeron que la pasteurización HTST (72°C , 15 s) de la leche provoca un incremento del rendimiento quesero de aproximadamente 1-4% con respecto a aquellos elaborados con leche CR. Los quesos elaborados a partir de leche PA tuvieron menores pérdidas de nitrógeno en el suero de quesería y consecuentemente mayor recuperación de nitrógeno en el queso, explicando así las diferencias observadas en rendimiento con respecto al queso de leche CR. Según los autores, las menores pérdidas de nitrógeno se debieron a la asociación, inducida por el tratamiento térmico, de la ηLG con las caseínas.

Se han realizado diversos estudios acerca de los efectos de la alta presión sobre el rendimiento quesero que podemos agruparlos bajo dos enfoques diferentes: los que estiman el rendimiento por centrifugación de los geles enzimáticos producidos (López-Fandiño *et al.*, 1996; Arias *et al.*, 2000), y aquellos que estudian el rendimiento mediante la cantidad de queso

obtenida a partir de una determinada cantidad de leche (Drake, Harrison, Asplund, Barbosa-Canovas y Swanson, 1997; Trujillo *et al.*, 1999b).

López-Fandiño *et al.* (1996), estimando rendimientos queseros por centrifugación, encontraron que presiones de 200 MPa no causaban ningún cambio en el rendimiento, pero que la aplicación de 300 o 400 MPa durante 30 min lo incrementaron en un 14 y 20%, respectivamente. Este aumento fue atribuido por los autores al efecto conjunto de una mayor cantidad de η -LG retenida y especialmente a una mayor retención de agua. Trabajando con leche de cabra y oveja, López-Fandiño y Olano (1998a) observaron que la leche de cabra presentaba un comportamiento similar a la de vaca, mientras que la leche de oveja mostraba mayores rendimientos queseros incluso a presiones de 200 MPa. Este fenómeno está relacionado con una mayor desnaturalización de la η -LG en la leche de oveja a 200 MPa en comparación a las leches de vaca o cabra, y al hecho que la leche de oveja presenta contenidos superiores en η -LG que la otras dos leches (López-Fandiño y Olano, 1998a). Arias *et al.* (2000) estudiaron el efecto de los TAP a diferentes pH sobre el rendimiento y retención de agua de geles enzimáticos, encontrando que para la leche tratada a 400 MPa la retención de proteína y humedad era mayor cuanto mayor era el pH de la leche, en el intervalo de pH 5,5-7,0.

De igual manera, el rendimiento de queso Cheddar elaborado a partir de leche PR (3 ciclos de 1 min a 586 MPa) fue aproximadamente un 7% mayor que el obtenido a partir de leche CR o PA (Drake *et al.*, 1997), mientras que Trujillo *et al.* (1999b) obtuvieron un 5% más de rendimiento en los quesos de cabra elaborados a partir de leche PR (500 MPa, 15 min a 20°C) en comparación con los quesos de leche PA (72°C, 15 s).

2.2.2. Composición general

La influencia de la pasteurización de la leche en la composición general del queso (pH, humedad, contenido en proteína o grasa, etc..) ha sido estudiada por diferentes autores, mostrándose en la mayoría de los trabajos, que la pasteurización no afecta de manera significativa a la composición general del queso con respecto a aquellos elaborados a partir de leche CR (McSweeney *et al.*, 1993; Beuvier *et al.*, 1997; Bachmann *et al.*, 1998).

No obstante, existe cierta controversia acerca del efecto de la pasteurización de la leche sobre el contenido de humedad del queso. Así, algunos autores han encontrado que el tratamiento de pasteurización de la leche origina quesos con mayor humedad (Price y Call,

1969; Bachmann *et al.*, 1998), mientras que otros autores han observado que la humedad de los quesos de leche PA es similar (McSweeney *et al.*, 1993; Beuvier *et al.*, 1997; Ginzinger, Jaros, Mayer, Rohm y Tschager, 1999b) o ligeramente menor (Drake *et al.*, 1997; Gómez, Garde, Gaya, Medina y Núñez, 1997) que en los quesos de leche CR. Según Lau *et al.* (1990) las variaciones en humedad encontradas en los diferentes estudios pueden deberse a diferencias en los procedimientos de manufactura de los quesos.

Bachmann *et al.* (1998) publicaron un trabajo realizado en seis laboratorios europeos diferentes comparando quesos modelo elaborados con un mismo protocolo de manufactura a partir de leche CR, PA o microfiltrada, encontrando que la humedad media de los quesos fue significativamente influenciada por la pasteurización. Según los autores, el aumento de humedad en los quesos de leche PA pudo estar asociado con la unión de las proteínas del suero a la micela de caseína.

También se ha descrito que algunos quesos de leche PA retienen más grasa y proteína que otros elaborados con leche CR. Así, Irvine *et al.* (1948) en queso Cheddar y Gómez *et al.* (1997) en queso tipo Hispánico observaron que los quesos elaborados a partir de leche PA contuvieron aproximadamente 0,98 y 2,5 más de grasa respectivamente, que los correspondientes a leche CR. En cuanto al contenido de proteína, Lau *et al.* (1990) observaron que los quesos Cheddar fabricados con leche PA tuvieron aproximadamente un 1% más de proteína, debido a la incorporación de parte de las proteínas del suero en la cuajada.

En cuanto a los efectos de las altas presiones sobre la composición general del queso, Drake *et al.* (1997) observaron que el contenido de humedad de los quesos Cheddar elaborados con leche PR fue mayor (~2,5%) en relación a aquellos de leche PA, y el porcentaje de grasa menor (~1,75%), mientras que las demás características físico-químicas no mostraron diferencias importantes. Trujillo *et al.* (1999a; 1999b) trabajando con queso de cabra elaborado con leche PR observaron mayores valores de pH, sal y humedad y menor contenido de grasa que los correspondientes quesos de leche PA. Según los autores, las menores cantidades de grasa en los quesos de leche PR (~1,7%) pudieron deberse a diferentes características de los geles obtenidos. Cuando la leche es tratada por altas presiones pueden formarse agregados de proteína sérica. Si estos agregados son muy grandes, pueden romper la continuidad de la matriz de caseína dificultando la inclusión de los glóbulos de grasa en la cuajada (Trujillo *et al.*, 1999a). Por otra parte, el mayor contenido en sal encontrado en los quesos de leche PR (~0,6%) fue justificado por los mayores valores de humedad de estos quesos, ya que la cantidad de sal que penetra durante el salado del queso es proporcional a su contenido de humedad (Geurts, Walstra y Mulder, 1974).

Molina *et al.* (2000) utilizando leche PR (400 MPa, 22ºC y 15 min) para la producción de queso bajo en grasa, observaron que los quesos de leche PR mostraron mayores valores de

humedad, sal, proteína y grasa con relación a los quesos de leche PA. Los mayores valores de proteína se debieron, según los autores, a la incorporación de las proteínas del suero en la cuajada, mientras que la mayor incorporación de grasa fue atribuida a la mejora de la estructura del gel formado, que retendría más eficientemente la grasa.

2.2.3. Microbiota del queso

Las características bioquímicas del queso cambian durante la maduración como consecuencia del desarrollo microbiano y de sus actividades enzimáticas, permitiendo así que el queso adquiera su típico flavor y textura. Los microorganismos presentes en el queso catabolizan el lactato, produciendo acetato, piruvato y CO₂, e hidrolizan las proteínas, péptidos y grasas a compuestos más pequeños (Demarigny *et al.*, 1997). Esta actividad es considerada esencial para el desarrollo de las características típicas del queso.

Al inicio de la maduración la microbiota del queso está compuesta mayoritariamente por las bacterias del fermento (BF). Los recuentos de las BF son generalmente altos al inicio, del orden de 10⁸-10⁹ ufc g⁻¹ de queso, y van disminuyendo regularmente en 2 o más ciclos logarítmicos a lo largo de la maduración.

McSweeney *et al.* (1993), Beuvier *et al.* (1997) y Olarte, Sanz, González y Torre (2000), trabajando con quesos Cheddar, tipo Suizo y de cabra, respectivamente, describieron que el descenso de las BF es más lento en los quesos elaborados con leche CR que en los fabricados a partir de leche PA (en aproximadamente 2 a 4 Log ufc g⁻¹ de queso).

Normalmente, existe una tendencia opuesta entre los recuentos de las BF y de las bacterias que no forman parte del fermento (BNF) durante la maduración. A medida que las primeras disminuyen, las BNF incrementan su número hasta alcanzar recuentos de 10⁷-10⁸ ufc g⁻¹ en quesos de leche CR y uno o dos unidades logarítmicas menos en los de leche PA (McSweeney *et al.*, 1993).

Las bacterias que componen el grupo de las BNF del queso son variadas, pero principalmente este grupo está formado por los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* y *Leuconostoc* spp. (Peterson y Marshall, 1990). Los lactobacilos son las bacterias dominantes de las BNF y las cepas encontradas en los quesos elaborados con leche CR son mucho más heterogéneas que las halladas en los quesos de leche PA (McSweeney *et al.*, 1993; Demarigny, Beuvier, Dasen y Buboz, 1996).

El número y la heterogeneidad de las BNF es mayor en los quesos fabricados a partir de leche CR que en aquellos elaborados con leche PA, debido a que el tratamiento térmico

aplicado a la leche destruye un gran porcentaje de ellas. Numerosos autores han estudiado la importancia de las BNF en el madurado del queso, observando una mayor proteólisis y un flavor más pronunciado en los quesos elaborados con leche CR (McSweeney *et al.*, 1993; Beuvier *et al.*, 1997; Rehman, Banks, McSweeney y Fox, 2000b). Por otra parte, es importante resaltar también que es la heterogeneidad en las cepas de las BNF, y no tanto su número, el factor que posee mayor importancia con relación a la calidad del queso (Rehman, McSweeney y Fox, 1999).

Durante la elaboración del queso, se puede producir una contaminación microbiológica procedente de los utensilios de quesería, del medio ambiente, de la manipulación de la cuajada, etc., detectándose en el queso microorganismos que no estaban originalmente presentes en la leche PA. De esta forma coliformes o enterococos, pueden desarrollarse en el queso de leche PA, pero generalmente, con recuentos menores que en los quesos fabricados con leche CR.

La microbiota de los quesos de leche CR de cabra ha sido objeto de estudio en numerosas variedades de queso, tales como Majorero (Gómez, Peláez y De la Torre, 1989), blanco salado (Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis, 1992), Gredos (Medina, Gaya y Núñez, 1992), Cendrat del Montsec (Mor-Mur, Carretero, Pla y Guamis, 1994), Armada (Tornadijo *et al.*, 1995), Cameros (Olarte, Sanz, González Fandos y Torre, 2000), Valdeteja (Alonso-Calleja, Carballo, Capita, Bernardo y García-López, 2002), etc. En la mayoría de los quesos de cabra los recuentos de microorganismos totales están comprendidos entre las 10^7 y las 10^9 ufc g⁻¹ de queso, y el mayor porcentaje de estos recuentos corresponde a bacterias lácticas (Alonso-Calleja *et al.*, 2002).

Olarte *et al.* (2000) observaron que los quesos elaborados a partir de leche PA de cabra mostraron siempre los menores recuentos de *Micrococcaceae* (<3 Log ufc g⁻¹ de queso) en relación a los quesos de leche CR. Los quesos de leche PA tuvieron los menores recuentos de *Enterobacteriaceae* (que disminuyeron por debajo del límite de detección más rápidamente que en los quesos de leche CR). Además, *Staphylococcus aureus* fue detectado solamente en los quesos fabricados con leche CR.

Aunque numerosos autores han investigado los efectos de los TAP sobre los microorganismos de la leche (Drake *et al.*, 1997; Mussa y Ramaswamy, 1997; García-Risco *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 1999b), existen pocos trabajos sobre la microbiota y su evolución durante el madurado en quesos elaborados a partir de leche tratada por altas presiones. Drake *et al.* (1997) elaboraron queso Cheddar con leche CR, PA (72°C, 15s) y PR (3 ciclos de 1 min a 586 MPa), encontrando que los quesos elaborados con leche PR mostraban recuentos mucho menores de bacterias psicrótrofas y coliformes (~2 Log ufc g⁻¹) con respecto a los elaborados con leche CR. Estos autores concluyeron que la calidad microbiológica de los quesos de leche

PR fue equivalente a la de los quesos elaborados a partir de leche PA, aunque sólo examinaron las poblaciones de coliformes y psicrótrofos.

2.2.4. Proteólisis

La proteólisis es el más complejo y, en muchas variedades de queso, el más importante de los tres eventos primarios (glicólisis, lipólisis y proteólisis) que ocurren durante el madurado del queso (Fox *et al.*, 1993). De acuerdo con estos autores la proteólisis contribuye al madurado del queso de diferentes maneras: contribuye directamente al desarrollo del flavor del queso mediante la liberación de aminoácidos y péptidos, o indirectamente a través del catabolismo de aminoácidos para formar aminas, ácidos, tioles, etc.; incrementa la liberación de compuestos sápidos durante la masticación; contribuye al cambio de pH debido a la formación de NH₃ y modifica la textura mediante la ruptura de la matriz proteica.

Durante el madurado del queso, la proteólisis es catalizada por varios agentes, que según McSweeney y Sousa (2000) pueden provenir de seis fuentes diferentes según el procedimiento utilizado para su elaboración: enzimas coagulantes (quimosina, pepsina, proteasas vegetales, microbianas o fúngicas); enzimas endógenas de la leche (plasmina, catepsina D y tal vez otras proteasas de las células somáticas); enzimas del fermento (BF); enzimas de las bacterias que no forman parte del fermento (BNF); enzimas del fermento secundario (*Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*, etc.); y proteasas o peptidasas exógenas usadas para acelerar el madurado.

En la mayoría de las variedades de queso, la hidrólisis inicial de las caseínas es causada por las enzimas coagulantes residuales y en menor grado por la plasmina y tal vez por la catepsina D (McSweeney y Sousa, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que las proteasas de las BF y de las BNF son también activas en la degradación de caseínas (Fox y Stepaniak, 1993). Esta hidrólisis de las caseínas origina péptidos grandes (insolubles en agua) y medianos (solubles en agua) que son posteriormente degradados por las enzimas coagulantes y enzimas de las BF y BNF (McSweeney y Sousa, 2000). Finalmente, la producción de pequeños péptidos y aminoácidos libres es causada por la acción de las proteasas y peptidasas microbianas.

Numerosos autores han estudiado la influencia de la pasteurización de la leche sobre la proteólisis desarrollada en diferentes variedades de queso (Tabla 5). Lau *et al.* (1991) atribuyeron las diferencias en proteólisis encontradas en quesos Cheddar elaborados con leche CR o PA a algunas modificaciones físico-químicas de la leche tras el tratamiento térmico, fundamentalmente a través de las interacciones de las proteínas séricas con las micelas de

caseína. Sin embargo, en este estudio no se abordó la influencia de la microbiota de las leches ni su evolución en los quesos.

Diferentes autores han demostrado el papel fundamental de la microbiota endógena sobre la proteólisis desarrollada en diferentes variedades de quesos: tipo Suizo (Beuvier *et al.*, 1997; Demarigny *et al.*, 1997), Cheddar (McSweeney *et al.*, 1993; Rehman *et al.*, 2000b), Manchego (Gaya, Medina, Rodríguez-Marín y Núñez, 1990), y quesos modelo (Skeie y Ardö, 2000).

Con relación a los tratamientos de altas presiones, se han publicado muy pocos trabajos en los que se estudie la influencia de los TAP de la leche en la proteólisis desarrollada en el queso (Tabla 5). Sin embargo, como comentaremos a continuación, se ha podido observar diferencias entre los valores de proteólisis primaria y secundaria de los quesos elaborados con leche PR y aquellos fabricados a partir de leche CR o PA.

- ***Proteólisis primaria***

Podemos definir a la proteólisis primaria como los cambios en las caseínas ζ_s -, η -, ν - y péptidos, que pueden ser detectados por electroforesis en gel de poliacrilamida (Rank, Grappin y Olson, 1985). La proteólisis primaria es el resultado de la acción de los enzimas coagulantes residuales, de la plasmina, de la catepsina D y de proteasas bacterianas del fermento y de las BNF sobre las caseínas de la leche.

La Tabla 5 recoge una serie de estudios sobre la proteólisis primaria (degradación de la ζ_{s1} - y η -CN) y proteólisis secundaria (cuantificación de diferentes fracciones nitrogenadas y péptidos por HPLC) desarrolladas en diferentes variedades de quesos elaborados a partir de leche CR, PA o PR.

Los estudios realizados en quesos de pasta cocida, como por ejemplo Kasseri (Moatsou, Kandarakis, Moschopoulou, Anifantakis y Alichanidis, 2001), Bergkäse (Ginzinger *et al.*, 1999b) y tipo Suizo (Beuvier *et al.*, 1997) han mostrado que los quesos elaborados a partir de leche PA presentan una menor hidrólisis de las caseínas ζ_s -, que aquellos elaborados con leche CR. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la inactivación parcial de la catepsina D durante la etapa de pasteurización, así como la disminución de la actividad proteolítica de la microbiota endógena de la leche, ya que ésta se ve fuertemente inactivada durante el tratamiento térmico de pasteurización. Sin embargo, otros autores que trabajaron con quesos de pasta no cocida como Manchego (Gaya *et al.*, 1990; Gómez, Rodríguez, Gaya, Núñez y Medina, 1999) y Arzúa (Centeno, Rodríguez-Otero y Cepeda, 1994) elaborados a partir de

leche PA observaron una mayor hidrólisis de las ζ_s -CN, efecto que puede ser debido a una mayor retención de enzimas coagulantes en el queso (Gaya *et al.*, 1990).

En lo que respecta a la η -CN, y en estudios realizados en quesos Bergkäse, tipo Suizo y Manchego elaborados con leche PA, esta proteína presentó una mayor hidrólisis en comparación a sus homólogos de leche CR, hecho que puede ser atribuido a la activación del plasminógeno y/o a la inactivación de los inhibidores de la plasmina tras el tratamiento térmico (Richardson, 1983). Sin embargo, en otras variedades de quesos como Anevato, Arzúa y Cheddar elaborados con leche PA se ha observado una menor degradación de la η -CN. Estas diferencias pueden deberse a varios factores, entre ellos el bajo nivel de actividad plasmina encontrado en estas últimas variedades de queso, y principalmente a una menor actividad proteolítica de la microbiota endógena tras la pasteurización de la leche.

Según estos resultados, parece claro que los parámetros de manufactura del queso (pH al desuerado, temperatura de cocción de la cuajada y las características físico-químicas del queso) son muy diferentes entre cada variedad de queso. Estos parámetros de fabricación pueden enmascarar parcial o totalmente los efectos de la pasteurización en las actividades enzimáticas (quimosina, plasmina, catepsina D) y en la acción de la microbiota sobre las ζ_s - y la η -CN (Grappin y Beuvier, 1997). Es muy difícil por lo tanto, obtener una conclusión general sobre la influencia de la pasteurización de la leche en la proteólisis primaria de diferentes variedades de queso.

Existen muy pocos estudios sobre los niveles de proteólisis primaria alcanzados en quesos producidos a partir de leche PR. Trujillo *et al.* (1999a) estudiaron los perfiles electroforéticos (PAGE-SDS) de quesos de cabra elaborados a partir de leche PA (72°C, 15 s) y PR (500 MPa, 15 min, 20°C). Estos autores no encontraron grandes diferencias cualitativas en los perfiles electroforéticos de estos quesos, siendo la principal diferencia observada la gran cantidad de η -LG que presentaron los quesos de leche PR en comparación a los elaborados con leche PA.

Molina *et al.* (2000) observaron que quesos con bajo contenido en grasa elaborados a partir de leche PR (400 MPa, 22°C, 15 s) exhibieron una mayor degradación de las ζ_{s1} - y η -CN, fenómeno explicado por la mayor retención de enzimas coagulantes residuales en la cuajada, a causa de un mayor contenido de humedad.

