

“INNOVACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS
UTILIZANDO PEPTIDASAS DE ORIGEN MICROBIANO”

Julia Lombardi
Licenciada en Biotecnología
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Físicoquímica, Departamento Química-Física dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2013 y el 28 de febrero de 2018, bajo la dirección de la Dra. Valeria Boeris y la co-dirección del Dr. Sergio Darío Rozycki.

Directora: Dra. Valeria Boeris

Co – Director: Dr. Sergio D. Rozycki.....

Jurado:

Jurado:

Jurado:

Defendida:

GRACIAS TOTALES !!

Grupo de investigación
CEYFA (Componentes
Estructurales y
Funcionales de los
Alimentos), con el que
tuve la suerte de
trabajar.



CONICET



Facultad de Ciencias
Bioquímicas y
Farmacéuticas



UCC

University College Cork, Ireland
Coláiste na hOllscoile Corcaigh



**UMASS
AMHERST**

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral fueron publicados en los siguientes artículos:

- *Mineral fortification modifies physical and microstructural characteristics of milk gels coagulated by a bacterial enzymatic pool.* Julia Lombardi, José Manuel Pellegrino, Marina Soazo, Ana Paula Folmer Corrêa, Adriano Brandelli, Patricia Risso, Valeria Boeris. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017.
- *Milk protein suspensions enriched with three essential minerals: Physicochemical characterization and aggregation induced by a novel enzymatic pool.* Julia Lombardi, Darío Spelzini, Ana Paula Folmer Corrêa, Adriano Brandelli, Patricia Risso, Valeria Boeris. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016.

ESTADÍAS EN EL EXTERIOR

Algunos de los resultados presentados en esta tesis han sido obtenidos durante las siguientes estadías en el exterior:

- Estancia de investigación de seis meses en University College Cork, Irlanda. Financiamiento: beca Amidila - Erasmus Mundus. Supervisor en la universidad destino: Dr. Paul McSweeney. Período: noviembre 2015 – mayo 2016.
- Estancia de investigación de un mes en Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Financiamiento: programa de Cooperación Científico-Tecnológico MINCYT/CAPES. Supervisor en la universidad destino: Dr. Adriano Brandelli. Período: enero 2014 – febrero 2014

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- Aplicación de un extracto enzimático microbiano obtenido por fermentación en estado sólido como coagulante lácteo. XI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Valparaíso, Chile, 2017
- Application of a microbial coagulant in cheddar cheese manufacture: rheological and textural analysis. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Mar del Plata, Argentina, 2017.
- Proteolysis during ripening in Cheddar cheese made using an enzymatic extract from *Aspergillus niger* as coagulant. II Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos. Punta del Este, Uruguay, 2016.
- Análisis de la textura de geles de caseína obtenidos por coagulación con una proteasa de origen bacteriano. Efecto de iones calcio y magnesio. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina, 2015.
- Propiedades reológicas y microestructurales de geles de caseínas enriquecidos con calcio y magnesio obtenidos por coagulación con una proteasa bacteriana. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Córdoba, Argentina, 2014.
- Caracterización microestructural y reológica de geles de caseínas obtenidos con un pool enzimático bacteriano. Efecto de la presencia Zn^{2+} . XVI Congreso y XXXIV Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Argentina, 2014
- Coagulation of casein micelles induced by bacterial enzymes: effect of cations. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Villa Carlos Paz, Argentina, 2013.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- Integrante del proyecto “Proteasas coagulantes de leche”. Acreditado por la Secretaría de Políticas Universitarias (2017 – 2018). Director: Dr. Darío Spelzini.
- Integrante del proyecto “Aprovechamiento de subproductos lácteos y frutihortícolas y valorización de recursos autóctonos para la producción de alimentos funcionales, promoviendo el desarrollo de zonas económicamente vulnerables”. Acreditado por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (2015 – 2018). Director: Dra. María del Pilar Buera.
- Integrante del proyecto “Desarrollo de un método económico para obtener concentrados de las proteínas del suero lácteo para su incorporación en productos alimentarios”. Acreditado por la Secretaría de Políticas Universitarias (2016 – 2017). Director: Dra. Valeria Boeris.
- Integrante del proyecto “Metodologías alternativas para el aprovechamiento de las proteínas del suero lácteo”. Acreditado por la UNR (2016 – 2017). Director: Dra. Valeria Boeris.
- Integrante del proyecto “Valorización de recursos autóctonos y/o regionales para la formulación de productos lácteos funcionales, favoreciendo la sustitución de importaciones y el desarrollo social de zonas económicamente vulnerables”. Acreditado por CIN - CONICET (2015 – 2017). Director: Dra. María del Pilar Buera.
- Auxiliar del proyecto “Desarrollo y evaluación de quesos funcionales” Acreditado y subsidiado por la UNR (2013 – 2014). Director: Dra. Patricia Hilda Risso.

“Nothing in biology makes sense
except in the light of evolution”
(Dobzhansky, 1973)

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	11
PALABRAS PROVENIENTES DEL IDIOMA INGLÉS	13
RESUMEN	14
CAPÍTULO 1	15
Importancia del tema en estudio	16
Leche bovina	17
Composición química	17
Estructura de las caseínas	17
Coagulación enzimática	19
CAPÍTULO 2	21
1. INTRODUCCIÓN	22
1.1. Enzimas fúngicas coagulantes de la leche	23
1.1.1. <i>Aspergillus niger</i> como productor de enzimas	23
1.2. Elaboración de queso	25
1.2.1. Queso Cheddar	26
2. OBJETIVOS PARTICULARES	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Cultivo del microorganismo	32
3.2. Obtención del extracto enzimático	33
3.3. Decoloración del extracto enzimático	33
3.4. Caracterización del extracto enzimático de <i>A. niger</i>	34
3.4.1. Determinación de la concentración de proteínas	34
3.4.2. Determinación de la actividad coagulante de la leche	34
3.4.3. Determinación de la actividad proteasa	35
3.4.4. Análisis de proteínas por electroforesis	36
3.5. Caracterización de los geles lácteos inducidos por el extracto enzimático de <i>A. niger</i>	37
3.5.1. Preparación de leche reconstituida y formación de geles lácteos	37
3.5.2. Análisis de color	37
3.5.3. Análisis de textura mecánica	38
3.5.4. Determinación de propiedades reológicas	39
3.6. Caracterización del líquido expelido por los geles lácteos	40
3.6.1. Determinación de la masa de líquido expelido	40

3.6.2. Determinación de la actividad antioxidante.....	40
3.7. Análisis de proteínas en geles lácteos y su líquido expelido.....	41
3.8. Elaboración de queso Cheddar.....	41
3.9. Análisis de composición química.....	43
3.9.1. Determinación de NaCl.....	43
3.9.2. Determinación de humedad.....	44
3.9.3. Determinación del contenido de grasa.....	44
3.9.4. Determinación del contenido de proteínas.....	45
3.10. Maduración de queso Cheddar.....	46
3.10.1. Determinación de pH.....	46
3.10.2. Análisis microbiológico.....	46
3.10.3. Obtención de perfiles de textura mecánica.....	47
3.10.4. Análisis de la proteólisis.....	49
3.10.4.1. Fracción insoluble.....	49
3.10.4.2. Fracción soluble.....	50
3.11. Análisis del color final de los quesos.....	51
3.12. Procesamiento de los datos obtenidos.....	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1. Caracterización del extracto enzimático de <i>A. niger</i>	54
4.1.1. Determinación de concentración de proteínas y actividades.....	54
4.1.2. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	55
4.2. Caracterización de los geles obtenidos al coagular leche con diferentes concentraciones del extracto de <i>A. niger</i>	56
4.2.1. Análisis de color.....	56
4.2.2. Análisis de textura mecánica.....	57
4.2.3. Determinación de propiedades reológicas.....	58
4.3. Caracterización del líquido expelido por los geles lácteos inducidos por diferentes concentraciones del extracto de <i>A. niger</i>	60
4.4. Análisis de proteínas en geles lácteos y su líquido expelido.....	62
4.5. Elaboración de queso Cheddar.....	63
4.5.1. Análisis de la composición química.....	63
4.6. Maduración de queso Cheddar.....	64
4.6.1. Determinación de pH.....	64
4.6.2. Análisis microbiológico.....	66

4.6.3. Análisis de los perfiles de textura mecánica	67
4.6.4. Análisis de la proteólisis.....	68
4.6.4.1. Fracción insoluble: caseínas.....	68
4.6.4.2. Fracción soluble: péptidos, aminos libres y nitrógeno.....	70
4.7. Determinación del color final del queso	72
5. CONCLUSIÓN.....	73
CAPÍTULO 3.....	75
1. INTRODUCCIÓN	76
1.1. Enzimas bacterianas con actividad coagulante de la leche	77
1.1.1. Extracto enzimático P7	77
1.2. Interacción entre caseínas y cationes de sales minerales	77
1.2.1. Minerales con gran valor nutricional	78
2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	80
3. MATERIALES Y MÉTODOS	82
3.1. Caracterización de suspensiones de leche.....	83
3.1.1. Determinación de concentración de proteínas.....	83
3.1.2. Preparación de suspensiones de leche fortificadas	83
3.1.3. Determinación del tamaño promedio y potencial electrocinético de micelas de caseína.....	84
3.1.4. Interpretación de espectros de fluorescencia	84
3.1.5. Estudio de unión del ANS a las proteínas de la leche	85
3.1.6. Análisis del <i>quenching</i> de la fluorescencia por acrilamida	85
3.1.7. Análisis de color.....	86
3.1.8. Determinaciones de viscosidad	86
3.2. Cultivo del microorganismo.....	87
3.3. Obtención del extracto enzimático	88
3.4. Determinación de la actividad proteasa	89
3.5. Estudio del proceso de agregación de las micelas de caseína utilizando el extracto enzimático P7.....	89
3.6. Análisis reológico del proceso de gelificación de leche inducido por el extracto enzimático P7.....	90
3.7. Caracterización de geles lácteos inducidos por el extracto enzimático bacteriano.....	90
3.7.1. Análisis microestructural	90

3.7.2. Análisis de color.....	92
3.7.3. Análisis de textura mecánica	92
3.8. Procesamiento de los datos obtenidos	93
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
4.1. Determinación de la concentración de proteínas en suspensión de leche bovina.....	95
4.2. Determinación del tamaño promedio y potencial electrocinético de micelas de caseína por dispersión de luz.....	95
4.3. Estudio de cambios estructurales de las caseínas.....	96
4.3.1. Interpretación de espectros de fluorescencia	96
4.3.2. Estudio de unión del ANS a las proteínas de la leche	98
4.3.3. Análisis del <i>quenching</i> de la fluorescencia por acrilamida	100
4.4. Análisis de color de suspensiones de leche.....	101
4.5. Determinaciones de viscosidad de suspensiones de leche	102
4.6. Determinación de la actividad proteasa del extracto enzimático P7	104
4.7. Estudio del proceso de agregación de las micelas de caseína utilizando el extracto enzimático P7	105
4.8. Gelificación de leche inducida por el extracto enzimático P7.....	109
4.8.1. Análisis reológico	109
4.8.2. Análisis microestructural	111
4.9. Caracterización de geles lácteos inducidos por el extracto enzimático bacteriano.....	117
4.9.1. Análisis de color.....	117
4.9.2. Análisis de textura mecánica	118
4.9.3. Análisis microestructural	120
4.9.3.1. Diámetro de poro	120
4.1.1.1. Grado de anisotropía	121
4.1.1.2. Textura digital	122
5. CONCLUSIÓN	124
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a*: Componente cromático que mide la transición del verde al rojo

Abs: Absorbancia

ABTS: 2, 2'-Azinobis-3-etil-benzo- tiazolina-6-ácido sulfónico

AC: Actividad coagulasa

AL: Aminas libres

ANOVA: Análisis de la variancia

ANS: 1-anilino-8-naftalén sulfonato

AP: Actividad proteasa

b*: Componente cromático que mide la transición del azul al amarillo

BAL: Bacterias ácido-lácticas

CN: Caseínas

D_h: Diámetro hidrodinámico

DP: Diámetro de poro

E: Entropía

EEAN: Extracto enzimático de *Aspergillus niger*

EEP7: Extracto enzimático de *Bacillus sp. P7*

FCC: Fosfato de calcio coloidal

FES: Fermentación en estado sólido

FF: Fuerza de fractura

FI: Firmeza

G': Módulo elástico

G'_{máx}: Módulo elástico a los 90 min

G'': Módulo viscoso

GA: Grado de anisotropía

IB: Índice de blancura

IF: Intensidad de fluorescencia

IF⁰: Intensidad de fluorescencia en ausencia de *quencher*

IP: Índice de pardeamiento

K_{sv}: Constante de Stern-Volmer

L*: Luminosidad

MC: Micelas de caseína

Me: Movilidad electroforética

MPM: Marcador de peso molecular
NS: Nitrógeno soluble
NT: Nitrógeno total
p: Probabilidad asociada
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
pI: Punto isoelectrónico
PL: Proteínas de la leche
Potencial ζ : Potencial electrocinético
QA: Quesos elaborados con EEAN
QQ: Quesos elaborados con quimosina
RP-UPLC: Cromatografía líquida de ultra eficiencia en fase reversa
S₀: Proporción de ANS unido a proteína
SDS: Dodecilsulfato de sodio
Ser-P: Residuos de serina fosforilados
t_{ag}: Tiempo de agregación
TCA: Ácido tricloroacético
TCC: Tiempo de corte de la cuajada
TEMED: Tetrametiletilendiamina
TFA: Ácido trifluoroacético
t_{gel}: Tiempo de gelificación
t_{s-g}: Tiempo de transición sol – gel
UC: Unidad de actividad coagulasa
UFC: Unidades formadoras de colonia
UP: Unidad de actividad proteasa
v_i: Velocidad inicial
v_g: Velocidad de gelificación
% T: Concentración total de monómeros de acrilamida
 β : Parámetro beta (relacionado con el tamaño promedio de las MC)
 γ : Velocidad de deformación
 η : Viscosidad
 η_a : Viscosidad aparente
 λ : Longitud de onda
 τ : Esfuerzo

PALABRAS PROVENIENTES DEL IDIOMA INGLÉS

Buffer: Solución reguladora de pH

Flavor: Sensación olfato-gustativa de un alimento

Quencher: Agente extintor de la fluorescencia

Quenching: Extinción de la fluorescencia

Stomacher: Homogeneizador a paletas

Stacks: Apilamientos

RESUMEN

En la industria láctea son de gran interés las proteasas capaces de coagular leche que se utilizan para elaborar quesos. En la actualidad, la enzima más utilizada con este fin es la quimosina recombinante. Sin embargo, el interés en producir alimentos con nuevas texturas y sabores mantiene activa la búsqueda de coagulantes naturales alternativos. Durante este trabajo de tesis se ha estudiado la coagulación de leche bovina inducida por un coagulante de origen fúngico y otro bacteriano. Además, se han caracterizado ciertas propiedades físico-químicas de los geles lácteos obtenidos.

Se cultivó el hongo *Aspergillus niger* NRRL3 por fermentación de residuos agroindustriales en estado sólido y a partir de su micelio se preparó un extracto enzimático (EEAN) con actividad coagulante de la leche. Se ensayaron distintas concentraciones de EEAN para obtener geles lácteos que luego fueron caracterizados. En la mayoría de los casos, estos geles resultaron más laxos que los inducidos por quimosina. Al aumentar la concentración de EEAN, el índice de pardeamiento de los geles resultó mayor y se liberó más suero, con mayor actividad antioxidante. Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos reológicos, se decidió utilizar 3,5 % V/V de EEAN para elaborar queso Cheddar. La excesiva proteólisis desempeñada por EEAN, no sólo durante la etapa de coagulación de la leche sino también durante la maduración del queso, dio como resultado una composición química característica y diferente a la obtenida en los quesos control (elaborados con quimosina). A su vez, esto repercutió en la textura final del queso y en el perfil de péptidos que dan aroma.

El otro coagulante utilizado fue un extracto enzimático producido por *Bacillus sp.* P7 (EEP7). Se estudió el efecto de la presencia de sales minerales, muy utilizadas en la fortificación de productos lácteos, sobre la estructura de las proteínas lácteas y la actividad del EEP7. Se obtuvieron geles lácteos fortificados con estas sales minerales utilizando EEP7 como coagulante y los mismos fueron caracterizados. En presencia de los cationes con mayor afinidad por las caseínas se formaron micelas más grandes que coagularon más rápido, resultando en geles lácteos más fuertes y firmes.

Importancia del tema en estudio

En la provincia de Santa Fe se encuentran las cuencas lecheras por excelencia del país (Figura 1.1), contando con grandes, medianas y pequeñas empresas de producción primaria e industrial de lácteos. Éstas constituyen un pilar importante en la economía argentina por su distribución territorial y generación de empleo.

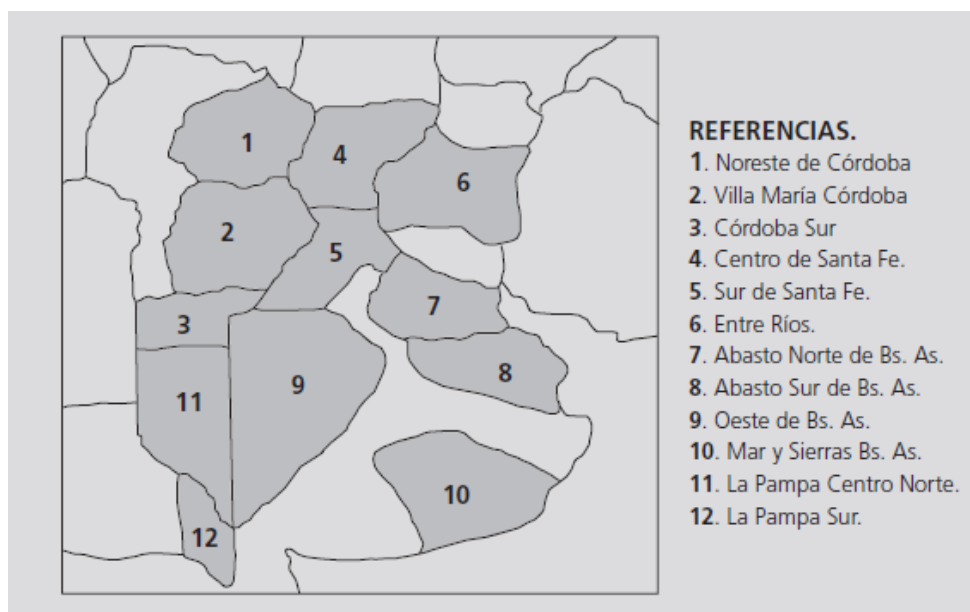


Figura 1.1: Mapa de las principales cuencas lecheras en Argentina (Mancuso y Teran, 2008).

Nuestro país destina un 76 % de la leche cruda a la elaboración de productos lácteos, 17 % a leches fluidas y el resto está considerada como leche informal. En las industrias de elaboración de productos, la mayor parte de la leche (51,4 %) se destina a la elaboración de quesos, un 31,2 % se destina a la producción de leche en polvo, 9,3 % a manteca y el resto a otros lácteos (dulce de leche, leche condensada, yogur, postres y flanes) (Mancuso y Teran, 2008). Por esto, se considera que las investigaciones destinadas a la innovación en la elaboración de productos lácteos, en particular de quesos, tienen gran impacto no sólo en la región santafesina, sino también en la cadena láctea nacional.

Particularmente, la innovación en el proceso de elaboración de quesos puede abordarse desde diferentes perspectivas. Tal es así que hay investigaciones destinadas a la producción de quesos con diferente contenido de colesterol (Kwak y col., 2002; Galante y col., 2017), de sodio (Katsiari y col.,

1997; Cruz y col., 2011; Silva y col., 2017) e incluso fortificados con vitaminas y minerales (Wagner y col., 2008; Kahraman y Ustunol, 2012; Tippetts y col., 2012; Soodam y col., 2015). Además, hay estudios en los que se modificaron los pasos de la elaboración (Johnson y col., 2001; Everard y col., 2008) o el coagulante utilizado (Yegin y col., 2011; Moynihan y col., 2014; Shah y col., 2014). Antes de aplicar cualquier innovación sobre un proceso es indispensable trabajar primero con un modelo de estudio más simple. En este trabajo de tesis se utilizaron geles lácteos como sistemas modelo de alimentos producidos a partir de leche coagulada enzimáticamente, en particular de queso.

Leche bovina

Composición química

La leche es una mezcla compleja de agua, grasa, proteínas, lactosa, vitaminas y minerales. El agua es la fase dispersante (~ 87 %) con glóbulos de grasa (~ 3,5 % P/V) y proteínas (~ 3,5 % P/V) en la fase dispersa. La lactosa (~ 5 % P/V), vitaminas y sales minerales (~ 1 % P/V), en cambio, se encuentran en su mayor parte disueltas (Agudelo Gómez y Bedoya Mejía, 2005). La proporción en la que se encuentran estos nutrientes depende, entre otros factores, de la raza, edad y nutrición del animal en cuestión, además de las condiciones ambientales en las que fue criado (Fox y col., 2000; Haug y col., 2007).

Estructura de las caseínas

Este trabajo se enfoca en el proceso de coagulación enzimática de la leche, en el que están involucradas las proteínas constituyentes de la leche llamadas caseínas. Alrededor del 80 % de las proteínas en la leche son caseínas (CN) mientras que las proteínas del suero completan el 20 % restante. Hay cuatro tipos principales de caseínas, α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN y κ -CN, todas con puntos isoeléctricos (pI) de 4,6 a 20°C. Los residuos Ser de las caseínas se encuentran fosforilados y la cantidad de estos grupos (Ser-P) en su estructura primaria las clasifica en sensibles o no al calcio. Esta clasificación es importante para describir cómo se disponen estas proteínas en la leche, ya que la mayoría se encuentra formando micelas y aproximadamente el 5% queda libre en solución. La κ -CN posee sólo un residuo Ser-P y, por esto, es

considerada insensible al calcio; además es la única que está glicosilada: posee un tri ó tetrasacárido, incluyendo residuos de ácido N-acetilneuramínico aniónicos, unido a residuos de treonina cercanos a su extremo C-terminal. Las demás caseínas poseen más residuos Ser-P, incluso se encuentran agrupados en determinadas regiones de interacción con el calcio propio de la leche (Bordin y col., 2001; Farrell y col., 2004). Debido a que el pH de la leche es cercano a la neutralidad, los grupos ionizables de las caseínas se encuentran desprotonados lo que le otorgan carga negativa a las proteínas. De esta manera, las caseínas poseen una conformación desplegada y muy flexible con sólo algunas regiones localizadas capaces de adoptar estructura secundaria (Thorn y col., 2015).

La materia seca de las micelas de caseína (MC) es 94% proteína y 6% minerales, principalmente fosfato de calcio coloidal (FCC). Existen varios modelos que explican la estructura de las MC, el último que se propuso es el “modelo de doble unión” (Phadungath, 2005). Según él, hay dos tipos de interacciones involucradas en el mantenimiento de la estructura de las MC: atracción hidrofóbica y repulsión electrostática. Las micelas se formarían a partir de la interacción hidrofóbica entre las caseínas, mientras que la repulsión electrostática entre las mismas limitaría su tamaño final. El FCC favorecería la interacción hidrofóbica al neutralizar la carga negativa de los residuos Ser-P agrupados. Las moléculas de κ -CN quedan ubicadas en la superficie de la micela debido a que poseen sólo un extremo hidrofóbico para interactuar con otras proteínas y sólo un residuo Ser-P que no es suficiente para unir FCC. Los extremos glicosilados hidrofílicos de estas moléculas quedan expuestos, confiriéndole estabilidad estérica y electrostática a la estructura, como se muestra en la Figura 1.2 (Horne, 1998).

En biología se postula que toda estructura está asociada a una determinada función. La función primordial de la leche bovina es nutrir a los terneros y la organización de las CN en micelas permite la incorporación no solo de proteínas sino también de una alta concentración de minerales que precipitarían de no estar interaccionando en tal estructura (Horne, 2002).

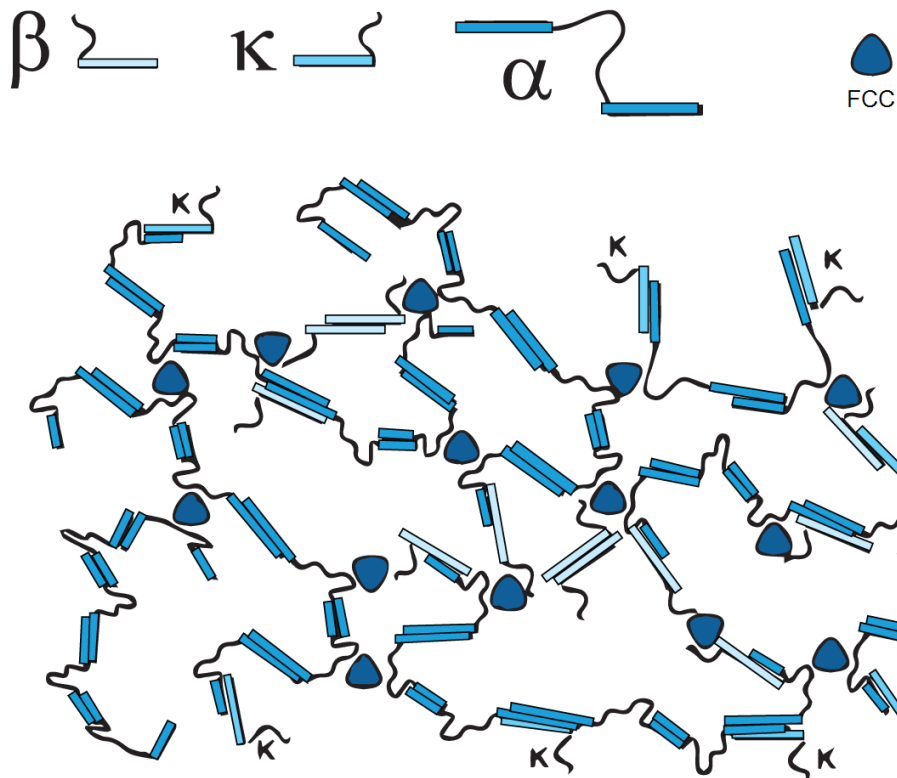


Figura 1.2: Esquema descriptivo del modelo de doble unión (Horne, 1998). Las barras rectangulares simbolizan regiones hidrofóbicas de las CN, mientras que las líneas curvas representan regiones hidrofílicas.

Coagulación enzimática

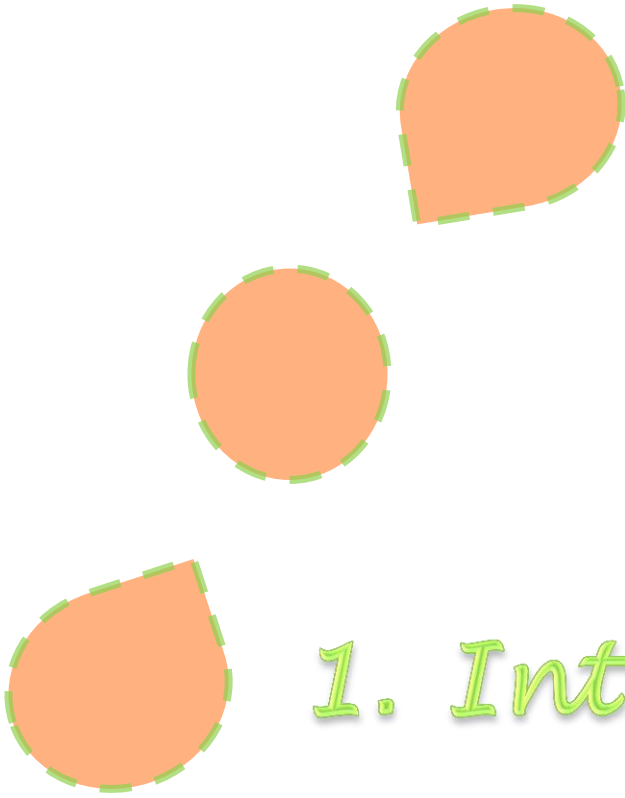
La preparación enzimática inicialmente más usada para coagular la leche fue el cuajo, que se extrae del cuarto estómago de los terneros destetados y que está compuesto mayoritariamente por quimosina y en menor proporción por pepsina. Sin embargo, debido a cuestiones éticas (por la excesiva matanza de animales jóvenes) y para disminuir las variaciones en actividad y composición según la edad y alimentación de los animales, la búsqueda de coagulantes alternativos es un área en desarrollo. En general, las enzimas utilizadas como coagulantes en la industria láctea son aspartil proteasas, debido a que su pH óptimo ácido favorece la agregación de las caseínas y la consecuente coagulación de la leche (Yegin y Dekker, 2013).

La química de coagulación de las MC puede dividirse en dos etapas (Lucey, 2002). En la primera etapa, cuando el coagulante es quimosina, se produce la hidrólisis del enlace peptídico de la κ -CN, Phe 105 - Met 106, lo que reduce la repulsión tanto electrostática como estérica entre las MC. El fragmento N-terminal 1 - 105 de las κ -CN es fundamentalmente hidrofóbico y

queda unido a las otras CN en la micela. El fragmento C-terminal 106 - 169 con la porción glicosilada queda libre en solución. En la segunda etapa, independientemente del agente coagulante, aumenta la viscosidad de la suspensión ya que ocurren dos procesos: primero, la agregación de las MC que está dirigida por fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas y que consiste en la incorporación inicial de una micela con otra. Los agregados resultantes son visibles por microscopía electrónica y pueden estudiarse por espectroscopía. Segundo, la gelificación que consiste en la formación de un gel o red irreversible de moléculas de CN. Esta estructura es dinámica y sus reordenamientos pueden estudiarse por reología y microscopía confocal (Fox y col., 2000).