TABLA 5. INFLUENCIA DE LA PASTEURIZACIÓN O PRESURIZACIÓN DE LA LECHE EN LA PROTEÓLISIS DEL QUESO¹

QUESO	PROTEÓLISIS PRIMARIA ²			PROTEÓLISIS SECUNDARIA			REFERENCIA
	ζ_s -CN	η -CN	Péptidos	NS	NSTCA	NSPTA-AA	
Kasseri (4 m; pasta hilada cabra/oveja)	PA < CR	PA nd ³ CR	PA nd. CR	PA nd. CR	PA nd. CR	PA nd. CR	Moatsou <i>et al.</i> (2001)
Anevato (1 m; cabra/oveja)	PA < CR	PA < CR	-	-	-	PA > CR	Xanthopoulos <i>et al.</i> (2000)
Cheddar (6 m)	PA nd. CR	PA nd. CR	PA nd. CR	PA nd. CR	-	PA < CR	Rehman <i>et al.</i> (2000c)
Queso modelo (4 m)	-	-	-	PA nd. CR	PA nd. CR	PA < CR	Skeie y Ardö (2000).
Manchego (2 m)	PA > CR	PA > CR	HI >CR; HO > PA	PA < CR	PA nd. CR	PA < CR	Gómez <i>et al.</i> (1999)
Bergkäse (pasta cocida)	PA < CR	PA > CR	HO > PA	PA > CR	PA nd. CR	PA nd. CR	Ginzinger <i>et al.</i> (1999b).
Cheddar (6 m)	PA nd. CR	PA nd. CR	-	PA nd. CR	-	PA > CR	Kelly (1999)
De oveja (6 m)	PA nd. CR	PA > CR	-	PA > CR	PA > CR	PA < CR	Mendia <i>et al.</i> (2000)
Tipo Suizo (3 m)	PA < CR	PA > CR	HO > PA	PA nd. CR	-	PA < CR	Beuvier <i>et al.</i> (1997)
Tipo Manchego (2 m)	-	-	PA nd. CR	-	-	-	Gómez <i>et al.</i> (1997)
Cheddar (15 m)	-	-	-	PA > CR	PA > CR	PA < CR	Rosenberg <i>et al.</i> (1995)
Arzúa (45 d; vaca)	PA > CR	PA < CR	-	-	-	-	Centeno <i>et al.</i> (1994)
Cheddar (6 m)	PA nd. CR	PA nd. CR	HI >CR; HO > PA	PA nd. CR	-	PA < CR	McSweeney <i>et al.</i> (1993).
Cheddar (6 m)	PA nd. CR	PA < CR	HI >CR; HO > PA	PA nd. CR	PA < CR	-	Lau <i>et al.</i> (1991)
Manchego (4 m)	PA > CR	PA > CR	-	PA < CR	PA < CR	PA < CR	Gaya <i>et al.</i> (1990).
Bajo en grasa	PA < PR	PA < PR	HI > PR; HO > PR	-	-	-	Molina <i>et al.</i> (2000)
Cabra	-	-	HO > PA	PA > PR	PA > PR	PA < PR	Trujillo <i>et al.</i> (1999a)

¹ Al final de su maduración. ² Nivel de hidrólisis de ζ_s - y η -CN en quesos elaborados con leche cruda (CR), pasteurizada (PA) o tratada por altas presiones (PR).

³ nd.: no hay diferencia entre tratamientos. **NS**: nitrógeno soluble a pH 4,6; **TCA**: fracción soluble en 12% de ácido tricloroacético; **NSPTA-AA**: fracción soluble en 5% de ácido fonsfotungstico o aminoácidos libres; **HO**: péptidos hidrófobos; **HI**: péptidos hidrófilos

- ***Proteólisis secundaria***

Podemos considerar los productos de la proteólisis secundaria como aquellas proteínas, péptidos y aminoácidos solubles en la fase acuosa del queso y que se pueden extraer con diferentes solventes, como por ejemplo agua (Rank *et al.*, 1985).

La proteólisis secundaria se puede evaluar mediante técnicas de fraccionamiento de nitrógeno o por técnicas de HPLC. Según Ardö (1999), las técnicas de fraccionamiento de nitrógeno más usadas son:

- Nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS), comprende las proteínas (excluyendo todas las caseínas), todos los péptidos, aminoácidos libres y pequeños compuestos nitrogenados tales como aminas, urea y amoníaco.
- Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (NSTCA) contiene péptidos de cadena media a corta, aminoácidos libres y pequeños compuestos nitrogenados
- Nitrógeno soluble en ácido fosfotungstico al 5% (NSPTA) comprende péptidos muy cortos, aminoácidos libres y pequeños compuestos nitrogenados excepto aminoácidos dibásicos y amoníaco.

Para cuantificar los aminoácidos libres (AA) totales se utilizan diferentes métodos basados en la reacción con ácido trinitrobencenosulfónico, ninhidrina, o-ftaldialdehído y fluorescamina (McSweeney y Fox, 1993).

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de la proteólisis secundaria de diferentes variedades de quesos elaborados a partir de leches CR, PA o PR. En esta tabla podemos observar que, en general, los valores de NS y de NSTCA de los quesos de leche PA y CR tienden a ser similares, mientras que los valores de NSPTA-AA son generalmente mayores en los quesos elaborados con leche CR. Estos resultados muestran que la microbiota natural de la leche posee una gran actividad aminopeptidásica.

De igual forma que ocurre en la proteólisis primaria, existen pocos datos referentes al desarrollo de la proteólisis secundaria en quesos fabricados con leche PR. Trujillo *et al.* (1999a) observaron que los quesos elaborados con leche PR mostraron valores de NS y de NSTCA inferiores a los quesos de leche PA, mientras que la concentración de aminoácidos libres fue mayor en los quesos de leche PR (Tabla 5). Estas diferencias, según los autores, pudieron deberse al mayor contenido de agua y sal de los quesos PR, que podría afectar la actividad enzimática y microbiana de los quesos.

El perfil peptídico de los quesos también se ve modificado con el tratamiento de la leche (Tabla 5). En la mayoría de los trabajos se han encontrado diferencias cuantitativas y

cualitativas entre los diferentes quesos, principalmente en las cantidades de péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos. De acuerdo con González del Llano, Polo y Ramos (1995) los péptidos hidrofóbicos se relacionan con los sabores amargos del queso.

En general, los quesos PA presentan mayor concentración de péptidos hidrofóbicos que los elaborados con leche CR, los cuales muestran mayores concentraciones de péptidos hidrofílicos. La menor concentración de péptidos hidrofóbicos encontrada en los quesos elaborados con leche CR está relacionada con los mayores recuentos de las BNF observados en estos quesos. Las BNF presentan una gran actividad peptidásica, y serían los responsables de hidrolizar los péptidos hidrofóbicos en este tipo de quesos (Beuvier *et al.*, 1997; Ginzinger *et al.*, 1999).

En lo que respecta al perfil peptídico de los quesos de leche PR, Trujillo *et al.* (1999a) observaron que estos quesos mostraban una concentración menor de péptidos hidrófobos en comparación con los quesos de leche PA. Por otra parte, Molina *et al.* (2000) comparando quesos bajos en grasa elaborados a partir de leche PA o PR, observaron que las diferencias entre los péptidos de los diferentes quesos eran principalmente cuantitativas. Los quesos de leche PR mostraron una mayor concentración de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos, aproximadamente 29 y 57% mayor, respectivamente. Según estos autores, la mayor humedad de los quesos de leche PR pudo haber estimulado la proteólisis en este tipo de queso.

2.2.5. Lipólisis

La acción enzimática de las lipasas sobre los glóbulos grasos causa un aumento de la concentración de ácidos grasos libres (AGL), fenómeno se le conoce como lipólisis.

Las lipasas que podrían actuar en el queso tienen diferentes orígenes: la leche, la preparación enzimática coagulante, los fermentos, los adjuntos del fermento, las bacterias no-fermento y en el caso de que sean usadas, las lipasas exógenas (McSweeney y Sousa, 2000). No obstante, la actividad lipolítica detectada en el queso está influenciada además por muchos otros factores, como la calidad de la leche, los tratamientos tecnológicos aplicados a ésta (homogeneización, agitación, enfriamientos, bombeo, etc.) y por las condiciones de maduración de los quesos (Walstra y Jenness, 1984).

La lipólisis es particularmente intensa en algunos quesos italianos, en los madurados con mohos y en los quesos de cabra, y es esencial para el correcto desarrollo del flavor de éstos (Grappin y Beuvier, 1997). Aunque la lipólisis contribuye al flavor de algunas variedades de queso, principalmente cuando está correctamente equilibrada con los productos de proteólisis o

de otras reacciones, una producción excesiva de AGL puede afectar negativamente el flavor del queso (Grappin y Beuvier, 1997; McSweeney y Sousa, 2000).

Exceptuando los quesos de pasta cocida, en los que la lipólisis es normalmente baja ya que la lipoproteín lipasa (LPL) de la leche es parcialmente inactivada durante la cocción, los quesos elaborados a partir de leche PA contienen una concentración en AGL menor que los fabricados con leche CR (Grappin y Beuvier, 1997).

La lipólisis desarrollada en queso Manchego, Bergkäse y Cheddar elaborados a partir de leche PA fue un 38, 36-42 y 50% menor, respectivamente, que en los correspondientes quesos de leche CR (Gaya *et al.*, 1990; McSweeney *et al.*, 1993; Ginzinger *et al.*, 1999b).

En un estudio en el cual se elaboraron quesos Cheddar a partir de leche PA, CR, y PA con un 10, 5 y 1% de adición de leche CR, se observó que la lipólisis fue considerablemente mayor en los quesos de leche CR y en los de leche PA mezclada con leche CR, respecto a los quesos de leche PA (Rehman *et al.*, 2000c). Según estos autores, la LPL de la leche y las lipasas de las BNF fueron las responsables de estos resultados.

Trujillo *et al.* (1999b) determinaron la actividad lipásica y la concentración de AGL totales en leche de cabra PA (72°C, 15 s) o PR (500 MPa, 15 min, 20°C). La concentración de AGL obtenida en leche PR fue aproximadamente el doble que la presentada por la PA. Además, estos autores encontraron actividad lipásica en leche de cabra tras el tratamiento de alta presión, en tanto que no detectaron actividad de la enzima en la leche PA. Como se ha visto anteriormente en la sección 2.1.2.2, la LPL es una enzima que puede ser casi completamente inactivada por la pasteurización de la leche, sin embargo esta enzima parece ser más resistente a los tratamientos de alta presión. En un trabajo relacionado, Trujillo *et al.* (1999a) observaron que la concentración de AGL totales en queso de cabra elaborados a partir de leche PR fue mayor que la presentada en los quesos de leche PA.

2.2.6. Glicólisis

Una de las principales funciones de los fermentos utilizados en la elaboración de queso es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa (Fox *et al.*, 1993). El ácido láctico contribuye al flavor de quesos de coagulación ácida y probablemente también de algunas variedades de quesos madurados, particularmente al inicio de la maduración (McSweeney y Sousa, 2000).

La disminución del pH del queso debida a la producción de ácido láctico afecta a: la sinéresis; la retención de calcio; la retención y actividad de las enzimas coagulantes, influyendo

en el tipo y grado de proteólisis durante el madurado, y al desarrollo de la microbiota contaminante (Fox, Lucey y Cogan, 1990).

El L-lactato es el producto principal del metabolismo de la lactosa, mientras que su isómero D-lactato se forma posteriormente debido a la actividad de las BNF y en parte a la racemización del L-lactato (Fox *et al.*, 1990).

Varios autores han estudiado el efecto de la pasteurización de la leche sobre la glicólisis desarrollada en el queso. Eliskases-Lechner, Ginzinger, Rohm y Taschager (1999) encontraron que los valores de ácido láctico en queso Bergkäse elaborado con leche PA fueron aproximadamente un 28% mayores en relación a los de leche CR. Beuvier *et al.* (1997) en queso tipo Suizo obtuvieron concentraciones de L-lactato mayores en quesos de leche PA (880 mg 100 g⁻¹ de queso) respecto a los de leche CR (470 mg 100 g⁻¹ de queso), aunque no observaron diferencias en los niveles de D-lactato. Sin embargo, Bachmann *et al.* (1998) en un trabajo interlaboratorial y comparando quesos modelo elaborados a partir de leches CR, PA o microfiltrada, encontraron que la concentración de D-lactato representó un 42% del total de ácido láctico en los quesos de leche CR y sólo un 29% en los de leche PA, probablemente debido a una reducción de la microbiota y enzimas endógenas producidas por la pasteurización.

Actualmente no disponemos de mucha información acerca de los fenómenos de glicólisis en los quesos elaborados a partir de leche PR. Trujillo *et al.* (1999a) cuantificaron lactato durante la maduración de quesos de leche PA y PR, encontrando mayores valores de L-lactato (~26%) y de D-lactato (~33%) en los quesos de leche PA. Según los autores, la actividad del fermento, su habilidad para fermentar la lactosa y la isomerización del L-lactato en los quesos de leche PR pudieron verse disminuidas por la mayor cantidad de sal que presentaron estos quesos.

2.2.7. Productos de fermentación y volátiles. Características sensoriales

El flavor del queso no puede ser atribuido solamente a un componente en particular, sino al correcto balance de un gran número de compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas como ácidos, alcoholes primarios y secundarios, cetonas y aldehídos, ésteres, aminas, hidrocarburos, compuestos azufrados, etc. (Escríche, Fuentes, González y Chiralt, 2000). Los principales cambios metabólicos que ocurren durante el madurado del queso son la degradación de la lactosa y de algunos ácidos orgánicos (como lactato o citrato), la liberación

de ácidos grasos libres, la degradación de las caseínas para generar péptidos y aminoácidos y una serie de reacciones de degradación de aminoácidos a componentes volátiles del flavor (amoníaco, aldehídos, aminas, fenoles, alcoholes, etc.) (Smit *et al.*, 2000; McSweeney y Sousa, 2000).

El desarrollo de los ácidos orgánicos durante el período de maduración del queso depende, presumiblemente, del número y de la actividad metabólica de los microorganismos (Lues, 2000). Como hemos comentado anteriormente, la pasteurización de la leche causa una drástica disminución de la microbiota endógena, hecho que modifica a la vez el catabolismo de compuestos como el lactato o el citrato. Varios autores han observado que la concentración de estos ácidos orgánicos en queso tipo Suizo y Bergkäse elaborados a partir de leche PA es mayor que la encontrada en los correspondientes quesos de leche CR (Beuvier *et al.*, 1997; Eliskases-Lechner *et al.* 1999). Por el contrario, en los quesos que poseen la microbiota endógena de la leche CR encontramos por lo general mayores valores en otros ácidos orgánicos como ácido acético, propiónico o fórmico (González-de Llano, Rodríguez y Cuesta, 1996; Beuvier *et al.*, 1997; Demarigny *et al.*, 1997; Eliskases-Lechner *et al.*, 1999; Skeie y Ardö, 2000).

Estudios en los que se evaluaron compuestos volátiles en quesos de leche CR o PA han dado a conocer diferencias en las concentraciones de AGL, compuestos azufrados, etanol, ésteres y de algunas cetonas y aldehídos debido a la acción de las enzimas y/o microbiota natural de la leche (Skeie y Ardö, 2000; Rehman *et al.*, 2000a; Rehman *et al.*, 2000c; Gómez-Ruiz, Ballesteros, González-Viñas, Cabezas y Martínez-Castro, 2002; Fernández-García, Carbonell y Núñez, 2002).

Así, Gómez-Ruiz *et al.* (2002) observaron que quesos Manchego elaborados con leche CR tuvieron una mayor concentración de alcoholes, AGL, ésteres y cetonas que los correspondientes quesos de leche PA. En otro trabajo realizado también en queso Manchego se pudo observar que en la fracción volátil de los quesos de leche CR predominaban los alcoholes (~86% mayor) y ésteres (~89%), mientras que las metil-cetonas y el diacetilo fueron cuantitativamente más importantes en los quesos de leche PA, aproximadamente un 30 y un 95% mayor, respectivamente (Fernández-García *et al.*, 2002). Trabajando con queso Cheddar, Rehman *et al.* (2000c) observaron que la concentración de AGL y de la mayoría de los ésteres determinados fue mayor en los quesos de leche CR, mientras que los elaborados con leche PA mostraron elevadas concentraciones para la mayoría de los aldehídos.

En lo que respecta al flavor del queso, numerosos trabajos describen que los quesos elaborados a partir de leche CR poseen un flavor más intenso que los correspondientes quesos de leche PA, y alcanzan unas características de flavor óptimas más rápidamente (Gaya *et al.*, 1990; McSweeney *et al.*, 1993; Beuvier *et al.*, 1997; Bachmann *et al.*, 1998; Ginzinger, Jaros,

Lavanchy y Rohm, 1999a; Rehman *et al.*, 2000c; Gómez-Ruiz *et al.*, 2002; Fernández-García *et al.*, 2002). En este sentido, Gaya *et al.* (1990) calcularon que un queso Manchego elaborado con leche PA debería madurarse durante tres meses para lograr una intensidad de flavor similar a la que alcanza un queso de leche CR en dos meses.

Numerosos autores han investigado en diferentes variedades de queso la influencia de la microbiota endógena de la leche sobre las características organolépticas del queso (Beuvier *et al.*, 1997; Bachmann *et al.*, 1998; Ginzinger *et al.*, 1999a; Skeie y Ardö, 2000; Rehman *et al.*, 2000c). McSweeney *et al.* (1993) observaron mayores recuentos de BNF y un flavor sustancialmente más intenso en los quesos Cheddar elaborados con leche CR en comparación con los quesos de leche PA o microfiltrada, por lo que sugirieron que las BNF poseen un papel importante en el desarrollo del flavor. Beuvier *et al.* (1997) encontraron que los quesos tipo Suizo elaborados con leche CR tuvieron mayor sensación picante, mientras que los de leche PA fueron más ácidos y amargos. La sensación de picor de estos quesos fue correlacionada con los ácidos acético y propiónico. En este trabajo las propionibacterias, lactobacilos heterofermentativos y enterococos (todos con mayores recuentos en los quesos de leche CR) fueron correlacionados positivamente con la sensación picante y negativamente con la acidez de los quesos.

Exceptuando la evolución del ácido láctico durante el madurado de un queso de cabra (Trujillo *et al.*, 1999a), no se han publicado datos acerca de los productos de fermentación o de compuestos volátiles en quesos elaborados a partir de leche PR. Drake *et al.* (1997) no observaron diferencias significativas en el flavor, medidas por un panel de catadores entrenados en una escala de diez puntos, de los quesos Cheddar elaborados con leche PA o PR. De igual forma, el análisis sensorial de los quesos de cabra elaborados a partir de leche PR o PA indicó una calidad sensorial muy similar entre ellos (Trujillo *et al.*, 1999a). Por lo tanto, los tratamientos de alta presión aplicados en la leche de quesería no parecen afectar de manera significativa la calidad sensorial de los quesos, aunque existen pocos estudios al respecto.

2.2.8. Textura

Junto con el sabor y aroma, la textura es una de las características del queso que determina su identidad y la aceptabilidad por parte del consumidor. Muchos son los factores que condicionan la textura de un queso, entre ellos los de naturaleza intrínseca como la humedad, proteólisis, pH, materia grasa, sal, y extrínseca como la temperatura, humedad

relativa ambiente y tiempo de maduración (Creamer y Olson, 1982; Amantea, Skura y Nakai, 1986; Yun, Hsieh, Barbano y Kindstedt, 1994; Attaie, Richter y Risch, 1996; Macedo, Malcata y Oliveira, 1997).

Como se ha descrito anteriormente, diversos autores han observado que la leche PA origina quesos con mayor humedad que los elaborados a partir de leche CR (Price y Call, 1969; Bachmann *et al.*, 1998), aunque otros trabajos muestran que la humedad de los quesos de leche PA es similar (Gaya *et al.*, 1990; McSweeney *et al.*, 1993; Beuvier *et al.*, 1997; Ginzinger *et al.*, 1999b) o ligeramente menor (Drake *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1997) que en los quesos de leche CR. Estas variaciones en humedad han sido relacionadas con las diferencias en firmeza observadas en los quesos; a medida que disminuye el contenido de humedad aumenta la firmeza (Creamer y Olson, 1982; Amantea *et al.*, 1986).

Nicol y Robinson (1999) realizaron un análisis de perfil de textura en quesos semiduros elaborados con leche CR y PA, encontrando valores de dureza de 67,54 y 34,99 N, respectivamente. Según los autores, la menor humedad de los quesos de leche CR podría ser responsable en parte de su mayor dureza.

Sin embargo, las diferencias de textura no pueden atribuirse solamente a diferencias en los valores de humedad de los quesos, ya que la ζ_{s14} y η -CN, responsables primarias de la formación de la matriz del queso, son una de las variables que más influyen en la textura. Así, Creamer y Olson (1982) postularon que la pérdida de elasticidad observada en el queso durante la maduración estaba relacionada con el contenido de ζ_{s1} -CN intacta del mismo. Por lo tanto, los fenómenos de degradación proteica provocarían un debilitamiento de la matriz caseínica perdiendo elasticidad, mientras que las pérdidas de humedad que ocurren durante la maduración, aumentan la firmeza del queso.

Por otra parte, las diferencias reológicas encontradas en quesos Cheddar (Amantea *et al.*, 1986; Rosenberg, Wang, Chuang y Shoemaker, 1995) y Manchego (Gómez *et al.*, 1999) elaborados con leche CR o PA han sido atribuidas a interacciones del tipo proteínas séricas-caseínas y a diferencias de humedad y proteólisis. Amantea *et al.* (1986) observaron que las curvas de fuerza-compresión de dos quesos de similar composición, pH y tiempo de maduración fueron afectadas por el tratamiento térmico de la leche. Ellos sugirieron que en los quesos de leche PA, en los que las proteínas de suero forman complejos con las caseínas, se ve disminuida la capacidad de las caseínas de formar una cuajada firme y dando lugar a una textura débil en el queso. Sin embargo, estos autores sólo cuantificaron la proteólisis de los quesos mediante la determinación del contenido de aminoácidos libres y no valorando el contenido de las caseínas intactas.

Rosenberg *et al.* (1995) encontraron que los parámetros viscoelásticos G' (módulo de almacenamiento) y G'' (módulo de pérdida) fueron ambos menores en queso Cheddar de leche

PA que en los elaborados a partir de leche CR, como consecuencia de la mayor proteólisis de los quesos de leche PA.

No existe mucha bibliografía acerca de los atributos texturales de los quesos elaborados a partir de leche PR. Molina *et al.* (2000) emplearon leches PA (65°C, 30 min) y PR (400 MPa, 22°C, 15 min) en la producción de quesos de bajo contenido en grasa, encontrando que los quesos de leche PR fueron más blandos que los de leche PA (8,89 y 20,83 N, respectivamente). Los autores relacionaron estos resultados con los mayores valores de humedad y de proteólisis de los quesos PR, que contribuyeron al debilitamiento de la estructura del queso por medio de la degradación de la matriz proteica (principalmente de la ζ_{s1} -CN).

3. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

**3.1. RENNET COAGULATION PROPERTIES OF RAW,
PASTEURIZED AND HIGH PRESSURE-TREATED GOAT
MILK.**

BUFFA, M., TRUJILLO, A.J. Y GUAMIS, B.
MILCHWISSENSCHAFT, 56 (5), 243-246 (2001c).

Rennet coagulation properties of raw, pasteurised and high pressure-treated goat milk

By M. BUFFA, A.J. TRUJILLO and B. GUAMIS

Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

In this work, rennet coagulation properties (rennet clotting time, rennet curd aggregation and curd firmness) of raw (RA), pasteurised (PA, 72 °C, 15 s) and high pressure-treated (PR, 500 MPa, 15 min at room temperature) milk were assessed on line (in the cheese vat) using a non destructive objective method (Gelograph®-NT). The technological treatments caused an increase ($p < 0.05$) on the rennet clotting time (PR > PA) with respect to RA milk. Pasteurisation did not affect rennet curd aggregation and firmness suggesting that PA milk has the same cross-linking capacity as RA milk. However, both aggregation rate and firmness were higher in PR milks than in RA or PA milks. These results provide interesting information for improving the cheese making capacity of goat milk as high pressure treatment, although the rennet clotting time increased, considerably improved the aggregation rate and curd firmness.

Labgerinnungseigenschaften von roher, pasteurisierter und hochdruckbehandelter Ziegenmilch

In der Untersuchung wurden die Labgerinnungseigenschaften (Labgerinnungszeit, Labbruchaggregation und Bruchfestigkeit) von roher (RA), pasteurisierter (PA, 72 °C, 15 s) und hochdruckbehandelter (PR, 500 MPa, 15 min bei Umgebungstemperatur) Milch on line (in der Käsewanne) unter Verwendung einer nicht destruktiven, objektiven Methodik (Gelograph®-NT) ermittelt. Die technologischen Behandlungen führten zu einer Erhöhung ($p < 0.05$) der Labgerinnungszeit (PR > PA), bezogen auf die RA-Milch. Die Pasteurisierung beeinflusste nicht die Labbruchaggregation und die Bruchfestigkeit, was darauf hinweist, dass PR-Milch die gleiche Quervernetzungskapazität wie RA-Milch besitzt. Demgegenüber waren sowohl die Aggregationsrate als auch die Bruchfestigkeit in PR-Milch höher als in RA- oder PA-Milch. Die Ergebnisse geben interessante Informationen zur Verbesserung der Käseherstellungskapazität von Ziegenmilch, da eine Hochdruckbehandlung trotz Erhöhung der Labgerinnungszeit die Aggregationsrate und die Bruchfestigkeit beträchtlich steigerte.

21 Goat milk (rennet coagulation, high pressure treatment)

21 Ziegenmilch (Labgerinnung, Hochdruckbehandlung)

1. Introduction

Heat treatment is the most frequently used technological process in the industrial processing of milk and dairy products. Almost all dairy products are manufactured from heated milk for specific reasons involving microbial stability and safety, shelf-life extension or technological aspects related to product functionality or quality. The most popular heat treatment applied to cheese milk is pasteurisation. Pasteurisation eliminates the heat-sensitive raw milk microbiota, and generally, attenuates or activates the activity of many indigenous milk enzymes, it also produces slight denaturation of serum proteins and a modification of milk rennetability (1).

There is currently an increased interest in food processing with high hydrostatic pressure as a viable alternative to heating due to microbial inactivation and to the reported beneficial aspects on quality and sensory attributes. High-pressure treatment (HPT) produces modifications on milk proteins, such as fragmentation of casein micelles or aggregation of whey proteins (especially β -lactoglobulin; β -Lg), and on mineral equilibrium (2, 3, 4, 5). Moreover, it has been reported that HPT improves the rennet coagulation and cheese yield properties of milk (6, 7).

One of the very important cheese making steps is the rennet-induced coagulation of milk. In the cheese industry, the optimum cutting time of milk coagulum is determined by the subjective judgement of the cheese maker. Few non-destructive objective methods are available for the measurement of the progress of curd development and curd firmness in the cheese vat (8). Until now, the studies on the rennet coagulation properties

from PR milks are based on laboratory tests (5, 6, 7). However, no data from rennet coagulation properties of PR milk during the real cheese making process is available, although there are considerable differences between laboratory and real conditions.

The objective of the present work was to compare the rennet coagulation properties of raw (RA), pasteurised (PA) and pressure-treated (PR) goat milk, assessed on line (in the cheese vat) by the Gelograph®-NT, during cheese making.

2. Material and methods

2.1 Cheese manufacture

Milk was obtained from a herd of Murciano-Granadina goats. The milk batch was divided into 3 portions. Each of these portions was used for cheese making according to a standard protocol. Goat cheeses were manufactured in 25-L vats from RA, PA (72 °C, 15 s) or PR (500 MPa, 15 min, 20 °C) milks. Milks (18 kg) were heated to 31 °C and then 2% of a lactic starter (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* plus *L. lactis* ssp. *cremoris*; AM Larbus S.A., Barcelona, Spain) was added. Milks were maintained for 10 min at 31 °C. Subsequently 0.025% (v/w) of a solution of 35% (w/w) CaCl_2 (food quality grade), and 0.02% (v/w) calf rennet (Renifor-15/E, Lamirsa, Barcelona, Spain) containing 780 mg chymosin/l, were added. As soon as the calf rennet was added, the probe of the coagulometer was dipped directly into the milk. After 35 min, the coagulum was cut and drained. Further cheese-making operations (moulding, pressing,

salting etc.) were performed in order to finish cheese manufacture, as TRUJILLO *et al.* (7) described. Nine standard cheese productions (uncooked pressed cheese) were made (3 for each group) from RA, PA and PR goat milk.

2.2 Coagulation properties

Rennet coagulation properties (rennet clotting time, RCT; rennet curd aggregation, RCA; curd firmness at 35 min, F₃₅) were evaluated by the Gelograph®-NT. The system is based on the principle of light absorption and scattering in the coagulating milk. Light in the near infrared range is passed through the milk sample and depending on the structure of this, it will be scattered or absorbed to a greater or lesser extent.

2.3 Compositional analyses

Soluble protein content in the milk was calculated after the determination of total, soluble and non-protein nitrogen by Kjeldahl method. The soluble nitrogen at pH 4.6 was determined by the Rowland's method (9). Non-protein nitrogen was determined after precipitation with 12% trichloroacetic acid. Cheese wheys were also analysed for total nitrogen.

2.4 Statistical analysis

Results were processed by an analysis of variance (ANOVA) using the general linear models procedure of SAS® System for WIN™ (6.12 version). The Student-Newman-Keuls test was used for comparison of sample data. Evaluations were based on a significant level of p<0.05.

3. Results and discussion

Figure 1 shows the Gelograph®-NT charts for RA, PA and PR milks obtained online during cheese making. Pasteurisation of goat milk resulted in a significant (p<0.05) increase of the RCT, but the rate of aggregation and firmness were almost unaffected (p<0.05) compared to RA milk, although slightly higher values in firmness were obtained in PA milk (Table 1). These results agree with those obtained by RAYNAL and REMEUF (10).

Table 1: Rennet coagulation properties of raw, pasteurised and high-pressure-treated goat milk

Coagulation properties ¹	RA ²	PA	PR
RCT (min)	7.78 ^C (0.33)	8.85 ^B (0.05)	12.16 ^A (0.50)
RCA (ΔT/min)	0.15 ^B (0.01)	0.15 ^B (0.02)	0.20 ^A (0.01)
F ₃₅ (ΔT)	1.49 ^B (0.14)	1.63 ^B (0.15)	3.11 ^A (0.28)

¹ RCT = Rennet clotting time, RCA = rate of curd aggregation, F₃₅ = curd firmness at 35 min, T = transmittance. ² Means and standard deviation. ABC Means with the same superscripts in the same line do not differ at p<0.05.

The process of curd formation can be explained as a 2-stage reaction of renneting: the enzymatic reaction and the subsequent coagulation stage involving the aggregation of modified micelles by a nonenzymic reaction.

Normally, the RCT of milk increases with the severity of heat treatment. However, there are conflicting reports as to whether the increased RCT is due to impairment of the enzymatic or aggregation reactions, or both. It has been well established that when heated, denatured β-Lg

or β-Lg/α-lactalbumin and κ-casein form a complex by sulphydryl-disulfide interchange (11), which probably delays the action of rennet enzymes via repulsion or steric hindrance slowing the enzymatic phase of coagulation (12). However and according to VAN HOOYDONK *et al.* (13), the delay of the enzymatic phase is not the limiting factor of coagulation, and it is generally agreed that the secondary phase of the renneting process is more adversely affected by heating than the enzymatic phase (11). Denatured whey proteins on the surface of casein micelles sterically hinder the aggregation of rennet-altered micelles, resulting in prolonged RCT.

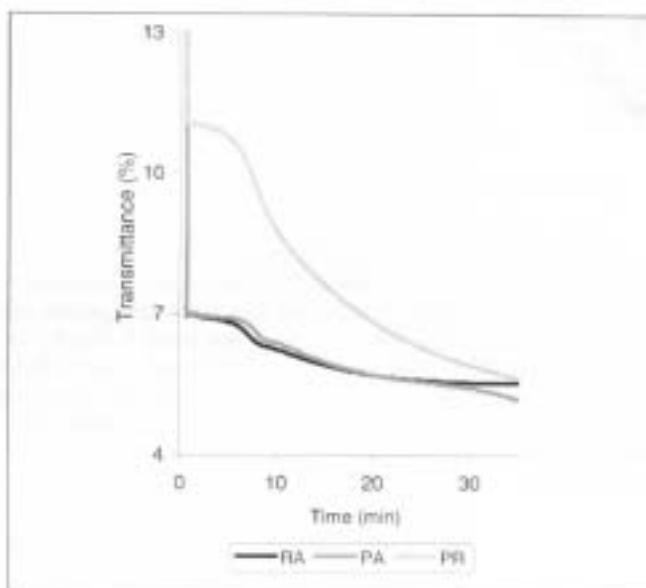


Fig. 1: Typical tracing on the Gelograph®-NT chart from raw, pasteurised and high pressure-treated goat milk

GALLAGHER and MULVIHILL (14) studied the effect of the absence of a free thiol group in β-Lg (which naturally occurs in porcine β-Lg) on the rennet coagulation characteristics. They studied these characteristics in a synthetic bovine milk system following heating. Serum protein-free bovine casein micelles dispersed in synthetic milk salt buffer containing added porcine β-Lg did not induce a typical RCT increase, whereas a similar system containing added bovine β-Lg had a RCT increase. This protein model shows the importance of the disulfide induced complex between bovine β-Lg and κ-casein in causing the large increase in the RCT of heated bovine milk.

Our results show that on monitoring coagulation with Gelograph®-NT only RCT was affected, suggesting that enzymatic phase was delayed but not limited by subsequent aggregation.

Coagulation properties of PR milk during cheese making are shown in Table 1. PR milk showed higher (p<0.05) RCT than PA and RA milks. These results agree with those obtained by LÓPEZ-FANDIÑO and OLANO (15) who evaluated the rennet coagulation properties using a Formagraph® (laboratory scale) on ovine and caprine milks submitted to high pressures.

Differences in rennet coagulation properties of PR milk should be attributed to changes in size and distribution of casein micelles, denaturation of whey proteins and solubilisation of caseins and minerals from casein micelles. Different authors have reported that HPT

causes important whey protein denaturation and micelle disintegration (2, 3, 5). FELIPE *et al.* (3) studied the denaturation of each whey protein in goat milk. These authors reported that pressures between 400 and 500 MPa cause high levels of β -Lg denaturation that are only obtained after a severe heat treatment of 80 °C for 10 min. As β -Lg is the main constituent of whey protein, almost 50% of total whey protein became irreversibly aggregated above 400 MPa.

Analysis of nitrogen fraction of milks showed that pasteurisation and HPT produced a decrease in the soluble protein content of 20.4 and 44.3%, respectively. In addition, the diminution in total nitrogen of cheese wheys obtained from PA and PR milks (11.76 and 17.65%, respectively) compared to RA milk indicated that whey proteins were partially incorporated into the gel network.

The increase in RCT observed for PR milk is certainly related to soluble protein denaturation. NEEDS *et al.* (5) using an -SH blocking agent provided indirect evidence that, in bovine skim milk, pressure causes β -Lg bind to the surface of micelles via an interaction with κ -casein. However, it is also possible that large aggregates of β -Lg formed during HPT interfere in the aggregation of renneted micelles, slowing down the aggregation phase of coagulation (3).

As for heat treatment, it is not known whether the increased RCT of PR milk is due to impairment of the enzymic or aggregation phases, or both. LÓPEZ-FANDINO *et al.* (6) measured the caseinomacropeptide release in

PR bovine milk and in a model system (mixtures of β -Lg and κ -casein), and found that the enzymic phase of the coagulation process was inhibited by prior pressure processing of milk or the model system. However, NEEDS *et al.* (5) in bovine skim milk showed that the rate of caseinomacropeptide release is constant, and therefore only the aggregation phase of rennet coagulation is negatively affected by pressure treatment.

Rennet curd obtained from PR goat milk had a higher ($p < 0.05$) rate of coagulation and firmness than PA and RA milks (Table 1). It is well known that HPT causes disruption of casein micelles (2, 16, 17). JOHNSTON *et al.* (16) found a diminution in the lightness (related to changes in micelle size) of bovine skim milk treated by high pressure up to 300 MPa. An effect of HPT on liquid milk, derived from micelle disintegration, is the change in appearance. The milk becomes less capable of scattering light and hence appears more translucent. The high value of transmittance observed for PR milk in Fig. 1 indicates that high pressure-induced micelle disintegration.

LAW *et al.* (17) showed, by ultracentrifugation and electron microscopy techniques, that HPT of goat milk at 20 °C causes disintegration of micelles into smaller particles and causes an increase in the amount of serum casein.

The increase in the number of protein particles, due to micelle disruption and β -Lg denaturation produced by HPT, increases the surface area and consequently the potential bonds available for micelle aggregation.

milchwissenschaft MILK SCIENCE INTERNATIONAL

Your journal for nutrition research and food science
is available

In the Internet since January 2001

The whole journal for downloading

Internet subscription per year DM 400,--
or as combination offer: Internet DM 300,-- + printed version 430,--

Further information: Tel. +49-89/714 10 13, Fax +49-89/719 27 53
e-mail: vv-verlag@t-online.de, Internet: <http://www.vv-verlag.de>

This should explain the higher firmness values obtained in curd from PR milks. Moreover, other authors (18, 19) have reported that smaller micelles form firmer rennet curds than larger micelles, due to the fact that small micelles fuse more closely than larger micelles which leads to a more continuous and closely gel network. Similar results have been obtained by REMEUF (20) studying the influence of genetic polymorphism of caprine α_{s1} -casein (variants A, E and F) on coagulation properties of goat milk. α_{s1} -Casein variant has a marked influence on micellar size (A < E and F). As far as technological properties are concerned, the most important differences observed by the authors were the rennet curd firmness (A > E > F) and rate of aggregation (A > E and F).

However, the high RCA value obtained for PR goat milk is uncertain. According to NEEDS *et al.* (5) two main opposing mechanisms operated to control RCA: 1. there is a direct effect of pressure in reducing micelle size, which results in their rapid aggregation, and 2. the increase of β -Lg denaturation reduces the aggregation rate counteracting the effects derived from the reduction in micelle size and explaining the negative effects of high pressure (400–600 MPa) on the RCA observed by these authors in cow milk.

The effect of pressurizing on the RCA behaviour in cow and goat milks might be the result of important differences on a physicochemical level. Caprine micelles are more mineralised, contain more β -casein and are less hydrated than their bovine counterparts (21). Furthermore, they possess much lower colloidal stability, which could lead to a higher degree of micelle aggregation than in cow milk (13). On the other hand, goat milk contains more soluble casein than cow milk, and non-sedimentable casein particularly rich in κ -casein (21).

LOPEZ-FANDINO *et al.* (4) found that in cow milk, percentages of pressure-released individual caseins are in the order β -> κ -> α_{s1} -> α_{s2} -caseins, while in goat milk dissociation rates are κ -> β -> α_{s1} -> α_{s2} -caseins. In addition to the lower colloidal stability of caprine micelles, the pressure-dissociation of caprine casein (especially of κ -casein) might increase the proportion of small size particles with improved aggregation properties. However, further work is necessary to clarify the mechanism of high pressure-favoured micelle aggregation in goat milk.

4. Conclusions

Rennetability of goat milk was not impaired by pasteurisation, although RCT of PA milk was slightly higher than RA milk.

PR milk had higher RCT than PA and RA milks, but also higher aggregation rates and firmness. The present results show that HPT is a promising way of improving rennet coagulation properties of goat milk as it had only minor effects on the RCT while it improved the curd aggregation and firmness.

5. References

- GRAPPIN, R., BEUVIER, E.: *Int. Dairy J.* **7** 751–761 (1997)
- SHIBAUCHI, Y., YAMAMOTO, H., SAGARA, Y.: In *High Pressure and Biotechnology*. (Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, P. Masson) John Libbey Eurotext Ltd., Paris, 239–241 (1992)
- FELIPE, X., CAPELLAS, M., LAW, A.J.R.: *J. Agric. Food Chem.* **45** 627–631 (1997)
- LÓPEZ-FANDINO, R., FUENTE, M.A. DE LA, RAMOS, M., OLANO, A.: *J. Dairy Res.* **65** 69–78 (1998)
- NEEDS, E.C., STENNING, R.A., GILL, A.L., FERRAGUT, V., RICH, G.T.: *J. Dairy Res.* **67** 31–42 (2000)
- LÓPEZ-FANDINO, R., RAMOS, M., OLANO, A.: *J. Agric. Food Chem.* **45** 3233–3237 (1997)
- TRUJILLO, A. J., ROYO, C., GUAMIS, B., FERRAGUT, V.: *Milchwissenschaft* **54** (4) 197–199 (1999)
- HOOYDONK, A.C.M. VAN, BERG, G. VAN DEN: *IDF Bull.* **225** 2–10 (1988)
- ROWLAND, S.J.: *J. Dairy Res.* **9** 42–46 (1938)
- RAYNAL, K., REMEUF, F.: *Int. Dairy J.* **8** 695–706 (1998)
- LUCEY, J. A.: In *Heat-Induced Changes in Milk* (Ed. P. F. Fox) IDF, Brussels, 171–187 (1995)
- PARK, S. Y., NAKAMURA, K., NIKI, R.: *J. Dairy Sci.* **79** 2137–2145 (1996)
- HOOYDONK, A.C.M. VAN, KOSTER, P.G., BOERRIGTER, I.J.: *Neth. Milk Dairy J.* **41** (1) 3–18 (1987)
- GALLAGHER, D.P., MULVIHILL, D.M.: *Int. Dairy J.* **7** 221–228 (1997)
- LÓPEZ-FANDINO, R., OLANO, A.: *Lait* **78** 341–350 (1998)
- JOHNSTON, D.E., AUSTIN, B.A., MURPHY, R.J.: *Milchwissenschaft* **47** (12) 760–763 (1992)
- LAW, A.J.R., LEAVER, J., FELIPE, X., FERRAGUT, V., PLA, R., GUAMIS, B.: *J. Agric. Food Chem.* **46** 2523–2530 (1998)
- NIKI, R., ARIMA, S.: *Jap. J. Zootech. Sci.* **55** 409–415 (1984)
- FORD, G.D., GRANDISON, A.S.: *J. Dairy Res.* **53** 129–133 (1986)
- REMEUF, F.: *Lait* **73** 549–557 (1993)
- REMEUF, F., LENOIR, J., DUBY, C.: *Lait* **69** 499–518 (1989)

**Suchen Sie Ihre Mitarbeiter weltweit
mit einer Stellenanzeige
in der internationalen Fachzeitschrift**

milchWissenschaft
MILK SCIENCE INTERNATIONAL

3.2. *MICROBIOLOGICAL CHANGES THROUGHOUT RIPENING OF GOAT CHEESE MADE FROM RAW, PASTEURIZED AND HIGH-PRESSURE TREATED MILK.*

BUFFA, M., GUAMIS, B., ROYO, C. Y TRUJILLO, A.J.