En las últimas décadas, la enzima coagulante más utilizada en la industria láctea ha sido la quimosina recombinante. Por otro lado y con el objetivo de innovar en la elaboración de productos lácteos se han estudiado coagulantes de la leche de origen vegetal y microbiano (Kumar y col., 2010; Jacob y col., 2011). La etapa inicial de proteólisis ejercida por los coagulantes enzimáticos afecta la estructura de los geles lácteos originados. Por esto, es interesante encontrar nuevos agentes coagulantes y caracterizar las propiedades físico-químicas de los geles lácteos inducidos por ellos.

El **objetivo general** de este trabajo de tesis es estudiar el efecto de utilizar extractos enzimáticos microbianos sobre el proceso de coagulación de la leche y caracterizar las propiedades físico-químicas de los geles lácteos obtenidos.



1. *Introducción*

1.1. Enzimas fúngicas coagulantes de la leche

Existen muchas enzimas de origen fúngico (*Rhizomucor sp.*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.*) con actividad coagulante de la leche (Areces y col., 1992; Preetha y Boopathy, 1994, 1997; Vishwanatha y col., 2010; Yegin y col., 2011). Sin embargo, en general no son apropiadas para elaborar productos lácteos debido a su excesiva actividad proteolítica y termoestabilidad (Jacob y col., 2011). Para mejorar estas propiedades y poder utilizar estas preparaciones enzimáticas en la industria láctea se han aplicado modificaciones químicas y por técnicas de ingeniería genética. En la actualidad se comercializan e incluso se utilizan en la elaboración de quesos preparaciones enzimáticas “modificadas” de *Rhizomucor sp.* (Reps y col., 2006; Yegin y Dekker, 2013). De todas formas, el descubrimiento de coagulantes fúngicos provenientes de fuentes naturales económicas y con capacidad de ser utilizados en la industria láctea es todavía un área en continuo desarrollo. De hecho, hay varios trabajos publicados que aplican coagulantes fúngicos “sin modificar” en la elaboración de quesos frescos o con pocos meses de maduración (Yasar y Guzeler, 2011; Merheb-Dini y col., 2012; Alves y col., 2013).

1.1.1. *Aspergillus niger* como productor de enzimas

El género *Aspergillus* está constituido por especies de hongos filamentosos, compuestos por cadenas de células, llamadas hifas. Las diferentes especies del género se clasifican según el color de sus esporas, integrando las marrones y negras al grupo *Aspergillus niger* (Schuster y col., 2002). Su morfología se muestra en la Figura 2.1.1., los conidios son sus esporas asexuales y son producidos a partir de las células conidiógenas de las hifas fértiles (conidióforos) (Chang y col., 2014).

Se han caracterizado varias proteasas extracelulares obtenidas a partir de cultivos de *A. niger*. Las mayoritarias son dos aspartil proteasas ácidas (con pH óptimo bajo), PEPA y PEPB, aunque también se purificaron algunas serín proteasas minoritarias (van den Hombergh y col., 1997). La Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) clasificaron a la especie fúngica *A. niger* y a sus preparaciones enzimáticas como “generalmente reconocidas como seguras” (GRAS, por sus siglas en inglés) (Schuster y col., 2002). Debido

a esto, muchas enzimas de este origen han sido utilizadas en la industria de bebidas y alimentos (Theron y Divol, 2014; Mandujano-González y col., 2016). En relación con la industria láctea en particular, se determinó actividad coagulante de la leche de ciertas proteasas producidas por *A. niger*. Incluso se elaboró queso fresco utilizando preparaciones enzimáticas de este microorganismo como agente coagulante (Fazouane-Naimi y col., 2010).

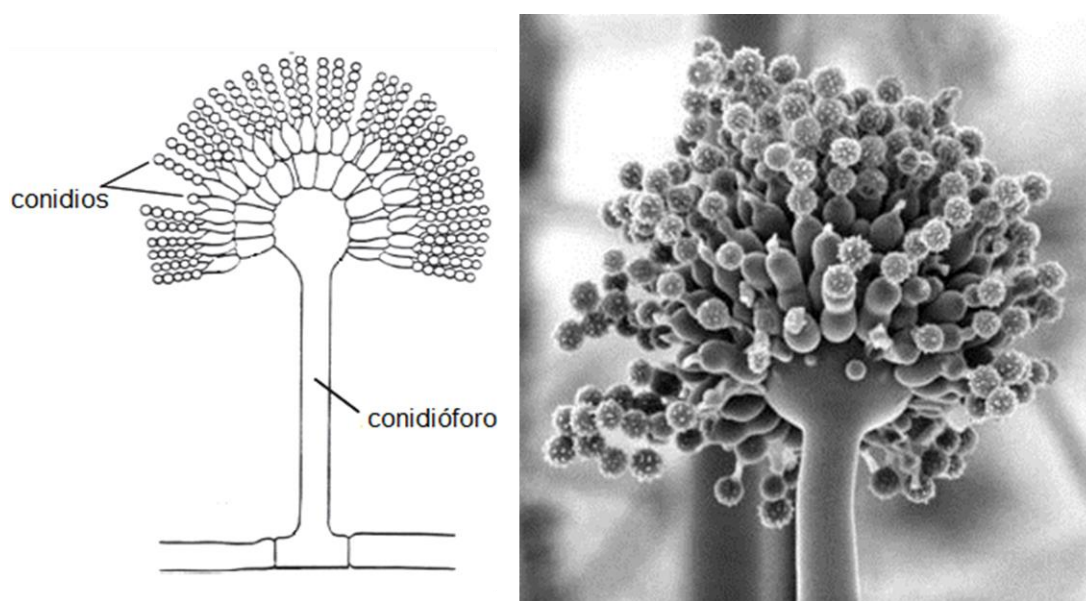


Figura 2.1.1: Estructura morfológica básica del género *Aspergillus*. A la izquierda: esquema (Chang y col., 2014). A la derecha: Imagen obtenida con microscopio electrónico de barrido (Hertz-Fowler y Pain, 2007).

Una de las ventajas de trabajar con esta especie fúngica es su capacidad de adaptarse a condiciones de crecimiento muy variadas. En este trabajo de tesis se utilizó la técnica de fermentación en estado sólido (FES) para obtener un extracto enzimático (EEAN) con actividad coagulante de la leche a partir de la cepa NRRL3 de *A. niger*. La FES se define como la fermentación que involucra sólidos en ausencia (o casi ausencia) de agua libre; sin embargo, los sustratos deben poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo. Algunas de las ventajas sobre la fermentación en medio líquido son: menores requerimientos energéticos, reducción de la cantidad de aguas residuales y el aprovechamiento de residuos sólidos como sustratos (Pandey, 2003). Ya se han obtenido enzimas extracelulares con diversas actividades a partir de *A. niger* por FES (Kamini y col., 1998; Castilho y col., 2000); lo novedoso en este caso es la combinación

de desechos agroindustriales utilizados como sustratos para la fermentación. Además, la investigación se enfoca en la utilización de EEAN como coagulante para inducir la formación de geles lácteos y en su posterior caracterización físico-química. Se consideró a estos geles como los modelos de estudio de productos lácteos basados en leche coagulada, en particular de queso.

1.2. Elaboración de queso

De acuerdo a la definición del Código Alimentario Argentino “se entiende por queso al producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), coagulado por acción del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes” (Código Alimentario Argentino, 2006).

El origen de la elaboración del queso no se puede datar con exactitud, uno de los primeros registros proviene de pinturas rupestres en cavernas del año 5000 a. C. La conversión de leche en cuajada fue descubierta por accidente, cuando los nómades se trasladaban de un lugar a otro, en días de calor, con la leche contenida en “bolsas” fabricadas a partir de estómagos de rumiantes. Si la leche se dejaba quieta, coagulaba debido no sólo a la presencia de quimosina, sino también a la acidez generada como resultado de la actividad bacteriana en los estómagos. Parte de la fase líquida (suero) era absorbida por la piel o filtrada a través de “la bolsa” y eliminada por evaporación (Law y Tamime, 2011).

Dado que el queso es un producto lácteo fermentado, un paso fundamental en su elaboración es el metabolismo de la lactosa para generar ácido láctico, llevado a cabo por las bacterias ácido-lácticas (BAL). La acidificación del medio tiene tres funciones principales: favorece la actividad del coagulante, la expulsión de suero y previene el crecimiento de especies bacterianas indeseadas. La velocidad de acidificación afecta a la textura de la cuajada ya que controla la velocidad de desmineralización (separación del fosfato de calcio de la matriz proteica). Las BAL son adicionadas a la leche

antes del agente coagulante, aunque en la elaboración de algunos quesos artesanales no se utilizan BAL externas, sino que se aprovechan las especies adventicias en la leche (Fox y col., 2000; McSweeney, 2004). A modo de ejemplo, en la Figura 2.1.2 se muestra un diagrama de flujo general del protocolo para elaborar queso. Con el surgimiento de las distintas variedades, que en la actualidad son más de 500, este proceso sufrió ciertas modificaciones.

1.2.1. Queso Cheddar

Para elaborar quesos en países de clima frío fue necesario modificar algunos pasos del protocolo. Por ejemplo, una vez separado el suero, se desarrollaron dos estrategias para mantener la temperatura de la cuajada y promover así su acidificación. Una de las técnicas se basaba en la adición de agua tibia a la cuajada, mientras que la otra consistía en apilar la cuajada en montones que impedían la disminución de la temperatura. En este último caso, las pilas de cuajada se llamaron “Cheddars”, debido al lugar en donde se llevó a cabo este procedimiento por primera vez (a mediados del siglo XIX): un pueblo llamado Cheddar en el suroeste de Inglaterra (Lawrence y col., 1993).

La técnica utilizada para salar la cuajada también es crucial en la caracterización de una variedad de queso. En los primeros protocolos de elaboración de queso, la superficie de la cuajada se cubría con sal para preservarla por largos períodos de tiempo. No obstante, en localidades donde la sal se obtenía por evaporación del agua de mar, se comenzó a considerar la inmersión de la cuajada en salmuera (por ejemplo, en queso Gouda holandés). Otra opción consiste en cortar la cuajada en pequeñas porciones y adicionarle sal granulada, proceso llamado “salado en seco”. Esta técnica surgió en Inglaterra, donde abundan las rocas de sal y es la forma característica de salar el queso Cheddar. Debido a que la sal inhibe el crecimiento de las BAL, es muy importante esperar a que la cuajada alcance un pH de ~ 5,4 antes de adicionar la sal; a partir de este valor de pH la cuajada adquiere la textura fibrosa característica de esta variedad (Lawrence y col., 1993).

Por otro lado, la maduración es otro proceso fundamental para obtener la textura, el sabor y el aroma finales de las distintas variedades de queso. Por esto, muchos investigadores se han dedicado a estudiar los procesos químicos

y físicos que ocurren durante este período de tiempo, que puede variar de meses a años (Lane y col., 1997; Lynch y col., 1997; McSweeney, 2004).

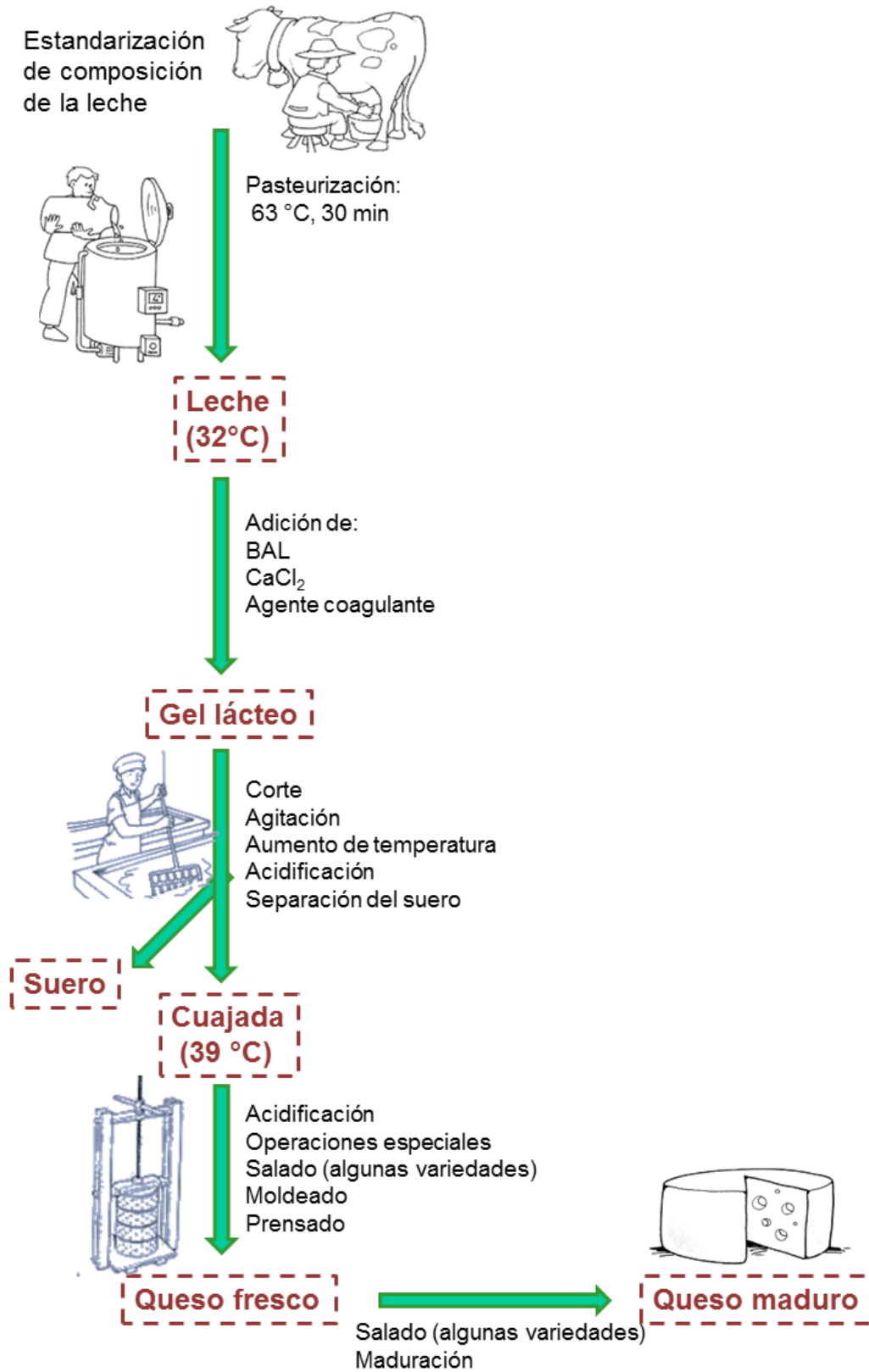


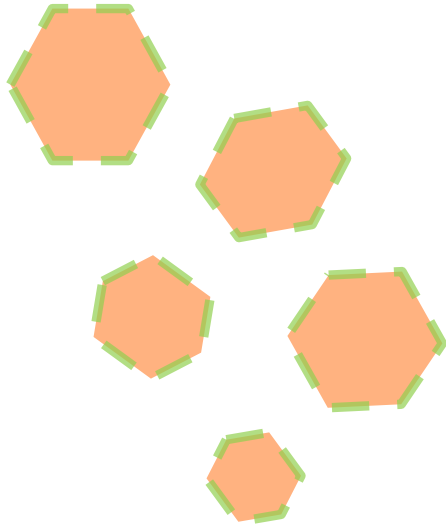
Figura 2.1.2: Protocolo general para la elaboración de queso, basado en el diagrama de flujo publicado por Fox y col. (2000).

En este trabajo de tesis se utilizó EEAN como coagulante para elaborar queso Cheddar y estudiar particularmente su efecto sobre las propiedades físico-químicas del queso durante su maduración. Principalmente se caracterizaron la proteólisis y los cambios en la textura de los quesos durante 4 meses de maduración. Se ha reportado que la proteólisis diferencial ejercida por distintos coagulantes afecta el sabor y el aroma del queso (Singh y col., 2003). Sin embargo, en base al estudio inicial de otro coagulante microbiano (Merheb-Dini y col., 2012), en esta primera instancia no se llevó a cabo el análisis sensorial de los quesos.

2. Objetivos particulares



- ✓ Obtener y caracterizar un extracto enzimático a partir del cultivo de *Aspergillus niger* NRRL3 por fermentación en estado sólido.
- ✓ Caracterizar los geles lácteos y el suero obtenidos al coagular leche con el extracto enzimático de *A. niger*.
- ✓ Elaborar queso Cheddar utilizando el extracto enzimático de *A.niger* como agente coagulante.
- ✓ Estudiar la composición química del queso Cheddar obtenido y los cambios físico-químicos desarrollados durante su maduración.



3. Materiales y métodos



3.1. Cultivo del microorganismo

El microorganismo utilizado fue *Aspergillus niger* NRRL3. El crecimiento de este hongo se llevó a cabo en tubos picos de flauta con agar papa (39 g/L, Britania) por incubación durante 5 días a 30 °C (Figura 2.3.1 a). Para resuspender los conidios se adicionaron 2 mL de agua destilada estéril y se utilizó una espátula. Se realizaron diluciones de la suspensión obtenida y se contaron los conidios con una cámara de Neubauer (Aberkane y col., 2002). Al mismo tiempo, se midió la absorbancia de las diluciones a 620 nm (Abs_{620nm}) para realizar una correlación con el número de conidios. Teniendo en cuenta los parámetros de correlación obtenidos, se determinó el número de conidios en las diluciones por medidas de Abs_{620nm} (Acacio y col., 2004).



Figura 2.3.1: a) *Aspergillus niger* NRRL3 en tubos picos de flauta con agar papa. b) Cáscara de naranja trozada, contenida en placas de Petri de vidrio para secar en estufa. c) Erlenmeyers de 500 mL usados para la fermentación, conteniendo el sustrato sólido (cáscarilla de soja y cáscara de naranja) procesado y seco. d) Sustrato sólido hidratado, inoculado con el microorganismo.

El cultivo del hongo se llevó a cabo por fermentación en estado sólido, en frascos erlenmeyers de 500 mL. Los sustratos sólidos empleados fueron cascarilla de soja (Molinos Río de la Plata S.A.) y cáscaras de naranja secas,

molidas y tamizadas (Figura 2.3.1 b y c). Se colocaron 30 g de sustrato sólido en cada erlenmeyer, en relación soja/naranja = 0,25 = 6 g de soja/24 g de naranja. El medio basal fue preparado con MgSO_4 10 g/L; NaCl 10 g/L; FeSO_4 0,08 g/L; NaNO_3 3,5 g/L y K_2HPO_3 250 mM (Cicarelli Laboratorios) y se ajustó su pH a 7 (Castilho y col., 2000). Tanto el medio basal como los sustratos sólidos fueron esterilizados por separado a 121 °C durante 15 min. En condiciones de esterilidad, se adicionaron 181,2 mL de medio basal a cada erlenmeyer, teniendo en cuenta el índice de ganancia de agua de los sustratos secos (3,4 mL $\text{H}_2\text{O}/\text{g}_{\text{soja}}$ y 6,7 mL $\text{H}_2\text{O}/\text{g}_{\text{naranja}}$). Para lograr la completa absorción del agua libre, el sustrato se hidrató durante una noche. Transcurrido ese tiempo, se inocularon $5 \cdot 10^5$ esporas en cada erlenmeyer y se los incubó durante 8 días a 30 °C en estufa (Tecnodalvo).

3.2. Obtención del extracto enzimático

Para obtener un extracto enzimático (EEAN) a partir del micelio de *Aspergillus niger* se adicionaron 50 mL de agua destilada a cada erlenmeyer y mediante agitación magnética se mezclaron el micelio y el sustrato durante 10 min. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 10000 g durante 20 min a 4 °C (Paranthaman y col., 2009), el sobrenadante se separó por filtración a través de una gasa, se registró su pH y se utilizó como EEAN. Antes de proceder a la caracterización de EEAN, se lo fraccionó para ensayar el efecto de la liofilización y decoloración sobre su actividad.

3.3. Decoloración del extracto enzimático

Para reducir la coloración de EEAN, se llevó a cabo el proceso de adsorción en carbón activado (Vishwanatha y col., 2010). Primero se ensayaron distintas concentraciones de adsorbente y diferentes tiempos de incubación para seleccionar las condiciones en las cuales la decoloración fue significativa. Se incubó al extracto con carbón activado 5 % P/V durante 12 h a 4 °C en agitación constante. Luego de este tratamiento, el carbón activado fue separado por centrifugación a 10000 g durante 20 min.

3.4. Caracterización del extracto enzimático de *A. niger*

3.4.1. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en EEAN se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951), usando caseinato de sodio (Sigma-Aldrich) como testigo. Distintas concentraciones de caseinato de sodio y de EEAN fueron incubadas con CuSO_4 (Cicarelli Laboratorios) en medio alcalino (Na_2CO_3 2 % P/V y NaOH 0,1 M; Cicarelli Laboratorios) durante 10 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo, el Cu^{2+} reacciona con los enlaces peptídicos formando un compuesto de coordinación que despliega la estructura tridimensional de la proteína exponiendo los residuos fenólicos de tirosina al solvente (Figura 2.3.2).

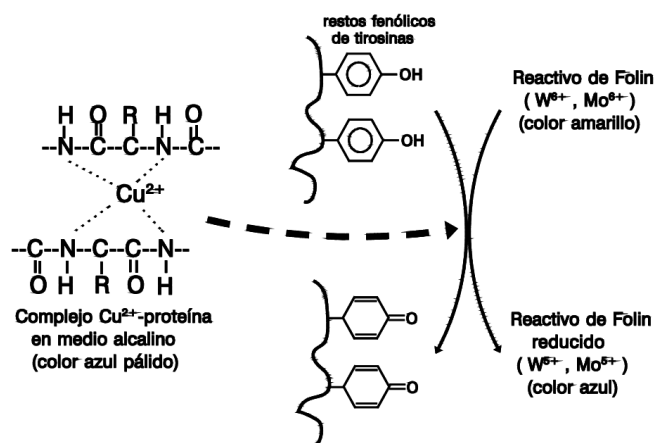


Figura 2.3.2: Reacciones químicas que producen el cambio de color medido en el protocolo de Lowry.

Luego se agregó el reactivo de molibdeno/tungsteno de Folin-Ciocalteu (Merck) al medio de reacción y se incubaron las muestras en oscuridad durante 30 min. El reactivo de Folin-Ciocalteu es reducido por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina cambiando el color de la solución de amarillo a azul, por lo que se determinó su $\text{Abs}_{750\text{nm}}$ en un espectrofotómetro V 550 (Jasco Inc.) de doble haz. En todos los casos se utilizó una cubeta de plástico de 1 cm de camino óptico y las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.4.2. Determinación de la actividad coagulante de la leche

La actividad coagulasa (AC) del EEAN se determinó por el método de Berridge, con algunas modificaciones (Berridge, 1952). Se incubaron tubos de

vidrio conteniendo 2 mL de leche en un baño termostático a 37 °C durante 15 min. Se adicionaron distintas alícuotas (50; 100; 150 y 200 μL) de EEAN (V_{EEAN}) a cada tubo y se los invirtió cada 2 min para luego devolverlos al baño termostático. Se definió como tiempo de coagulación al tiempo en que se observa un delgado film que se adhiere sobre las paredes del tubo. Se construyeron gráficas de tiempo de coagulación vs. $1/V_{\text{EEAN}}$, como la que se muestra en la Figura 2.3.3.

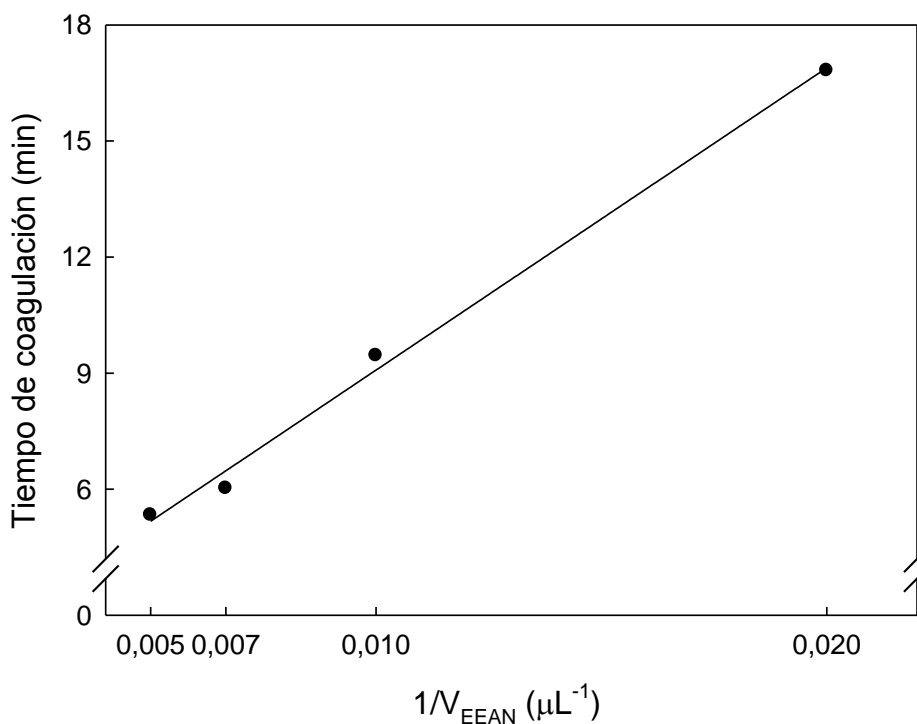


Figura 2.3.3: Ajuste lineal utilizado en la determinación de actividad coagulasa.

Se realizó el ajuste lineal de las gráficas obtenidas, considerando:

$$\text{tiempo de coagulación} = m * \frac{1}{V_{\text{EEAN}}} + h \quad (2.1)$$

Donde m corresponde a la pendiente y h a la ordenada al origen de la recta obtenida por el ajuste lineal. Utilizando estos dos parámetros, se definió una unidad de AC (1 UC) como el volumen (mL) de EEAN que se necesita para coagular 10 mL de leche en 10 min a 37 °C (Hashem, 2000). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

3.4.3. Determinación de la actividad proteasa

La actividad proteasa (AP) de EEAN se determinó a partir del método de Anson (1938), con algunas modificaciones propuestas por Cupp-Enyard (2008).

El sustrato utilizado fue caseinato de sodio 0,65 % P/V preparado en *buffer* fosfato (K_2HPO_4 , Cicarelli Laboratorios) 50 mM pH 7. Se colocaron 600 μ L de sustrato y 25 μ L de EEAN en tubos plásticos de 1,5 mL que fueron incubados a 37 °C en un baño termostático. Pasados 15 min, se cortó la reacción por el agregado de ácido tricloroacético (TCA, Cicarelli Laboratorios) 5 % P/V y los tubos fueron centrifugados a 10000 g durante 15 min. El sobrenadante se incubó con reactivo de Folin-Ciocalteu y con Na_2CO_3 0,55 M durante 30 min a 37 °C para finalmente medir su Abs_{660nm} . En este caso, el cambio de color del reactivo se debe a la reducción del mismo por las tirosinas libres del medio, generadas por la hidrólisis del caseinato. Se definió una unidad de AP (1 UP) como el volumen (mL) de EEAN que causó un aumento unitario en la Abs_{660nm} . Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

3.4.4. Análisis de proteínas por electroforesis

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en la que se utiliza dodecilsulfato de sodio (SDS) como agente desnaturizante es conocida, por sus siglas en inglés, como SDS-PAGE. El gel de concentración se preparó con acrilamida/bisacrilamida 10 % T en *buffer* Tris-HCl 0,1 M pH 6,8 (Sigma-Aldrich) mientras que el gel de separación se preparó con una concentración de acrilamida/bisacrilamida de 16 % T en *buffer* Tris-HCl 0,4 M pH 8,8. Se adicionó SDS 0,1 % P/V (Sigma-Aldrich) en las preparaciones para ambos geles. Para catalizar la polimerización de la acrilamida se utilizó persulfato de amonio 0,05 % P/V y tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich), 0,1 % V/V y 0,5 % V/V para el gel de concentración y de separación, respectivamente. Los geles (con un tamaño de 7 x 8 cm) se prepararon en una unidad vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad).

Las proteínas en EEAN fueron precipitadas por TCA 10 % P/V (Sagar y Pandit, 1983) y el precipitado se resuspendió en el *buffer* de siembra para electroforesis. La composición del *buffer* de siembra fue Tris-HCl 65 mM pH 6,80; glicerol 26 % V/V (Cicarelli Laboratorios); SDS 2 % P/V; azul de bromofenol 0,04 % P/V y β -mercaptoetanol 5 % V/V (Sigma-Aldrich). El *buffer* de corrida contenía: SDS 0,1 % P/V y glicina 0,19 M en Tris 25 mM pH 8,3 (Laemmli, 1970). La corrida electroforética se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando 25 mA de intensidad para el gel de concentración y 40 mA

para el gel de separación. Para teñir los geles se utilizó Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma-Aldrich) (Blakesley y Boezi, 1977) y su posterior decoloración se logró por sucesivos enjuagues con agua destilada. Los geles se escanearon y se interpretaron utilizando el programa *GelPro Analyser 4.0* (Media Cybernetics). Se obtuvo el perfil electroforético a partir de la imagen del gel, las bandas con menor movilidad electroforética (Me) son las cercanas al límite del gel de concentración, mientras que las bandas con mayor Me son las cercanas al frente de corrida.

3.5. Caracterización de los geles lácteos inducidos por el extracto enzimático de *A. niger*

3.5.1. Preparación de leche reconstituida y formación de geles lácteos

La suspensión de leche se preparó por disolución de leche descremada en polvo (Milkaut) 10 % P/V en CaCl₂ 5 mM, resultando un pH final de 6,7 ± 0,1. Se adicionó 0,01 % P/V de azida sódica (Cicarelli Laboratorios) como preservante microbiano. En todos los casos, la suspensión se preparó 24 h antes de realizar los experimentos, para alcanzar la estabilización de la estructura de las MC y se la conservó en heladera a 4 °C.