FOOD MICROBIOLOGY, 18, 45-51 (2001b).



ORIGINAL ARTICLE

Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk

M. Buffa, B. Guamis, C. Royo and A. J. Trujillo*

The bacteriological quality during ripening of raw (RA), pasteurized (PA; 72°C, 15 s) and pressure-treated (PR; 500 MPa, 20°C, 15 min) goat milk assessed by enumeration of total bacteria, psychrotrophic bacteria, Enterobacteriaceae, lactobacilli, enterococci, Micrococcaceae and lactococci was evaluated. The high pressure treatment applied was as efficient as pasteurization in reducing the bacterial population of milk. Experimental cheeses were made from RA, PA and PR milks to study the microbial population during ripening. Lactobacilli and lactococci were the predominant microbiota present during ripening in all the cheeses. There were no differences in numbers of starter bacteria during ripening. However, lactobacilli counts for RA milk cheese were significantly higher than for PA and PR cheeses in all the ripening stages studied. Micrococcaceae and enterococci remained at a secondary level, and no differences were observed between cheeses at the end of ripening. On the other hand, the number of Enterobacteriaceae decreased during ripening, but faster in PR milk cheese than in PA and RA milk cheeses. The results of this study suggest that goat cheese made from PR milk had similar microbiological characteristics to PA milk cheeses.

© 2001 Academic Press

Introduction

In general, milk is an excellent medium for growth of many micro-organisms. Microbial growth produces a loss of milk quality, and sometimes this growth could reach levels that make the milk processing or consumption impossible. To avoid this, different microbial inactivation processes have been used. Heat treatment is the oldest and most widely used technological process applied to milk. The heat treatment usually applied to cheese milk is pasteurization. The principal purpose of pas-

teurization is the elimination of pathogens which can be present in milk. So for hygienic reasons, most cheeses are produced from pasteurized (PA) milk. However, some researchers have found differences between cheeses made from raw (RA) and PA milk; cheeses made from RA milk tend to develop a stronger flavour and generally ripen faster than cheeses made from PA milk, due to inactivation of enzymes and destruction of the heat sensitive microbiota by the pasteurization treatment (Grappin and Beuvier 1997). RA milk cheeses represent a significant proportion of ripened cheeses produced in Mediterranean countries. For example, goat's cheese is highly valued for its peculiar sensory characteristics, especially if produced from RA milk.

*Corresponding author. Fax: +34 93581 2006.
E-mail: toni.trujillo@uah.es

Received
25 May 2000

Tecnología dels
Aliments (CeRTA),
Facultat de Veterinària,
Universitat Autònoma
de Barcelona,
08193 Bellaterra,
Spain

New technologies, such as high hydrostatic pressure, can be applied to the preservation of foods (Cheftel 1992). As long ago as 1899, Hite studied the effect of high pressure treatment (HPT) on milk, but technological problems and the inability to work on a large scale prevented the technological development of this technique.

One of the principal goals of HPT is to produce a significant decrease in microbial number without causing negative effects on flavor or nutritional components. However, high pressure produces modifications of milk proteins, such as fragmentation of casein micelles, aggregation of whey proteins (especially β -lactoglobulin), and changes in mineral equilibria (Shibauchi et al. 1992, López-Fandiño et al. 1996, Felipe et al. 1997, López-Fandiño et al. 1998, Needs et al. 2000). Moreover, it has been reported that HPT improves the rennet coagulation and cheese-yield properties of milk (Drake et al. 1997, Trujillo et al. 1999a).

The effect of HPT of milk on cheese yield, sensory and microbiological quality of Cheddar cheese was studied by Drake et al. (1997). They reported a comparable microbiological quality (coliforms, psychrotrophs and total counts) of PA and high pressure-treated (PR) milk cheeses and no detrimental effects of HPT on cheese flavour. Trujillo et al. (1999a) compared the physicochemical characteristics of PA and PR goat milk, and evaluated the efficiency and yield of production of cheese made from both types of milk. These authors also studied the consequences and possible implications of HPT on the ripening process of the cheeses (Trujillo et al. 1999b). Some differences, mainly in proteolysis, were detected between PA and PR milk cheeses. These differences were attributed to physicochemical alterations of milk induced by the HPT and/or to the role of the different microbial groups present in the milks after the technological treatments applied. However, the microbial conditions of the milks or cheeses were not studied in depth.

The objectives of the present work were to study the microbiological changes that occur in milk after pasteurization and HPTs, and to compare the microbial groups most relevant during ripening of goat cheese made from RA, PA or PR milk.

Materials and Methods

Cheese manufacture

Milk was obtained from a herd of Murciano-Granadina goats. Goat cheeses were manufactured in 25-l vats following the protocol described previously by Trujillo et al. (1999a) from RA, PA (72 °C, 15 s) and PR milk (500 MPa, 15 min at 20 °C) from the same milk batch. Milk (18 kg) was heated to 32 °C, and a 2% lactic starter (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* plus *L. lactis* spp. *cremoris*; AM Larbus S.A., Barcelona, Spain) was added. Subsequently, 35% (w/w) CaCl₂ and calf rennet (Renifor-15/E, Lamirsa, Barcelona, Spain) were added at 0.025% (v/v) and 0.02% (v/v), respectively. After the coagulation, the curd was cut, molded, pressed and salted by immersion in brine. Cheeses were ripened in a chamber at 14 °C and 85% relative humidity. Cheese manufacture was performed in four separate experiments.

Compositional analyses

The 1- and 45-day-old cheeses were analysed for total solids, fat, protein, salt, pH and total free amino acids by standard methods, as described by Trujillo et al. (1999a, b).

Microbiological analyses

Milk. The microbiological quality of the different milks was assessed by enumerating the following micro-organisms:

- Total bacteria on plate count agar (PCA) medium (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) incubated for 72 h at 30 °C.
- Psychrotrophic bacteria on PCA medium (Oxoid) incubated for 10 days at 7 °C.
- Enterobacteriaceae on violet red bile glucose agar (VRBGA) medium (Biokar Diagnostics, Bioser SA, Barcelona, Spain) incubated for 24 h at 37 °C in micro-aerophilia.
- Lactobacilli on Rogosa agar (LBS) medium (Biokar Diagnostics) incubated for 72 h at 30 °C in microaerophilia (McSweeney et al. 1993).
- Enterococci on kanamycin aesculin azide agar (KAA) medium (Oxoid) surface plated

- and incubated for 48 h at 37°C (Beuvier et al. 1997).
- Micrococcaceae on mannitol salt agar (MSA) medium (Biokar Diagnostics) surface plated and incubated for 72 h at 30°C.

The detection limit was 1 cfu ml⁻¹ milk, except for KAA and MSA media which was 10 cfu ml⁻¹ milk.

Cheese

The same populations were enumerated in cheese except for the psychrotrophic bacteria. In addition, counts of lactococci on M17 medium (Biokar Diagnostics) incubated for 48 h at 30°C were made.

The above-mentioned micro-organisms were counted throughout the ripening period (1, 15, 30 and 45 days).

Ten grams of cheese were cut aseptically and then dissolved in 90 g of 4% (w/v) citrate solution at 40°C to achieve an initial 10⁻¹ cheese dilution. Further decimal dilutions were made with 1% diluted Ringer solution. All of the analyses were performed in duplicate. The detection limit was 10 cfu g⁻¹ cheese, except for KAA and MSA media which was 100 cfu g⁻¹ cheese.

Statistical analysis

Results were analysed by an analysis of variance (ANOVA) using the general linear models procedure of Statistical Analysis Sys-

tem (SAS, 6.12 version). Student-Newman-Keuls test was used for comparison of sample data. Evaluations were based on a significant level of $P < 0.05$.

Results and Discussion

Milk

Raw milk used in cheesemaking had total counts of 8.1×10^5 cfu ml⁻¹. Similar counts have been observed in goat milk by Fontecha et al. (1990), although higher and lower values have been reported by other authors (Medina et al. 1992, Mor-Mur et al. 1994, Tornadillo et al. 1995).

Total count values of PA milk depend on the initial number of bacteria present in RA milk. Faticchini et al. (1979) reported a total count of 7×10^5 cfu ml⁻¹ for PA goat milk used in cheesemaking, and Gómez et al. (1989) found values from 5×10^3 to 5.6×10^4 cfu ml⁻¹ in similar milks. These results agree with values obtained in our study (Table 1).

The high pressure resistance of micro-organisms is variable. Generally, Gram-positive bacteria are more resistant to pressure than Gram-negative bacteria (Cheftel 1992). The resistance to pressure is also determined by the shape of cells; the most sensitive bacteria are rod-shaped and the most resistant are spheres (Ludwing and Schreck 1997).

As observed for PA milk, there was a significant reduction in total counts for PR milk (Table 1). Psychrotrophic bacteria were one of

Table 1. Bacterial counts (cfu ml⁻¹) of micro-organisms in raw, pasteurized and pressure-treated cheese milks.

Microbiota	Treatment		
	Raw	Pasteurized	Pressure-treated
Total bacteria	8.1×10^5 ^a	4.6×10^3 ^b	4.9×10^3 ^b
Psychrotrophic bacteria	7×10^5 ^a	<10 ^b	10 ^b
Esterobacteriaceae	6.9×10^4	ND ²	ND
Lactobacilli	2.3×10^3	ND	ND
Micrococcaceae	2.1×10^3 ^a	310 ^b	32 ^b
Enterococci	6×10^3 ^a	14 ^b	<10 ^b

Values presented are means of duplicate analyses from four independent experiments ($n = 8$).
ND: not detected.

^{a, b} Different superscripts within rows indicate significant differences ($P < 0.05$).

the most important groups found in RA milk (7×10^5 cfu ml $^{-1}$) in agreement with other authors (Mor-Mur et al. 1994). Goat milk is frequently stored under refrigeration for several days because goat farms usually have a low production volume. Storage of RA milk under refrigeration allows psychrotrophic bacteria to grow, especially *Pseudomonas* spp. Different authors have studied the pressure resistance of *Pseudomonas fluorescens* as an indicator for *Pseudomonas* spp (Gerville et al. 1997, Gerville et al. 2000). These studies showed that *P. fluorescens* is quite barosensitive and easily inactivated. In accordance with these observations, the number of psychrotrophic bacteria found in PR milk was extremely low (10 cfu ml $^{-1}$; Table 1). Similar counts were obtained in PA milk showing that psychrotrophic bacteria was sensitive to the heat treatment applied.

Enterobacteriaceae counts are widely used as a contamination index. An elevated number in milk indicates deficient handling during milking and collection. For RA milk, counts of 6.9×10^3 cfu ml $^{-1}$ were obtained, and these values are in accordance with those described by Mor-Mur et al. (1994). Inactivation of *Escherichia coli* (a member of Enterobacteriaceae family) after HPT has been studied by many authors (Gerville et al. 1997). Drake et al. (1997) studied the effect of milk pressurization on the microbiological and sensory qualities of Cheddar cheese. A treatment of three 1-min cycles at 586 MPa was used to process milk for cheese production. These authors reported a similar number of coliforms for PR and PA milks. In our study, Enterobacteriaceae were not detected in either PA or PR milks (Table 1).

Lactobacilli have a very important role in the development of many milk products, such as yogurt and ripened cheese. In our study, 2.3×10^3 cfu ml $^{-1}$ of lactobacilli were counted in RA milk. These values are higher than those reported by Medina et al. (1992), but lower than those obtained by Fontecha et al. (1990): 5.2×10^2 and 10^4 cfu ml $^{-1}$, respectively. However, lactobacilli were not detected in milk after pasteurization or pressurization (Table 1). The behaviour of lactobacilli submitted to high pressure has been studied by Gerville et al. (1999). They observed that the inactivation

rates of *Lactobacillus helveticus* inoculated into ovine milk increased linearly with pressure (from 200 to 500 MPa) and exposure time (from 5 to 15 min) up to non-detectable levels.

Micrococcaceae were present in RA milk at the same level as lactobacilli (Table 1). However, higher numbers ($3-4 \times 10^4$ cfu ml $^{-1}$) have been reported by Tornadillo et al. (1995) in RA goat milk. The family Micrococcaceae includes the genera *Micrococcus*, *Staphylococcus* and *Plano-coccus*. *Micrococcus* has some technological interest, as it has been evaluated for reducing the ripening time of Cheddar cheese (Bhowmik et al. 1990). Because *S. aureus* and its enterotoxins have caused many cases of foodborne illness, inactivation of the organism by high pressure has been investigated. Gerville et al. (1999) reported that inactivation of *S. aureus* inoculated into ovine milk increased with pressure and exposure time. A treatment of 500 MPa at 50°C for 15 min reduced the *S. aureus* number from approximately 10^7 cfu ml $^{-1}$ to undetectable levels. Values of Micrococcaceae found in PR milk (Table 1) were lower than those obtained in PA milk.

The number of enterococci found in RA goat milk was 6×10^3 cfu ml $^{-1}$. Higher counts of this bacterial group have been described by Fontecha et al. (1990), although lower values have been reported by Medina et al. (1992): 10^3 and 3×10^2 cfu ml $^{-1}$, respectively. Enterococci are able to resist harsh conditions, e.g. freezing, drying and some thermal treatments. For this reason, they are sometimes used as a contamination index. Surprisingly, until now no data on the baroresistance of enterococci have been published. We have observed a significant ($P < 0.05$) reduction in the numbers of enterococci after milk pressurization, comparable to the reduction after pasteurization treatment (Table 1).

Results obtained in the microbiological analysis of milks showed that the HPT applied was as efficient as pasteurization in reducing the bacterial populations studied.

Cheese

Compositional analyses. The composition of the RA, PA and PR milk cheeses after 1 and 45 days of ripening was within the normal ranges

Table 2. Composition of goat cheeses made from raw, pasteurized and pressure-treated milks after 1 and 45 days of ripening.

	Treatment		
	Raw	Pasteurized	Pressure-treated
Day 1			
pH	5.09 ± 0.09	5.05 ± 0.09	5.09 ± 0.06
TS (%)	46.04 ^a ± 2.75	45.14 ^b ± 2.24	43.56 ^c ± 2.72
Fat (%)	24.69 ± 2.05	24.31 ± 2.45	24.19 ± 2.59
TN (%)	2.47 ± 0.23	2.63 ± 0.13	2.57 ± 0.25
NaCl (%)	0.91 ± 0.23	0.88 ± 0.15	0.9 ± 0.15
FAA	0.86 ^b ± 0.37	1.01 ^{ab} ± 0.46	1.15 ^a ± 0.66
Day 45			
pH	4.9 ^b ± 0.07	5.03 ^a ± 0.12	4.98 ^a ± 0.07
TS (%)	61.86 ^a ± 2.22	61.63 ^a ± 1.67	60.33 ^b ± 0.46
Fat (%)	33.81 ± 3.86	33.5 ± 3.46	32.5 ± 1.87
TN (%)	3.88 ± 0.39	3.79 ± 0.13	3.71 ± 0.09
NaCl (%)	1.29 ± 0.29	1.28 ± 0.19	1.25 ± 0.04
FAA	18.4 ^b ± 8.25	21.78 ^b ± 6.7	23.91 ^a ± 8.07

Values are means of duplicate analyses from four independent experiments ($n=8$).

TS: Total solids.

TN: Total nitrogen.

FAA: free amino acids (mg Leu g⁻¹ cheese).

^{a, b, c} Different superscripts within rows indicate significant differences ($P<0.05$).

for goat cheese (Table 2). However, some differences between cheeses were observed; the PR milk cheeses had higher moisture content than RA or PA milk cheeses. Moreover, total free amino acid content was higher in PR milk cheeses than RA or PA milk cheeses. These findings agree with those of Trujillo et al. (1999a).

Microbiological analyses

Fig. 1 shows the average results of the major groups of micro-organisms of cheeses made from RA, PA and PR milk during ripening.

Independently of the kind of milk, the number of total micro-organisms in the three types of cheeses were quite similar (approximately 3.2×10^9 cfu g⁻¹ cheese) (Fig. 1(a)). This elevated number denotes the influence of the starter bacteria inoculated into the cheese milk. In accordance with other studies (McSweeney et al. 1993), starter counts decreased during ripening by 1–2 log cycles in 45 days. Lactic acid bacteria counts in M17 medium (lactococci) showed closed values to those found for total bacteria, and no differences ($P<0.05$) at the beginning or at the end of

ripening were observed between cheeses (Fig. 1(b)).

Several authors have reported that non-starter lactic acid bacteria grow during cheese ripening. They are able to multiply in ripened cheese by up to about 10^7 – 10^8 cfu g⁻¹ in RA milk cheeses, 1 or 2 log units more than PA (McSweeney et al. 1993, Beuvier et al. 1997). The number of lactic bacteria in LBS medium (*Lactobacillus* spp.) found in our study was similar ($P<0.05$) for PA and PR milk cheeses (approximately 10^3 cfu g⁻¹), but lower ($P<0.05$) than RA milk cheeses (approximately 10^6 cfu g⁻¹). In all cases their numbers increased further during ripening (Fig. 1(c)). Probably, the higher counts found in RA milk cheeses are a reflection of the higher numbers of lactobacilli in RA milk.

Lactobacilli and *Enterobacteriaceae* were not present in PA and PR milks, but appeared in both cheeses. The presence of these micro-organisms in the cheeses may be due to environmental contamination and handling during cheesemaking. Cheeses made from PA or PR milks contained almost 10^2 cfu g⁻¹ of *Enterobacteriaceae*. This number decreased to non detectable levels in 30 and 45 days for PR and PA

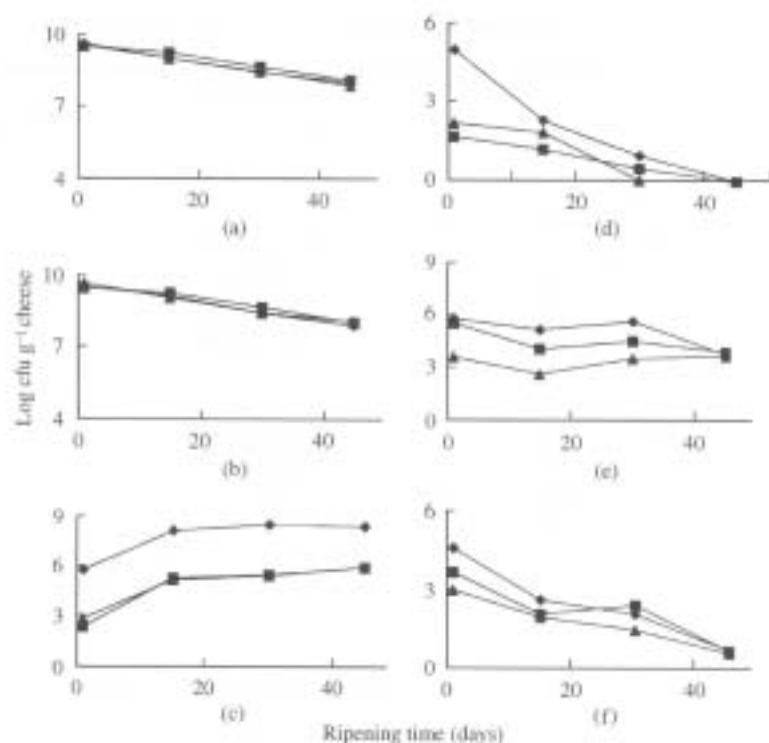


Figure 1. Results ($\log \text{cfu g}^{-1}$ cheese) of total counts (a), lactococci (b), lactobacilli (c), Enterobacteriaceae (d), enterococci (e) and Micrococcaceae (f) during ripening in goat cheese made from raw (◆), pasteurized (■) and pressure-treated (▲) milk. Each point is the mean of duplicate analyses from four independent experiments ($n=8$).

milk cheeses, respectively. The RA milk cheeses contained the highest ($P<0.05$) number of enterobacteria at day 1, then they also decreased to non detectable levels at day 45 (Fig. 1(d)). The decline of these micro-organisms could be due to the development of unfavourable growth conditions during cheese ripening (e.g. decrease in A_w and pH). Similar behaviour has also been observed by different authors in some goat milk cheeses, for example in Gredos (Medina et al. 1992) and Cendrac del Montsec (Mor-Mur et al. 1994) cheeses.