Los geles se formaron a partir de esta suspensión de leche, que se fraccionó en tubos para ser incubados en baño termostático a 37 °C durante 15 min. Una vez equilibrada la temperatura, se adicionó EEAN y se procedió a la homogenización del sistema para finalmente trasvasarlo al recipiente final que contendrá al gel. Se separó 1 mL de sistema para controlar la gelificación por inversión, mientras que los recipientes fueron mantenidos sin perturbaciones en el baño termostático hasta la formación del gel. Se ensayaron 10 concentraciones de EEAN diferentes (1 - 10 % V/V) y se realizaron triplicados de cada condición para todos los experimentos.

3.5.2. Análisis de color

Los geles se formaron a partir de 20 mL de suspensión de leche en recipientes plásticos cilíndricos de 3 cm de diámetro y 3 cm de altura. Se utilizó una cámara fotográfica digital (EOS-Rebel T3, Canon) para tomar imágenes de los geles lácteos en una caja de madera blanca con iluminación uniforme

(Soazo y col., 2015). Se colocó una cartulina negra debajo de cada gel, para aumentar el contraste y las imágenes fueron almacenadas en formato TIFF (Figura 2.3.4 a). Se ajustaron los parámetros de la cámara digital en modo manual con una apertura del lente de 8, tiempo de exposición 1/200, zoom de 35 mm, sin *flash*, sensibilidad ISO 400 y máxima resolución (3648 X 2736 pixeles). En las mismas condiciones, se tomaron imágenes de una carta de calibración de color IT8 (Wolf Faust), como la que se muestra en la Figura 2.3.4 b).

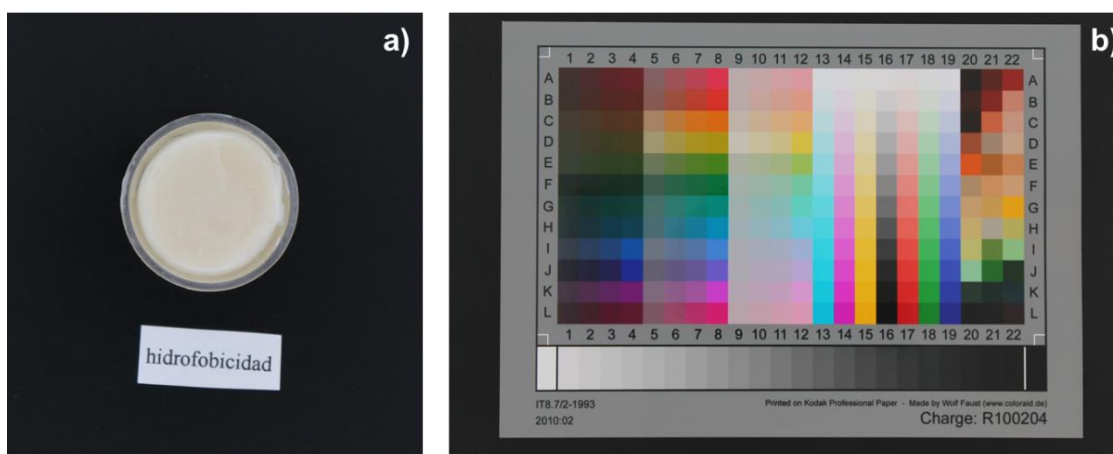


Figura 2.3.4: a) Imagen de un gel lácteo inducido por EEAN obtenida sobre fondo negro. b) Imagen de la carta de calibración de color IT8 obtenida en las mismas condiciones que las muestras.

Durante el procesamiento de las imágenes, esta carta de calibración se utilizó para obtener un perfil de color que fue aplicado a las imágenes de los geles con el programa *Photoshop* (Adobe Systems Inc.) (Yam y Papadakis, 2004). Para cuantificar el color se seleccionó el modelo internacional CIELAB, basado en los valores de L^* (luminosidad), a^* (componente cromático que va del verde al rojo) y b^* (componente cromático que va del azul al amarillo). Estos parámetros fueron obtenidos a partir del histograma de color de cada imagen y con los mismos se calculó el índice de pardeamiento (IP) (Palou y col., 1999).

$$IP = \frac{401,2 a^* + 540,7 b^*}{5,6 L^* + a^* - 3 b^*} \quad (2.2)$$

3.5.3. Análisis de textura mecánica

Se llevaron a cabo ensayos de penetración utilizando una máquina universal de ensayo (Multitest 2.5-d, Mecmesin) acoplada a un dinamómetro

digital con celda de carga de 25 N (Figura 2.3.5). Los geles lácteos fueron penetrados por una sonda de geometría cilíndrica de 2 cm de diámetro a una velocidad de desplazamiento constante de 1 mm/s y hasta una profundidad de 10 mm.



Figura 2.3.5: Penetración de geles lácteos con máquina universal de ensayo.

A partir de los perfiles de penetración obtenidos (gráficas de fuerza vs. distancia penetrada), se calcularon dos parámetros de textura mecánica: la fuerza requerida para fracturar los geles lácteos (FF) y la firmeza de los mismos (FI). Se definió FF como la fuerza máxima ejercida sobre el gel previo a un cambio drástico en su perfil de penetración y FI como la derivada inicial de la fuerza respecto de la distancia penetrada (Pang y col., 2015).

3.5.4. Determinación de propiedades reológicas

La reología se dedica al estudio de la deformación y el flujo de la materia. Ante la aplicación de un esfuerzo, los materiales se deforman y pueden presentar comportamiento viscoso (fluidos), elástico (sólidos) ó viscoelástico. Los geles lácteos son materiales viscoelásticos, por lo que presentan comportamiento dual (Rao, 2010). Se llevaron a cabo experimentos de oscilación dinámica de corta amplitud con un reómetro, modelo AR-G2 (TA Instruments), utilizando una geometría de aluminio de plato paralelo (de 60 mm de diámetro). Pasaron 3 min entre la adición de EEAN al sistema y el comienzo de la oscilación, una vez introducida la muestra en el reómetro. Se aplicó un esfuerzo oscilatorio de 0,1 % a una frecuencia constante de 1 Hz. Para

caracterizar las propiedades reológicas de los geles se registraron tanto el módulo viscoso (G'') como el elástico (G') durante 90 min a 32 °C.

Para el análisis de los resultados, se decidió informar el valor de G' a los 90 min ($G'_{\text{máx}}$) y el tiempo de gelificación (t_{gel}), considerado el tiempo necesario para obtener un $G' \geq 1$ Pa (Jaros y col., 2008; Ibáñez y col., 2015).

3.6. Caracterización del líquido expelido por los geles lácteos

3.6.1. Determinación de la masa de líquido expelido

Se formaron geles lácteos a partir de 10 mL de suspensión de leche en tubos plásticos de 15 mL. En una balanza analítica se determinó la masa de los tubos conteniendo los geles (M_a). Luego, los tubos fueron centrifugados a 200 g durante 10 min, se separó el líquido expelido en cada tubo y se registró nuevamente su masa (M_b). La masa de líquido expelido se calculó como $M_a - M_b$ (Pang y col., 2015).

3.6.2. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó utilizando el ensayo de decoloración del radical ABTS (Re y col., 1999). Se preparó una solución madre de ABTS 7 mM (Sigma-Aldrich) en agua destilada. Para formar la solución de radical ABTS ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) se mezcló la solución madre con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, Cicarelli Laboratorios) 2,45 mM y se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente por 12 a 16 h antes de usar. El espectro de absorción de la solución $\text{ABTS}^{+\cdot}$ presenta un máximo a 730 nm y la absorbancia a esta longitud de onda disminuye si el radical se reduce a ABTS.

Para el ensayo, la solución de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ fue diluida en *buffer* fosfato 5 mM pH 7 hasta alcanzar $\text{Abs}_{730\text{nm}} = 0,70 \pm 0,02$. A 1 mL de solución $\text{ABTS}^{+\cdot}$ diluida se le adicionaron 10 μL de líquido expelido por los geles y luego de exactamente 6 min se midió $\text{Abs}_{730\text{nm}}$. Si la muestra posee alguna sustancia antioxidante, el $\text{ABTS}^{+\cdot}$ se reduce a ABTS, por lo que la $\text{Abs}_{730\text{nm}}$ disminuye. El blanco se llevó a cabo con 10 μL de agua destilada y los resultados se expresaron como $\Delta\text{Abs}_{730\text{nm}} = \text{Abs}_{730\text{nm}} (\text{blanco}) - \text{Abs}_{730\text{nm}} (\text{muestra})$. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

3.7. Análisis de proteínas en geles lácteos y su líquido expelido

Se analizaron muestras de geles lácteos inducidos por diferentes concentraciones de EEAN (1 – 5 % V/V) y el líquido expelido por los mismos utilizando SDS-PAGE. Se respetó el protocolo explicado en la sección 3.4.4., modificándose solamente la concentración total de monómeros de acrilamida para cada gel (% T). El gel de concentración se preparó 7 % T, mientras que el gel de separación fue de 13 % T.

Los geles lácteos se formaron a partir de 0,5 mL de suspensión de leche y luego del agregado de EEAN fueron incubados por 30 min en baño termostático a 37 °C. Los tubos plásticos conteniendo este sistema fueron centrifugados, a 200 g durante 15 min para separar el líquido expelido. Se adicionaron 500 µL de *buffer* de siembra al precipitado obtenido en esta centrifugación y se sembraron 5 µL en el SDS-PAGE (Pesic y col., 2012).

Las proteínas del líquido expelido fueron precipitadas con TCA 20 % P/V y luego de la centrifugación (10000 g durante 15 min), se resuspendió el precipitado con 100 µL de *buffer* de siembra. Se sembraron 20 µL de esta muestra en el SDS-PAGE. Como control, se sembraron 5 µL de una dilución 1/20 de una suspensión de leche (EEAN 0 % V/V).

3.8. Elaboración de queso Cheddar

Se elaboraron quesos del tipo Cheddar, según el protocolo publicado en la bibliografía (Fox y col., 2000), en la planta piloto de la Universidad de Cork, Irlanda. La leche de vaca (3,5 % de grasa; 3,35% de proteína) se pasteurizó por incubación a 63 °C durante 30 min. Se ensayó el efecto de la utilización de dos coagulantes diferentes en la elaboración y maduración de queso Cheddar. Los quesos control (QQ) se elaboraron usando quimosina (CHY-MAX Plus, ~200 IMCU/mL, CHR Hansen) mientras que los quesos tratados (QA) se elaboraron usando EEAN. Luego de la pasteurización, se fraccionó la leche: 10 L por recipiente y se suplementó con CaCl₂ 0,09% P/V. Los recipientes se incubaron en baño termostático a 32 °C, como se muestra en la Figura 2.3.6.



Figura 2.3.6: Recipientes conteniendo 10 L de leche, sumergidos en baño termostático a 32 °C.

Se adicionó un cultivo iniciador (*Lactococcus lactis* R-604Y, CRH Hansen,) en concentración final 0,03 % P/V y se homogeneizó por agitación manual. Luego de 30 min, se adicionaron los respectivos coagulantes a cada recipiente: la quimosina se adicionó en una concentración final de 0,03 % V/V, mientras que EEAN fue disuelto en una fracción de leche para lograr una concentración final de 3,5 % V/V. Una vez que la leche coagulada adquirió suficiente firmeza (Figura 2.3.7 a), se procedió al corte con liras horizontales y verticales (Figura 2.3.7 b). A partir de este momento, el pH del sistema fue registrado utilizando un medidor de pH digital portátil. Se elevó la temperatura de los baños de 32 °C a 39 °C hasta alcanzar un pH de 6,2. El pH original de la leche es ligeramente ácido, con un valor promedio 6,7 (Fox y col., 2000).

Se separó el suero de los recipientes (Figura 2.3.7 c) y la cuajada se cortó en bloques que se apilaron y cocinaron (invirtiéndolos cada 15 min) hasta alcanzar un pH de 5,4 (Figura 2.3.7 d). Los bloques de cuajada se cortaron en trozos y fueron salados por incubación durante 30 min con NaCl 2,5 % P/P (Figura 2.3.7 e). Finalmente los trozos de cuajada salados se colocaron dentro de moldes de desuerado (Figura 2.3.7 f y g) y fueron comprimidos durante 14 h. Pasado ese tiempo, los quesos se envasaron al vacío y se incubaron en una cámara de maduración (8 °C) durante 4 meses. La elaboración de los quesos se realizó por triplicado.



Figura 2.3.7: Imágenes obtenidas durante el protocolo de elaboración de queso Cheddar.

3.9. Análisis de composición química

Pasados 10 días desde la elaboración de los quesos, se determinó su composición química. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado para cada queso. Además, se determinó el rendimiento quesero en cada caso en función de la cantidad de leche procesada y del peso de los quesos obtenidos, utilizando la siguiente fórmula (Melilli y col., 2002):

$$\text{Rendimiento quesero (\%)} = \frac{\text{Masa del queso obtenido (Kg)}}{\text{Masa de leche utilizada (Kg)}} * 100 \quad (2.3)$$

3.9.1. Determinación de NaCl

Para determinar el contenido de NaCl de los quesos se utilizó la metodología propuesta por Fox (1963) que valora el Cl⁻ por titulación potenciométrica con AgNO₃. Se incubaron 2 g de queso rallado en 100 mL de HNO₃ (Sigma-Aldrich) 0,1 % V/V a 60 °C durante 15 min. Las muestras se

enfriaron a temperatura ambiente y fueron tituladas con AgNO_3 0,1 N (Sigma-Aldrich) usando un electrodo de plata como indicador.

3.9.2. Determinación de humedad

El porcentaje de humedad de los quesos se determinó utilizando el método estándar de secado en estufa (Standard, 2004). Primero, los recipientes conteniendo arena (Sigma-Aldrich) se secaron en estufa a $103\text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 2 h. Luego, los mismos fueron conservados en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se registró su masa exacta (M_1). Se colocaron aproximadamente 2 g (exactamente pesados) de queso rallado (M_2) en los recipientes y después de homogeneizar las muestras con la arena, se llevó a cabo el secado en la estufa durante una noche o hasta pesada constante (M_3). El porcentaje de humedad de las muestras se calculó teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(M_2 - M_3)}{(M_2 - M_1)} * 100 \quad (2.4)$$

3.9.3. Determinación del contenido de grasa

La determinación del contenido de grasa de los quesos se llevó a cabo por el método de Gerber (Standard, 1955).

Se envolvieron en papel absorbente muestras de 3 g de queso rallado, exactamente pesadas, como se muestra en la Figura 2.3.8 a). Dentro de butirómetros especiales para queso se colocaron 10 mL de H_2SO_4 (Thermo Fisher Scientific), 3 mL de H_2O destilada a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y las muestras envueltas (Figura 2.3.8 b). Luego se adicionaron otros 5 mL de agua destilada a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y 1 mL de pentanol para finalmente colocar la tapa.

Los butirómetros se calentaron en baño termostático a $80\text{ }^\circ\text{C}$ y se agitaron vigorosamente cada 15 min hasta lograr la completa disolución de la muestra. Finalmente se centrifugaron los butirómetros invertidos a 400 g durante 5 min (centrífuga Funke-Gerber). El contenido de grasa de cada muestra se determinó por lectura directa, como se muestra en la Figura 2.3.8 c).

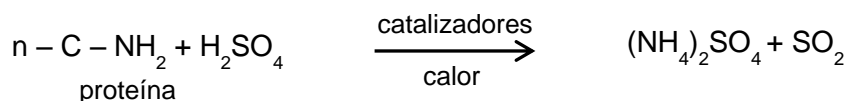


Figura 2.3.8: Método de Gerber. a) Muestras de queso envueltas en papel absorbente. b) Butirómetro lleno con ácido sulfúrico, agua y la muestra. c) Lectura del contenido de grasa una vez terminado el experimento.

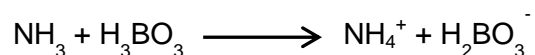
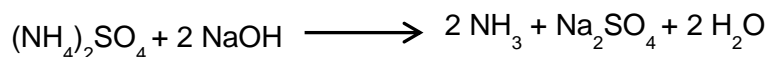
3.9.4. Determinación del contenido de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método de Kjeldahl (1883). Para los quesos se utilizó 1 g de muestra y para los sueros, 2 g de muestra. Se adicionaron a cada muestra 20 mL de H₂SO₄ bajo en nitrógeno (Thermo Fisher Scientific) y dos píldoras de catalizadores (conteniendo cada una 3,47 g de K₂SO₄ y 0,003 g de Se; Thompson & Capper). La metodología constó de 3 pasos:

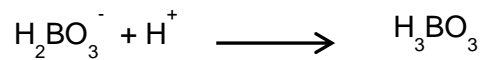
- a) La digestión del material orgánico por incubación a 400 °C (ebullición del H₂SO₄) por más de 5 h.



- b) La alcalinización del NH₄⁺ acompañado de la destilación del NH₃ y su recolección en ácido bórico para formar el anión borato



- c) La titulación del borato con ácido clorhídrico de concentración exactamente conocida para valorar el nitrógeno contenido en la muestra



A pesar de que el nitrógeno de la muestra también proviene de componentes no proteicos, el resultado del análisis es una buena aproximación del contenido de proteína del alimento. A partir del volumen de HCl (Vol_{HCl}) gastado en la titulación del anión borato y de su concentración, se calculó el porcentaje de nitrógeno total (NT) en la muestra según la siguiente fórmula:

$$[\text{NT}] (\%) = \frac{\text{Vol}_{\text{HCl}}(\text{mL}) * [\text{HCl}](\text{N}) * 0,014}{\text{Masa de la muestra (g)}} * 100 \quad (2.5)$$

Luego, el porcentaje de proteína se calculó teniendo en cuenta el factor de conversión para productos lácteos:

$$[\text{Proteína}](\%) = [\text{NT}](\%) * 6,38 \quad (2.6)$$

3.10. Maduración de queso Cheddar

El análisis de la maduración de los quesos se llevó a cabo mediante distintas metodologías que se realizaron una vez al mes durante los 4 meses de maduración.

3.10.1. Determinación de pH

Se pesaron 2 g de queso rallado y se colocaron en una bolsa con el doble de masa de agua destilada. Se homogeneizó el sistema utilizando un *Stomacher* (Biomaster) durante 5 min a temperatura ambiente y se midió el pH. Esta determinación se realizó por triplicado.

3.10.2. Análisis microbiológico

Se llevó a cabo el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) iniciadoras y no iniciadoras utilizando diferentes medios y condiciones de cultivo. Las BAL iniciadoras se incubaron aeróbicamente en agar LM 17 (Merck Millipore) a 30 °C durante 3 días (Terzaghi y Sandine, 1975); mientras que, los microorganismo no iniciadores se incubaron en agar Rogosa (Merck Millipore)

a 30 °C durante 5 días, en jarras de anaerobiosis (Rogosa y col., 1951). Las muestras fueron tomadas del interior de cada queso en flujo laminar y con material flameado en mechero. Se removió una delgada capa de la superficie del queso con un cuchillo y la muestra fue obtenida utilizando un sacabocado, como se muestra en la Figura 2.3.9.



Figura 2.3.9: Metodología utilizada para tomar muestras de los quesos en condiciones de esterilidad.

Se recogió la muestra en una bolsa estéril, se registró su masa y se adicionaron 9 mL de *buffer* citrato de sodio (Sigma-Aldrich) por cada gramo de muestra. El sistema fue homogeneizado en *Stomacher* durante 5 min y a partir de la suspensión resultante (dilución 10^{-1}) se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Se colocó 1 mL de las cuatro primeras diluciones (más concentradas) en diferentes placas de Petri que fueron cubiertas con agar Rogosa. Se procedió de la misma manera con las últimas tres diluciones (menos concentradas) y las placas se cubrieron con agar LM 17. Se llevaron a cabo duplicados de todas las placas. Transcurrido el tiempo de incubación para cada microorganismo, se seleccionaron aquellas placas que a simple vista tenían entre 25 y 250 colonias. Se contaron las colonias en cada placa y se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de queso.

3.10.3. Obtención de perfiles de textura mecánica

Se obtuvieron perfiles de textura mecánica de los quesos usando un texturómetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems). Las muestras, cilindros de 20 mm de diámetro y 20 mm de altura de cada queso, se tomaron 30 min antes de llevar a cabo el análisis, como se muestra en la Figura 2.3.10.

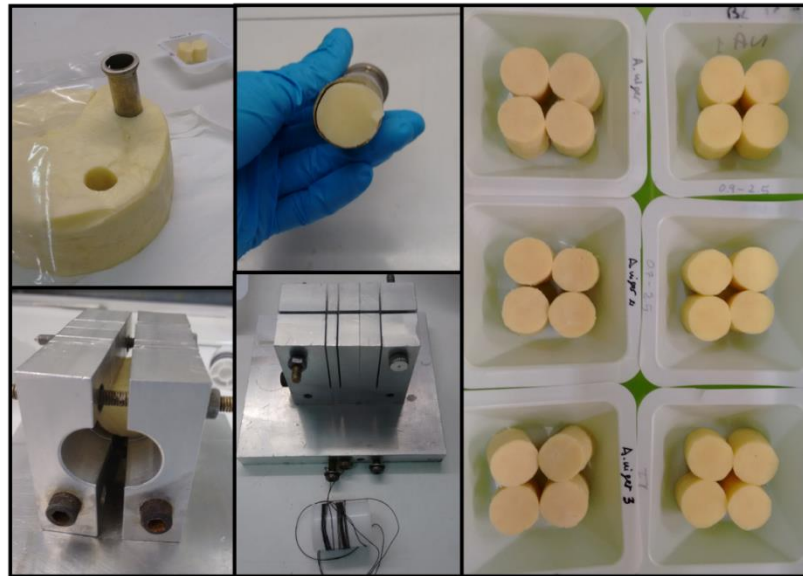


Figura 2.3.10: Metodología para tomar muestras a analizar con el texturómetro.

Los cilindros fueron sometidos a una compresión del 75 % de su altura original, en dos ciclos, a una velocidad de 1 mm/s. Este ensayo se realizó por cuadruplicado. En la Figura 2.3.11 se muestran ejemplos de los perfiles de textura obtenidos para cada queso. Se obtuvieron perfiles con la misma forma en todos los casos para cada tipo de queso. A partir de los perfiles de textura se calcularon los parámetros: dureza, elasticidad uniaxial y cohesividad.

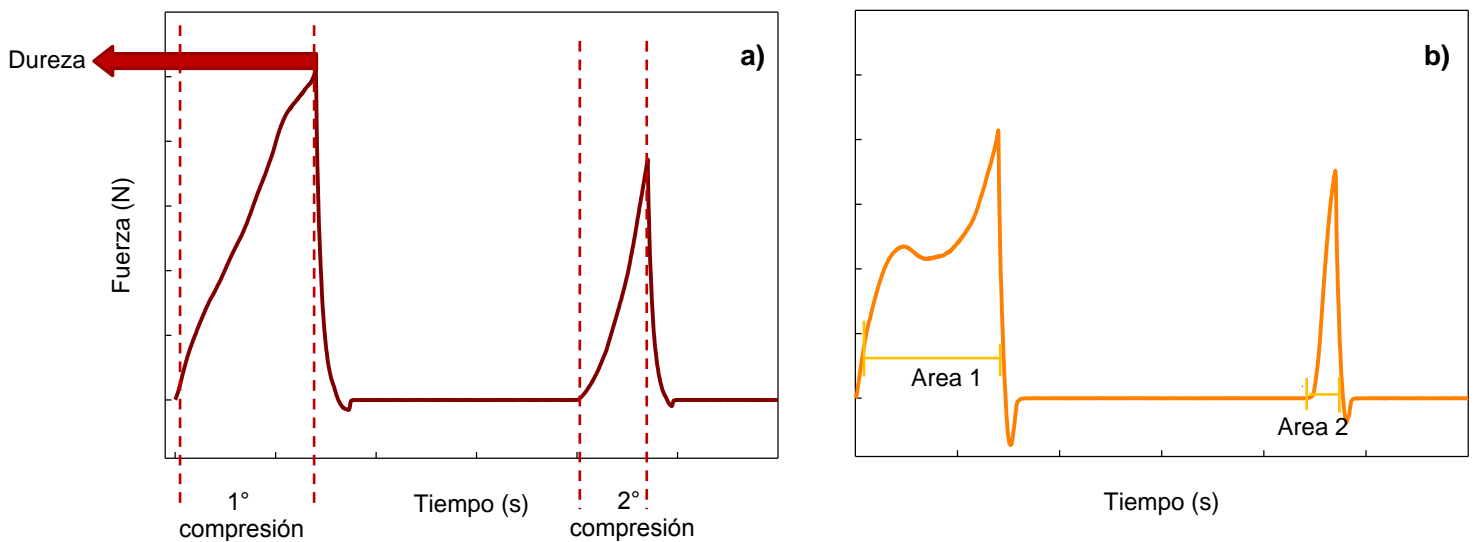


Figura 2.3.11: Perfiles de textura mecánica para a) QQ y b) QA, pasados 30 días de su elaboración.

La dureza del material equivale a la fuerza máxima ejercida durante la 1° compresión (Figura 2.3.11 a). La elasticidad uniaxial hace referencia a la altura

que el alimento recupera en el tiempo entre la 1° y la 2° compresión, se calcula como la relación entre el tiempo que dura la 2° compresión y el tiempo que dura la 1° compresión (Figura 2.3.11 a). La cohesividad refleja cuán bien el producto soporta una segunda deformación relativa a la resistencia ofrecida durante la 1° compresión y se calcula como la relación entre el área 2 y el área 1 (Figura 2.4.8 b) (Fizman y col., 1998; Tunick, 2000).

3.10.4. Análisis de la proteólisis

Se llevó a cabo la extracción de proteínas de los quesos a pH 4,6. Se pesaron 20 g de queso rallado y se colocaron en una bolsa con el doble de masa de agua destilada. El sistema fue homogeneizado en *Stomacher* durante 10 min; la suspensión de queso resultante se colocó en recipientes para centrífuga y se ajustó su pH con HCl 1 N a 4,6. Luego, las muestras se incubaron en baño termostático a 40 °C durante 1 h y se centrifugaron durante 30 min a 3000 g a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Sorvall, Thermo Fisher Scientific Inc.). Se removió la grasa de las muestras utilizando una espátula, se reservó el precipitado (fracción insoluble) mientras que el sobrenadante (fracción soluble) se filtró a través de papel de filtro N° 113 (Whatman) (McSweeney y Fox, 1997). Se liofilizaron las fracciones solubles e insolubles para su posterior análisis. La fracción insoluble contiene a las CN y a los polipéptidos derivados de su proteólisis primaria mientras que la fracción soluble contiene aminoácidos y péptidos producidos durante la proteólisis secundaria.

3.10.4.1. Fracción insoluble

Se analizó la fracción insoluble de proteínas a pH 4,6 en cada tipo de queso y a distintos tiempos de maduración mediante urea-PAGE. La concentración de acrilamida en el gel de concentración fue de 4,2 % T, mientras que en el gel de separación fue de 12,5 % T. En este caso, el agente desnaturizante utilizado fue urea 8 M, tanto en los geles como en el *buffer* de siembra (Andrews, 1983). Los liofilizados se disolvieron en *buffer* de siembra (10 mg/mL) mediante incubación a 50 °C durante 15 min. Se utilizó caseinato de sodio 10 mg/mL como marcador de peso molecular (MPM). Los geles (con un tamaño de 16 x 16 cm) se prepararon en una unidad vertical Protean 2 xi (Bio-Rad). Se sembraron 3,5 µL del MPM y 8 µL de las fracciones insolubles

obtenidas a distintos tiempos de maduración. La corrida electroforética se llevó a cabo a 280 V para el gel de concentración y a 300 V para el gel de separación. Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma-Aldrich) y se destiñeron por sucesivos enjuagues con agua destilada, como se explicó en la sección 3.4.4.

3.10.4.2. Fracción soluble

La concentración de nitrógeno en la fracción soluble ([NS]) se determinó por el método de Kjeldahl a los 2 y a los 4 meses de maduración. Se utilizaron 5 g de fracción soluble para el ensayo. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y se procedió como se explicó en la sección 3.9.4. Los resultados se expresaron con respecto a la concentración de nitrógeno total ([NS]/[NT]).

La concentración de aminas libres ([AL]) se determinó por el método del ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS) (Fields, 1971). El TNBS reacciona con aminas libres generando un compuesto que permanece unido al aminoácido, péptido o proteína y presenta máxima absorción de la luz a 420 nm. La reacción se lleva a cabo a pH alcalino y se corta por acidificación del medio. Se incubó una alícuota de fracción soluble con reactivo TNBS (Sigma-Aldrich) 2 % V/V en $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1 M pH 9,5 (Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 1 h. La reacción se cortó por el agregado de NaH_2PO_4 0,1 M (Sigma-Aldrich) conteniendo Na_2SO_3 1,5 mM (Sigma-Aldrich) y se midió Abs a 420 nm. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y se utilizó L-leucina-p-nitroanilina (Sigma-Aldrich) para realizar la curva de calibración. Utilizando los parámetros de la curva de calibración, se calculó la [AL] para cada queso a los 2 y a los 4 meses de maduración.

Se obtuvieron los perfiles de péptidos de las fracciones solubles mediante cromatografía líquida de ultra eficiencia en fase reversa (RP-UPLC). Se utilizaron dos solventes para la fase móvil: A, ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich) 0,1 % V/V en agua ultra pura (Milli-Q system, Waters Corporation) y B, TFA 0,1 % V/V en acetonitrilo (Merck Millipore). Las fracciones solubles liofilizadas fueron disueltas en el solvente A (10 mg/mL) y, antes de ser introducidas en el cromatógrafo, se filtraron a través de un filtro de membrana de acetato celulosa (Sartorius GmbH), tamaño de poro 0,45 μm . El equipo utilizado fue un Acquity UPLC (clase H) (Waters Corporation). La

elución fue registrada espectrofotométricamente a 214 nm. Se utilizó una columna C18 Acquity UPLC BEH (2,1 mm de diámetro y 100 mm de longitud).

3.11. Análisis del color final de los quesos

Se utilizó un colorímetro digital (Konika-Minolta Optics Inc), como el que se muestra en la Figura 2.3.12, para determinar el color de los quesos pasados 120 días de su maduración. Se seleccionó el modelo internacional de color CIELAB y se determinaron los parámetros L^* , a^* y b^* en cada caso. Las determinaciones fueron realizadas a partir de 3 porciones de cada queso y a temperatura ambiente.



Figura 2.3.12: Determinación de los parámetros que definen el color de una muestra de queso utilizando un colorímetro digital.

3.12. Procesamiento de los datos obtenidos

El análisis gráfico y estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa *Sigma Plot* (versión 12.0). Para estudiar las diferencias entre parámetros obtenidos con diez concentraciones de EEAN diferentes se utilizó el análisis de la variancia (ANOVA) a un solo factor y el test de Tukey.

Por otro lado, para estudiar las diferencias entre parámetros obtenidos a partir de muestras independientes se utilizó la prueba t de Student, cuando los datos presentaron distribución normal de los residuos e igual variancia. En caso contrario, se utilizó el test de Mann-Whitney. Si los parámetros estudiados correspondían a muestras dependientes, se utilizó la prueba t de Student

apareada, cuando los residuos presentaron distribución normal. En caso contrario se utilizó la prueba de rango de Wilcoxon.

Para estudiar las diferencias entre los parámetros determinados a partir de los quesos y además conocer la variación de estas diferencias durante su maduración se aplicó ANOVA bifactorial y test de Tukey.

En todos los casos las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a valores de $p < 0,05$.

4. Resultados y discusión



4.1. Caracterización del extracto enzimático de *A. niger*

4.1.1. Determinación de concentración de proteínas y actividades

En las fermentaciones realizadas se obtuvieron extractos enzimáticos a partir del micelio de *A. niger* (EEAN). Se determinaron actividad coagulasa (AC) y actividad proteasa (AP) de cada uno para seleccionar aquellos con mayor capacidad de coagular la leche. Se mezclaron los extractos seleccionados para trabajar con una única solución de partida. Se obtuvieron valores promedio de AC (UC/mL) = $1,1 \pm 0,1$ y de AP (UP/mL) = $29,3 \pm 0,7$. Teniendo en cuenta que no se realizaron procesos de purificación se espera que la relación entre ambas actividades (AC/AP) en EEAN sea menor a la de otros extractos fúngicos propuestos como agentes coagulantes de la leche (Hashem, 2000; Vishwanatha y col., 2010). De todas formas, es difícil realizar comparaciones fehacientes ya que existen diferentes metodologías para determinar la AC y su valor depende de cual se utilizó (Law y Tamime, 2011).

El EEAN posee color marrón que podría afectar significativamente el color de los geles lácteos y por esto se llevó a cabo su decoloración mediante incubación con carbón activado. Sin embargo, este tratamiento causó una disminución de ambas actividades enzimáticas reduciéndose la relación AC/AP al 85 % de su valor original debido a la adsorción de enzimas en el carbón activado. Esto está de acuerdo con la reducción significativa de la concentración de proteínas en EEAN, de (17 ± 4) mg/mL a $(7,6 \pm 0,5)$ mg/mL. Este resultado no coincide con otro ya publicado en el que el tratamiento con carbón activado redujo ambas actividades enzimáticas pero la relación AC/AP se incrementó a más del doble (Vishwanatha y col., 2010). Las peptidasas inespecíficas se adsorberían preferencialmente en el carbón activado en este caso aunque no así en el nuestro. Por esto, se trabajó con el EEAN inicial del cual se ensayó, además, la variación de la AC/AP luego del proceso de liofilización, que permite reducir el volumen de extracto y facilita su conservación. El proceso de liofilización redujo la AC/AP sólo en un 9 % y, por esto, el EEAN liofilizado fue utilizado de aquí en adelante.

4.1.2. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La capacidad de *A. niger* de producir diferentes tipos de enzimas ha sido estudiada en profundidad (van den Hombergh y col., 1997). Sin embargo, en función de las condiciones de crecimiento y sustratos utilizados, tanto la composición enzimática de los extractos como la actividad resultante pueden variar (Schuster y col., 2002). Como se observa en la Figura 2.4.1, el EEAN contiene más de una proteína que podría ser responsable de las actividades desarrolladas por el mismo.

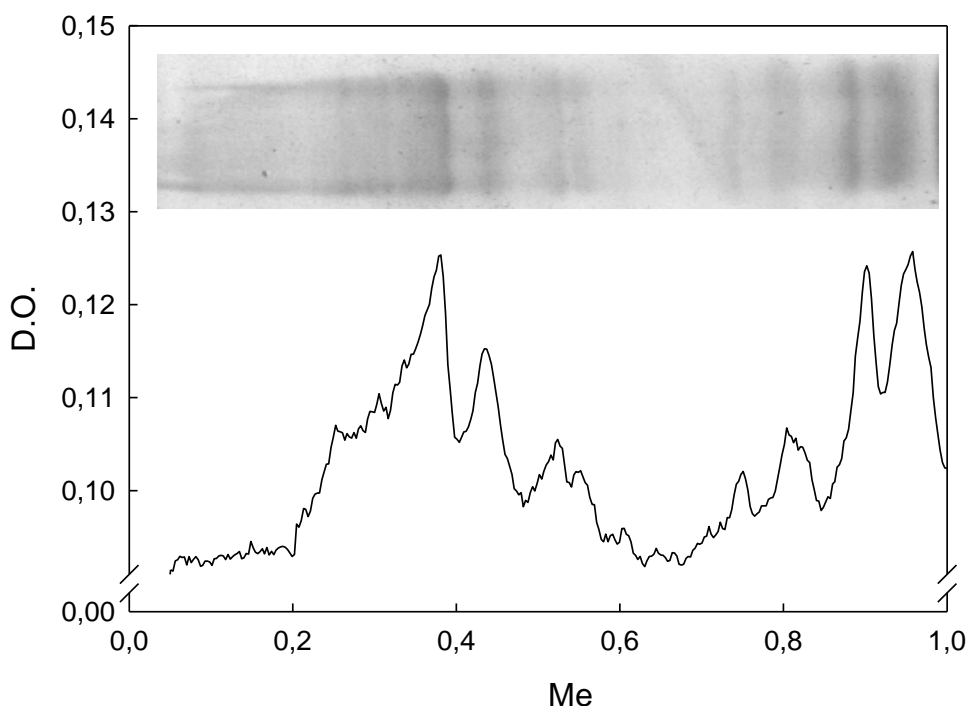


Figura 2.4.1: Perfil electroforético obtenido por SDS-PAGE de las proteínas presentes en EEAN obtenido en condiciones desnaturalizantes.

Sin embargo, no todas las bandas presentes en el perfil electroforético de la Figura 2.4.1 podrían estar asociadas a enzimas. Para saber esto es importante realizar un zimograma que es otra técnica electroforética en la que un sustrato es copolimerizado en el gel de poliacrilamida para la posterior detección de actividad enzimática por incubación en las condiciones óptimas de reacción (Wilkesman y Kurz, 2009). No fue posible obtener el zimograma y se evaluaron diferentes explicaciones. Probablemente las enzimas en EEAN se encuentran diluidas y su actividad no es suficiente para poder observarlas o bien la electroforesis afecta la estructura enzimática impidiendo su revelado por actividad. La purificación y concentración de las enzimas de EEAN sería un

paso fundamental para lograr caracterizarlas. Por otro lado, este trabajo de tesis se enfoca en estudiar la capacidad de EEAN de producir geles lácteos y en caso afirmativo, caracterizar los mismos para saber si son compatibles con la elaboración de queso.

4.2. Caracterización de los geles obtenidos al coagular leche con diferentes concentraciones del extracto de *A. niger*

4.2.1. Análisis de color

Se obtuvieron geles a partir de la coagulación de leche utilizando distintas concentraciones de EEAN. En la Figura 2.4.2 se muestran los resultados obtenidos.

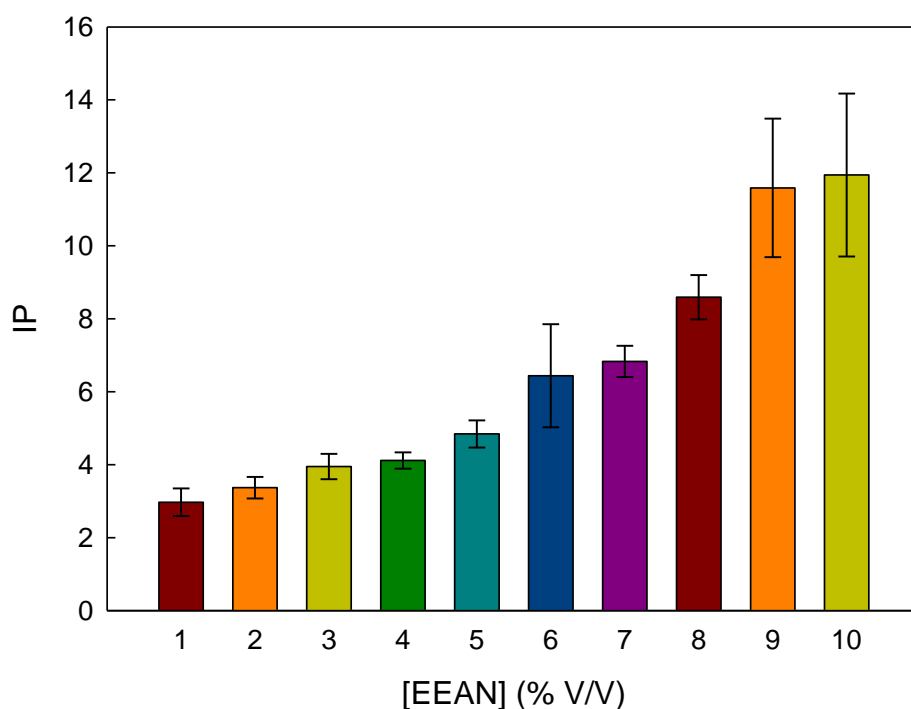


Figura 2.4.2: Variación del IP en función de la concentración de EEAN utilizada durante la coagulación de la leche. [PL] = 35 g/L; temperatura de gelificación: 37 °C.

El índice de pardeamiento (IP) de los geles resultó mayor al aumentar la concentración de EEAN utilizada como coagulante ($p < 0,0001$), esto se debe al color intrínseco del micelio de *A. niger* que va del marrón oscuro al negro (Schuster y col., 2002). Debido a que uno de los objetivos es utilizar el EEAN para la fabricación de queso, es importante tener en cuenta que la coloración marrón en este producto lácteo es considerada “no apetecible” (Divine y col., 2012). Por esto, deberían ser utilizadas bajas concentraciones de EEAN en la

etapa de coagulación. De todas formas, el color de los geles obtenidos con 9 y 10 % V/V de EEAN resultó similar al de yogures elaborados con leche de soja (Mei y col., 2016), demostrando que podrían ser aceptados por los consumidores.

4.2.2. Análisis de textura mecánica

Un perfil de penetración típico se compone de dos etapas, una de resistencia y otra de fractura (Fizman y Salvador, 1999). Durante la primera etapa, la sonda cilíndrica ejerce una fuerza sobre el gel y el mismo ofrece una fuerza de oposición, deformándose debido a cambios microestructurales reversibles. En la segunda etapa, en cambio, el gel se fractura perdiendo su integridad y se modifican sus propiedades viscoelásticas. Algunos de los perfiles de penetración obtenidos para los geles inducidos por distintas concentraciones de EEAN se muestran en la Figura 2.4.3. Los resultados se clasificaron en tres grupos según la concentración de EEAN utilizada: 1 % V/V, de 2 a 8 % V/V y de 9 a 10 % V/V. Los perfiles de penetración de los geles inducidos por 1 % V/V de EEAN presentaron puntos de fractura bien definidos. Sus valores de FF y FI resultaron significativamente mayores ($p < 0,05$) a los demás y similares a los valores obtenidos al coagular leche con quimosina, FF (N) = $0,17 \pm 0,02$ y FI (N/mm) = $0,09 \pm 0,03$ (Galante, 2016). La fractura en los perfiles de los geles inducidos por 2 a 8 % V/V de EEAN resultó menos definida, indicando que su textura es más débil: FF_{promedio} (N) = $0,054 \pm 0,007$ y FI_{promedio} (N/mm) = $0,04 \pm 0,01$. Esto es debido a la elevada actividad proteasa en relación a la coagulasa, característica de los coagulantes microbianos (Jacob y col., 2011; Yegin y Dekker, 2013). De hecho, algunos coagulantes microbianos son tan proteolíticos que disuelven el gel luego de formarlo (Vishwanatha y col., 2010). Esto último parece ocurrir al utilizar 9 o 10 % V/V de EEAN, ya que no es posible definir el punto de fractura en sus perfiles de penetración.

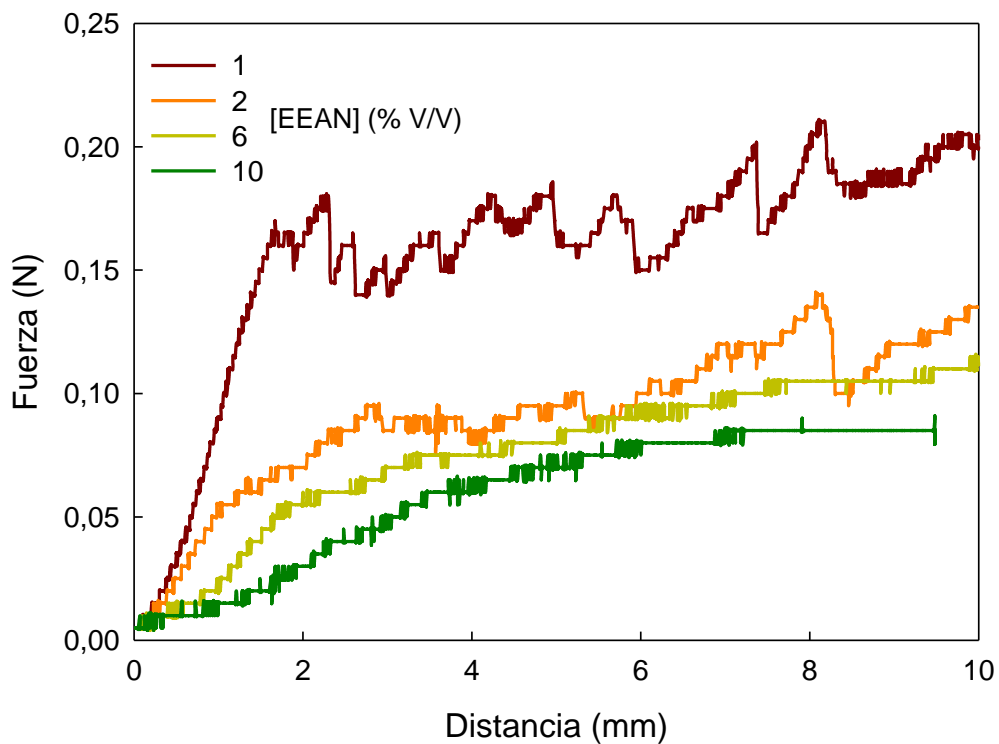


Figura 2.4.3: Perfiles de penetración de los geles inducidos por distintas concentraciones de EEAN. [PL] = 35 g/L; temperatura de gelificación: 37 °C.

Por lo tanto, para obtener geles con textura comparable a la obtenida con quimosina, convendría utilizar concentraciones de EEAN menores a 2% V/V.

4.2.3. Determinación de propiedades reológicas

El tiempo de corte de la cuajada (TCC) durante la elaboración de queso usando quimosina es de 45 a 50 min y se considera que la elasticidad del gel (G') debería alcanzar un valor de al menos 20 Pa (Costa y col., 2010; Jacob y col., 2011).

En la Tabla 2.4.1 se muestran algunas propiedades reológicas obtenidas durante la formación de geles lácteos a partir de distintas concentraciones de EEAN. Estos resultados son fundamentales para decidir qué concentración de EEAN utilizar en la elaboración de quesos. Por esto, los experimentos se llevaron a cabo a la temperatura de coagulación utilizada durante tal proceso. No se muestran los resultados obtenidos con 1 y 2 % V/V de EEAN ya que los tiempos de gelificación (t_{gel}) en estas condiciones fueron demasiado largos (más de 1 y 2 h, usando 2 y 1 % V/V de EEAN, respectivamente). Si se retarda

demasiado el TCC, se desarrollan cambios en la composición del queso, que finalmente afectan su textura (Johnson y col., 2001). Además, la elasticidad final de los geles ($G'_{\text{máx}}$) resultó muy baja en comparación a los valores alcanzados con quimosina en las mismas condiciones (Ibáñez y col., 2015).

Tabla 2.4.1: Propiedades reológicas de los geles obtenidos a partir de distintas concentraciones de EEAN. [PL] = 35 g/L; temperatura de gelificación: 32 °C.

[EEAN] (% V/V)	t_{gel} (min)	$G'_{\text{máx}}$ (Pa)
3	45 ± 2	17 ± 3
4	32,6 ± 0,4	38 ± 1
5	29 ± 3	27 ± 5
6	23,4 ± 0,2	34,7 ± 0,5
7	21 ± 3	35 ± 3
8	17,7 ± 0,2	38 ± 5
9	15,1 ± 0,5	40 ± 1
10	15,0 ± 0,2	35,8 ± 0,8

Al aumentar la concentración de EEAN utilizada para coagular la leche, se obtuvieron menores t_{gel} . Usando 3 % V/V de EEAN se obtuvieron valores de t_{gel} de entre 43 y 47 min. Sin embargo, el $G'_{\text{máx}}$ en esta condición resultó menor a 20 Pa. Cuando se utilizaron concentraciones de EEAN entre 4 y 10 % la gelificación se produjo más rápidamente que lo recomendable. Por otra parte, mayores concentraciones de EEAN pueden resultar en altos niveles de proteólisis inespecífica generando péptidos con sabor amargo e incluso afectando el rendimiento queso (Vishwanatha y col., 2010; Jacob y col., 2011). Estos resultados sugieren la utilización de una concentración de EEAN entre 3 y 4 % V/V durante la elaboración de quesos. Las propiedades reológicas usando 3,5 % V/V de EEAN fueron las siguientes: t_g (min) = 43 ± 2; $G'_{\text{máx}}$ (Pa) = 20,3 ± 0,9, resultando apropiadas según lo mencionado anteriormente.

4.3. Caracterización del líquido expelido por los geles lácteos inducidos por diferentes concentraciones del extracto de *A. niger*

En la Figura 2.4.4 se muestran la cantidad de líquido expelido y su concentración de proteínas, obtenido al centrifugar los geles inducidos por distintas concentraciones de EEAN.

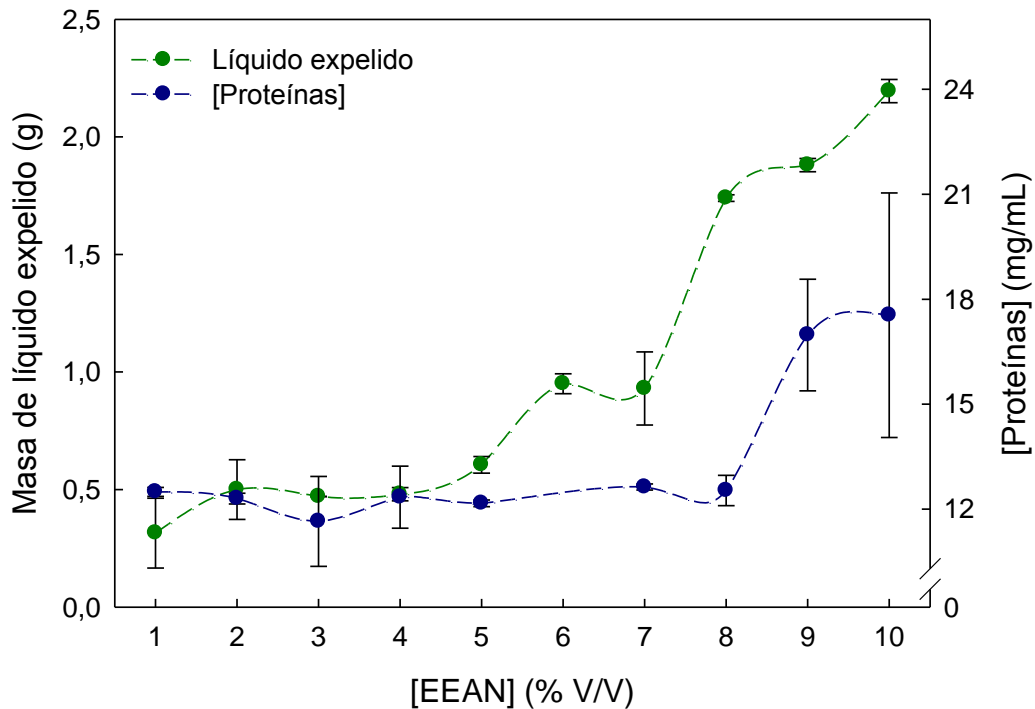


Figura 2.4.4: Cantidad de líquido expelido y su concentración de proteínas en función de la concentración de EEAN utilizada durante la coagulación de leche. [PL] = 35 g/L; temperatura de gelificación: 37 °C.

La concentración de proteínas en el líquido expelido se determinó por el método de Lowry por lo que puede considerarse que también se están cuantificando péptidos y aminoácidos. No se observaron diferencias significativas en dicha concentración en los líquidos expelidos por los geles coagulados con 1 a 8 % V/V de EEAN, mientras que cuando se utilizó 9 o 10 % de EEAN la concentración resultó mayor. Por otro lado, la cantidad de líquido expelido fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en geles inducidos por concentraciones de EEAN mayores a 5 % V/V. Los productos de la proteólisis desarrollada en estas condiciones incrementarían la concentración de partículas solubles en el sistema por lo que se favorecería la liberación de

mayor cantidad de líquido por el efecto osmótico. La sinéresis controla tanto la humedad final del queso como el rendimiento quesero y de acuerdo a los resultados de las secciones anteriores, sería conveniente utilizar concentraciones de EEAN menores a 5 % V/V para elaborar quesos.

En la Figura 2.4.5 se muestra la actividad antioxidante del líquido expelido en función de la concentración de EEAN utilizada como coagulante.

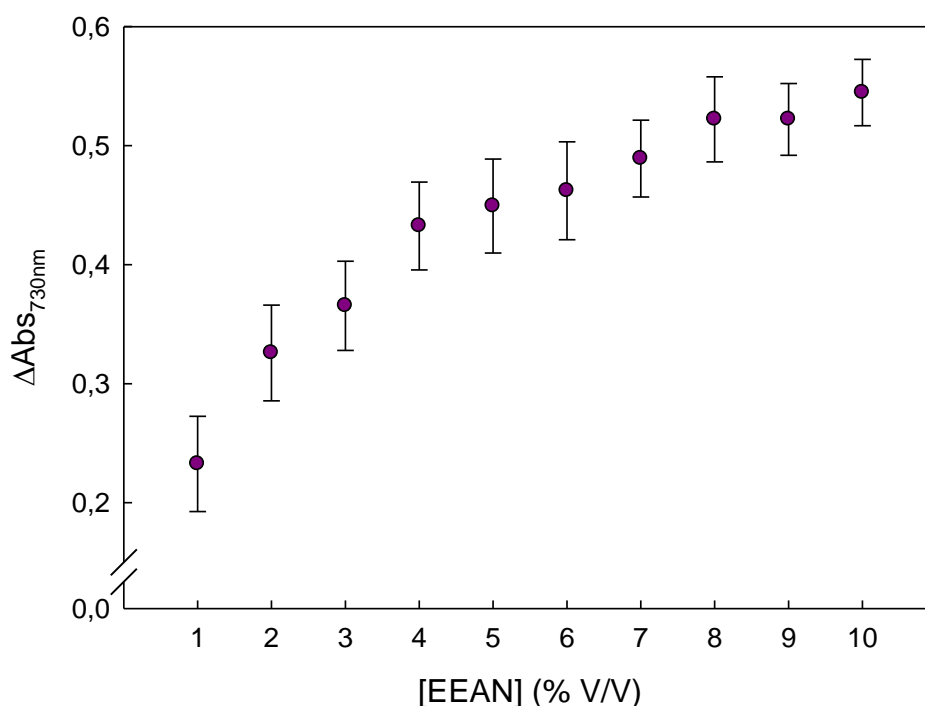


Figura 2.4.5: Actividad antioxidante del líquido expelido por los geles lácteos obtenidos con distintas concentraciones del EEAN. [PL] = 35 g/L; temperatura de gelificación: 37 °C.

La actividad antioxidante del líquido expelido ($\Delta\text{Abs}_{730\text{nm}}$) resultó mayor cuanto mayor fue la concentración de EEAN empleada como coagulante. La leche de vaca contiene muchos compuestos antioxidantes, incluso sus proteínas e hidrolizados han demostrado poseer actividad antioxidante (Bayram y col., 2008; Zulueta y col., 2009). Los responsables de tal actividad son los aminoácidos hidrofóbicos, tales como prolina, histidina, tirosina y triptófano (Pihlanto, 2006). Por esto, se presume que la actividad antioxidante en este caso parece ser inherente a la secuencia de aminoácidos de los péptidos generados por digestión de las proteínas lácteas llevada a cabo por las proteasas de EEAN y no a la concentración de proteínas, péptidos o aminoácidos en el suero.

4.4. Análisis de proteínas en geles lácteos y su líquido expelido

Según los resultados de las secciones anteriores, no deberían utilizarse concentraciones de EEAN mayores a 5 % V/V durante la elaboración de quesos. Se analizó la digestión de las proteínas en estas condiciones, tanto en los geles lácteos como en el líquido expelido por los mismos mediante SDS-PAGE utilizando concentraciones de EEAN menores e iguales a 5 % V/V. Los resultados para las proteínas presentes en los geles lácteos se muestran en la Figura 2.4.6 a) y b), mientras que el perfil electroforético de las proteínas del líquido expelido se muestra en la Figura 2.4.6 c).

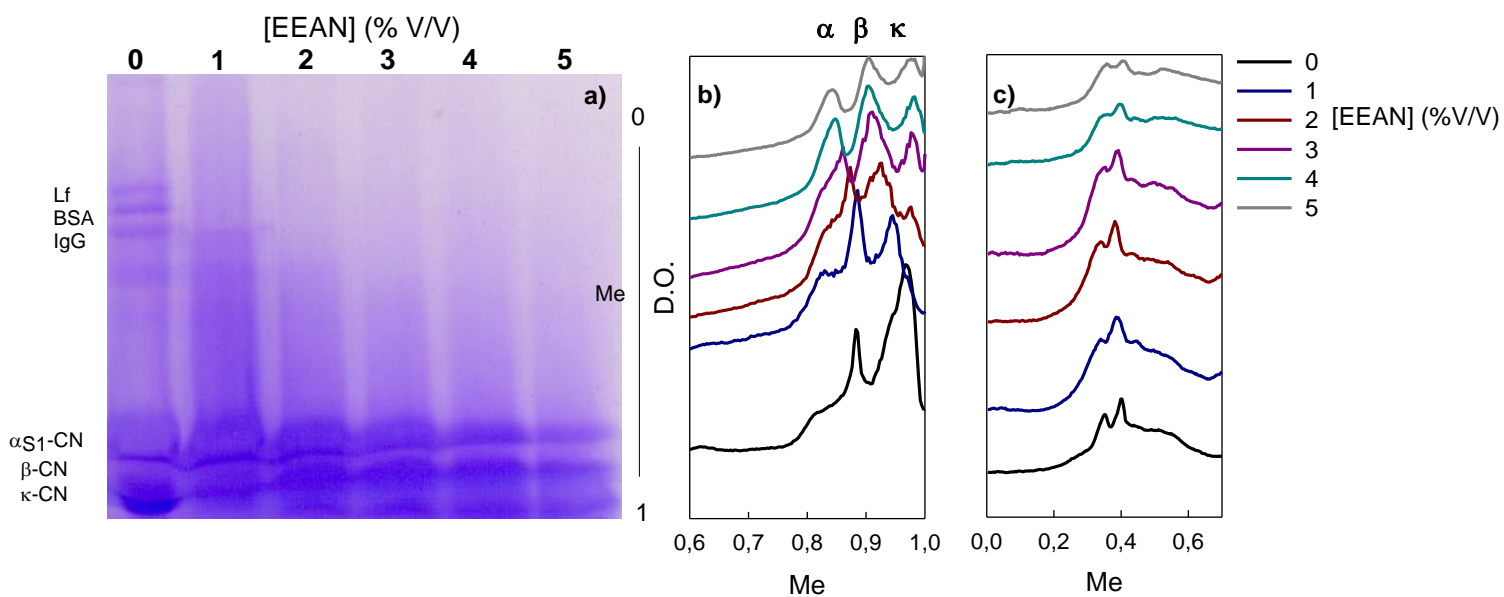


Figura 2.4.6: Proteínas presentes en los geles lácteos inducidos por 0 a 5 % V/V de EEAN a) SDS-PAGE y b) perfil electroforético. c) Proteínas presentes en el líquido expelido por tales geles. [PL] = 35 g/L; temperatura de gelificación: 37 °C.