The presence of enterococci in PR or PA milk cheeses also was the result of contamination during cheesemaking. At day 1, enterococci were present in RA and PA milk cheeses in higher quantities (10^5 cfu g^{-1}) than in PR milk cheeses ($3.2 \times 10^3 \text{ cfu g}^{-1}$), and generally, they remained stable or showed a slight decrease during ripening (Fig. 1(e)).

However, no differences ($P<0.05$) were observed between cheeses at the end of ripening.

Enterococci are able to grow under low A_w conditions, with the presence of salt and within a relatively wide range of temperatures. The technological importance of this group of bacteria is linked to its acidification power, the capacity to use citrate and its proteolytic, lipolytic and esterolytic activities (Menéndez et al. 1998). These properties suggest that enterococci may participate in cheese ripening.

The Micrococcaceae also may have a beneficial role in cheese ripening because, like the Enterococci, they also provide proteolytic, lipolytic and esterolytic activities (Bhowmik and Marth 1990). At the beginning of ripening, RA milk cheese had higher ($P<0.05$) counts (nearly $1 \times 10^5 \text{ cfu g}^{-1}$) than PA or PR milk cheeses (1×10^4 and 10^3 cfu g^{-1} , respectively). The counts of all cheeses generally fell during ripening (Fig. 1(f)), and no differences were observed between cheeses at the end of ripening.

In general, the counts obtained for the microbial groups studied in PR cheeses were

very similar to PA cheeses. These results suggest that it is possible to apply HPT to milk for making cheese of satisfactory hygienic quality.

References

- Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S. and Duboz, G. (1997) Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *Int. Dairy J.* **7**, 311–323.
- Bhowmik, T. and Math, E. H. (1990) Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* **73**, 859–866.
- Bhowmik, T., Riesterer, R., Van Boekel, M. A. J. S. and Marth, E. H. (1990) Characteristics of low-fat Cheddar cheese made with added *Micrococcus* or *Pediococcus* species. *Milchwissenschaft* **45**, 230–235.
- Cheftel, J. C. (1992) Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In *High Pressure and Biotechnology*. (Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson) pp. 195–209. Montrouge, John Libbey Eurotex.
- Drake, M. A., Harrison, S. L., Asplund, M., Barbosa-Canovas, G. and Swanson, B. G. (1997) High pressure treatment of milk and effects on microbiological and sensory quality of Cheddar cheese. *J. Food Sci.* **62**, 843–845.
- Faticanti, F., Deiana, P., Farris, G. A. and Soggia, G. (1979) Études microbiologiques sur le lait et fromage de chèvre en Sardaigne. Note II: streptocoques, lactobacilles et Leuconostoc. *Lait* **58**, 387–400.
- Felipe, X., Capellas, M. and Law, A. J. R. (1997) Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 627–631.
- Fonterocha, J., Peláez, C., Juárez, M., Requena, T., Gómez, C. and Ramos, M. (1990) Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J. Dairy Sci.* **73**, 1150–1157.
- Gervilla, R., Felipe, X., Ferragut, V. and Guamis, B. (1997) Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in ovine milk. *J. Dairy Sci.* **80**, 2297–2303.
- Gervilla, R., Sendra, E., Ferragut, V. and Guamis, B. (1999) Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* in ovine milk subjected to high hydrostatic pressure. *J. Dairy Sci.* **82**, 1099–1107.
- Gervilla, R., Ferragut, V. and Guamis, B. (2000) High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk at different fat content. *J. Dairy Sci.* **83**, 674–682.
- Gómez, R., Peláez, C. and De la Torre, E. (1989) Microbiological study of semi-hard goat's milk cheese (Majorero). *Int. J. Food Sci. and Technol.* **24**, 147–151.
- Grappin, R. and Beuvier, E. (1997) Possible implication of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int. Dairy J.* **7**, 751–761.
- Hite, B. H. (1899) The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull. West Virginia Univ. Agric. Exp. Sta.* **58**, 15–35.
- López-Fandiño, R., Carrascosa, A. V. and Olano, A. (1996) The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *J. Dairy Sci.* **79**, 929–936.
- López-Fandiño, R., de la Fuente, M. A., Ramos, M. and Olano, A. (1998) Distribution of minerals and proteins between the mineral phases of pressurized milks from different species. *J. Dairy Res.* **65**, 69–78.
- Ludwing, H. and Schreck, Ch. (1997) The inactivation of vegetative bacteria by pressure. In *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*. (Ed. Karel Heremans), pp. 221–224. Leuven, Leuven University Press.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Lucey, J. A., Jordan, K. N. and Cogan, T. M. (1993) Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* **3**, 613–634.
- Medina, M., Gaya, P. and Nuñez, M. (1992) Gredos goat's milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *J. Dairy Res.* **59**, 563–566.
- Menéndez, S., Centro, J. A., Godínez, R. and Rodríguez-Otero, J. L. (1998) Some technological properties and enzymatic activities of strains of *Enterococcus faecalis* isolated from Cebreiro cheese. *Alimentaria* **296**, 59–64.
- Mor-Mur, M., Carretero, C., Pla, R. and Guamis, B. (1994) Microbiological changes during ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. *Food Microbiol.* **11**, 177–185.
- Needs, E. C., Stanning, R. A., Gill, A. L., Ferragut, V. and Rich, G. T. (2000) High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *J. Dairy Res.* **67**, 31–42.
- Shibauchi, Y., Yamamoto, H. and Sagara, Y. (1992) Conformational changes of casein micelles by high pressure treatment. In *High Pressure and Biotechnology*. (Eds. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson) pp. 239–241. Paris, John Libbey Eurotext Ltd.
- Tornadillo, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., Martín Sarmiento, R. and Carballo, J. (1995) Microbial changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait* **75**, 551–570.
- Trujillo, A. J., Rojo, C., Guamis, B. and Ferragut, V. (1999a) Influence of pressurization on goat milk and cheese composition and yield. *Milchwissenschaft* **54**, 197–199.
- Trujillo, A. J., Rojo, C., Ferragut, V. and Guamis, B. (1999b) Ripening profiles of goat cheese produced from milk treated with high pressure. *J. Food Sci.* **64**, 833–837.

3.3. PROTEOLYSIS IN GOAT CHEESE MADE FROM RAW, PASTEURIZED OR PRESSURE-TREATED MILK.

**TRUJILLO, A.J., BUFFA, M., CASALS, I., FERNÁNDEZ, P. Y GUAMIS, B.
INNOVATIVE FOOD SCIENCE AND EMERGING TECHNOLOGIES,
3, 309-319 (2002)**



ELSEVIER

Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk[☆]

A.J. Trujillo^{a,*}, M. Buffa^a, I. Casals^b, P. Fernández^b, B. Guamis^a

^aTecnologia dels Aliments, Centre Especial de Recerca Planta Pilot Tecnologia dels Aliments (CeRTA, Xit),

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^bServeis Científico-Tècnics, Unitat de Tècniques Separatives, Josep Samitier 1-5, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Received 12 December 2001; accepted 24 April 2002

Abstract

Primary and secondary proteolysis of goat cheese made from raw (RA), pasteurized (PA; 72 °C, 15 s) and pressure-treated milk (PR; 500 MPa, 15 min, 20 °C) were examined by capillary electrophoresis, nitrogen fractionation and HPLC peptide profiles. PA milk cheese showed a more important hydrolysis ($P < 0.05$) of α_{s1} -casein than RA milk cheese at the first stages of ripening (15 days), while PR milk cheese had a level between those seen in PA and RA milk cheeses. Degradation of β -casein was more important ($P < 0.05$) in PA and PR than in RA milk cheeses at 15 days of ripening. However, from thereon β -casein in PR and RA milk cheeses was hydrolyzed at essentially similar rates, but at lower rates ($P < 0.05$) than in PA milk cheeses. Pressure treatment could induce proteolysis of β -casein in a way, which is different from that produced by heat treatment. There was an increase in 4.6-soluble nitrogen (WSN) and in trichloroacetic acid (TCASN) throughout ripening in cheeses, but higher contents ($P < 0.05$) in PA and PR milk cheeses at the end of ripening were observed. PR milk cheeses contained considerably higher content ($P < 0.05$) of free amino acids than RA or PA milk cheeses. In general, heat and pressure treatments had no significant effect on the levels of hydrophobic and hydrophilic peptides.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: High pressure; Goat milk cheese; Proteolysis

Industrial relevance: Pressure treatment of milk prior to cheese processing as well as pressure treatment of cheeses had been studied previously for processing of raw milk cheeses and for accelerating ripening respectively. The present paper is of special interest because it assesses and compares the degree of proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure treated milk. Although effects were related to high pressure or to heat treatment respectively no significant differences were observed in the levels of hydrophobic and hydrophilic peptides. This may prove relevant for novel food approval since substantial equivalence between heat and pressure treated products may be maintained.

1. Introduction

Cheese ripening involves several biochemical processes including proteolysis, lipolysis and glycolysis. Proteolysis is the principal and most complex biochem-

ical event occurring during the ripening process of most cheese varieties (Fox, 1989; Grappin & Beuvier, 1997). Hydrolysis of cheese proteins leads to the formation from large water-insoluble peptides (comparable in size to intact caseins) and medium and small-soluble peptides to free amino acids. Proteolysis contributes to cheese ripening through a direct contribution to flavor via the formation of peptides and amino acids, and by changing the texture of cheese owing to breakdown of the protein network (Fox, 1989).

Milk pasteurization (heating at 72–74 °C for 15 s or equivalent treatments) destroys pathogenic and most, but not all, spoilage microorganisms, and it is the most

[☆] Part of this paper was presented as poster at the European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods (Eurocraft 2001), Berlin, Germany.

*Corresponding author. Tel.: +34-935-813-292; fax: +34-935-812-006.

E-mail address: Toni.Trujillo@ub.es (A.J. Trujillo).

important heat treatment applied to cheese milk to provide acceptable safety and quality.

Pasteurization has helped to improve cheese quality, i.e. enhancing control over lactic acid production during cheese manufacture and producing cheeses with greater consistency and standard levels of quality (Lau, Barbano & Rasmussen, 1991). However, it is generally accepted that the flavor of cheese made from pasteurized (PA) milk is less intense than that from good quality raw (RA) milk (McSweeney, Fox, Lucey, Jordan & Cogan, 1993; Shakeel-Ur-Rehman, Banks, McSweeney & Fox, 2000).

Several studies have been carried out to describe the influence of pasteurization on the cheese proteolysis, but mainly in cow milk cheeses (Lau et al., 1991; McSweeney et al., 1993; Rosenberg, Wang, Chuang & Shoemaker, 1995; Beuvier et al., 1997; Skeie & Ardö, 2000). These studies have shown that there is little consistency among different varieties of cheeses, in relation to the influence of milk pasteurization on the primary and secondary proteolysis of cheeses.

Raw milk cheeses represent a significant proportion of ripened cheeses in most Mediterranean countries, particularly those made from goat and ewe milk. To our knowledge, few studies have been made to compare goat cheeses made from raw or pasteurized milk. Recently, Xanthopoulos, Polychroniadou, Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis (2000) studied the characteristics of Anevato cheese made from raw or heat-treated goat milk inoculated with a selected wild isolates of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from the traditional cheese as starter culture. Using urea-PAGE, they observed that casein breakdown in PA milk cheeses was delayed compared to RA milk cheeses, however free amino group content (N–NH₂) was lower in RA milk cheeses.

Among the modern technologies in the food industry, the most important are those involving non-thermal treatments (microfiltration, high-intensity pulsed electric fields, oscillating magnetic fields, high-intensity pulsed light, high-hydrostatic pressure, ultrasonics,...). The application of high-hydrostatic pressure is one of the most promising methods for the treatment and preservation of food. Pressures between 300–600 MPa cause inactivation of microorganisms including most infectious food-borne pathogens without causing many modifications on renneting properties and endogenous milk enzymes (Trujillo, Ferragut, Gervilla, Capellas & Guamis, 1997a). Furthermore, because hydrogen and covalent bonds are generally unaffected by high pressure, some important quality characteristics of foods, such as taste, flavor, color, vitamins and nutrients are undamaged (Cheftel, 1991). Thus, this technology can be used to increase the microbiological safety and quality of milk

to produce high quality cheeses. Recently, some studies have been focused on the use of high pressure to produce cheese (Trujillo et al., 2000).

In this paper, capillary electrophoresis to assess the nature and extent of primary hydrolysis of cheese proteins, and fractionation of nitrogen components and HPLC peptide profiles to assess secondary proteolysis, were used to compare the degree of proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk.

2. Materials and methods

2.1. Cheese manufacture

Milk was obtained from a herd of Murciano-Granadina goats (Muntanyola, Barcelona, Spain). Semi-hard uncooked cheeses (~200 g) from goat milk were manufactured in 25-l vats following the protocol described previously by Trujillo, Royo, Ferragut & Guamis (1999a). Cheese making was performed in three independent experiments. In each experiment 18 kg of RA, PA and PR milk from the same milk batch were used for cheese making.

Pasteurized milk was obtained by using a heat-exchanger (Garvía S.A., Barcelona, Spain) at 72 °C at a flow rate of 200 l/h with a holding time of 15 s.

Pressure-treated milk was obtained by using discontinuous high-pressure equipment (GEC Alsthom ACB, Nantes, France). A pressure chamber of 2 l equipped with a heating/cooling system to control temperature during pressurization and decompression was used. Refrigerated milk (4 °C) was equilibrated at 20 °C and batches of 1 l were pressure-treated at 500 MPa and 20 °C with a holding time of 15 min.

Milk was heated to 32 °C, and a 2% lactic starter (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* plus *L. lactis* spp. *cremoris*; AM Larbus S.A., Barcelona) was added. Subsequently, 35% (w/w) CaCl₂ and calf rennet (Renifor-15/E, Lamirsa, Barcelona) were added at 0.025% (v/w) and 0.02% (v/w), respectively. After the coagulation, the curd was cut, moulded, pressed and salted by immersion in brine. Cheeses were ripened in a chamber at 14 °C and 85% relative humidity. Cheeses were covered with wax on day 18 after manufacture. Samples were taken periodically during ripening (at days 1, 15, 30 and 45) and frozen at –20 °C until analyzed.

2.2. Physico-chemical analyses of cheeses

Samples of cheeses were taken and analyzed in duplicate for dry matter (DM; International Dairy Federation, 1982), fat (F; International Organization for Standardization, 1975) and total nitrogen (TN; International Dairy Federation, 1993). Moisture (M) contents were calculated as 100–DM. The pH of a cheese/

distilled water (1:1) slurry was measured. Salt (S) was determined by chloride analysis (Corning 926 Salt Analyzer; Corning Medical and Scientific Glass Works, Medfield, MA).

2.3. Preparation of cheese extracts

Water-soluble fractions (WSF) of the cheeses were prepared according to the method of Kuchroo and Fox (1982). The pH 4.6-soluble nitrogen (WSN) and soluble nitrogen in 12% trichloroacetic acid (TCASN) were prepared from WSF. Total nitrogen, WSN and TCASN were determined by the Kjeldahl method (International Dairy Federation, 1993). Total free amino acids was determined on the WSF of cheeses by the cadmium-ninhydrin method of Folkertsma and Fox (1992).

2.4. Capillary electrophoresis analysis

The water-insoluble fractions recovered during the water-soluble extraction were washed three times with 1 M sodium acetate buffer (pH 4.6) and the remaining fat was eliminated by washing with dichloromethane-sodium acetate buffer (1:1, v/v). The final protein precipitate was freeze-dried.

Capillary electrophoresis (CE) analyses were performed following the method of Recio and Olieman (1996). Sample buffer (pH 8.6) contained 167 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Amresco, Solon, Ohio, USA), 42 mM 3-morpholino-propanesulphonic acid (BioChemika MicroSelect, Fluka, Buchs, Switzerland), 67 mM ethylenedinitrilotetra-acetic acid disodium salt dihydrate (Tritoplex III; Merck, Darmstadt, Germany), 17 mM DL-dithiothreitol (Sigma, St. Louis, MO 63178, USA), 6 M urea (BioChemika MicroSelect, Fluka) and methylhydroxypropyl cellulose (0.5 g/l; Sigma).

The separation buffer (pH 3.0) contained 0.32 M citric acid, 20 mM sodium citrate, 6 M urea and 0.5 g/l of methylhydroxypropyl cellulose.

Freeze-dried water-insoluble fractions from cheese (18 mg) were dissolved in 1 ml of diluted sample buffer (sample buffer/water 1.5:1). After incubation for 1 h at room temperature, 20 µl lactic acid 18% were added (final pH 7.0) and injected in the CE apparatus.

Separations were carried out using a BioFocus 2000 capillary electrophoresis instrument (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, CA 94547, USA) controlled by BioFocus System Operating Software. The separations were performed using a hydrophilic-coated fused-silica capillary column (CElect P1, Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA) of 0.47 m × 50 µm i.d. (effective length 0.40 m). Electrophoresis was run at 40 °C and a final voltage of 20 kV and UV-detection was performed at 214 nm.

The area of each peak was integrated using BioFocus System Integration Software (version 5.0) and expressed as a percentage of the respective area at day 1.

2.5. Cheese protein hydrolysis by chymosin and plasmin in model systems

Commercial calf chymosin (EC 3.4.23.4, Anirene™ 880) containing 880 mg of chymosin/l and plasmin (EC 3.4.21.7) from bovine plasma were obtained from Granday-Roger Lab. (Paris, France) and Sigma (St. Louis, USA), respectively.

Freeze-dried water-insoluble fractions from 1-day-old cheese (25 mg) were dissolved in 0.5 ml 50 mM sodium acetate buffer at pH 6.2 and treated with 20 µl from a 1% (v/v) chymosin solution, and in 0.5 ml 100 mM phosphate buffer at pH 7.6 and treated with plasmin at a level of 0.2 units/ml. The solutions were incubated at 30 °C for 30 min and at 38 °C for 2 h for the chymosin and plasmin treatments, respectively. In both hydrolysis, enzymatic reactions were stopped by dilution 1:1.5 (v/v) with CE sample buffer at pH 8.6. Samples were analyzed by CE as above.

2.6. Peptide analysis by HPLC

Peptides in the WSF were separated by reverse-phase HPLC using an automated system (LCM1; Waters Corporation, Milford, 01757 MA, USA). Separations were carried out on a 250 × 4.6 mm column packed with C18-bonded silica gel with a particle diameter of 5 µm and pore width of 3000 nm (Symmetry 300™, Waters) at a constant temperature of 40 °C, following the method of González del Llano, Polo and Ramos (1995). After running the samples, the integration area of peptides, excluding that of free amino acids, was determined. The area of peptides eluted between 10 and 35 min was considered the hydrophilic peptide area, whereas the area of peptides eluted from 35 to 80 min was considered the hydrophobic peptide area. The amounts of hydrophobic and hydrophilic peptides were expressed as units of chromatogram area per gram of DM.

2.7. Statistical analysis

Data were processed by analysis of variance (ANOVA) using the general linear models procedure (GLM) of SAS® System for WIN® (8 version). The Student-Newman–Keuls test was used for comparison of sample data. Evaluations were based on a significance level of $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical analyses

The composition of the 1-day-old cheeses is listed in Table 1. Significant differences were found between

Table 1

Composition of goat cheese (1 day old) made from raw (RA), pasteurized (PA) and pressure-treated (PR) milk

	Treatments		
	RA	PA	PR
Moisture (%)	53.77 ^C (3.23) ^a	54.67 ^B (2.62)	56.86 ^A (3.08)
Fat/DM (%)	54.63 ^A (2.55)	53.17 ^A (3.80)	54.92 ^A (3.31)
TN/DM (%)	5.16 ^B (0.18)	5.83 ^A (0.10)	5.91 ^A (0.42)
S/M	1.48 ^A (0.13)	1.50 ^A (0.25)	1.62 ^A (0.40)
pH	5.05 ^{AB} (0.02)	5.02 ^B (0.07)	5.09 ^A (0.07)

^a Mean of three replicates (standard deviation).