La presencia de SDS desnaturaliza las proteínas, eliminando sus estructuras secundarias y terciarias. Además, le confiere carga neta negativa a cada proteína en proporción a su masa. Por lo tanto, se llevó a cabo la separación de proteínas de acuerdo a su masa molecular. Como se observa en la primera calle del gel de la Figura 2.4.6 a), la lactoferrina (Lf, PM= 76,11 kDa), la albúmina sérica bovina (BSA, PM= 66,39 kDa) y una porción de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina G (IgG, PM≈ 60 kDa) se ubican en la parte superior porque son los constituyentes proteicos de la leche con mayor masa molecular. Por otro lado, las CN se desplazaron más rápidamente y se ubican

en la parte inferior del gel (Farrell y col., 2004). No se identificaron las proteínas de la leche bovina con menor masa molecular (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina) debido a que la concentración de acrilamida utilizada no permitió la resolución de todas las proteínas en un sólo gel.

Como se muestra en la Figura 2.4.6 a), en los geles lácteos sólo se distinguen la α_{s1} -CN (PM= 23,62 kDa), la β -CN (PM= 24,02 kDa) y la κ -CN (PM= 19,04 kDa), que se indican en el perfil electroforético de la Figura 2.4.6 b) como los picos α , β y κ , respectivamente (Pesic y col., 2012). Se observó una disminución progresiva en la intensidad de las bandas correspondientes a las CN a medida que aumentó la concentración de EEAN utilizada durante la coagulación de leche.

En el perfil electroforético del líquido expelido (Figura 2.4.6 c), sólo se identifican las proteínas más pesadas del suero, con la menor Me. Se observó una disminución significativa en la intensidad de las bandas correspondientes a estas proteínas a partir de la muestra en la que se utilizó 4 % V/V de EEAN. Estos resultados permiten concluir que durante la elaboración de queso convendría utilizar concentraciones de EEAN menores a 4 % V/V. Por un lado se evitaría la proteólisis de las proteínas del suero, lo que modificaría la composición de la cuajada y, por el otro, se alcanzaría menor grado de proteólisis de las CN lo que evitaría la disminución del rendimiento quesero (Fox y col., 2000).

4.5. Elaboración de queso Cheddar

4.5.1. Análisis de la composición química

Se determinó la composición química de los quesos Cheddar pasados 10 días de su elaboración y en la Tabla 2.4.2 se muestran los resultados obtenidos. No se obtuvieron diferencias significativas entre la concentración de NaCl de los quesos elaborados con quimosina (QQ) y de los quesos elaborados con EEAN (QA). Los QA presentaron valores de humedad significativamente mayores a los de QQ. La humedad en quesos está controlada por la sinéresis de la cuajada (Fox y col., 2000). De acuerdo con Johnson y col. (2001), la sinéresis es menor cuando la cuajada es menos firme, resultando en quesos con mayor humedad. Como se discutió en la sección 4.2.2, la firmeza de los geles producidos por [EEAN] > 1 % V/V es menor que la

de los geles producidos por quimosina, explicando la mayor retención de suero de los QA. Por otro lado, la concentración de grasa en los QA resultó menor que en los QQ, esto podría deberse a la presencia de lipasas en el extracto enzimático de *A. niger* (Pokorny y col., 1997; Kamini y col., 1998; Mahadik y col., 2002), que desestabilizarían los glóbulos de grasa de la cuajada.

Tabla 2.4.2: Composición química de los quesos Cheddar elaborados con quimosina (QQ) ó EEAN (QA) como agentes coagulantes (a los 10 días de maduración).

	QQ	QA	Prob
NaCl (%)	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	p = 0,054
Humedad (%)	37 ± 1	40,0 ± 0,6	p < 0,001
Grasa (%)	31 ± 2	27 ± 2	p < 0,005
Proteínas (%)	25,1 ± 0,7	24,0 ± 0,3	p < 0,001
Proteínas en el suero (%)	1,01 ± 0,01	1,29 ± 0,03	p < 0,001
Rendimiento			
(Kg queso/100 Kg leche)	11,2 ± 0,3	11,3 ± 0,8	p = 0,742

La menor concentración de proteínas obtenida en los QA también revela un mayor grado de proteólisis debido a la acción de EEAN, que produce péptidos o aminoácidos que son separados con el suero. Por esto, la concentración de proteínas en los sueros de los QA resultó mayor a la de los sueros provenientes de los QQ. Afortunadamente, esto último no derivó en diferencias significativas en el rendimiento quesero. De todas formas, según Fox y col. (2000) la escala utilizada para elaborar los quesos es demasiado pequeña para determinar valores representativos del rendimiento quesero.

4.6. Maduración de queso Cheddar

4.6.1. Determinación de pH

En la Figura 2.4.7 se muestra la variación de pH en los quesos durante su maduración.

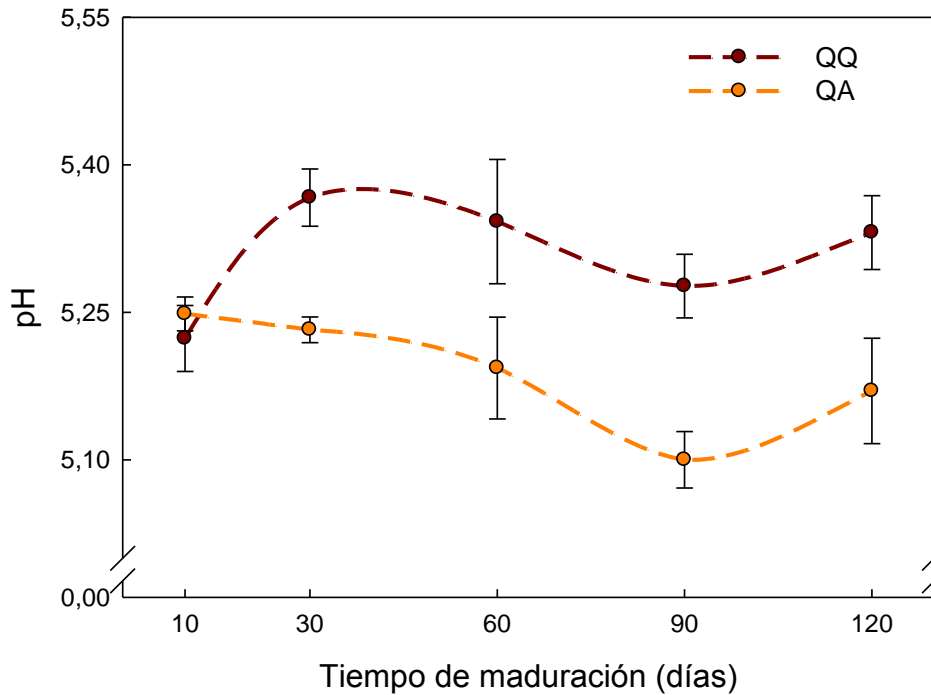


Figura 2.4.7: Valores de pH para los QQ y los QA a distintos tiempos durante su maduración.

En los QQ el pH aumentó durante el primer mes de maduración y se mantuvo sin variaciones significativas durante los 90 días posteriores. El pH de los QA resultó menor al de los QQ y tampoco presentó variaciones significativas durante el proceso de maduración. El pH final alcanzado para ambos tipos de queso se encuentra dentro de los valores óptimos para queso Cheddar, que van de 4,95 a 5,40. Además, es habitual que el pH del interior del queso se mantenga constante durante su maduración (Fox y col., 2000).

El pH de los quesos está controlado por la concentración de ácido láctico generado durante la elaboración por los microorganismos iniciadores. Por lo tanto, también va a depender de la concentración inicial de lactosa en la leche que varía, entre otros factores, según el período de lactancia en el que se encuentre la vaca y su alimentación. En este caso, tanto la concentración de microorganismos iniciadores como la composición química de la leche utilizada para elaborar QQ fueron las mismas que para QA por lo que la diferencia en el pH final de ambos tipos de queso estaría relacionada con el uso de coagulantes diferentes. Las proteasas de EEAN remanentes en QA luego de su elaboración estarían generando productos de proteólisis (aminoácidos, por

ejemplo) que serían metabolizados por los microorganismos iniciadores a acetato u otros compuestos que disminuirían el pH (McSweeney, 2004).

4.6.2. Análisis microbiológico

Se realizó el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) iniciadoras y no iniciadoras en los quesos durante su maduración. Los resultados se muestran en la Figura 2.4.8.

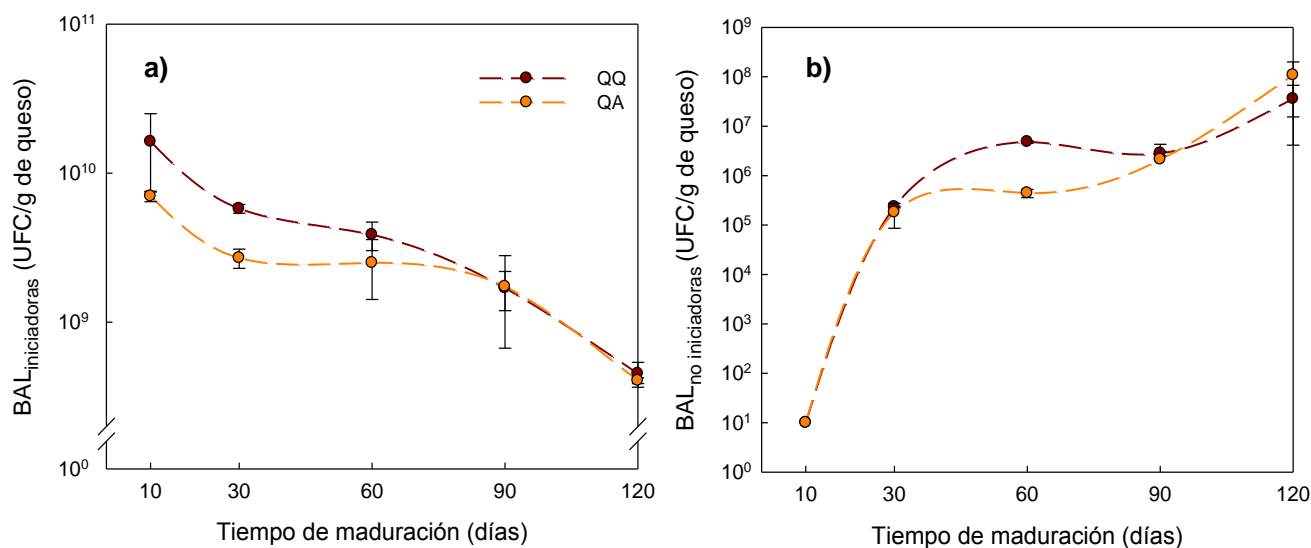


Figura 2.4.8: Número de BAL a) iniciadoras y b) no iniciadoras durante la maduración de los quesos Cheddar elaborados con quimosina (QQ) o EEAN (QA).

No se obtuvieron diferencias significativas en el recuento de BAL iniciadoras y no iniciadoras para QQ y QA durante su maduración.

Los microorganismos iniciadores fueron adicionados en las primeras etapas de la elaboración de quesos para justamente “iniciar” el descenso de pH, que favorece la agregación de las MC, mediante la producción de ácido láctico. Durante la maduración del queso estos microorganismos se lisan aportando nutrientes accesibles para el crecimiento de las BAL no iniciadoras (McSweeney, 2004). Por esto, como se observa en la Figura 2.4.8 b), el aumento en la concentración de BAL no iniciadoras ocurre en general luego del primer mes de maduración de los quesos (Lynch y col., 1997). Los microorganismos no iniciadores son especies bacterianas adventicias que provienen del aire (entran al queso durante su elaboración), de la leche (y resisten la pasteurización) y del equipamiento utilizado para hacer queso. En el

queso Cheddar irlandés los microorganismos no iniciadores son generalmente especies mesofílicas de lactobacilos (*L. casei ssp casei*, *L. casei ssp pseudopantarum*, *L. plantarum* y *L. curvatus*) (Lynch y col., 1997). El metabolismo y las enzimas de ambas clases de BAL son indispensables para los cambios bioquímicos llevados a cabo durante la maduración del queso Cheddar (McSweeney, 2004).

4.6.3. Análisis de los perfiles de textura mecánica

Los perfiles de textura de los QA resultaron diferentes a los de QQ en todos los tiempos de maduración analizados. Para cuantificar esta diferencia, se calcularon los tres parámetros de textura más utilizados en control de calidad de quesos: dureza, elasticidad uniaxial y cohesividad. En la Tabla 2.4.3 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2.4.3: Dureza, elasticidad uniaxial y cohesividad de los QQ y los QA a distintos tiempos durante su maduración.

Tiempo de maduración (días)	Dureza (N)		Elasticidad uniaxial		Cohesividad	
	QQ	QA	QQ	QA	QQ	QA
30	109 ± 8	69 ± 4	0,44 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,152 ± 0,008
60	85 ± 8	62 ± 5	0,44 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,149 ± 0,008
90	84 ± 7	71 ± 6	0,33 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,12 ± 0,01
120	82 ± 8	64 ± 6	0,31 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,12 ± 0,01

En todos los tiempos ensayados, los valores de los tres parámetros de textura fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en los QA que en los QQ, por lo que la textura de los QA es más débil que la de los QQ. Esto se debería a la mayor proteólisis de las CN ejercida por EEAN durante la coagulación de la leche. En general, durante la maduración de quesos ocurre un ablandamiento de su textura como consecuencia de la proteólisis de las CN. Las enzimas responsables de esta proteólisis provienen no sólo del agente coagulante remanente en el queso luego de su elaboración, sino también de la leche

(plasmina) y de los microorganismos iniciadores y no iniciadores (McSweeney, 2004). Sin embargo, este ablandamiento no fue proporcional al tiempo de maduración.

La dureza de los QQ disminuyó significativamente sólo entre el primer y el segundo mes de maduración ($p < 0,05$), mientras que la dureza de los QA no cambió significativamente durante los 120 días que duró el análisis. La elasticidad uniaxial de los QQ disminuyó significativamente entre el segundo y el tercer mes de maduración ($p < 0,05$), mientras que en los QA la disminución de elasticidad uniaxial fue progresiva ($p < 0,05$) y sólo se mantuvo constante durante el último mes de maduración. La cohesividad de los QQ y los QA disminuyó significativamente entre los 60 y 90 días de maduración ($p < 0,05$).

4.6.4. Análisis de la proteólisis

4.6.4.1. Fracción insoluble: caseínas

En la Figura 2.4.9 se muestra el resultado del análisis por urea-PAGE de las proteínas insolubles a pH 4,6 en QQ y QA en distintos tiempos de maduración. El marcador de peso molecular (MPM) utilizado fue caseinato de sodio.

Las proteínas de la leche bovina con punto isoeléctrico cercano a 4,6 son las CN (Farrell y col., 2004; Phadungath, 2005). Como se muestra en la Figura 2.4.9, luego del proceso de elaboración del queso sólo son separables por electroforesis la α_{s1} -CN y la β -CN. Su concentración disminuyó durante la maduración de los quesos debido a la proteólisis de las mismas. De hecho, la proteólisis desarrollada durante la maduración de queso Cheddar elaborado con quimosina se ha estudiado extensivamente. Se han identificado tres fuentes de proteasas involucradas en tal proceso: la quimosina remanente en el queso, la plasmina endógena de la leche y las proteasas de las BAL. Las caseínas α_{s2} y β son sustratos de la plasmina y la ausencia de α_{s2} -CN en el gel de la Figura 2.4.9 se atribuye a la acción de esta proteasa. La β -CN es escindida por plasmina en tres sitios: Lys28-Lys29, Lys105-His106 y Lys107-Glu108, generando los fragmentos proteicos γ_1 -CN (β -CN f29-209), γ_2 -CN (β -CN f106-209) y γ_3 -CN (β -CN f108-209), respectivamente. La β -CN también es digerida cerca de su extremo C-terminal por la quimosina remanente en el queso luego de su elaboración, generando péptidos hidrofóbicos pequeños que

dan sabor amargo. La α_{s1} -CN es más sensible a la digestión por quimosina que por plasmina, uno de sus sitios de corte es el enlace Phe23-Phe24, originando un péptido pequeño (f1-23) que es rápidamente hidrolizado por las proteasas de las BAL iniciadoras. Otro típico sitio de corte es el enlace Leu101-Lys102, dando lugar al péptido f102-199 (Figura 2.4.9) (McSweeney, 2004).

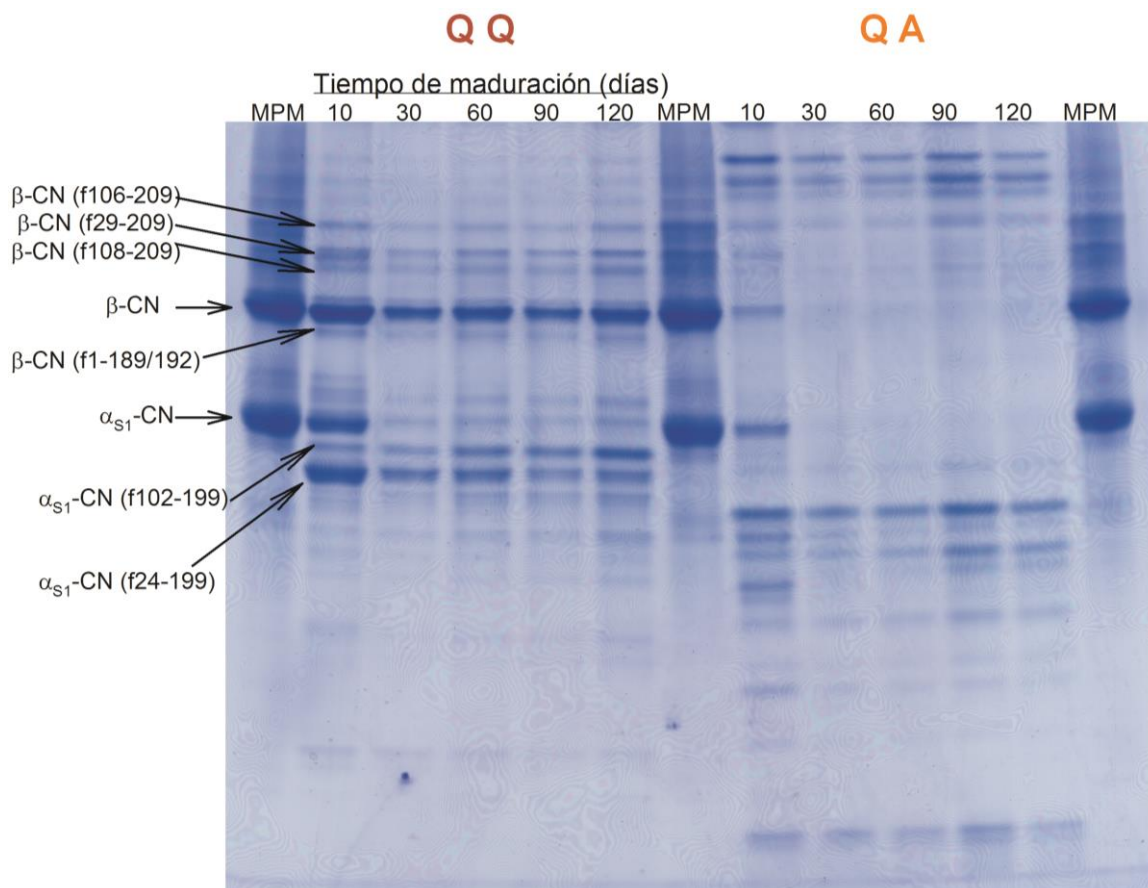


Figura 2.4.9: Urea-PAGE de las proteínas insolubles a pH 4,6 en los QQ y los QA a distintos tiempos de maduración.

Los quesos elaborados con EEAN mostraron un perfil de proteólisis completamente diferente al llevado a cabo por quimosina. En la etapa de coagulación de la leche, durante la elaboración del queso, la digestión de α_{s1} -CN y β -CN fue más significativa que al utilizar quimosina. Además, durante la maduración de QA, la proteólisis de estas CN fue tal que las mismas no pudieron detectarse por la técnica electroforética utilizada. Producto de la proteólisis exhaustiva desempeñada en los QA, se generaron fragmentos proteicos diferentes a los presentes en QQ, evidenciándose la especificidad de corte diferencial entre ambos coagulantes.

4.6.4.2. Fracción soluble: péptidos, aminas libres y nitrógeno

La proteólisis es uno de los procesos bioquímicos más complejos que ocurren durante la maduración del queso. La proteólisis primaria de las CN, estudiada en la sección anterior por electroforesis, genera péptidos que son digeridos a fragmentos peptídicos más pequeños y aminoácidos. Estos productos de la proteólisis secundaria son solubles a pH 4,6 (Sousa y col., 2001) y pueden cuantificarse determinando la concentración de nitrógeno. En la Tabla 2.4.4 se muestra la variación en la concentración de aminas libres ([AL]) y de nitrógeno soluble con respecto al nitrógeno total ([NS]/[NT]), para QQ y QA a dos tiempos de maduración. La proteólisis secundaria fue mayor en QA que en QQ ($p < 0,001$), obteniéndose mayores valores de [AL] y de [NS]/[NT] en estos quesos a los tiempos de maduración analizados. Las AL podrían corresponder a aminoácidos que están involucrados en la producción de compuestos volátiles que dan aroma a partir de la acción de aminotransferasas provenientes de las BAL iniciadoras (McSweeney, 2004). Además, los péptidos solubles están asociados a un sabor característico y por esto, la proteólisis secundaria diferencial afectaría el *flavor* del queso Cheddar (Fox y col., 2000).

Tabla 2.4.4: Valores de [AL] y [NS]/[NT] para QQ y QA a dos tiempos de maduración.

Tiempo de maduración (días)	[AL] (mg L-Leu /g queso)		[NS]/[NT] (%)	
	QQ	QA	QQ	QA
60	14,6 ± 0,9	26 ± 1	17,0 ± 0,8	30,9 ± 0,6
120	19 ± 1	33 ± 1	21,9 ± 0,8	35,3 ± 0,5

Los valores de [AL] y de [NS]/[NT] aumentaron significativamente durante la maduración de ambos quesos ($p < 0,01$). Esto explica el desarrollo de aroma y sabor más intensos en quesos madurados por períodos de tiempo más largos (Fox y col., 2000).

La caracterización del perfil de péptidos solubles para ambos tipos de quesos fue llevada a cabo por UPLC. En la Figura 2.4.10 se muestran ejemplos de los cromatogramas obtenidos para los QQ (a) y los QA (b) en distintos

tiempos de maduración. Se observaron los mismos perfiles de elución para los triplicados de ambos tipos de quesos.

Los dos picos prominentes (X e Y) que aparecen en los cromatogramas de los QQ son característicos del queso Cheddar y corresponden a péptidos provenientes de la proteólisis de la α_{s1} -CN (McSweeney y Fox, 1997). Como se explicó anteriormente, la α_{s1} -CN es escindida por quimosina en el enlace Phe23-Phe24, originando un péptido pequeño (f1-23), que es rápidamente digerido por las proteasas de las BAL iniciadoras en dos péptidos: f1-9 (X) y f1-13 (Y), con tiempos de elución de 5 y 6 min, respectivamente. Estos péptidos contribuyen al *flavor* del queso Cheddar y su concentración aumenta con el tiempo de maduración (Fox y col., 2000).

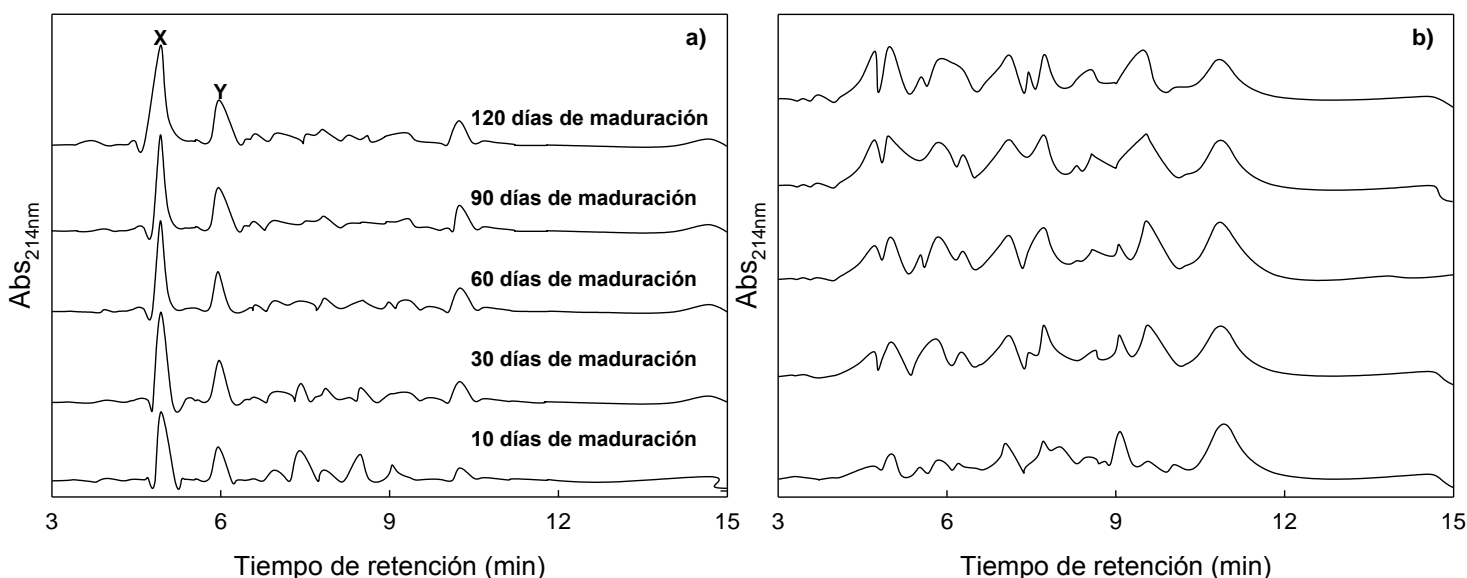


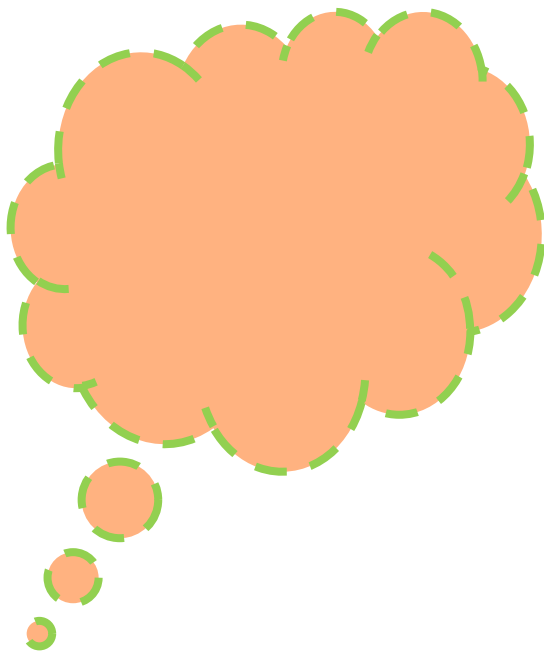
Figura 2.4.10: Perfiles peptídicos obtenidos a partir de las fracciones solubles a pH 4,6 de los QQ (a) y los QA (b) por UPLC en distintos tiempos de maduración.

El perfil peptídico de las fracciones solubles a pH 4,6 de los QA resultó completamente diferente al de QQ. Una de sus características más notables es la ausencia de los picos X e Y, lo que permitió concluir que el fragmento peptídico f1-23 no es producido durante la proteólisis primaria por el EEAN o bien, es digerido a sus aminoácidos constituyentes por las proteasas del EEAN durante la proteólisis secundaria.

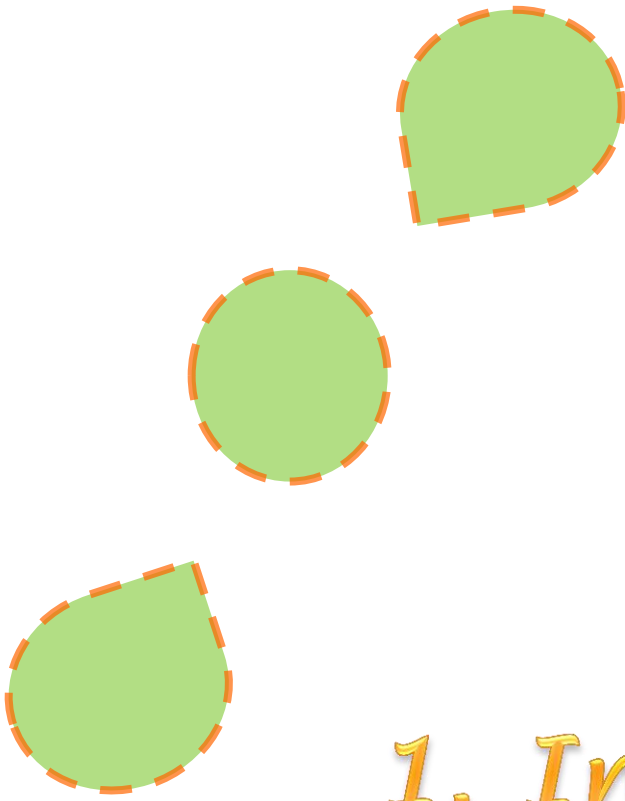
4.7. Determinación del color final del queso

No se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0,085$) entre los valores de luminosidad (L^*) para QQ (75 ± 2) y QA (77 ± 2). Sin embargo, se obtuvieron valores significativamente menores ($p < 0,001$) del componente b^* en los QA ($28,3 \pm 0,8$) que en los QQ ($32,1 \pm 0,8$). El componente a^* también resultó menor en los QA ($-3,9 \pm 0,4$) en comparación a los QQ ($-1,71 \pm 0,09$). Esto indicaría que los QA son menos amarillos que los QQ, de todas formas, los valores de los componentes cromáticos obtenidos entran dentro del rango de valores típico para queso Cheddar (Ibáñez y col., 2015).