DM: dry matter; TN: total nitrogen; S/M: salt-in-moisture.
ABCMeans with the same superscripts in the same row do not differ at $P < 0.05$.

cheeses in moisture and pH. However, from day 30, RA and PA milk cheeses showed similar moisture contents, while PR milk cheese had a significantly higher moisture content throughout the ripening period. No significant differences were observed in S/M between cheeses, although PR milk cheeses had the higher contents. Drake, Harrison, Asplund, Barbosa-Canovas and Swanson (1997) in Cheddar cheese and Trujillo et al. (1999a) in goat milk cheese reported that cheeses made from PR milk presented a higher moisture content than RA or PA milk cheeses, and this was responsible for significantly higher yields. Pressure treatment of milk leads to a greater moisture retention, due to the fact that denatured whey proteins (especially β -lactoglobulin, β -Lg) are incorporated in cheese.

3.2. Primary proteolysis

Primary proteolysis in cheese may be defined as those changes in caseins (CN; α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN and γ -CN) and peptides, which can be detected by electrophoretic methods (Fox, 1989). Primary hydrolysis of cheese proteins is mainly the result of the action of indigenous proteinases (i.e. plasmin, cathepsin D, somatic cells proteinases...) and the residual coagulant. However, proteinases from starter lactic acid bacteria and non-starter microorganisms are also active in the degradation of cheese proteins (Fox, Law, McSweeney & Wallace, 1993).

Electropherograms showing the separation of cheese proteins (pH 4.6 insoluble fraction) during the ripening of RA, PA and PR milk cheeses are shown in Fig. 1. Identification of intact caseins (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN and β -CN) was established by comparing the electropherograms of skimmed milks and 1-day-old cheeses with those of isolated pure proteins (Trujillo, Pavia, Ferragut, Casals & Guamis, 2000). The relative migration of the components was in accordance with previous reports (Recio, Pérez-Rodríguez, Amigo & Ramos, 1997; Molina, de Frutos & Ramos, 2000). The heterogeneity observed by CE of a particular casein is mainly attrib-

uted to multiple phosphorylation levels in the peptide chain (Recio et al., 1997).

In general, good resolution between intact proteins and breakdown products was achieved at day 1. Electrophoretic profiles from 1-day-old cheeses were very similar to the pH 4.6 insoluble fraction of cheese milk counterparts. However, the peak belonging to κ -CN disappeared with the concomitant appearance of a new peak corresponding to para- κ -CN with migration time near to the major α_{s2} -CN component.

Cheeses made from PA and PR milk also showed the peak corresponding to β -Lg indicating that heat and pressure-denatured β -Lg was retained in cheese curd during cheese making. On comparing pressure and heat treatments, pressures of 400–500 MPa cause high levels of β -Lg denaturation of goat that are only achieved after a fairly severe heat treatment of 80 °C for 10 min (Felipe, Capellas & Andrew, 1997). On the other hand, several studies have shown that when whey proteins are aggregated by heat or pressure treatment, they tend to precipitate at pH 4.6 together with the caseins (Felipe et al., 1997; Trujillo et al., 1999a). These facts explain the β -Lg presence and quantity in the pH 4.6 precipitates of PA and PR milk cheeses.

Electropherograms of cheeses after 15 days of ripening showed important changes. Peaks corresponding to α_{s1} -CN (especially those with lower migration times) extensively decreased. The primary site of chymosin action on bovine α_{s1} -CN is Phe₂₃–Phe₂₄ giving α_{s1} -I breakdown product or α_{s1} -CN f (24/25-199) and the complementary peptide α_{s1} -CN f (1-23). Goat α_{s1} -CN has also been described as very sensitive to the chymosin action at Phe₂₃–Val₂₄ bond with the appearance of α_{s1} -I breakdown product (Trujillo, Miranda, LeBars & Delacroix-Buchet, 1998). The hydrolysis of α_{s1} -CN in cheeses was coincidental with the appearance of different peaks (two main peaks) with larger migration times on the electrophoregrams. These peaks corresponded to α_{s1} -I as confirmed by the experiments carried out using model systems (data not shown), and in accordance with previous reports (Molina et al., 2000). The heterogeneity and large migration time of goat α_{s1} -I may be due to the inclusion of the phosphorylated zone of α_{s1} -CN, including the partial phosphorylated seryl residues (Ser₄₁ and Ser₁₁₅), which in turn lend a low electropositive charge to this product.

It is well noted that the α_{s1} -CN peak with higher migration time was not hydrolyzed to the same extent than other peaks of this casein, which confirms the presence and overlapping of a minor component of β -CN described previously by Recio et al. (1997). It is known that both β -CN and α_{s1} -CN are susceptible to the chymosin action, however, in solution chymosin hydrolyzes α_{s1} -CN at a higher rates than β -CN. On the other hand, when animal rennets are used, proteolysis

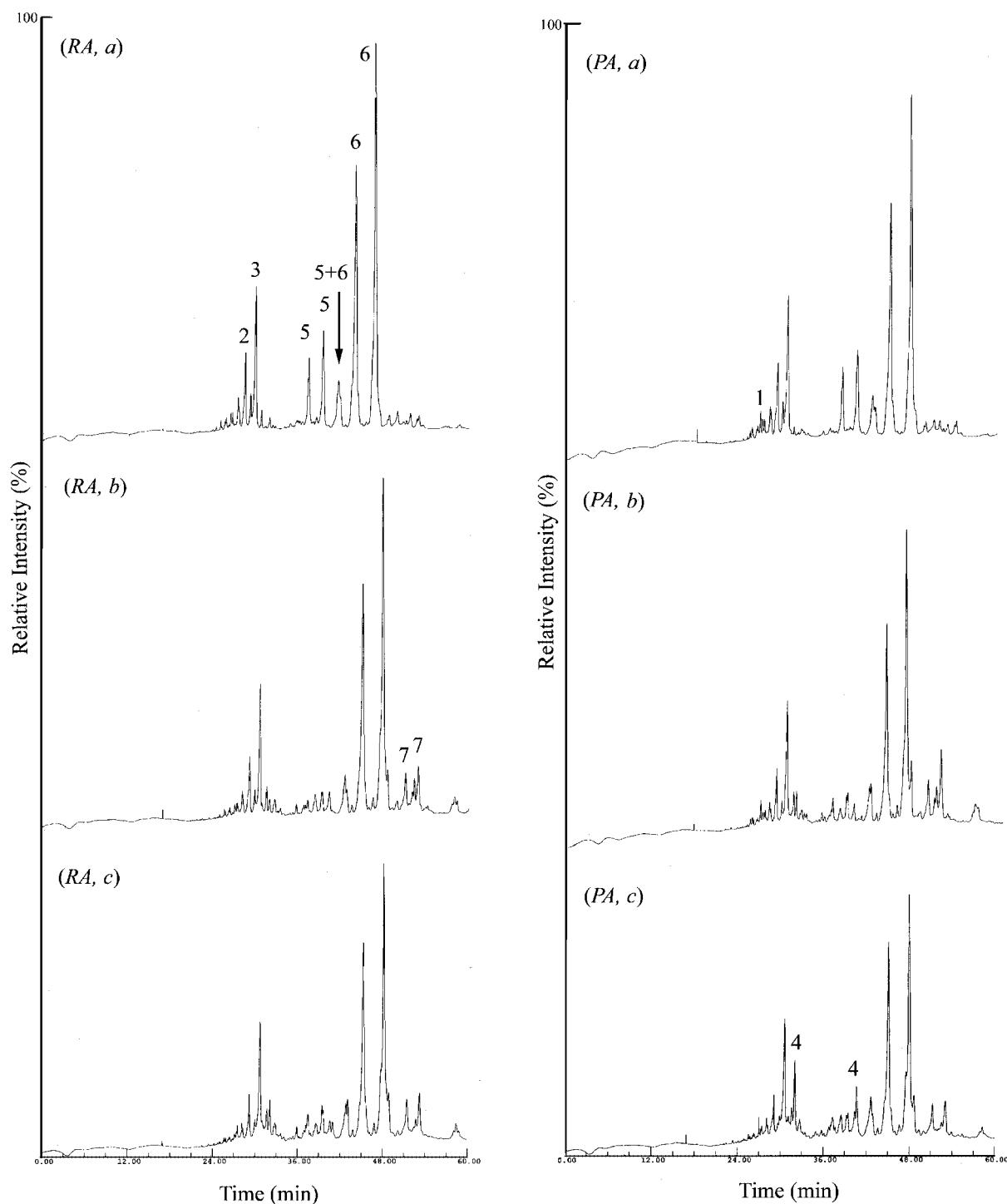


Fig. 1. Capillary electrophoresis analyses of the pH 4.6 insoluble fractions of goat cheeses made from raw (RA), pasteurized (PA) and pressure-treated (PR) milk at 1 (a), 15 (b) and 45 (c) days of ripening. 1. β -Lg; 2. α_{s2} -CN; 3. para- κ -CN; 4. γ -CN; 5. α_{s1} -CN; 6. β -CN; 7. α_{s1} -I.

of β -CN lags behind that of α_{s1} -CN in bacterially ripened cheeses, and in some cheese varieties β -CN is quite resistant to proteolysis throughout ripening (Fox et al., 1993).

Another important change was the presence of a few peaks located on the intermediate zone of the electro-

phoregrams, between α_{s1} - and α_{s2} -CNs. On the basis of their relative migration times on the electrophoreograms shown by different authors (Molina et al., 2000), and on the results obtained using model systems, they could be recognized as γ -CNs. It is known that plasmin, principal endogenous proteinase of milk, acts mainly on

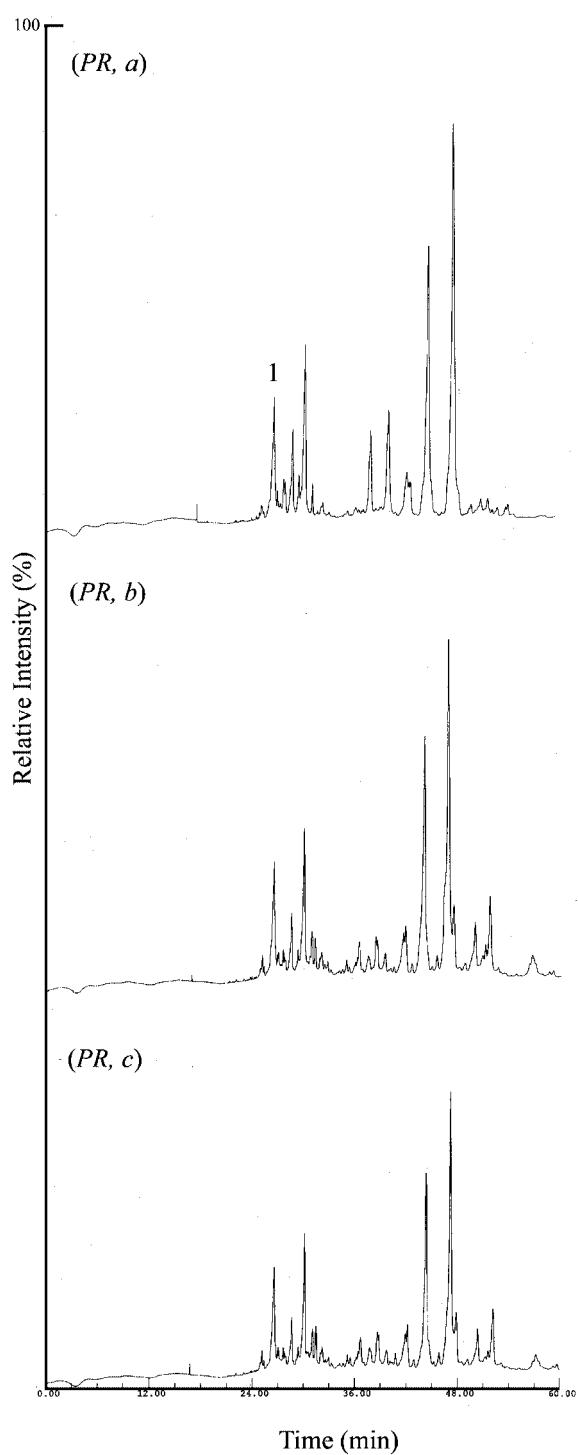


Fig. 1. (Continued).

β -CN hydrolysis that leads to the formation of γ -CNs (Fox et al., 1993; Trujillo, Guamis & Carretero, 1997b).

Apart from these general characteristics, little differences in proteolysis (qualitative aspects) were observed at 30 or 45 days of ripening in cheeses. However, significant quantitative differences in the composition of the pH 4.6-insoluble fraction of cheeses were evident

during ripening, especially between 15 and 30 days of ripening (Fig. 2).

In all the cheeses, α_{s1} -CN was hydrolyzed to a greater extent ($P < 0.05$) than β -CN, which in turn was degraded slowly throughout ripening. Mean β -CN content on day 45 was 72.6% (mean value of three cheese treatments) of that on day 1. However, α_{s1} -CN was more rapidly hydrolyzed than β -CN with a mean on days 15 and 45 of 37% and 23.4%, respectively to that on day 1.

The α_{s1} -CN represents the principal target for proteolysis during the early stages of ripening, and its hydrolysis by chymosin at Phe₂₃–Phe₂₄ bond is one of the most important events that take place during cheese ripening, and is responsible for the softening of cheese during the first stages of ripening (Creamer & Olson, 1982). At 15 days of ripening, PA milk cheese presented lower values ($P < 0.05$) of intact α_{s1} -CN than RA milk cheese, and PR milk cheese had an intermediate level than those seen in PA and RA milk cheeses. This agrees with the high level of α_{s1} -I, primary degradation product of α_{s1} -CN, detected in PA milk cheese.

Pasteurized and PR milk cheeses contained lower ($P < 0.05$) amounts of β -CN than RA milk cheese at 15 days of ripening. However, from thereon β -CN in PR and RA milk cheeses was hydrolyzed at essentially similar rates, but at lower rates ($P < 0.05$) than in PA milk cheeses. Furthermore, γ -CNs were found in higher amounts in PA milk cheeses (Fig. 2).

α_{s2} -CN, like β -CN, is also known to be very susceptible to plasmin attacks, and to a lesser extent to chymosin action (Fox et al., 1993). α_{s2} -CN also showed a marked decrease up to 15 days, especially in PR and RA milk cheeses. However, at the end of ripening PA milk cheeses presented lower ($P < 0.05$) α_{s2} -CN contents than RA and PR milk cheeses with a mean of intact protein on day 45 of 43%, 50 and 53%, respectively, compared to day 1.

Para- κ -CN showed a slight decrease during ripening in all cheeses, that was significative up to 15 days for all cheeses, but the para- κ -CN levels in RA and PR milk cheeses decreased at a faster rate ($P < 0.05$) than in PA milk cheeses. This can be explained by the protein being less susceptible to proteolysis due to steric hindrance resulting from interactions with heat-denatured whey proteins in PA milk cheeses.

β -Lg was incorporated at different levels in PA and PR milk cheeses (Fig. 1), but this protein was resistant to hydrolysis during ripening. β -Lg was not detected in RA milk cheeses.

Reports obtained from different sources, regarding the influence of pasteurization on the breakdown of α_{s1} -CN and β -CN, have shown that there is little consistency between different varieties of cheeses. It is known that the manufacturing parameters (cooking temperature, pH at draining,...) and physico-chemical variables (pH,

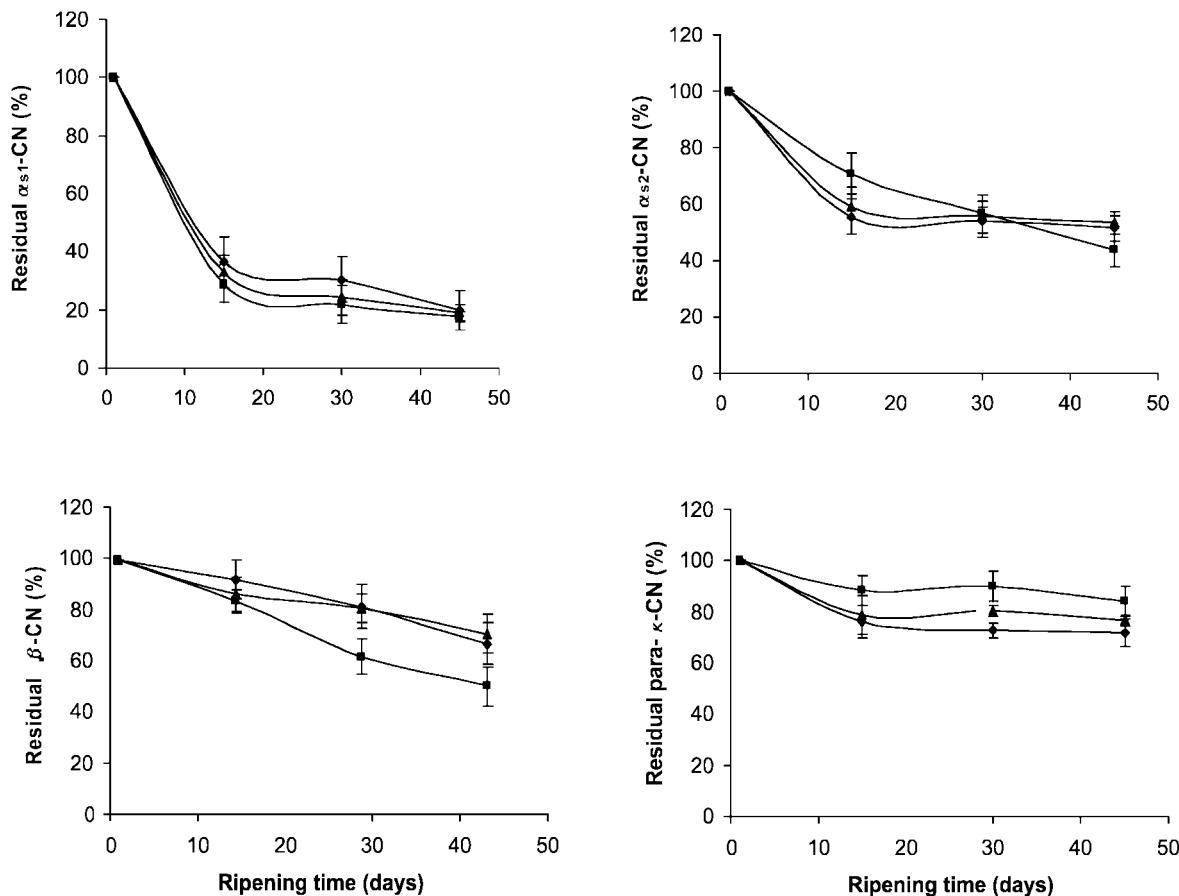


Fig. 2. Residual α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN and para- κ -CN in goat cheeses made from raw (♦), pasteurized (■) and pressure-treated (▲) milk during ripening. The amount of residual proteins is expressed as a percentage of the amount in the corresponding 1-day-old cheeses.

moisture, salt,...) of cheeses influence in a decisive way the activity of milk enzymes and coagulant. Therefore, the specific influence of pasteurization on the activity of these enzymes as well as the action of milk microbiota on α_{s1} -CN and β -CN can be partially or totally concealed (Grappin & Beuvier, 1997).

In cooked cheeses (i.e. Swiss-type cheese), the possible inactivation of acid proteinase (cathepsine D) of milk by pasteurization, and perhaps the proteolytic activity of the milk microbiota could explain the higher residual level of α_{s1} -CN found in PA cooked cheeses compared to RA counterparts (Beuvier et al., 1997). However, other authors working on Manchego (Gómez, Rodríguez, Gaya, Núñez & Medina, 1999) and Arzúa (Centeno, Rodríguez-Otero & Cepeda, 1994) cheeses found, as in our case, lower levels of intact α_{s1} -CN in cheeses made from PA milk, which was explained by a greater rennet retention.

On the other hand, the lower level of β -CN in PA cheeses can be explained by the activation of plasminogen in plasmin and/or inactivation of plasmin inhibitors following pasteurization. Such activation could explain the higher levels of γ -CNs detected in PA milk

cheeses (Fig. 1). However, as in the case of α_{s1} -CN, other studies carried out on Arzúa (Centeno et al., 1994) and Cheddar (Lau et al., 1991) cheeses made from PA milk, have shown a lower hydrolysis of β -CN than the corresponding RA milk cheeses, which may be explained by a lower level of cheese plasmin activities related to other cheese varieties (i.e. Swiss-type or Manchego cheeses), and also, more probably, by the elimination of some species and strains of the indigenous microbiota due to pasteurization process.

No reports, to our knowledge, are available on the extent and course of α_{s1} - and β -CN hydrolysis occurring during the ripening of cheeses made from PR milk. PR milk cheeses had α_{s1} -CN contents between those observed in RA and PA milk cheeses. However, cheeses made from PR milk contained similar ($P>0.05$) β -CN levels to PA milk cheese at 15 days of ripening, but lower ($P<0.05$) than RA counterpart. It is important to underline that PR milk cheeses had higher moisture and slightly higher (but not significant) S/M contents than RA and PA milk cheeses, and these parameters influence greatly the ripening of cheese. It has been stated that the higher the moisture, the faster the rate of protein

hydrolysis. In addition, moisture and S/M may influence the extent to which starter and secondary microbiota lyse, grow and produce enzymes (Grappin & Beuvier, 1997). In addition, the changes induced by pressure on milk may also alter the final cheese structure and possibly cheese proteolysis. Studies on goat milk have shown that high-pressure treatment (400–500 MPa) at room temperature does not affect plasmin activity (Trujillo et al., 1997b) as pasteurization does, but it causes micelle disintegration into smaller particles with a concomitant increase in the amount of serum casein in addition to a great denaturation of whey proteins, especially β -Lg (Felipe et al., 1997; Law et al., 1998). These reports seem to indicate that when pressure is applied to milk, the hydrophobic interactions between the caseins of the micelles are partly suppressed, releasing free caseins (especially κ - and β -CN) and small casein clusters possibly stabilized through the colloidal calcium phosphate. On the other hand, it has been reported that hydrophobic bonds might reform when pressure is released, but morphology of micellar structure is only partly restored as the reformed micelles are still very small. During the reforming micelle process, denatured β -Lg could form disulfide bonds with κ - or α_{s2} -CN in free solution or form large aggregates between β -Lg molecules, which should be included in the micelles (Needs, Stenning, Gill, Ferragut & Rich, 2000). This could lead to reformed micelles with altered structure and/or composition. These modifications might alter the susceptibility of cheese proteins to proteolysis by changing protein matrix structure or by making available new susceptible bonds of proteins to proteolysis, which in turn could explain the β -CN levels (similar to PA but lower to RA milk cheeses) found in PR milk cheeses at the first stages of ripening. However, there exists an opposing mechanism that could control proteolysis throughout ripening in PR milk cheeses. It has been described that denatured β -Lg inhibits the action of plasmin and chymosin influencing cheese ripening to some extent (Lo & Bastian, 1997).

3.3. Secondary proteolysis

To measure the secondary proteolysis products, i.e. proteins, peptides, and amino acids that are soluble in the aqueous phase of cheese and extractable with water (Fox, 1989), we considered the fractionation of nitrogen components (WSN and TCASN), the cadmium-ninhydrin method (high sensitive for free amino acids) and HPLC peptide profiles.

The WSN and TCASN contents of cheeses increased similarly throughout ripening (Fig. 3). However, at the end of ripening (45 days) cheeses made from PA and PR milks contained higher ($P < 0.05$) contents of WSN and TCASN than RA milk cheeses.

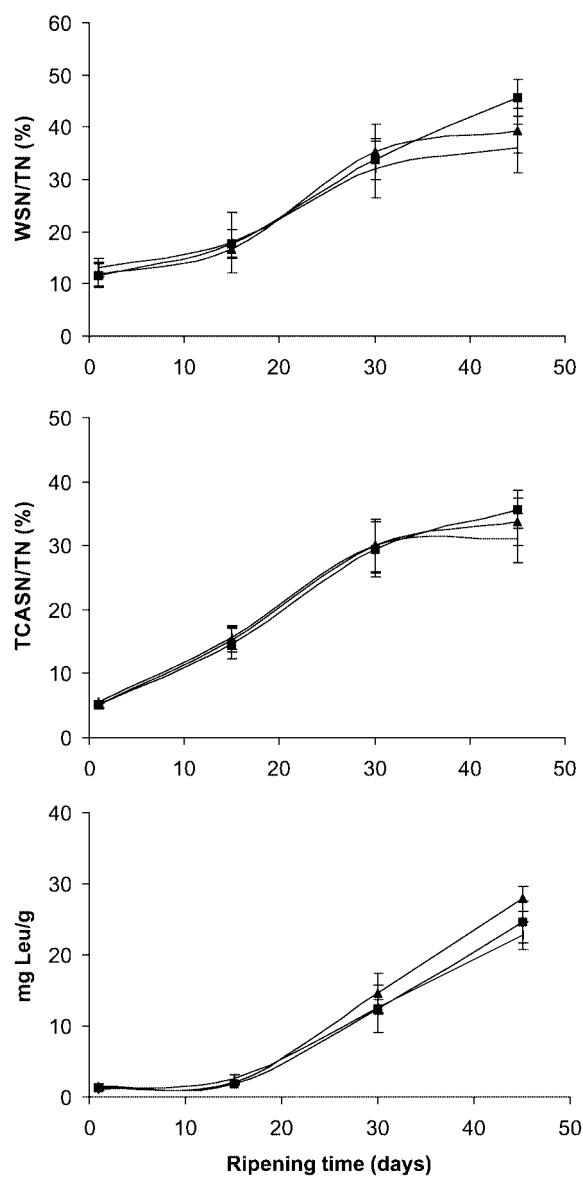


Fig. 3. Formation of water-soluble nitrogen (WSN), trichloroacetic-soluble nitrogen (TCASN) and total free amino-acids (FAA) throughout ripening in goat cheeses made from raw (◆), pasteurized (■) and pressure-treated (▲) milk.

Analysis of the WSN by the cadmium-ninhydrin method showed that PR milk cheeses contained considerably higher ($P < 0.05$) concentrations of free amino acids than RA or PA milk cheeses throughout ripening (Fig. 3), confirming preliminary observations made by Trujillo, Royo, Guamis and Ferragut (1999b) from PA and PR milk cheeses. RA and PA milk cheeses contained similar contents of free amino acids, which agrees with the results obtained by Skeie and Ardö (2000) in semi-hard round-eyed cheese.

As in the case of primary proteolysis, contradictory results about secondary proteolysis in RA and PA milk cheeses have been described, depending on the cheese

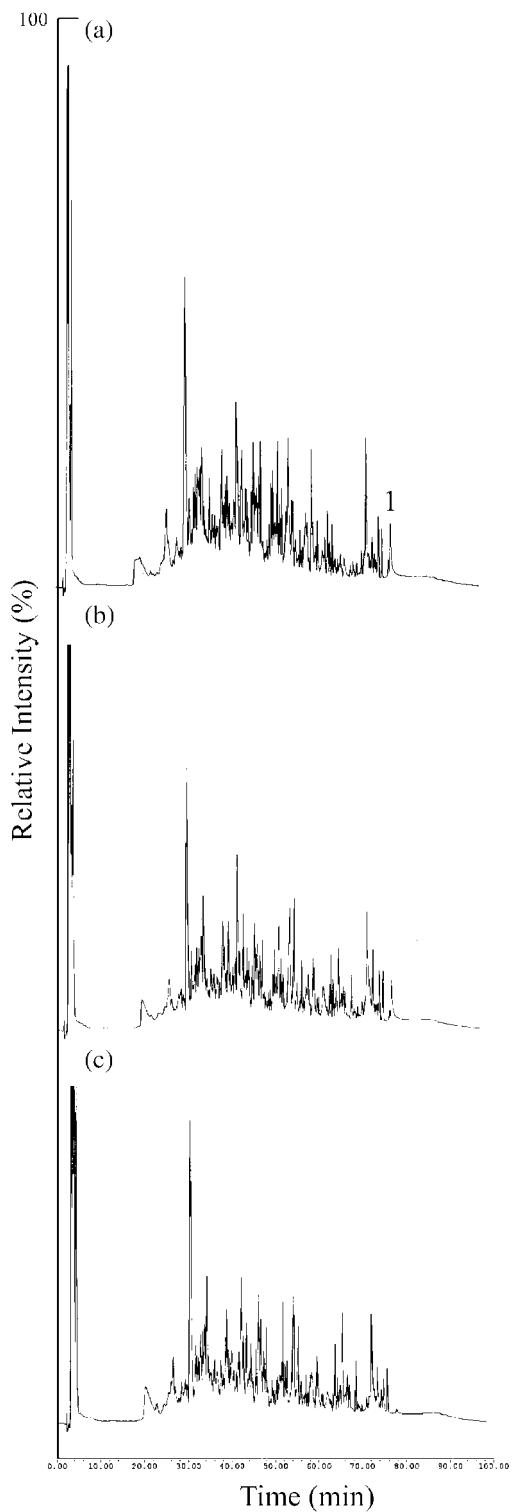


Fig. 4. RP-HPLC peptide profiles of water-soluble fraction from goat cheese made from raw (a), pasteurized (b) and pressure-treated (c) milk at 45 days of ripening. 1. β -Lg.

variety (McSweeney et al., 1993; Rosenberg et al., 1995; Beuvier et al., 1997; Skeie & Ardö, 2000; Xanthopoulos et al., 2000).

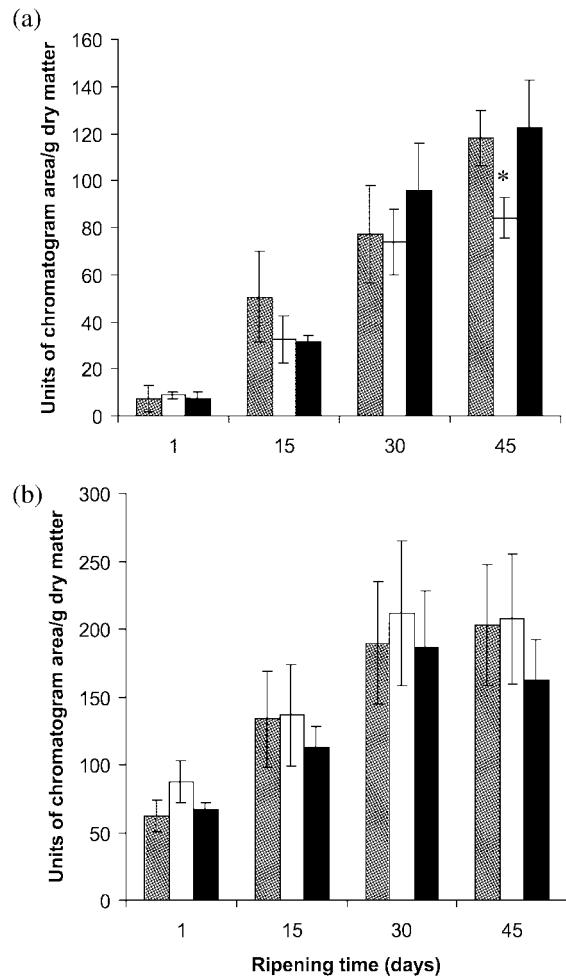


Fig. 5. Area count of hydrophilic (a) and hydrophobic (b) peptides present in the water-soluble fraction of goat cheeses made from raw (▨), pasteurized (□) and pressure-treated (■) milk. * Denotes significant difference ($P < 0.05$).

Peptide profiles of WSF from the cheeses were essentially similar (qualitative aspects) except for the peak eluting at 68 min in RA and PA milk cheeses (Fig. 4). This peak corresponded to native β -Lg, as it was checked by injecting pure β -Lg together with the WSF extracts (result not shown), confirming that β -Lg is highly retained in the pH 4.6 insoluble fractions from PR milk cheeses.

In general, pasteurization and pressure treatments of milk had no significant effects on the levels of hydrophobic and hydrophilic peptides or on their ratio in the WSF of cheeses. Only PA milk cheeses at 45 days of ripening contained lower ($P < 0.05$) content of hydrophilic peptides than RA or PR milk cheeses. PA milk cheeses contained higher, but not significant, contents of hydrophobic peptides than RA or PR milk cheeses throughout ripening. According to González del Llano et al. (1995) the hydrophobic peptide zone are related to bitter taste in cheese. The level of hydrophobic and

hydrophilic peptides significantly ($P < 0.05$) increased up to 30 days of ripening in all the cheeses, but they did not change between 30 and 45 days except for hydrophilic peptides in RA and PR milk cheeses (Fig. 5). Similar results have been obtained by Gómez, Garde, Gaya, Medina and Núñez (1997) working on Manchego cheese. In contrast, Lau et al. (1991) found that, although the amounts of peptides were the same for RA and PA milk cheeses, pasteurization resulted in higher concentration of hydrophobic peptides, resulting in a higher ration of hydrophobic/hydrophilic peptides in PA Cheddar cheese.

4. Conclusions

The results obtained showed that pasteurization (72 °C, 15 s) and pressurization (500 MPa, 15 min, 20 °C) of goat milk affected primary and secondary proteolysis of cheeses. Electrophoretic analyses showed that PA milk cheese had a more important ($P < 0.05$) hydrolysis of α_{s1} -CN than RA milk cheese at the first stages of ripening (15 days), while PR milk cheese had a level between those seen in PA and RA milk cheeses. Degradation of β -CN was also more important ($P < 0.05$) in PA and PR than in RA milk cheeses at 15 days of ripening. However, from thereon β -CN was hydrolyzed at essentially similar rates in PR and RA milk cheeses, but lower ($P < 0.05$) than in PA milk cheese.

Secondary proteolysis, which gives the proportion of peptides and free amino acids by nitrogen fractionation or by HPLC profiles, showed differences between cheeses. PR milk cheeses contained considerably higher ($P < 0.05$) concentrations of free amino acids than RA or PA milk cheeses throughout ripening, and at the end of ripening (45 days) cheeses made from PA and PR milks contained higher contents of WSN and TCASN than RA milk cheeses. In general, no great differences were appreciated in cheeses in the levels of hydrophobic and hydrophilic peptides.

Acknowledgments

The authors acknowledge the EU for the financial support given to this investigation (FAIR: 96 1113 High-pressure treatment of liquid foods and derived products).

References

- Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., & Duboz, G. (1997). Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal*, 7, 311–323.
- Centeno, J., Rodríguez-Otero, J.L., & Cepeda, A. (1994). Changes in the protein profile of Arzúa cheese (NW Spain) during ripening. *Milchwissenschaft*, 49, 319–322.
- Cheftel, J.C. (1991). Applications des hautes pressions en technologie alimentaire. *Actualités des Industries Alimentaire et Agro-Alimentaire*, 108, 141–153.
- Creamer, L.K., & Olson, N.F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47(631–636), 646.
- Drake, M.A., Harrison, S.L., Asplund, M., Barbosa-Canovas, G., & Swanson, B.G. (1997). High pressure treatment of milk and effects on microbiological and sensory quality of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 62(843–845), 860.
- Felipe, X., Capellas, M., & Andrew, J.R.L. (1997). Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 627–631.
- Folkertsma, B., & Fox, P.F. (1992). Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 59, 217–224.
- Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1379–1408.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H., & Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In P.F. Fox, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 1* (pp. 389–438). London, UK: Chapman and Hall.
- Gómez, M.J., Garde, S., Gaya, P., Medina, M., & Núñez, M. (1997). Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*, 64, 289–297.
- Gómez, M.J., Rodríguez, E., Gaya, P., Núñez, M., & Medina, M. (1999). Characteristics of Manchego manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 82, 2300–2307.
- González del Llano, D., Polo, M.C., & Ramos, M. (1995). Study of proteolysis in artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides. *Journal of Dairy Science*, 78, 1018–1024.
- Grappin, R., & Beuvier, E. (1997). Review: Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 751–761.
- International Dairy Federation (1982). Determination of the total solids contents (cheese and processed cheese). International Dairy Federation Standard 4A, International Dairy Federation, Brussels, Belgium..
- International Dairy Federation (1993). Milk. Determination of the nitrogen (Kjeldahl method) and calculation of the crude protein content. International Dairy Federation Standard 20B, International Dairy Federation, Brussels, Belgium..
- International Organization for Standardization (1975). Cheese—Determination of fat content—van Gulik method. International Organization for Standardization Standard 3433, International Organization for Standardization, Leusden, Netherlands..
- Kuchroo, C.N., & Fox, P.F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, 331–335.
- Lau, K.Y., Barbano, D.M., & Rasmussen, R.R. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science*, 74, 727–740.
- Law, A.J.R., Leaver, J., Felipe, X., Ferragut, V., Pla, R., & Guamis, B. (1998). International Organization for Standardization Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goats' milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2523–2530.
- Lo, C.G., & Bastian, E.D. (1997). Chymosin activity against α_{s1} -casein in model systems: influence of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 80, 615–619.
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Lucey, J.A., Jordan, K.N., & Cogan, T.M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3, 613–634.
- Molina, E., de Frutos, M., & Ramos, M. (2000). Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses madre from cows' ewes' and goats' milks. *Journal of Dairy Research*, 67, 209–216.

- Needs, E.C., Stenning, R.A., Gill, A.L., Ferragut, V., & Rich, G.T. (2000). High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *Journal of Dairy Research*, 67, 31–42.
- Recio, I., & Olieman, C. (1996). Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat-treated milk by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 17, 1228–1233.
- Recio, I., Pérez-Rodríguez, M.L., Amigo, L., & Ramos, M. (1997). Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 64, 515–523.
- Rosenberg, M., Wang, Z., Chuang, S.L., & Shoemaker, C.F. (1995). Viscoelastic property changes in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Food Science*, 60, 640–644.
- Shakeel-Ur-Rehman, , Banks, J.M., McSweeney, P.L.H., & Fox, P.F. (2000). Influence of ripening temperature on the volatiles profiles and flavor of Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 10, 55–65.
- Skeie, S., & Ardö, Y. (2000). Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese. *Lebensmittel-Wiss u-Technol*, 33, 499–505.
- Trujillo, A.J., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Felipe, X., Sendra, E., Saldo, J., Ferragut, V., & Guamis, B. (2000). Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Research International*, 33, 311–316.
- Trujillo, A.J., Ferragut, V., Gervilla, R., Capellas, M., & Guamis, B. (1997a). High hydrostatic pressure effects on milk and milk products. In S.G. Pandalai, *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry Vol. 1* (pp. 137–159). Trivandrum, India: Research Signpost.
- Trujillo, A.J., Guamis, B., & Carretero, C. (1997b). Hydrolysis of caprine β -casein by plasmin. *Journal of Dairy Science*, 80, 2258–2263.
- Trujillo, A.J., Miranda, G., LeBars, D., & Delacroix-Buchet, A. (1998). Proteolytic specificity of chymosin on caprine α_{s1} -caseins A and F. *Journal of Dairy Research*, 65, 233–241.
- Trujillo, A.J., Pavia, M., Ferragut, V., Casals, I., & Guamis, B. (2000). Analysis of proteins in milk and cheese by capillary zone electrophoresis. In S.G. Pandalai, *Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry, Vol 4, Part II* (pp. 239–255). Trivandrum, India: Research Signpost.
- Trujillo, A.J., Royo, C., Ferragut, V., & Guamis, B. (1999a). Ripening profiles of goat cheese produced from high-pressure-treated milk. *Journal of Food Science*, 64, 833–837.
- Trujillo, A.J., Royo, C., Guamis, B., & Ferragut, V. (1999b). Influence of pressurization on goat milk and cheese composition and yield. *Milchwissenschaft*, 54, 197–199.
- Xanthopoulos, V., Polychroniadou, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2000). Characteristics of Anevato cheese from raw or heat-treated goat milk inoculated with a lactic starter. *Lebensmittel-Wiss U-Technol*, 33, 483–488.

3.4. *LIPOLYSIS IN CHEESE MADE FROM RAW, PASTEURIZED OR HIGH-PRESSURE-TREATED GOATS' MILK.*

BUFFA, M., GUAMIS, B., PAVIA, M. Y TRUJILLO, A.J.
INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, 11 (3), 175-179 (2001a).