5. Conclusión



Se obtuvo un extracto enzimático a partir del cultivo de *Aspergillus niger* por fermentación de residuos agroindustriales en estado sólido. El extracto demostró poseer actividad coagulante de la leche por lo que se ensayaron distintas concentraciones del mismo para producir geles lácteos que luego fueron caracterizados. Los geles lácteos inducidos por el extracto resultaron, en general, más laxos que los inducidos por quimosina. Al aumentar la concentración de extracto utilizado como coagulante, el índice de pardeamiento de los geles resultó mayor y los mismos liberaron más suero, con mayor actividad antioxidante. Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos reológicos, se decidió utilizar 3,5 % V/V de extracto para elaborar queso Cheddar. La excesiva proteólisis desempeñada por el extracto fúngico, no sólo durante la etapa de coagulación de la leche sino también durante la maduración del queso, dio como resultado una composición química característica y diferente a la de quesos elaborados con quimosina. A su vez, esto repercutió en la textura final del queso y en el perfil de péptidos que dan aroma. Se midió una mayor concentración de proteínas en el suero expelido por la cuajada obtenida con el extracto enzimático. Como perspectiva a futuro se plantea el análisis sensorial de los quesos inducidos por el extracto enzimático de *A. niger*. Esta información sería fundamental para proponer este coagulante en la industria láctea con el objetivo de innovar en la generación de texturas y aromas característicos.



1. Introducción

1.1. Enzimas bacterianas con actividad coagulante de la leche

Se han encontrado varias enzimas de origen bacteriano, principalmente del género *Bacillus sp.*, con actividad coagulante de la leche. En la mayoría de los casos resultaron ser serín proteasas de temperaturas óptimas elevadas y con valores de pH óptimo cercanos a la neutralidad (Ageitos y col., 2007; El-Bendary y col., 2007; Yegin y Dekker, 2013).

1.1.1. Extracto enzimático P7

Con el objetivo de encontrar nuevas especies bacterianas con capacidad de producir enzimas queratinolíticas, se aislaron 86 cepas de la cuenca amazónica de Brasil. Las proteasas producidas por una de estas cepas (P7), aislada del intestino del pez *Piaractus mesopotamicus*, demostraron tener actividad proteolítica sobre las caseínas (CN). Por secuenciación de su ADN ribosomal 16S y posterior búsqueda de secuencias homólogas, se determinó que P7 correspondía al género *Bacillus*, presentando una similitud de secuencia mayor al 99 % con las especies *velesensis*, *subtilis* o *amyloliquefaciens* (Giongo y col., 2007). Se purificaron las proteasas extracelulares producidas por *Bacillus sp.* P7 y el extracto enzimático obtenido (EEP7) fue analizado por zimografía. Se encontraron dos bandas principales con actividad proteolítica y, por ensayos de inhibición, se concluyó que corresponden a serín proteasas (Corrêa y col., 2010). Se determinaron las condiciones óptimas de EEP7 para coagular leche, resultando pH 7,4 y 44 °C (Mancilla Canales y col., 2015). Además, se elaboraron productos lácteos utilizando cepas aisladas junto con P7 como agente coagulante (Dos Santos Da Fonseca y col., 2013; Lemes y col., 2016). Por otro lado, no se han estudiado las propiedades físico-químicas de los geles lácteos obtenidos al coagular leche con EEP7. Por esto, el enfoque de este trabajo de tesis es estudiar tanto el proceso de coagulación de leche por EEP7 como la microestructura de los geles obtenidos. Además, se determinó el efecto de la presencia de sales minerales utilizadas en la industria láctea sobre los parámetros en estudio.

1.2. Interacción entre caseínas y cationes de sales minerales

El pH de la leche (~ 6,7) es superior al pI de las CN (4,6), por lo tanto, tales proteínas se encuentran cargadas negativamente. Los fosfatos de sus

residuos de serina fosforilados (Ser-P) se encuentran agrupados y son los principales sitios de carga neta negativa que unen cationes. De acuerdo a la cantidad de estos grupos de residuos Ser-P en cada tipo de CN, su capacidad de unir cationes disminuye en el orden: $\alpha_{s2} > \alpha_{s1} > \beta > \kappa$ (Gaucheron, 2005). Por otro lado, las cadenas laterales de otros aminoácidos constituyentes de las CN también presentan carga neta negativa para interactuar con cationes. Producto de esta interacción, ocurren cambios en la estructura de las CN que posiblemente afecten el proceso de coagulación (Philippe y col., 2005; Chakraborty y Basak, 2008). La producción de leche y productos lácteos fortificados con minerales esenciales resultaron una buena estrategia para combatir su deficiencia y alcanzar los valores diarios recomendados (Achanta y col., 2007; Aquilanti y col., 2012). Por otro lado, resulta de gran interés conocer el efecto de esta fortificación sobre la estructura de las CN.

1.2.1. Minerales con gran valor nutricional

Los minerales esenciales pueden clasificarse en macro o micro-nutrientes según la cantidad en la que son requeridos por el ser humano. La cantidad diaria recomendada de los minerales considerados macro-nutrientes es mayor a 50 mg, mientras que la de los micro-nutrientes es menor a 50 mg. Entre los macro-nutrientes se encuentran: calcio, magnesio, fósforo, sodio y cloruro; los micro-nutrientes incluyen hierro y zinc, entre otros (Vahčić y col., 2010). Los minerales esenciales son importantes constituyentes de los huesos, los dientes, las células de muchos tejidos e intervienen en el funcionamiento de ciertas enzimas. Por lo tanto, su deficiencia tiene consecuencias sobre el metabolismo y es fundamental incorporarlos en la dieta (Soetan y col., 2010).

El estilo de vida actual ha producido una modificación en los hábitos alimenticios de las personas y en muchos casos se vuelve difícil llevar a cabo una dieta balanceada. Por esto, la producción y el consumo de alimentos fortificados se ha convertido en una buena estrategia para incorporar nutrientes esenciales. Los lácteos son buenos candidatos para la fortificación debido, entre otras cosas, a su elevado valor nutricional y su gran aceptabilidad por parte de la sociedad.

Dos de las consideraciones más importantes a tener en cuenta para elaborar productos lácteos fortificados con minerales son:

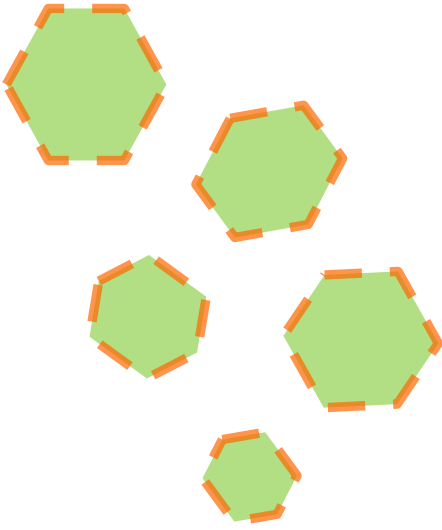
- La elección de la sal a utilizar; y
- Qué concentración utilizar para que sea suficiente, sin modificar las propiedades organolépticas del producto.

La OMS y la FDA han clasificado como GRAS a ciertas sales de cloruro que son de las más utilizadas en la fortificación de alimentos. En este trabajo de tesis se presenta el estudio del efecto de la presencia de CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 y NaCl , sobre las características físico-químicas de geles lácteos inducidos por EEP7. Las concentraciones ensayadas fueron seleccionadas teniendo en cuenta las concentraciones de sales utilizadas en la elaboración de productos lácteos fortificados (Augustin y Williams, 2006; Singh y Muthukumarappan, 2008; Aquilanti y col., 2012; Kahraman y Ustunol, 2012).

2. Objetivos particulares



- ✓ Estudiar el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de sales minerales sobre la estructura de las caseínas, las micelas de caseína y las propiedades físicas de suspensiones de leche.
- ✓ Determinar el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de las sales minerales ensayadas sobre la actividad proteolítica de un extracto enzimático producido por *Bacillus sp. P7*.
- ✓ Analizar el proceso de agregación de las micelas de caseína inducido por el extracto enzimático bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de las sales en estudio.
- ✓ Estudiar el proceso de coagulación de la leche inducido por EEP7 en presencia de diferentes concentraciones de las sales en estudio.
- ✓ Caracterizar los geles lácteos inducidos por EEP7 en presencia de diferentes concentraciones de las sales en estudio.



3. Materiales y métodos



3.1. Caracterización de suspensiones de leche

3.1.1. Determinación de concentración de proteínas

Se trabajó con suspensiones de leche descremada 10 y 20 % P/V que se prepararon como se explicó en la sección 3.5.1. del Capítulo 2. La concentración de proteínas en estas suspensiones se determinó utilizando el método de Kuaye (1994), que se basa en la modificación del espectro del aminoácido tirosina a altas longitudes de onda (λ) de la región UV en un medio alcalino fuerte (pH~13). Se midió absorbancia (Abs) a 248 nm y a 256 nm de dos soluciones:

- Una dilución 1/5 de un testigo de caseinato de sodio 1 g/L; y
- Una dilución 1/250 de la suspensión de leche preparada.

En los espectros de absorción de las proteínas lácteas hay una región (entre 248 y 256 nm) en la que la Abs varía linealmente con la λ y la pendiente es directamente proporcional a la concentración proteínas, por lo que la misma puede calcularse según:

$$[\text{Proteínas}](\text{g/L}) = \frac{(\text{Abs}_{\text{muestra}} 248 \text{ nm} - \text{Abs}_{\text{muestra}} 256 \text{ nm}) * 250}{(\text{Abs}_{\text{testigo}} 248 \text{ nm} - \text{Abs}_{\text{testigo}} 256 \text{ nm}) * 5} \quad (3.1)$$

3.1.2. Preparación de suspensiones de leche fortificadas

Las soluciones de las diferentes sales en estudio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, MgCl_2 50 mM, ZnCl_2 10 mM y NaCl 500 mM) fueron preparadas por disolución de las correspondientes drogas sólidas (Cicarelli Laboratorios) en agua destilada a temperatura ambiente con agitación magnética. Para la completa disolución del ZnCl_2 fue necesario adicionar unas gotas de HCl 0,1 M. Las concentraciones finales de cada sal variaron según el ensayo.

Las suspensiones de leche utilizadas en los experimentos fueron fortificadas con diferentes concentraciones de sal: hasta 15 mM de CaCl_2 , 10 mM de MgCl_2 , 0,250 mM de ZnCl_2 y 100 mM de NaCl. Para alcanzar estas concentraciones, las suspensiones de leche utilizadas en los experimentos se prepararon en *buffer* tris (hidroximetil) aminometano (Tris)-HCl 10 mM pH 7,4.

3.1.3. Determinación del tamaño promedio y potencial electrocinético de micelas de caseína

Se aplicaron los principios de dispersión dinámica de la luz para determinar diámetro hidrodinámico (D_h) y potencial electrocinético (potencial ζ) de las micelas de caseína (MC) en las suspensiones de leche. Se utilizó un analizador de partículas (nano partica SZ-100, Horiba Scientific) equipado con un láser de 532 nm, 10 mW (Philippe y col., 2005). Las determinaciones se llevaron a cabo a 44 °C, considerando la viscosidad 0,61 mPa.s y el índice de refracción del agua 1,33. En las determinaciones de D_h la luz dispersada fue recogida a 90° con respecto a la luz incidente. Las suspensiones se prepararon con agua ultra pura (MilliQ) y a una concentración final de proteínas lácteas ([PL]) de 0,35 g/L. Se ensayó el efecto de la presencia de las sales en estudio sobre el D_h y el potencial ζ , filtrando las soluciones de las sales minerales antes de la preparación de las muestras. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.1.4. Interpretación de espectros de fluorescencia

Se realizaron por duplicado espectros de fluorescencia intrínseca de suspensiones de leche, [PL] = 0,1 g/L. Se utilizó un espectrofluorómetro (Aminco-Bowman) equipado con portacubeta termostatizado y se trabajó a 44 °C. En todos los casos se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se registró la intensidad fluorescencia (IF) entre 300 y 400 nm, excitando a 280 nm. Se estudió el efecto de la presencia de las sales en estudio sobre los espectros obtenidos.

La fluorescencia intrínseca de una proteína se debe exclusivamente a sus residuos aromáticos. Debido a que el $\lambda_{excitación}$ de la fenilalanina es menor a 280 nm, el espectro de emisión de las proteínas corresponde a la emisión de sus residuos de tirosina (Tyr) y de triptófano (Trp) que se excitan a 280 nm. En general, ocurre transferencia de energía por resonancia entre residuos de Tyr y Trp de la misma proteína, siendo el Trp el responsable del espectro de emisión. El pico máximo en el espectro de emisión del Trp es muy sensible a la polaridad del entorno y por esto, el análisis de los espectros de fluorescencia intrínseca de las proteínas permite estudiar cambios en su estructura (Lakowicz, 2007).

Para corregir la atenuación de la IF causada por el fenómeno de filtro interno se llevaron a cabo espectros de absorbancia (de 280 a 400 nm) de las suspensiones de leche en estudio. Los espectros de fluorescencia intrínseca fueron corregidos aplicando la siguiente ecuación (Lakowicz, 2007):

$$IF_{\text{corregida}} = IF_{\text{medida}} * 10^{\frac{(Abs_{\lambda\text{excitación}} + Abs_{\lambda\text{emisión}})}{2}} \quad (3.2)$$

Esta ecuación tiene en cuenta que el fenómeno de filtro interno puede ocurrir tanto por absorción de luz incidente ($Abs_{\lambda\text{excitación}}$) como por absorción de luz emitida ($Abs_{\lambda\text{emisión}}$).

3.1.5. Estudio de unión del ANS a las proteínas de la leche

El compuesto 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS) no emite fluorescencia en solución acuosa, sin embargo cuando está unido a proteínas su rendimiento cuántico aumenta 200 veces. Por lo tanto, la IF de un sistema compuesto por proteínas y ANS corresponde exclusivamente al ANS unido a proteína. Se llevó a cabo la titulación de ANS (40 μM , Sigma-Aldrich) con suspensiones de leche, $[PL] = 0,1 \text{ g/L}$ a 44 °C. La IF del ANS se midió a 484 nm, excitando a 380 nm. Bajo estas condiciones de exceso de ANS, las zonas de las proteínas que unen esta sonda se encuentran siempre saturadas. Graficando la IF del ANS en función de $[PL]$ se obtuvo una relación lineal de cuya pendiente se calculó S_0 , que se considera una medida de cuánto ANS está unido a las PL (Haskard y Li-Chan, 1998).

$$S_0 = \frac{\partial IF}{\partial [proteína]} \quad (3.3)$$

Se estudió el efecto de la presencia de las sales en estudio sobre los valores de S_0 , realizando las determinaciones al menos por duplicado.

3.1.6. Análisis del *quenching* de la fluorescencia por acrilamida

Se midió la IF de suspensiones de leche, $[PL] = 0,1 \text{ g/L}$, luego de la adición de sucesivas alícuotas de 10 μL de acrilamida 4 M (Fluka) a 44 °C, utilizando $\lambda_{\text{excitación}} = 280 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 340 \text{ nm}$. Se estudió el efecto de la presencia de las sales en estudio, realizando los experimentos por duplicado. La acrilamida es un extintor (*quencher*) de la fluorescencia intrínseca de los Trp de las proteínas. Los resultados fueron analizados a partir de gráficos de

Stern-Volmer, que describen la disminución de la IF durante el *quenching* según la siguiente ecuación:

$$\frac{IF^0}{IF} = 1 + K_{SV} * [acrilamida] \quad (3.4)$$

En esta ecuación, IF^0 e IF corresponden a la fluorescencia emitida por la proteína en ausencia y en presencia del *quencher*, respectivamente. El parámetro K_{SV} , hace referencia a la constante de Stern-Volmer que indica cuán sensible es un fluoróforo a la acción del *quencher* (Lakowicz, 2007).

3.1.7. Análisis de color

Se determinaron los parámetros que caracterizan el color de suspensiones de leche, $[PL] = 0,35 \text{ g/L}$, según el modelo internacional CIELAB, utilizando la metodología explicada en la sección 3.5.2 del Capítulo 2. A partir de los resultados obtenidos, se calculó el índice de blancura (IB) de las muestras, según se publicó en la bibliografía (Salcedo-Chávez y col., 2002). Se estudió el efecto de la presencia de las sales en estudio sobre el IB.

$$IB = L^* - 3 b^* \quad (3.5)$$

3.1.8. Determinaciones de viscosidad

La viscosidad (η) de un fluido es una medida de su resistencia a fluir cuando se le aplica un esfuerzo (τ). De acuerdo con la ley de Newton, el τ aplicado y la velocidad de deformación (γ) obtenida son directamente proporcionales y la deformación comienza con el primer τ . De aquí surge la clasificación de fluidos “Newtonianos” para aquellos que cumplen con la afirmación anterior y “No newtonianos” para los que no lo hacen. La η de fluidos Newtonianos se define como $d\tau/d\gamma$, siendo constante e independiente de γ .

Los fluidos no Newtonianos, en cambio, sufren cambios estructurales durante la aplicación del τ y presentan alguno de los siguientes comportamientos, descritos en la Figura 3.3.1:

- La relación entre τ y γ es proporcional pero se requiere aplicar un esfuerzo mínimo para causar deformación (fluidos plásticos).
- El aumento en γ conduce a un aumento en τ menor al proporcional y puede o no requerirse un esfuerzo mínimo para causar deformación (fluidos pseudoplásticos).

- El aumento en τ conduce a un aumento en $\dot{\gamma}$ menor al proporcional (fluidos espesantes).

Los fluidos pseudoplásticos y espesantes cuyo comportamiento depende, además, del tiempo se denominan tixotrópicos o reopéticos, respectivamente.

La η en fluidos no Newtonianos varía con $\dot{\gamma}$ y se denomina viscosidad aparente (η_a) (Bourne, 2002; Rao, 2010).

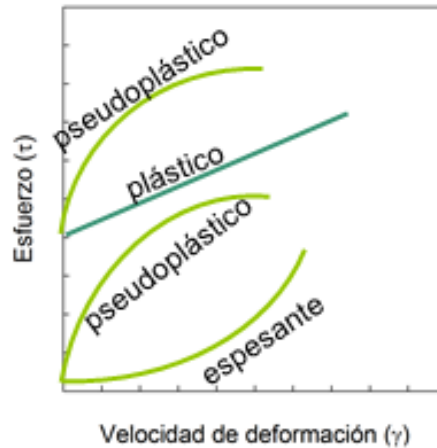


Figura 3.3.1: Curvas de flujo según comportamiento no Newtoniano.

Para estudiar la η de suspensiones de leche se utilizó un viscosímetro rotatorio (Brookfield) con geometría de cono (diámetro: 48 mm, ángulo del cono: $1,5^\circ$). Se realizaron barridos de $\dot{\gamma}$ entre $1,15$ y $230,4 \text{ s}^{-1}$ tanto en sentido ascendente como descendente (de $230,4$ a $1,15 \text{ s}^{-1}$) para obtener los respectivos gráficos de flujo (τ vs. $\dot{\gamma}$). Se registró la viscosidad en cada punto, realizando los experimentos por duplicado a $44 \text{ }^\circ\text{C}$. Se determinó el efecto de la presencia de las sales en estudio sobre la η de las muestras ($[\text{PL}] = 35 \text{ g/L}$).

3.2. Cultivo del microorganismo

El microorganismo *Bacillus sp.* P7 se conservó en 5 mL de infusión cerebro-corazón (BHI, Oxoid) conteniendo glicerol 20 % V/V a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Su propagación fue llevada a cabo en placas de Petri con agar BHI por incubación en estufa por 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para la producción del extracto enzimático se preparó un caldo de harina de pluma de gallina 10 g/L, conteniendo NaCl 0,5 g/L, KH_2PO_4 0,4 g/L y K_2HPO_4 0,3 g/L y se ajustó su pH a 8. Este caldo se fraccionó en erlenmeyers que fueron esterilizados en autoclave (a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min). Luego, se

llevó a cabo la inoculación del microorganismo en cada uno de los erlenmeyers a partir de las placas con agar BHI utilizando un asa bacteriológica. Los erlenmeyers fueron incubados por 48 h a 30 °C en agitación constante (Corrêa y col., 2010).

3.3. Obtención del extracto enzimático

Se fraccionó el cultivo del interior de los erlenmeyers en tubos plásticos para centrifugarlos a 10000 g durante 10 min a 4 °C. Se concentraron las enzimas presentes en el sobrenadante del cultivo por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma-Aldrich) al 60 % de saturación. La sal fue adicionada muy lentamente con agitación magnética constante, manteniendo la temperatura del sistema a 4 °C. Una vez disuelta la sal, el sistema se conservó refrigerado durante una noche. En la Figura 3.3.2 se muestran las proteínas precipitadas del sistema después de este tratamiento. Se fraccionó la suspensión en tubos plásticos que fueron centrifugados a 10000 g a 4 °C; el precipitado resultante fue resuspendido en cantidad necesaria de *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8. Finalmente se realizó una filtración en gel utilizando Sephadex G-100 (1 g en 100 mL de *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8) (Corrêa y col., 2010). Las fracciones activas recolectadas forman el extracto enzimático P7 (EEP7).



Figura 3.3.2: Proteínas precipitadas a partir del cultivo de *Bacillus sp.* P7 por tratamiento con sulfato de amonio al 60% de saturación.

3.4. Determinación de la actividad proteasa

Las condiciones óptimas para la coagulación de leche utilizando EEP7 resultaron ser pH 7,4 y 44 °C (Mancilla Canales y col., 2015). Por esto, se mantuvieron estas condiciones durante todos los experimentos realizados en este capítulo. Se midió la AP de EEP7 utilizando el método de la azocaseína (Hummel y col., 1965). La mezcla de reacción se preparó en tubos plásticos conteniendo 100 µL de EEP7, 100 µL de *buffer* Tris-HCl 10 mM pH 7,4 y 100 µL de azocaseína 10 g/L (Sigma-Aldrich). Se incubaron los tubos en baño termostático a 44 °C por 30 min y luego se adicionaron 500 µL de TCA 10 % P/V a cada uno para terminar la reacción y precipitar las proteínas, quedando solubles los péptidos que resultaron de la proteólisis de la azocaseína. El blanco de reacción se preparó de la misma manera, con la diferencia de que el TCA se adicionó antes de incubar el sistema a 44 °C. Se centrifugaron los tubos durante 10 min a 10000 g y el sobrenadante se mezcló con 200 µL de NaOH 1,8 N (el medio básico permite máxima absorción). Se midió Abs a 420 nm de las muestras analizadas y se definió 1 UP como el volumen (mL) de EEP7 que causó un aumento unitario en la Abs_{420nm} en las condiciones del ensayo. Se estudió el efecto de la presencia de las sales en estudio sobre la AP de EEP7, realizando las determinaciones por triplicado.

3.5. Estudio del proceso de agregación de las micelas de caseína utilizando el extracto enzimático P7

La agregación de las MC inducida por EEP7 se estudió a partir de la variación del tamaño de las mismas. Horne (1987) definió el parámetro β , relacionado con el tamaño promedio de las MC, como:

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial \log \text{Abs}}{\partial \log \lambda} \quad (3.6)$$

Según esta ecuación, a partir de la pendiente de los gráficos de log Abs vs. log λ se pueden calcular los valores de β . Se realizaron espectros de absorción de suspensiones de leche ([PL] = 0,35 g/L) antes de la adición de EEP7 y luego, cada 1 min. Los espectros se obtuvieron en el rango de λ de 420 a 650 nm, región en la que no hay absorción de los grupos cromóforos proteicos. A partir de los mismos se obtuvieron valores de β cada 1 min, aplicando la ecuación 3.6. Se estudió el efecto de la presencia de las sales en

estudio sobre el proceso de agregación de las MC. Los resultados fueron interpretados a partir del análisis de las gráficas de β en función del tiempo.

3.6. Análisis reológico del proceso de gelificación de leche inducido por el extracto enzimático P7

Se llevaron a cabo experimentos de oscilación dinámica con un reómetro, modelo AR-G2 (TA Instruments), utilizando una geometría de cono (diámetro: 40 mm, ángulo del cono: 2°) y manteniendo la temperatura a 44 °C. Se prepararon suspensiones de leche ([PL] = 35 g/L) fortificadas con distintas concentraciones de las sales en estudio. Pasaron 3 min entre la adición de EEP7 a las suspensiones y el comienzo de la oscilación, una vez introducida la muestra en el reómetro. Se aplicó un esfuerzo oscilatorio de 0,1 % a una frecuencia constante de 0,1 Hz. Se registraron tanto el módulo viscoso (G'') como el elástico (G') durante 30 min. Para el análisis de los resultados, se utilizaron los valores de G' a los 30 min ($G'_{\text{máx}}$) y el tiempo de gelificación (t_{gel}), considerado el tiempo al cual G' se vuelve mayor que G'' en las condiciones ensayadas (Gunasekaran y Ak, 2000).

3.7. Caracterización de geles lácteos inducidos por el extracto enzimático bacteriano

3.7.1. Análisis microestructural

Se estudió la microestructura de los geles lácteos inducidos por EEP7 a partir de parámetros obtenidos de imágenes digitales. Para obtener las imágenes se utilizó un microscopio confocal (Nikon C1SiR) sobre un microscopio invertido (Nikon TE2000E). A 1 mL de suspensión de leche fortificada ([PL] = 35 g/L) se le adicionaron el colorante fluorescente Rodamina B (Berna) y 54 μL de EEP7 (17 UP/mL). Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos:

- 1) Inmediatamente después del agregado de EEP7, se tomaron imágenes de las suspensiones cada 3 s durante 10 min, para estudiar la microestructura durante el proceso de coagulación;
- 2) Luego de la gelificación, se tomaron imágenes de los geles lácteos en distintos planos del eje Z (separados por 100 nm) para construir *stacks* tridimensionales del sistema.

Para el experimento 1), se utilizó una concentración final de Rodamina B de 0,02 mg/mL y las suspensiones fueron colocadas en un dispositivo de acero que permite regular la temperatura de la muestra durante la toma de imágenes a 44 °C. Objetivo utilizado: 20X de apertura numérica (AN) 0,75 (Nikon Plan Apo).

Para el experimento 2), se utilizó una concentración final de Rodamina B de 0,002 mg/mL y los geles lácteos se formaron en placas Lab-Tek (Thermo Fisher Scientific) por incubación de las mismas en baño termostático a 44 °C. Para obtener las imágenes se utilizó el objetivo 60X (con aceite de inmersión) de AN 1,40 (Mellema y col., 2000).

En todos los casos, el análisis digital de las imágenes se llevó a cabo con el programa gratuito *ImageJ*, versión 1.47 v (National Institutes of Health). Utilizando uno de sus complementos llamado *BoneJ* (Doube y col., 2010), versión 1.3.12, se determinaron dos parámetros: diámetro de poro (DP) y grado de anisotropía (GA). Los valores de DP fueron obtenidos aplicando el método de “*Local Thickness*” (Hildebrand y Rüegsegger, 1997), mientras para obtener los valores de GA se utilizó el método de “*Mean Intercept Length*” (Odgaard, 1997).

La unidad constituyente más pequeña de las imágenes bidimensionales es el píxel, mientras que para las imágenes tridimensionales se llama vóxel. La cantidad de tonalidades (niveles) de un color que pueden estar contenidas en cada píxel o vóxel está definida por los bits de la imagen. Las imágenes obtenidas en el microscopio tienen 24 bits y se conocen como “RGB color” porque cada píxel puede contener uno de 256 niveles de rojo, verde o azul lo que resulta en una cantidad de $2^{8 \times 3} = 256^3$ de tonalidades posibles (Ferreira y Rasband, 2012).

Los métodos del *BoneJ* se aplican a imágenes binarias, en las que cada píxel o vóxel puede contener uno de dos niveles posibles: negro o blanco (Ferreira y Rasband, 2012). El programa *Image J* ofrece distintos algoritmos para binarizar imágenes, las imágenes obtenidas en el experimento 1) ajustaron mejor a la binarización por la técnica de *Percentile* (Doyle, 1962). Las imágenes obtenidas en el experimento 2) fueron binarizadas por la técnica *Default* (Ridler y Calvard, 1978), que usa el algoritmo de IsoData, con algunas modificaciones. En todos los casos, se le asignó el color negro a los píxeles

que constituyen el fondo y el color blanco a los píxeles que corresponden al gel, como se muestra en la Figura 3.3.3.

Utilizando otro complemento del *ImageJ* llamado “*GLCM Texture*”, que aplica matrices de co-ocurrencia del nivel de gris (*Grey-Level Co-occurrence Matrix*), se determinó el parámetro entropía digital (E) (Haralick y col., 1973; Walker y col., 1995). Este complemento se aplica en imágenes de 8 bits, también llamadas imágenes en escala de gris (Figura 3.3.3 c) ya que cada píxel o vóxel puede contener uno de $2^8 = 256$ niveles de gris entre el negro (nivel 0) y el blanco (nivel 255).

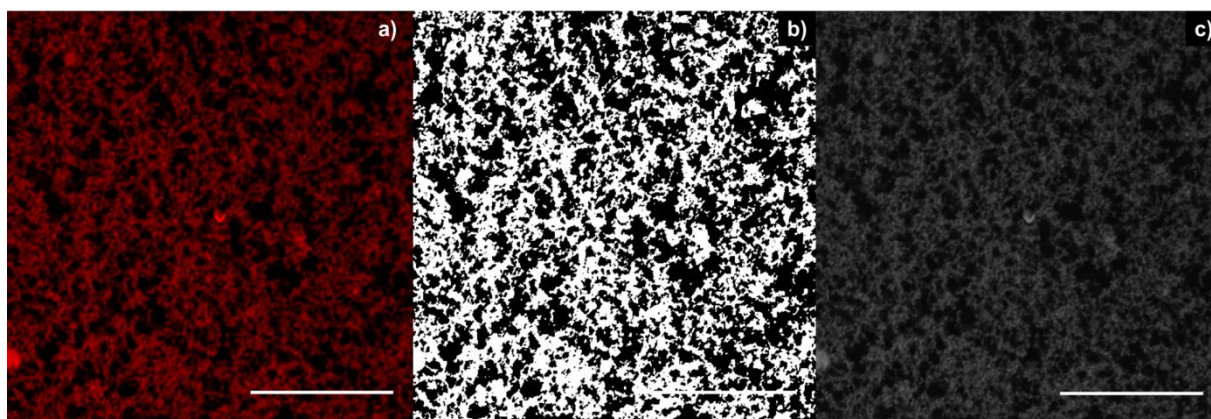


Figura 3.3.3: Imagen de un gel lácteo inducido por EEP7 a) RGB color, b) binaria y c) en escala de gris. Barra de escala: 30 μm

3.7.2. Análisis de color

Se determinaron los parámetros que caracterizan el color de geles lácteos inducidos por EEP7. Los geles lácteos se formaron a partir de las suspensiones de leche fortificadas con las sales en estudio, de la misma manera que se explicó en la sección 3.5.1. del Capítulo 2, siendo la temperatura de incubación, en este caso, 44 °C. El análisis de color se llevó a cabo utilizando la metodología explicada en la sección 3.5.2. del Capítulo 2 y se determinaron los valores de IB cómo se explicó anteriormente en este capítulo (sección 3.1.7).

3.7.3. Análisis de textura mecánica

Se llevaron a cabo ensayos de penetración de los geles lácteos inducidos por EEP7 utilizando la metodología explicada en la sección 3.5.3. del

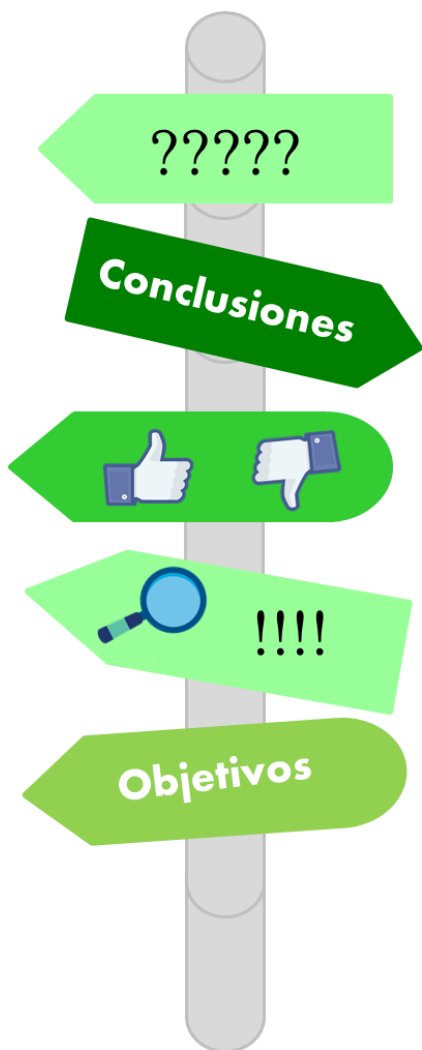
Capítulo 2. Se determinó el efecto de las distintas concentraciones de las sales en estudio sobre los valores de fuerza de fractura (FF) y firmeza (FI).

3.8. Procesamiento de los datos obtenidos

Para el estudiar el efecto de diferentes concentraciones de las sales analizadas sobre el proceso de agregación de las MC inducido por EEP7, se llevó a cabo un diseño experimental multifactorial, utilizando el programa *Design Expert* (versión 6.0, Stat-Ease Inc). Se consideraron 4 factores independientes (concentración de cada sal) con 3 niveles cada uno. Las variables respuesta evaluadas fueron: $\beta_{inicial}$, $velocidad_{inicial}$ y t_{ag} . Mediante ANOVA de los datos obtenidos, se determinaron los factores e interacciones que resultaron significativos ($p < 0,05$) sobre las variables respuesta. Una vez determinados los mismos, se obtuvieron las ecuaciones modelo que relacionan factores y variables.

Para los demás experimentos el análisis gráfico y estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa *Sigma Plot* (versión 12.0). La relación lineal entre variables se determinó a partir del coeficiente de correlación de Pearson. Para determinar las diferencias entre parámetros obtenidos a partir de muestras independientes (con diferente concentración de sal) se utilizó la prueba *t de Student*. En todos los casos las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a valores de $p < 0,05$.

4. Resultados y discusión



4.1. Determinación de la concentración de proteínas en suspensión de leche bovina

La concentración de proteínas en suspensiones de leche descremada 10% P/V fue entre 30 – 40 g/L. Estas suspensiones se conservaron hasta 30 días después de su preparación. Cada uno de los experimentos fue llevado a cabo con una misma suspensión de leche descremada.

4.2. Determinación del tamaño promedio y potencial electrocinético de micelas de caseína por dispersión de luz

Se determinaron los valores de potencial ζ y D_h de las MC en ausencia y presencia de distintas concentraciones de las sales en estudio. En la Tabla 3.4.1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.4.1: Valores de potencial ζ y D_h de las MC. Efecto de distintas concentraciones de las sales en estudio. Condiciones del medio: [PL] = 0,35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Sal	[Sal] (mM)	Potencial ζ (mV)	D_h (nm)
-	0,0	- 26 \pm 2	121 \pm 2
ZnCl ₂	0,125	- 26 \pm 3	220 \pm 2
	0,250	- 24 \pm 3	206 \pm 3
	5	- 12 \pm 2	206 \pm 3
CaCl ₂	10	- 5 \pm 2	198 \pm 5
	15	- 4 \pm 2	193 \pm 4
MgCl ₂	5	- 18 \pm 3	166 \pm 6
	10	- 16,0 \pm 3	168 \pm 4
NaCl	50	- 7 \pm 3	-
	100	- 5 \pm 2	-

Los valores de ambos parámetros para las MC en ausencia de sal concuerdan con los ya publicados en la bibliografía (Philippe y col., 2005). No se muestra el tamaño de las MC en presencia de NaCl ya que no fue posible

obtener valores reproducibles. En presencia de las concentraciones de NaCl ensayadas ocurre una disminución de la cantidad de Ca^{2+} unido a las CN (Mekmene y col., 2009). Esto se debe al apantallamiento de las cargas negativas de las CN, que se evidencia en los resultados de potencial ζ . El Ca^{2+} es muy importante en el mantenimiento de la estructura de las MC, por lo que se estaría perdiendo su integridad.

Por otro lado, el potencial ζ de las MC disminuyó significativamente en presencia de CaCl_2 o MgCl_2 , aunque no se vio afectado por la presencia de ZnCl_2 . Las cargas negativas de las CN al pH de trabajo fueron apantalladas por las cargas positivas de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Sin embargo, las concentraciones de ZnCl_2 ensayadas fueron tan bajas que el Zn^{2+} no fue suficiente para causar tal apantallamiento.

En cuanto al tamaño, en presencia de ZnCl_2 , CaCl_2 o MgCl_2 aumentó significativamente el D_h de las MC. Una reestructuración de las CN, producto de su interacción con los cationes divalentes, estaría promoviendo la formación de micelas más grandes. De hecho, el D_h resultó mayor en presencia de los cationes con mayor afinidad por las MC: $\text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ (Philippe y col., 2005).

4.3. Estudio de cambios estructurales de las caseínas

4.3.1. Interpretación de espectros de fluorescencia

En la Figura 3.4.1 se muestran los espectros de fluorescencia intrínseca de suspensiones de leche en ausencia y presencia de las distintas sales ensayadas. La fluorescencia intrínseca de una proteína está dominada por la emisión de sus Trp. La longitud de onda a la cual este aminoácido presenta su máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}} = 350$ nm en agua) es muy sensible al entorno. En un ambiente apolar, $\lambda_{\text{máx}}$ se desplaza hacia el azul (disminuye), mientras que en un ambiente polar, el grupo imino del Trp forma puentes de hidrógeno con el solvente y $\lambda_{\text{máx}}$ se desplaza hacia el rojo (aumenta) (Lakowicz, 2007). Se pueden estudiar entonces cambios estructurales en las proteínas a partir de variaciones en sus espectros de emisión de fluorescencia.

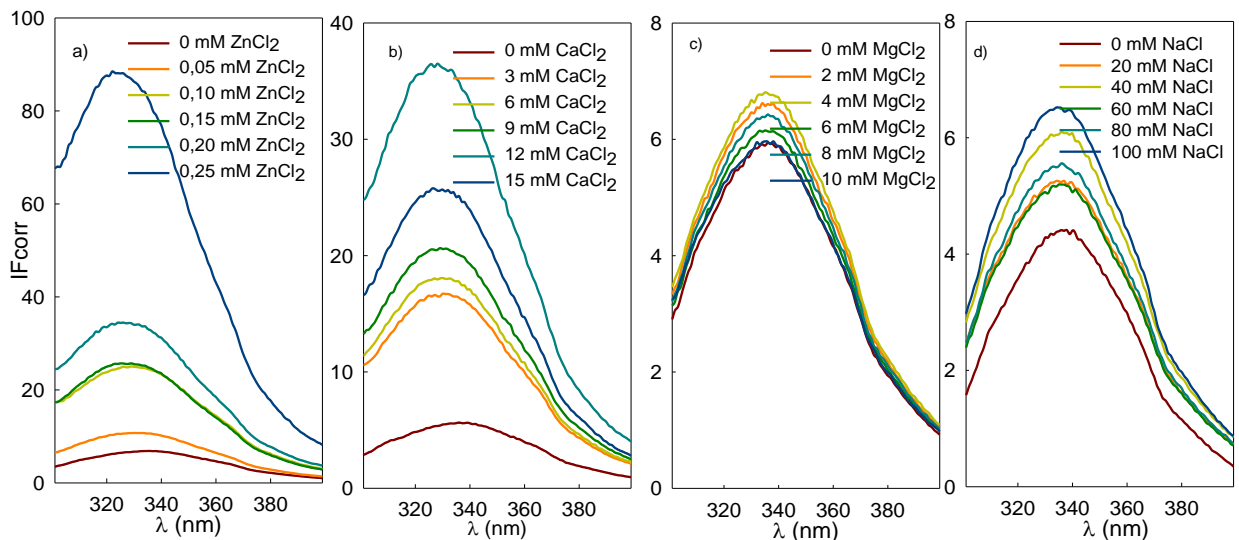


Figura 3.4.1: Espectros de fluorescencia intrínseca de suspensiones de leche. Efecto de distintas concentraciones de sales: a) ZnCl_2 , b) CaCl_2 , c) MgCl_2 y d) NaCl . Condiciones del medio: $[\text{PL}] = 0,1 \text{ g/L}$; $\text{Tris-HCl } 10 \text{ mM pH } 7,4$; $44 \text{ }^\circ\text{C}$.

En todos los espectros de emisión obtenidos se observó la $\lambda_{\text{máx}}$ a 330 nm y un hombro a 360 nm. Esto indica que en las proteínas de la leche hay dos poblaciones de Trp: una expuesta al solvente ($\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$) y otra protegida por la estructura de las proteínas, en un entorno más apolar ($\lambda_{\text{máx}} = 330 \text{ nm}$). Analizar la variación de la relación $\text{IF}_{330\text{nm}}/\text{IF}_{360\text{nm}}$ en las distintas condiciones ensayadas podría evidenciar transiciones de Trp polares a entornos apolares ($\uparrow \text{IF}_{330\text{nm}}/\text{IF}_{360\text{nm}}$) o viceversa ($\downarrow \text{IF}_{330\text{nm}}/\text{IF}_{360\text{nm}}$). La relación $\text{IF}_{330\text{nm}}/\text{IF}_{360\text{nm}}$ aumentó en presencia de ZnCl_2 y CaCl_2 , aunque se mantuvo constante en presencia de MgCl_2 y NaCl . Esto significaría que, en presencia de ZnCl_2 y CaCl_2 , ocurren cambios estructurales que llevarían a Trp expuestos al solvente a un entorno apolar.

En todos los casos estudiados se observó un aumento en la IF emitida por los Trp al aumentar la concentración de sal. Esto también se relaciona con la transición de Trp polares a entornos apolares. Cuando los Trp se encuentran expuestos al solvente son más sensibles a la colisión con otras moléculas presentes en solución, promoviendo la relajación del estado excitado por mecanismos no radiantes. Producto de la interacción entre las CN y los cationes, algunos Trp pasarían a un entorno apolar, emitiendo fluorescencia durante la relajación de su estado excitado. El aumento en la IF emitida es más significativo en presencia de Zn^{2+} o Ca^{2+} , los cationes con mayor afinidad por

las CN (Philippe y col., 2005). El aumento de la IF fue directamente proporcional a la concentración de ZnCl_2 , mientras que en presencia de CaCl_2 o MgCl_2 , la IF aumenta hasta una determinada concentración de sal (12 mM para Ca^{2+} y 4 mM para Mg^{2+}), por encima de la cual disminuye. Esto podría deberse a la disminución en la capacidad de ciertas CN de acomplejar minerales cuando la fuerza iónica es muy alta (Baumy y Brule, 1988). Las fosfoserinas de las CN se encuentran menos ionizadas cuando la fuerza iónica es alta, disminuyendo su interacción con moléculas de carga opuesta. Teniendo en cuenta que las concentraciones de NaCl ensayadas fueron las más elevadas, el efecto de la presencia de esta sal en el cambio estructural de estas proteínas resultó menor, lo cual podría deberse a su baja afinidad por las CN.

4.3.2. Estudio de unión del ANS a las proteínas de la leche

En la Figura 3.4.2, se muestra la variación de los valores de S_0 relativos en suspensiones de leche en presencia de las distintas sales ensayadas.

Los valores de S_0 son relativos porque se calcularon a partir de la relación entre el valor de S_0 obtenido en presencia de sales y el S_0 en ausencia de las mismas. Todas las sales en estudio, excepto NaCl, causaron variaciones significativas de S_0 ($p < 0,05$). Nuevamente, se evidencia el efecto de la afinidad específica de los cationes en estudio por las CN. En presencia de ZnCl_2 y CaCl_2 , se observaron las mayores variaciones de S_0 . El aumento en S_0 fue directamente proporcional a la concentración de ZnCl_2 . En cambio, en presencia de CaCl_2 o MgCl_2 , los valores de S_0 aumentaron hasta una determinada concentración (9 mM para CaCl_2 y 6 mM para MgCl_2), a partir de la cual disminuyeron, debido al efecto de la elevada fuerza iónica.

El aumento en los valores de S_0 indica un aumento en la cantidad de ANS unido a la superficie proteica (Lakowicz, 2007). Es importante tener en cuenta que tanto la molécula de ANS como la mayoría de las PL, presentan carga negativa al pH de trabajo (Farrell y col., 2004). El apantallamiento de cargas negativas en presencia de los cationes en estudio permitió la interacción hidrofóbica entre ANS y PL.

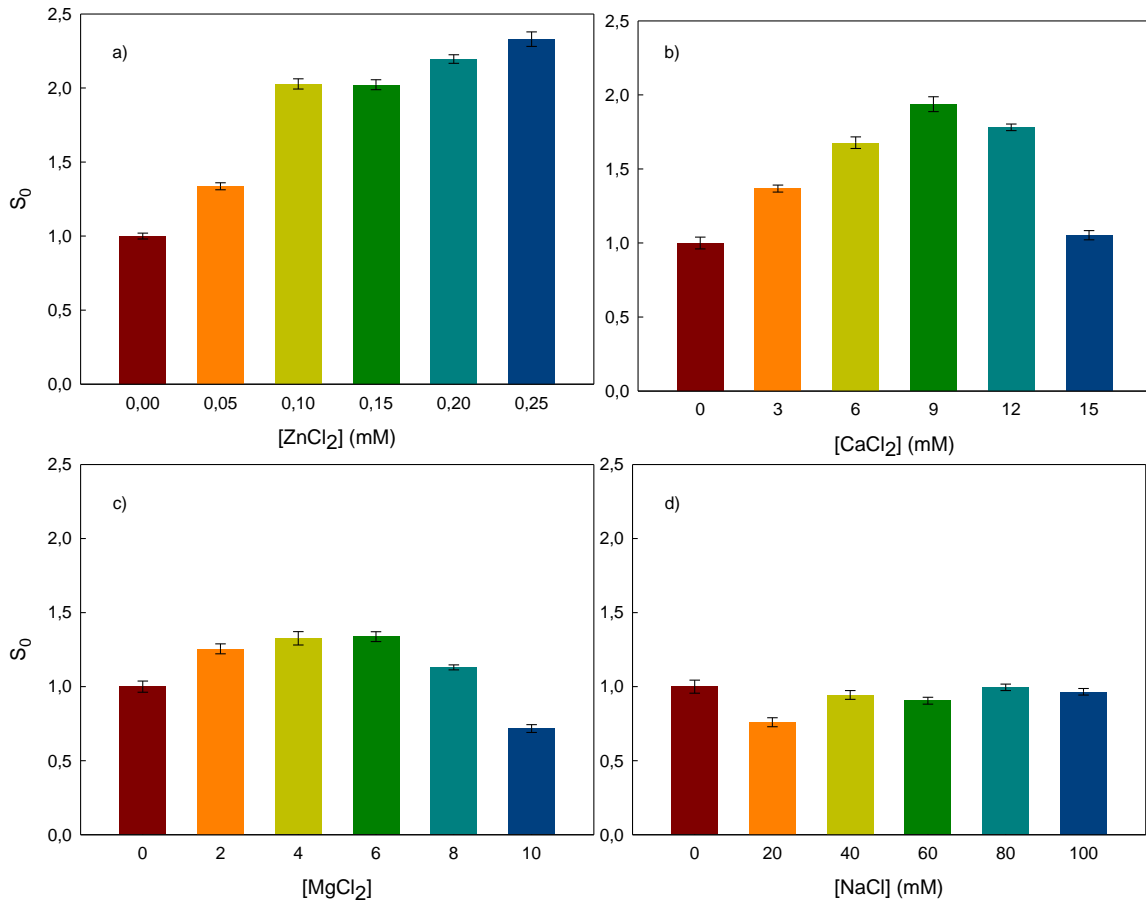


Figura 3.4.2: Efecto de distintas concentraciones de sales sobre S_0 : a) $ZnCl_2$, b) $CaCl_2$, c) $MgCl_2$ y d) $NaCl$. Condiciones del medio: $[PL] = 0,1$ g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

La interacción entre las PL y el Zn^{2+} no es exclusivamente electrostática; a diferencia de los demás cationes en estudio, el Zn^{2+} es un metal de transición, dentro de sus propiedades se destaca la de actuar como ácido de Lewis, formando complejos de coordinación con moléculas que le donan electrones. De hecho, se ha comprobado por espectroscopía infrarroja que tanto el oxígeno de grupos carboxilos desprotonados (en Asp y Glu) como el fosfato (en Ser-P) son sitios específicos de unión del Zn^{2+} a las CN (García y col., 2006; Pomastowski y col., 2014). El oxígeno del grupo sulfonato del ANS también podría actuar como donante de electrones. En presencia de $ZnCl_2$, el ANS interactuaría con las PL no sólo hidrofóbicamente sino también mediante coordinación.

4.3.3. Análisis del *quenching* de la fluorescencia por acrilamida

En la Figura 3.4.3 se muestran los gráficos de Stern-Volmer obtenidos en los experimentos de *quenching*, en ausencia y presencia de distintas concentraciones de sales.

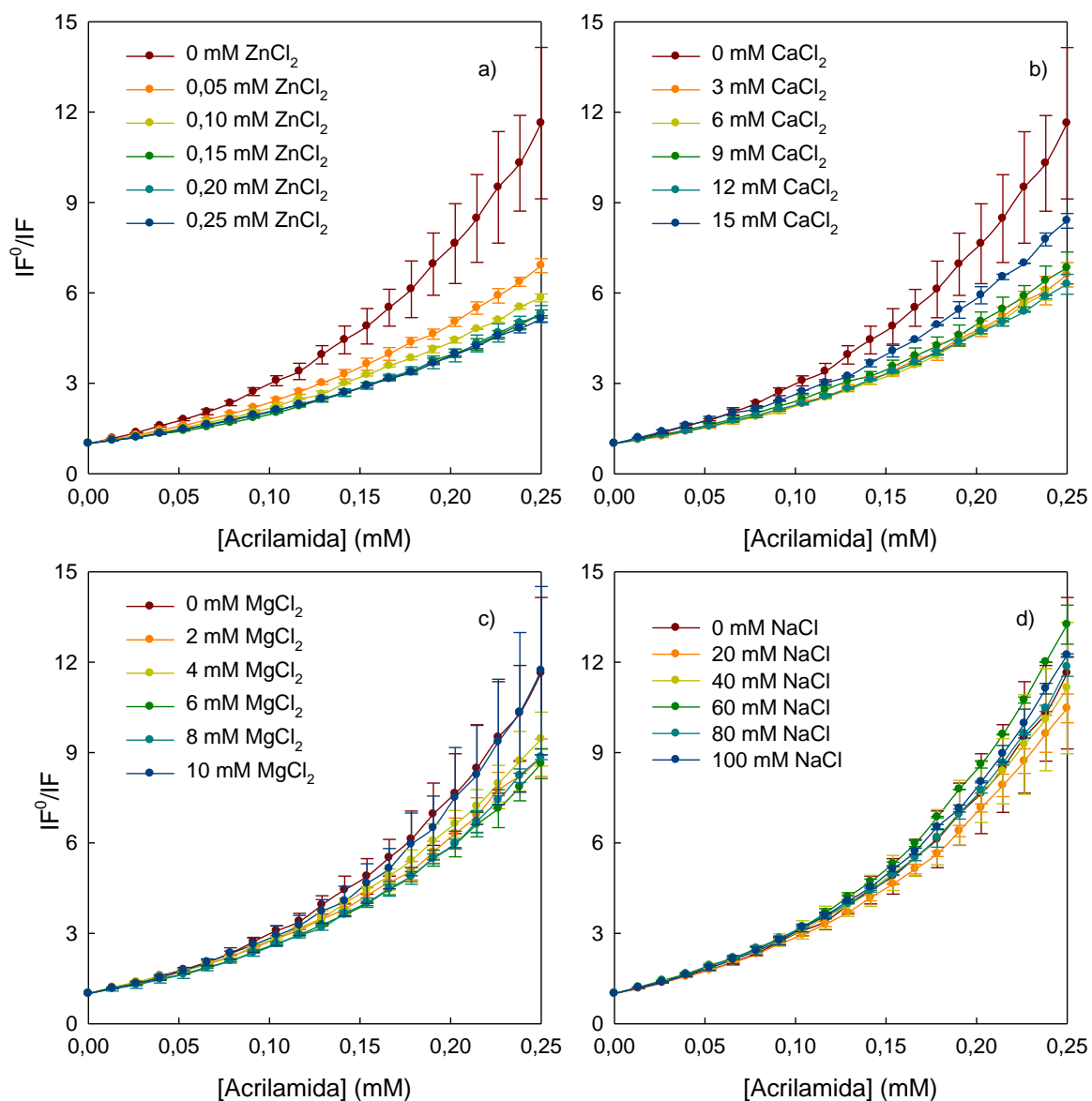


Figura 3.4.3: *Quenching* de la fluorescencia intrínseca de suspensiones de leche. Efecto de distintas concentraciones de sales: a) ZnCl₂, b) CaCl₂, c) MgCl₂ y d) NaCl. Condiciones del medio: [PL] = 0,1 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

En todas las condiciones ensayadas se obtuvieron gráficos no lineales (cóncavos); estos resultados se deben a que fluoróforo y *quencher* están tan cerca que la probabilidad de que ocurra *quenching* es unitaria. El modelo que

describe esta situación se conoce con el nombre de “modelo de la esfera de acción” (Lakowicz, 2007).

Como se evidencia en los gráficos de Stern-Volmer, la afinidad de los cationes en estudio por las CN afectó el *quenching* de la fluorescencia. En presencia de $ZnCl_2$ y $CaCl_2$, las curvas de Stern-Volmer se ubican por debajo de la curva control en ausencia de cationes, indicando que el *quenching* estaría ocurriendo en menor medida. Esto podría deberse a una disminución de la accesibilidad de la acrilamida a los Trp, concordando con los resultados de las dos secciones anteriores (4.3.1. y 4.3.2.) que demuestran que estas sales producen cambios en la conformación de las CN. En presencia de $MgCl_2$, la variación en la magnitud de *quenching* es menos significativa, resultando nula en los medios conteniendo NaCl.

4.4. Análisis de color de suspensiones de leche

En la Tabla 3.4.2 se muestran los resultados del análisis de color de las suspensiones de leche en ausencia y presencia de distintas concentraciones de las sales en estudio.

La variación de los parámetros de color en presencia de las sales en estudio resultó en un aumento significativo ($p < 0,05$) del índice de blancura (IB). En presencia de $ZnCl_2$ se determinó el mayor IB. Le siguieron las soluciones con $CaCl_2$, mientras que, en presencia de $MgCl_2$ y NaCl se obtuvieron aumentos menores del IB. Estos resultados concuerdan con los anteriores de D_h dado que una suspensión con MC más grandes dispersa más la luz, otorgando una apariencia más blanquecina a la suspensión.

Tabla 3.4.2: Efecto de distintas concentraciones de las sales en estudio sobre el IB de suspensiones de leche. Condiciones del medio: [PL] = 0,35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4.

Sal	[Sal] (mM)	IB
-	-	29,8 ± 0,8
ZnCl ₂	0,125	93 ± 2
	0,250	92 ± 1
CaCl ₂	5	52,8 ± 0,9
	10	77,9 ± 0,4
	15	82,4 ± 0,7
MgCl ₂	5	39,9 ± 0,8
	10	39,3 ± 0,7
NaCl	50	35 ± 2
	100	42 ± 2

4.5. Determinaciones de viscosidad de suspensiones de leche

La leche bovina es uno de los fluidos más procesados en la industria alimentaria, por lo que resulta fundamental conocer cualquier cambio en sus propiedades físicas que pudiera afectar tal procesamiento. Las MC son las principales contribuyentes a la viscosidad de la leche, por esto, cualquier variable que afecte su estado de agregación puede modificar su viscosidad final (Bienvenue y col., 2003). En la Figura 3.4.4 se muestran los gráficos de esfuerzo (τ) vs. velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) para dos de las muestras analizadas. Se obtuvieron gráficas similares en todas las condiciones ensayadas, que corresponden a un comportamiento pseudoplástico, característico de leche con elevada concentración de sólidos totales (Morison y col., 2013). Además, se observó que en todos los casos fue necesario aplicar un esfuerzo mínimo para que las suspensiones comiencen a fluir. No se observaron diferencias significativas entre las curvas obtenidas durante el

barrido ascendente y descendente de γ , evidenciando que el comportamiento pseudoplástico no es dependiente del tiempo.

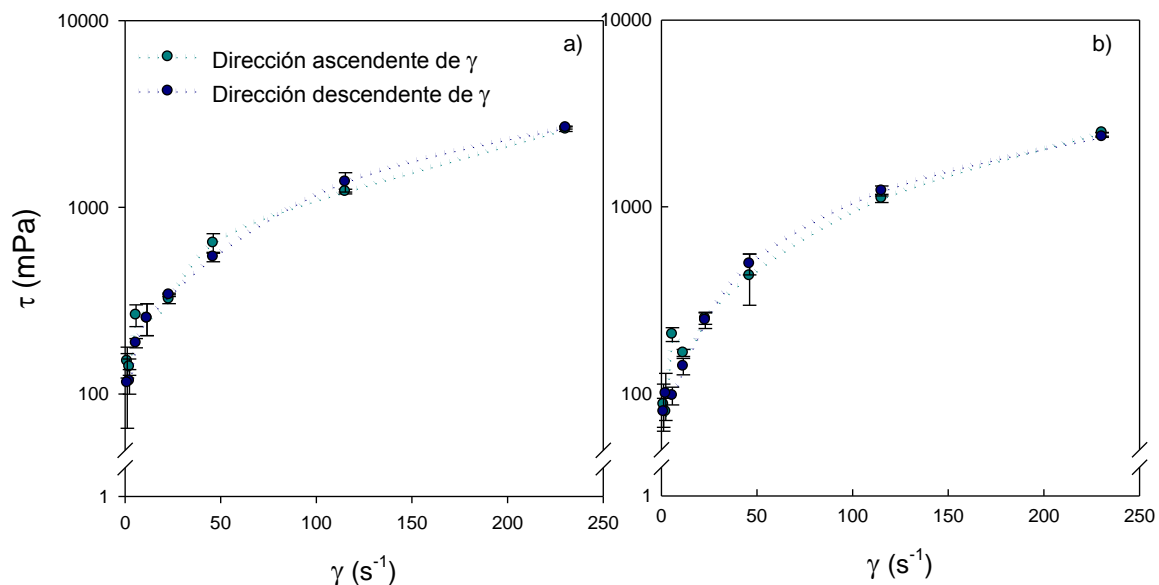


Figura 3.4.4: Curvas de esfuerzo (τ) vs. velocidad de deformación (γ) de leche en presencia de a) $CaCl_2$ 2,5 mM y b) $ZnCl_2$ 0,125 mM. Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

En la Figura 3.4.5 se muestran los gráficos de viscosidad aparente (η_a) vs. γ para todas las muestras de leche en presencia de las distintas concentraciones de sales en estudio. En todas las condiciones ensayadas la η_a disminuyó rápidamente con el aumento de γ , hasta un valor de $\gamma = 11,5 s^{-1}$, a partir del cual la disminución de η_a fue más gradual. Los valores de η_a obtenidos para las muestras de leche coinciden con los publicados en la bibliografía (Alcântara y col., 2012). Los cambios estructurales en las MC causados por la presencia de ciertas sales en estudio no afectaron significativamente la η_a de la leche.