ELSEVIER

International Dairy Journal 11 (2001) 175–179

INTERNATIONAL
DAIRY
JOURNAL

www.elsevier.com/locate/idairyj

Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk

Martín Buffa, Buenaventura Guamis, Marta Pavia, Antonio J. Trujillo*

Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària, Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Centre Especial de Recerca, 08193 Bellaterra, Spain

Received 10 October 2000; accepted 30 March 2001

Abstract

Free fatty acid (FFA) profiles of cheeses made from raw (RA), pasteurized (PA; 72°C, 15 s) or pressure-treated (PR; 500 MPa, 15 min, 20°C) goats' milk were determined to assess the effect of milk treatment on cheese lipolysis. Total FFA content increased during ripening of all cheeses analysed. The main FFAs present in the three types of cheese were palmitic, oleic, myristic, capric and stearic acids. Cheeses made from PR milk showed a similar ($P < 0.05$) level of lipolysis to cheeses made from RA milk, whereas the level of lipolysis in cheese made from PA milk was lower. This behaviour could be explained by heat-sensitive but pressure-resistant characteristics of the indigenous milk lipase. Although cheeses made from PR milk received the highest scores, no differences ($P < 0.05$) in the sensorial attributes between cheeses were found by the panel. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Lipolysis; Goat cheese; High-pressure treatment

1. Introduction

Cheese made from goats' milk is greatly appreciated in many countries due principally to its organoleptic characteristics. These characteristics usually depend on the balance between a large number of compounds that appear in cheese during a complex biochemical process, which includes both proteolytic and lipolytic degradation of milk constituents.

Lipolysis is particularly extensive in some hard Italian, mould-ripened and goat cheeses, and is essential to their correct flavour development. Most of the FFAs generated from lipolysis are precursors of volatile compounds, like methyl ketones, alkanones, lactones, etc., that play an important role in cheese flavour (Nájera, Barrón, & Barcina, 1993). Moreover, some normal FFA such as hexanoic, octanoic, nonanoic and decanoic acids, and branched-chain FFA like 3-methylbutanoic, 4-methyloctanoic and 4-ethyloctanoic acids contribute by themselves to the "goaty" flavour of cheese (Rahmat & Richter, 1996; Le Quéré, Pierre, Riaublanc, & Demaizières, 1998). Likewise, lipolysis

can affect negatively the flavour of cheeses (rancid taste) by the production of an excessive amount of volatile FFA released by the action of lipoprotein lipase (Grappin & Beuvier, 1997).

For hygienic reasons, most cheeses are made from PA rather than from RA milk. However, pasteurization inactivates some enzymes that could play an important role in cheese ripening, e.g. indigenous milk lipase.

New technologies, such as high-hydrostatic pressure, have been applied in the cheesemaking process (Trujillo et al., 2000). High-pressure treatment (HPT) of milk can produce a large decrease in microbial numbers without negative effects on flavour or nutritional components. However, modifications to milk proteins, such as fragmentation of casein micelles or aggregation of whey proteins, and of mineral equilibria result from HPT (Shibauchi, Yamamoto, & Sagara, 1992; Felipe, Capellas, & Law, 1997; López-Fandiño, de la Fuente, Ramos, & Olano, 1998). These changes have been related to the behaviour of PR milk in the production of rennet gels (Buffa, Trujillo, & Guamis, 2001). The application of HPT during the processing of milk for cheese production leads to an increased cheese yield and modification of proteolysis during cheese ripening (Trujillo, Royo, Guamis, & Ferragut, 1999a; Trujillo, Royo, Ferragut, & Guamis, 1999b).

*Corresponding author. Tel.: +34-93-5813292; fax: +34-93-5812006.

E-mail address: toni.trujillo@uab.es (A.J. Trujillo).

Recently, total FFA were determined in cheeses made from PA and PR milk by the BDI method (Trujillo et al., 1999a) but, to our knowledge, a wide study of lipolysis on cheese made from PR milk has not yet been carried out.

Our goal was to determine the FFA profiles of cheeses made from RA, PA (72°C , 15 s) or PR (500 MPa, 15 min, 20°C) goats' milk during ripening, in order to evaluate the effect of milk treatment on cheese lipolysis.

2. Materials and methods

2.1. Cheese manufacture

Milk was obtained from a herd of Murciano-Granadina goats from a local farm (Muntayola, Barcelona, Spain).

Cheeses were manufactured from RA, PA and PR goats' milk in two experiments, at an interval of one week. In each experiment, 50 kg of RA, 50 kg of PA and 50 kg of PR milk prepared from the same batch of milk were used for cheesemaking.

Milk was pasteurized using a heat exchanger (Garvia SA, Barcelona) at a flow rate of 200 L h^{-1} , with a holding time of 15 s at 72°C .

Pressure treated milk was obtained by using a semi-continuous hyperbar equipment (GEC Alsthom ACB, Nantes, France) by direct compression of the liquid with a piston. A pressure chamber of 4 L equipped with a heating/cooling system to control temperature during pressurization and decompression was used. Twenty minutes before treatment, refrigerated milk (4°C) was equilibrated to 20°C and batches of 4 L were pressurized at 500 MPa and $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a holding time of 15 min. The PR milk was kept at 4°C until cheesemaking.

Milk was heated to 31°C and then starter culture (AM Larbus, Barcelona) containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, and 35% (w/w) CaCl_2 (food quality grade) were added to cheese milk to final concentrations of 2% (w/w) and 0.02% (v/w), respectively. Ten minutes later, 0.02% (v/w) of calf rennet (Reniflor-15/E, Lamirsa, Barcelona), containing $780 \text{ mg chymosin L}^{-1}$ was added. After 30 min, the coagulum was cut, and the curds drained and moulded (13.6 cm diameter \times 13.2 cm high).

A vertical press was used to press the cheeses (1 h at 1.3 kPa and 11 h at 2.6 kPa). After that time, cheeses were salted by immersion in brine (19% NaCl solution) for 4 h at 14°C . Finally, cheeses were ripened in a room at 14°C and 85% relative humidity for 60 d.

2.2. Compositional analysis

Cheeses from RA, PA and PR milk were analysed for total solids and fat according to IDF (1982) and Van Gulik methods, respectively.

Analyses of cheeses made from RA, PA and PR goats' milk from the two experiments were performed in duplicate 1, 30 and 60 d after cheesemaking.

2.3. FFA analysis

Cheese FFA were extracted and butylated from approximately 5 g of cheese as described by Ha and Lindsay (1990). Heptanoic acid (30 μL of a 37.3 mg mL^{-1} solution) was used as an internal standard. Gas chromatography was carried out with a Hewlett Packard chromatograph, equipped with a flame ionisation detector (FID) and a splitless injection port. The carrier and make-up gases were high purity helium at flow rates of 3.6 and 45 mL min^{-1} , respectively. High purity hydrogen (40 mL min^{-1}) and compressed air (450 mL min^{-1}) were supplied to the FID. The temperature of the injector and detector was 250°C . Butyl esters were separated using a bonded polyethylene glycol fused silica capillary column (SGE bp20; 30 m \times 0.32 mm i.d.; 0.25 μm coating thickness; SGE Inc.). The column oven temperature was programmed to increase from 50°C to 230°C at a rate of $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ after 15 min at 50°C . The output signal from the detector was integrated using HP 6890 ChemStation software. The volume of sample injected was 1 μL . Individual FFA were identified and quantified using standards (>99% by GC), supplied by Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

FFA analysis of RA, PA and PR milk cheeses from the two experiments were performed 1, 30 and 60 d after cheesemaking. Two separate extractions and butylations were performed for each cheese sample, and two injections were made for each butylated sample. Results are presented as mg g^{-1} of fat.

2.4. Sensory analysis

Sixty day-old RA, PA and PR milk cheeses were assessed by ten trained panel members familiar with cheese made from goats' milk. Samples of cheeses were cut into pieces of about $80 \times 40 \times 5 \text{ mm}$ in size, and then were put on white plates coded with three digit random numbers. Water was provided for mouth washing. Overall aroma, overall taste, bitterness, saltiness, spicy taste and overall valuation were evaluated on an eight-point scale (1 = poor to 8 = intense).

2.5. Statistical analysis

Results were processed by an analysis of variance (ANOVA) using the general linear models procedure of SAS[®] System for WINTM (6.12 version). The Student-Newman-Keuls test was used for comparison of sample data. Evaluations were based on a significance level of $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Compositional analyses

No differences ($P<0.05$) in total solid levels were observed between 1 d-old RA, PA and PR milk cheeses, which had a mean value of 47.47%. Moisture content of all cheeses decreased regularly during ripening (approximately 23–24% by 60 d), due to evaporation of water from the surface.

The treatments applied to milk did not affect ($P<0.05$) the fat content of 1 d-old cheeses, which represented 53–55% of the total solids.

3.2. FFA analysis

Total FFA content of cheeses made from RA and PR milk increased from d 1 to d 60 (Fig. 1), indicating the significant ($P<0.05$) effect of the ripening stage on cheese lipolysis. However, there was no significant increase of FFA during ripening in PA milk cheese.

All cheeses showed a reduced rate of lipolysis from d 30, which may be caused by diminished enzymatic activity due to microenvironmental changes (e.g., moisture, pH) in cheese (Rahmat & Richter, 1996).

The release of individual FFA is shown in Fig. 2. The main FFA observed in the three types of cheeses during ripening were palmitic, oleic, myristic, capric and stearic acids, representing together approximately 80% of total

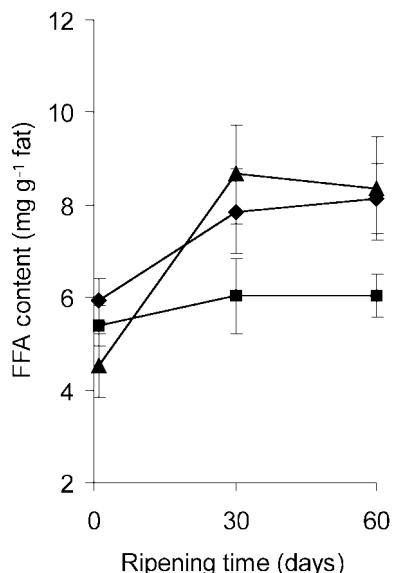


Fig. 1. Total free fatty acids content of cheeses made from raw (◆), pasteurized (■) or pressure-treated goats' milk (▲).

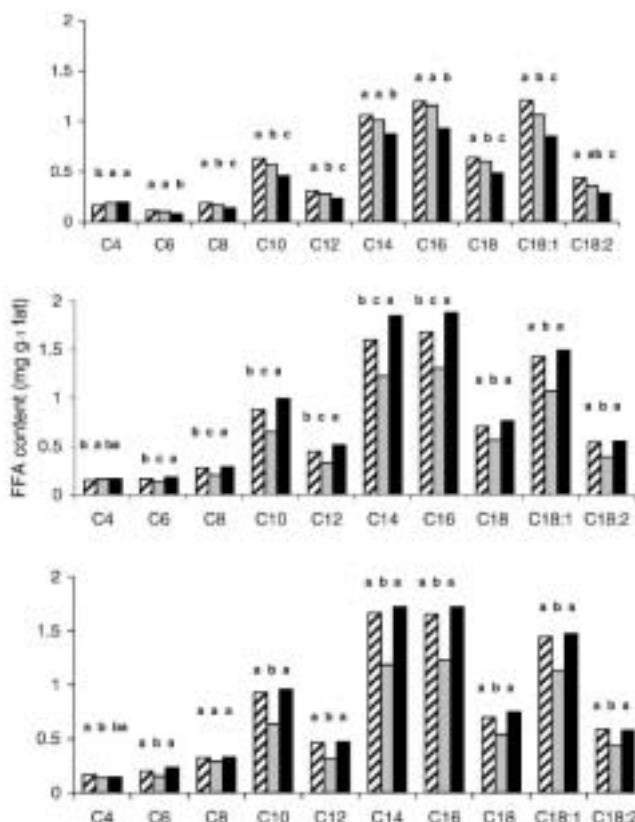


Fig. 2. Free fatty acid profile of cheeses made from raw (▨), pasteurized (□) or pressure-treated goats' milk (■) after 1, 30 and 60 d of ripening.

^{a,b,c}Mean values of each free fatty acid without a common superscript were significantly different ($P<0.05$).

FFA content. The amounts of individual FFA were within the normal ranges for cheese made from goats' milk (Nájera et al., 1993). Generally, at 30 and 60 d of ripening, the concentration of individual FFA in RA and PR milk cheeses was higher than that found in PA milk cheese (Fig. 2).

The relative increase in the concentration of short-chain FFA (C4–C8) during ripening was higher, except for butyric acid, than that of medium-chain FFA (C10–C14), which in turn was higher than that of long-chain FFA (C16–C18:2). This could be explained by the specificity of both milk lipoprotein lipase and starter lipases towards FFA located at the positions sn-1, 3 of the triglyceride, and generally, short-chain fatty acids are predominantly esterified at the sn-3 position (Juárez, 1986). Caproic acid in RA and PR milk cheeses and caprylic acid in cheese made from PA milk were the FFA, which had the highest relative increase by 60 d of ripening, while butyric acid showed the lowest relative increase in all cheeses. The very small increase in butyric acid was probably due to its metabolism to aromatic compounds (Rafecas, Boatella, & de la Torre, 1985).

At d 60, short-chain FFA represented approximately 8–9% of the total FFA content in all cheeses. This group of FFA had the highest correlation between FFA value and ripening time with R^2 ranging from 0.956 in RA cheeses to 0.918 in PR cheeses. These results agree with those reported by Poveda, Pérez-Coello and Cabezas (1999) for Manchego-type cheese, who suggested the possibility of using short-chain FFA as an index of ripening.

Medium and long-chain FFA represented approximately 35–37% and 54–55% respectively, of all FFA in the three types of cheese. Despite the quantitative importance of medium and long-chain FFA, they are not the main contributors to cheese flavour (de la Fuente, Fontecha & Juárez, 1993; Rahmat & Richter, 1996; Freitas & Malcata, 1998). Myristic, lauric, capric, and palmitic acids were the medium and long-chain FFA that showed the highest relative increase in all cheeses during ripening. However, the relative increase in these FFA was higher in RA and PR milk cheeses than in PA milk cheese.

In term of medium-chain FFA, myristic acid was the main FFA in the three types of cheese, ranging from 1.2 mg g^{-1} of fat in PA milk cheese to approximately 1.7 mg g^{-1} of fat in cheeses made from RA and PR milk. Palmitic acid was the predominant long-chain FFA in all cheese (Fig. 2), reaching, after 60 d of ripening, values that ranged from 1.2 mg g^{-1} of fat in PA milk cheese to 1.6 and 1.7 mg g^{-1} of fat in RA and PR milk cheeses, respectively.

Milk pasteurization significantly ($P < 0.05$) affected total FFA content in cheeses during ripening (Fig. 1). FFA concentration in cheese made from PA milk was lower than that found in both RA and PR milk cheeses,

which showed similar ($P < 0.05$) level of lipolysis during ripening.

It is well known that milk lipoprotein lipase is a relatively heat-labile enzyme, which can be completely inactivated by a thermal treatment of 78°C for 10 s (Driessens, 1989). However, lipoprotein lipase seems less sensitive to HPT than to thermal treatment. Indeed, Trujillo et al. (1999a) reported lipase activity in PR (500 MPa, 15 min at 20°C) goats' milk, while in pasteurized milk no lipase activity was detected. The level of lipolysis in PR milk cheese indicates that the activity of lipase that survives the HPT may be higher than after pasteurization. Consequently, lipolysis of cheeses made from PR goats' milk could perhaps be primarily attributed to the action of milk lipase that survives HPT, and also to the action of lipases from starter and non-starter bacteria during ripening.

3.3. Sensory analysis

It is accepted that short-chain FFA have a very important effect on the flavour of cheese (Rahmat & Richter, 1996; Freitas & Malcata, 1998). In this work, RA and PR milk cheeses after 60 d of ripening had higher short-chain FFA levels than PA milk cheese, except in the case of caprylic acid, levels of which were similar in all cheeses (Fig. 2). However, although PR milk cheese received the highest scores for overall aroma and taste, no differences ($P < 0.05$) were found between cheeses during the sensory evaluation. No differences were also observed for bitterness, saltiness and spicy tastes.

4. Conclusions

In the present work, pasteurization and HPTs applied to milk did not significantly affect the fat and total solid content of the resulting cheeses.

Generally, total FFA content increased during ripening in all the cheeses analysed, and the relative increase was more marked in short-chain than in the medium or long-chain FFA. The FFA contents of RA and PR milk cheeses were similar ($P > 0.05$) during ripening, whereas lipolysis in cheeses made from PA milk was lower.

HPTs have been tested for cheese production with promising results on the cheesemaking properties (coagulation and yield), inactivation of microorganisms, and proteolysis during cheese ripening. The significance of HPT as a possible method for cheesemilk processing is evident as it may allow the production of raw milk cheeses, including fresh or ripened cheese varieties, with improved performances (e.g., cheese yield, coagulation properties). In addition, our results showed that HPT applied to milk was able to produce a cheese with a

similar level of lipolysis to RA milk cheese without notable changes in the sensorial characteristics.

Acknowledgements

The authors acknowledge the EU for the financial support given to this investigation (FAIR: 96 1113; High-pressure-treatment of liquid foods and derived products). Authors wish to thank X. Felipe, J.M. Quevedo and J. Saldo for assistance in cheese manufacture and S. Llorens for help in cheese analyses.

References

- Buffa, M., Trujillo, A. J., & Guamis, B. (2001). Rennet coagulation properties of raw, pasteurized and high-pressure-treated goat milk. *Milchwissenschaft*, 56(5), 243–246.
- de la Fuente, M. A., Fontecha, J., & Juárez, M. (1993). Fatty acid composition of the triglyceride & free fatty acid fractions in different cows-, ewes- and goats-milk cheeses. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung Forschung*, 196, 155–158.
- Driessen, F. M. (1989). Heat inactivation of lipases and proteinases (indigenous and bacterial). In *Heat induced changes in milk*, (pp. 71–93). Bulletin 238. Brussels: International Dairy Federation.
- Felipe, X., Capellas, M., & Law, A. J. R. (1997). Comparison of the effects of high-pressure-treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goats milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 627–631.
- Freitas, A. C., & Malcata, F. X. (1998). Lipolysis in Picante cheese: influence of milk type and ripening time on free fatty acid profile. *Lait*, 78, 251–258.
- Grappin, R., & Beuvier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 751–761.
- Ha, J. K., & Lindsay, C. (1990). Method for the quantitative analysis of volatile free and total branched-chain fatty acids in cheese and milk fat. *Journal of Dairy Science*, 73, 1988–1999.
- IDF. (1982). Cheese and processed cheese. *Determination of the total solid content. Standard 4A*. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.
- Juárez, M. (1986). Physico-chemical characteristics of goat's milk as distinct from those of cow's milk. In *International Dairy Federation*, (pp. 54–67). Bulletin 202. Brussels: International Dairy Federation.
- Le Quéré, J.-L., Pierre, A., Riaublanc, A., & Demaizières, D. (1998). Characterization of aroma compounds in the volatile fraction of soft goat cheese during ripening. *Lait*, 78, 279–290.
- López-Fandiño, R., de la Fuente, M. A., Ramos, M., & Olano, A. (1998). Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurized milks from different species. *Journal of Dairy Research*, 65, 69–78.
- Nájera, A. I., Barrón, L. J. R., & Barcina, Y. (1993). Review: lipid fraction composition of cows, sheeps and goats cheese, and the influence on its quality. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33(4), 345–363.
- Poveda, J. M., Pérez-Coello, M. S., & Cabezas, L. (1999). Evolution of the free fatty acid fraction in Manchego cheese during ripening. *Milchwissenschaft*, 54, 685–687.
- Rafecas, M., Boatella, J., & de la Torre, M. C. (1985). Determinación de los ácidos grasos libres y totales durante la maduración de un queso Parmesano. *Anales de Bromatología*, 37, 229–241.
- Rahmat, A., & Richter, R. (1996). Formation of volatile free fatty acids during ripening of Cheddar-like goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 79, 717–724.
- Shibauchi, Y., Yamamoto, H., & Sagara, Y. (1992). Conformational changes of casein micelles by high-pressure-treatment. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, & P. Masson (Eds.), *High-Pressure and Biotechnology* (pp. 239–241). Paris: John Libbey Eurotext Ltd.
- Trujillo, A. J., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Felipe, X., Sendra, E., Saldo, J., & Guamis, B. (2000). Application of high-pressure-treatment for cheese production. *Food Research International*, 33, 311–316.
- Trujillo, A. J., Royo, C., Guamis, B., & Ferragut, V. (1999a). Influence of pressurization on goat milk and cheese composition and yield. *Milchwissenschaft*, 54, 197–199.
- Trujillo, A. J., Royo, C., Ferragut, V., & Guamis, B. (1999b). Ripening profiles of goat cheese produced from milk treated with high pressure. *Journal of Food Science*, 64, 833–837.