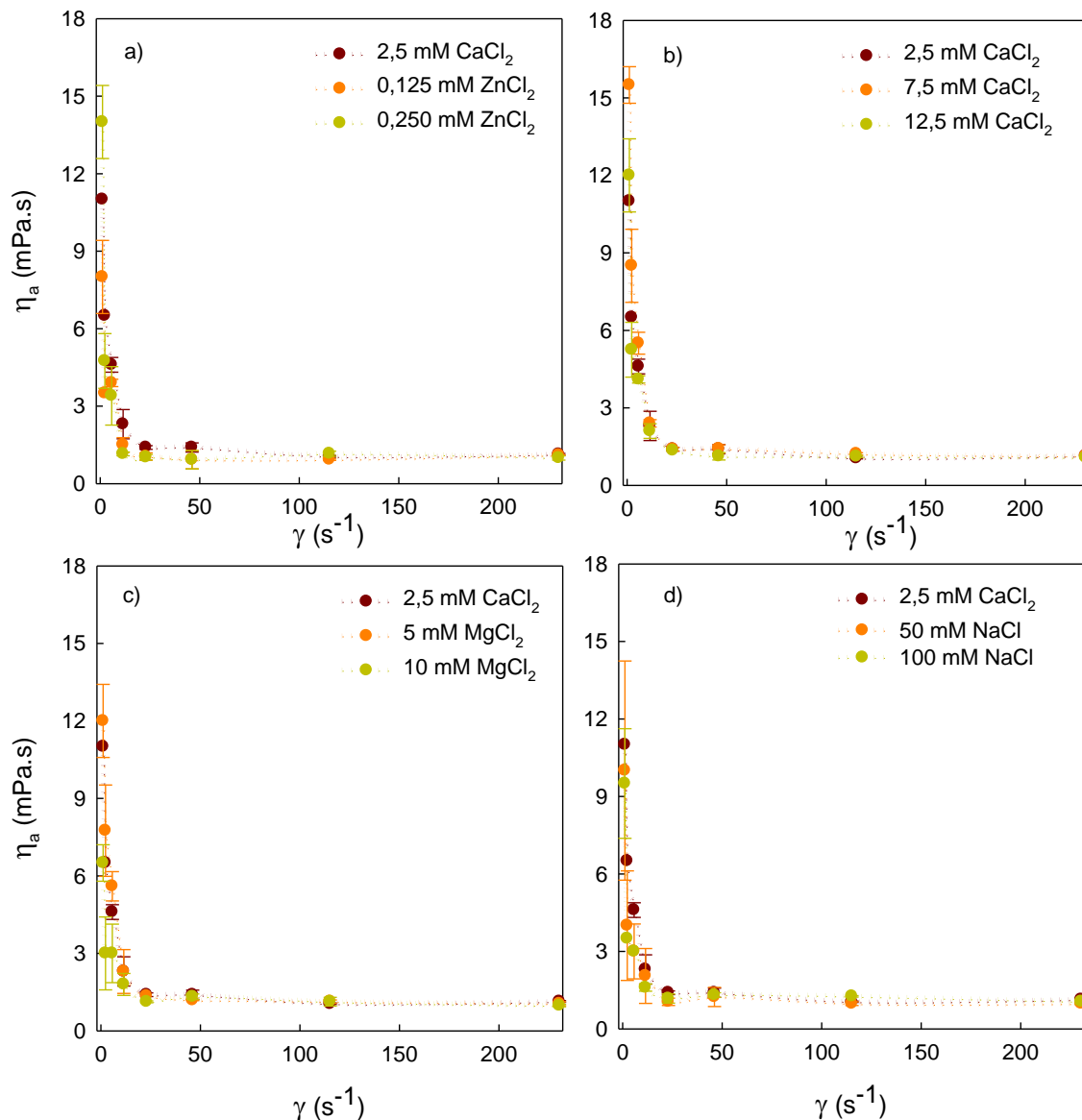


Figura 3.4.5: Curvas de viscosidad aparente (η_a) vs. velocidad de deformación (γ) de leche. Efecto de distintas concentraciones de a) ZnCl_2 , b) CaCl_2 , c) MgCl_2 y d) NaCl . Condiciones del medio: $[\text{PL}] = 35 \text{ g/L}$; $\text{Tris-HCl } 10 \text{ mM pH } 7,4$; $44 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.6. Determinación de la actividad proteasa del extracto enzimático P7

En la Tabla 3.4.3 se muestran los valores de AP de EEP7 en presencia de las distintas concentraciones de sales en estudio. Los valores son relativos a la actividad obtenida en ausencia de las sales, que se considera el 100%.

En presencia de CaCl_2 la AP de EEP7 resultó mayor que en ausencia de sal, mientras que en presencia de ZnCl_2 y MgCl_2 no se obtuvieron diferencias significativas.

Tabla 3.4.3: Efecto de distintas concentraciones de las sales en estudio sobre la actividad proteasa del EEP7. Condiciones del medio: Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Sal	[Sal] (mM)	AP relativa (%)
-	-	100 ± 1
ZnCl ₂	0,125	100 ± 1
	0,250	99 ± 3
CaCl ₂	5	106,6 ± 0,9
	10	105 ± 2
MgCl ₂	5	102 ± 4
	10	102 ± 6
NaCl	50	98 ± 1
	100	94 ± 4

La estimulación de la AP en presencia de Ca²⁺ podría deberse a la formación de puentes iónicos que estabilizarían a la enzima en su conformación activa (Corrêa y col., 2010). Probablemente, las pequeñas concentraciones de ZnCl₂ no fueron suficientes para lograr tal efecto. La elevada fuerza iónica otorgada por el NaCl sería la responsable de la disminución de la AP de EEP7.

4.7. Estudio del proceso de agregación de las micelas de caseína utilizando el extracto enzimático P7

La caracterización del proceso de agregación de las MC inducido por EEP7 fue llevada cabo a través de los parámetros: β_{inicial} (relacionado con el tamaño promedio de las MC), velocidad inicial (v_i) y tiempo de agregación (t_{ag}). En la Figura 3.4.6 se muestra la variación del parámetro β en función del tiempo en suspensiones de leche en presencia de distintas concentraciones de CaCl₂, después de la adición del EEP7. Además, se definen los distintos parámetros en estudio. Se obtuvieron gráficas similares en todas las condiciones ensayadas.

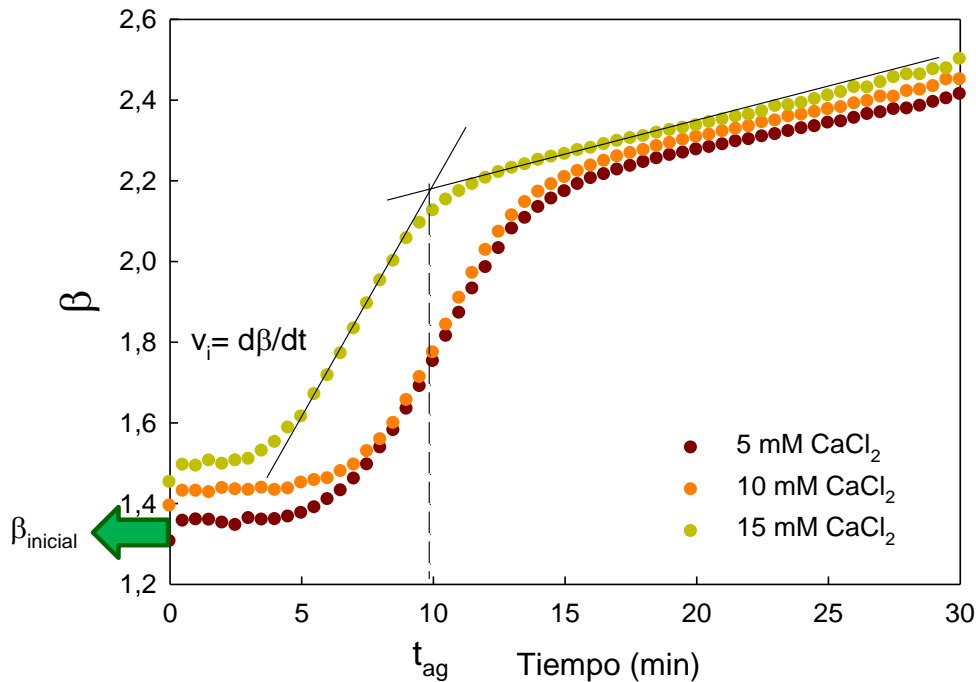


Figura 3.4.6: Variación del parámetro β en función del tiempo. Condiciones del medio: [PL] = 0,35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Estos resultados demuestran que el mecanismo de agregación de las MC por acción de EEP7 es diferente al llevado a cabo por cuajo, en el que la dependencia de β con el tiempo ajusta a un comportamiento exponencial (Risso y col., 2007). En este caso, en cambio, el comportamiento resultó más bien sigmoidal, distinguiéndose tres etapas: en la primera no ocurrieron variaciones significativas de β en el tiempo, probablemente la variación en el tamaño de las MC fue tan pequeña que no fue detectada por esta técnica; la segunda etapa se considera la correspondiente al proceso de agregación, en el que β aumentó rápidamente. Una vez finalizada la agregación inicial, el aumento de β fue más lento durante la última etapa.

La coagulación de leche inducida por quimosina se basa en la digestión del enlace Phe 105 – Met 106 de la κ -CN, que desestabiliza la estructura de las MC y promueve su agregación, aumentando β . La especificidad de corte de EEP7 es menor que la de quimosina, por lo que se estarían digiriendo otras PL además de la κ -CN y probablemente por esto el β no aumentó en la primera etapa. Para producir la desestabilización coloidal de las MC es necesario digerir una determinada proporción de κ -CN que se alcanzaría luego de la primera etapa. Además, el parámetro β no alcanzó un valor máximo en el

tiempo que duró el experimento. Podría interpretarse que la agregación de las MC ocurrió principalmente en la segunda etapa y que los cambios posteriores en β fueron debidos a la excesiva proteólisis ejercida por EEP7 que produjo nuevas interacciones entre los agregados proteicos.

Se evaluó la significancia de los factores estudiados en los parámetros determinados. Se encontró que la v_i no fue afectada por ninguna de las sales ensayadas ($p = 0,2694$). La Tabla 3.4.4 muestra cuáles fueron los factores que afectaron significativamente a cada uno de los parámetros del proceso de agregación ($p < 0,05$).

Tabla 3.4.4: Probabilidades asociadas obtenidas por ANOVA al estudiar el efecto de los factores (concentraciones de cada sal) sobre cada uno de los parámetros del proceso de agregación.

Factor	$\beta_{inicial}$	t_{ag}
[ZnCl ₂]	0,7776	0,0437
[CaCl ₂]	0,6983	0,5417
[MgCl ₂]	0,7326	0,7243
[NaCl]	0,1441	0,3459
[ZnCl ₂] ²	0,7908	0,5935
[CaCl ₂] ²	0,7271	0,6709
[MgCl ₂] ²	0,3518	0,6910
[NaCl] ²	0,4563	0,3639
[ZnCl ₂].[CaCl ₂]	0,4923	0,4210
[ZnCl ₂].[MgCl ₂]	0,9415	0,8327
[ZnCl ₂].[NaCl]	0,0370	0,0059
[CaCl ₂].[MgCl ₂]	0,6572	0,2668
[CaCl ₂].[NaCl]	0,0048	0,0228
[MgCl ₂].[NaCl]	0,2997	0,9212

Tanto los valores de β_{inicial} como los de t_{ag} fueron afectados significativamente por las concentraciones de ZnCl_2 , CaCl_2 y NaCl . Se realizaron ajustes correspondientes y en la Figura 3.4.7 se muestran algunas de las superficies de respuesta obtenidas.

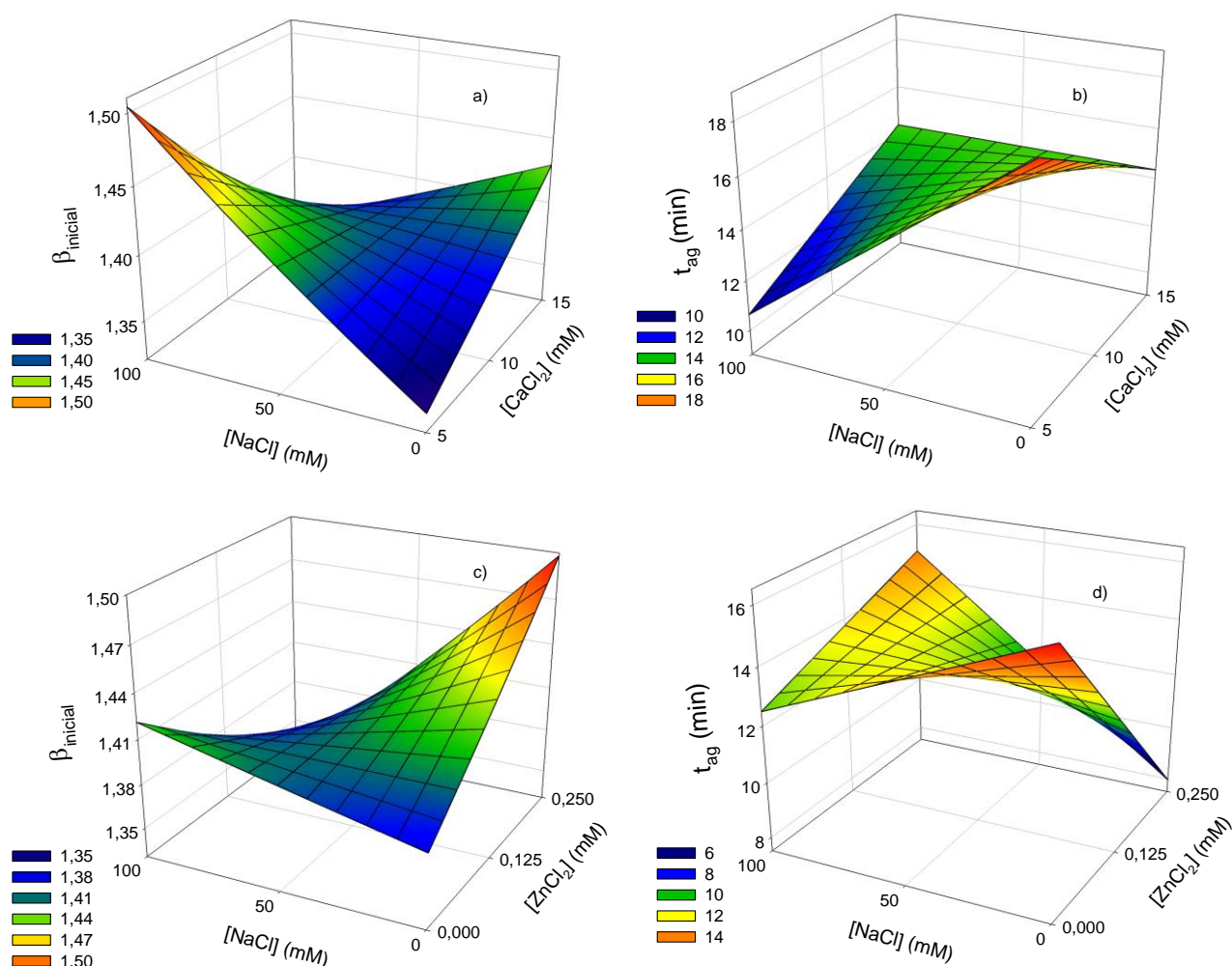


Figura 3.4.7: Superficies de respuesta para el efecto de la presencia de ZnCl_2 , CaCl_2 y NaCl sobre los valores de β_{inicial} y t_{ag} . a) y b) fueron obtenidas en ausencia de ZnCl_2 , mientras que c) y d) fueron obtenidas en presencia de una concentración constante de CaCl_2 (10 mM). Condiciones del medio: $[\text{PL}] = 0,35 \text{ g/L}$; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

El aumento en la concentración de cada una de las sales provocó un aumento en el valor de β_{inicial} , concordando con los resultados obtenidos por dispersión de luz, ya que al incrementarse la concentración de sal se favorece la formación de MC de mayor tamaño. Sin embargo, se observó un efecto antagónico entre NaCl y CaCl_2 y entre NaCl y ZnCl_2 : el incremento en la

concentración de NaCl produjo una disminución del β_{inicial} para las mayores concentraciones ensayadas de ZnCl_2 o de CaCl_2 . Esto puede explicarse considerando que la elevada fuerza iónica otorgada por el NaCl dificulta la interacción específica entre las CN y el Zn^{2+} o el Ca^{2+} .

El aumento en la concentración de ZnCl_2 , CaCl_2 y NaCl provocó una disminución en el valor de t_{ag} . Como se mostró anteriormente, el t_{ag} es el tiempo al cual finaliza la agregación primaria de las MC; por lo tanto, tiene en cuenta la proteólisis y posterior agregación de las micelas desestabilizadas. La presencia de ZnCl_2 , CaCl_2 y NaCl afectó diferencialmente a la actividad enzimática, por lo que se descarta que la etapa de proteólisis sea la determinante del t_{ag} . En este sentido, se destaca que β_{inicial} y t_{ag} se correlacionaron negativamente (Coeficiente de correlación de Pearson= -0,810; $p < 0,0001$). Por lo tanto, cuanto más grandes son las MC, menos tiempo requiere su agregación.

4.8. Gelificación de leche inducida por el extracto enzimático P7

4.8.1. Análisis reológico

En la Figura 3.4.8 se muestra la variación de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en el tiempo durante la coagulación de leche usando EEP7 en presencia de distintas concentraciones de las sales en estudio. No se muestran los resultados obtenidos en presencia de 2,5 mM de CaCl_2 debido a que en esta condición la leche no gelificó durante el tiempo que duró el ensayo.

Se obtuvieron diferencias significativas en los valores de t_{gel} ($p < 0,001$), siendo el valor promedio (11 ± 3) min. Por otro lado, se obtuvieron diferencias significativas en los valores $G'_{\text{máx}}$ ($p < 0,001$), siendo su distribución asimétrica, sesgada hacia la derecha con una mediana de 6,6 Pa y un rango intercuartil de (1,8 - 8,9) Pa. Los resultados se muestran en la Tabla 3.4.5.

Los valores de $G'_{\text{máx}}$ obtenidos en todas las condiciones ensayadas resultaron significativamente menores a los obtenidos para geles lácteos inducidos por quimosina (Lucey, 2002). Esto se relaciona con la pequeña relación AC/AP, característica de coagulantes microbianos, que origina geles más laxos debido al corte inespecífico de proteínas (Jacob y col., 2011). Además, la coagulación de leche inducida por EEP7 se llevó a cabo a mayores

valores de pH y temperatura que los utilizados para quimosina, lo que también afecta a la elasticidad de los geles resultantes (Jaros y col., 2008).

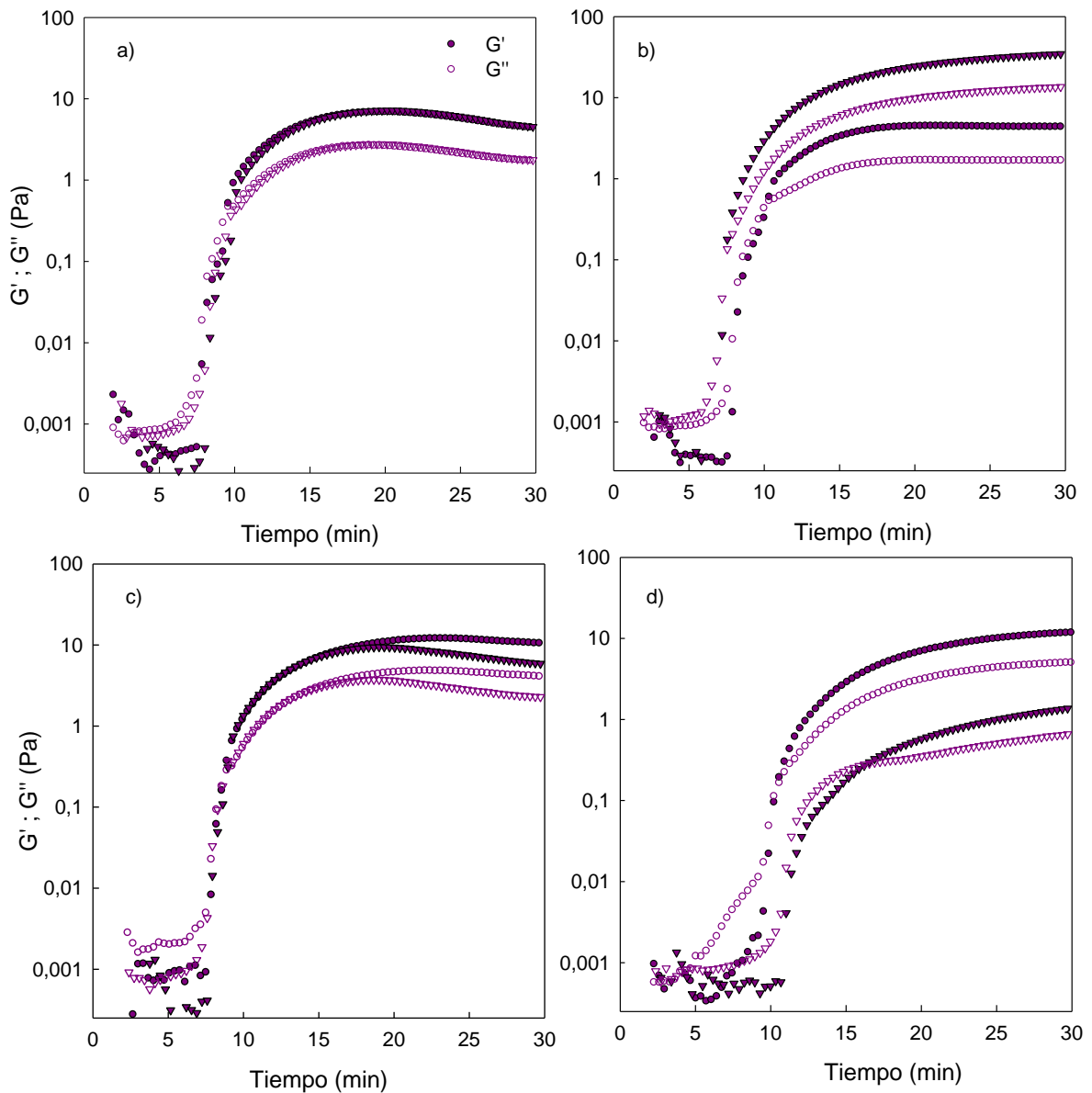


Figura 3.4.8: Variación de G' y G'' en el tiempo durante la coagulación de leche inducida por EEP7. Efecto de distintas concentraciones de a) $ZnCl_2$ (0,125 y 0,250 mM), b) $CaCl_2$ (7,5 y 12,5 mM), c) $MgCl_2$ (5 y 10 mM) y d) $NaCl$ (50 y 100 mM). Los círculos corresponden a las menores concentraciones de cada sal, mientras que los triángulos invertidos corresponden a las mayores concentraciones de cada sal. Condiciones del medio: $[PL] = 35$ g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

En presencia de $ZnCl_2$ y $MgCl_2$, el t_{gel} resultó similar al promedio y los valores de $G'_{m\acute{a}x}$ fueron intermedios. En presencia de $NaCl$ y 7,5 mM $CaCl_2$ se formaron los geles menos elásticos. La elevada fuerza iónica en presencia de

NaCl reduce la cantidad de Ca^{2+} unido a CN (Mekmene y col., 2009). En concordancia con los resultados obtenidos por dispersión de luz, en presencia de NaCl o bajas concentraciones de Ca^{2+} , se estaría perdiendo la integridad de las MC, por esto, el proceso de coagulación se enlentece (mayor t_{gel}) y los geles obtenidos son menos elásticos (Tsioulpas y col., 2007). Los geles más elásticos (mayor $G'_{\text{máx}}$) fueron obtenidos en presencia de 12,5 mM de CaCl_2 y éstos se formaron más rápidamente (menor t_{gel}) que los obtenidos en las demás condiciones ensayadas. Estos resultados confirman la importancia de la interacción entre CN y Ca^{2+} en el comportamiento coloidal de la leche, el proceso de coagulación y la elasticidad de sus geles.

Tabla 3.4.5: Efecto de distintas concentraciones de las sales en estudio sobre las propiedades reológicas del proceso de gelificación de leche usando PEP7. Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Sal	[Sal] (mM)	$G'_{\text{máx}}$ (Pa)	t_{gel} (min)
ZnCl ₂	0,125	5 ± 2	10,2 ± 0,8
	0,250	6,9 ± 0,4	10,08 ± 0,02
CaCl ₂	7,5	1,8 ± 0,2	12,2 ± 0,6
	12,5	36 ± 2	7,2 ± 0,6
MgCl ₂	5	10 ± 3	9,6 ± 0,9
	10	8,9 ± 0,8	9,25 ± 0,09
NaCl	50	1,9 ± 0,8	12 ± 2
	100	2 ± 1	16,0 ± 0,8

4.8.2. Análisis microestructural

El estudio de la microestructura de la leche durante la coagulación por EEP7 en presencia de las sales en estudio fue llevado a cabo por los parámetros: diámetro de poro (DP), grado de anisotropía (GA) y entropía digital (E). La rodamina enlentece la coagulación enzimática de las MC (Gatti y col., 1998), por esto, para lograr coagular leche en el tiempo que duró el ensayo fue necesario utilizar una mayor concentración de EEP7 en comparación a la

usada para reología. En la Figura 3.4.9 se muestran, a modo de ejemplo, algunas de las imágenes obtenidas durante la coagulación de leche utilizando EEP7 como agente coagulante en presencia de MgCl_2 5 mM.

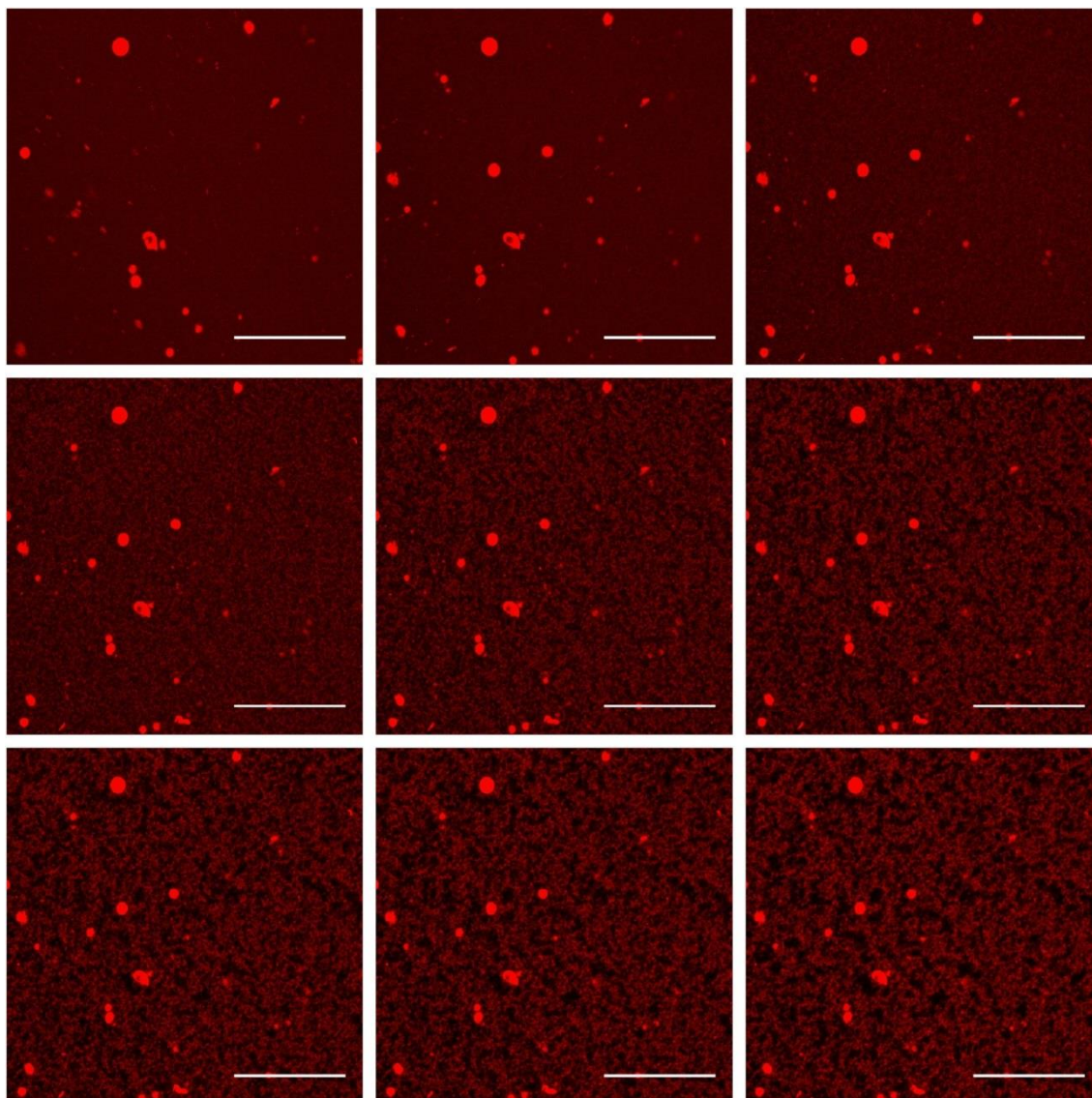


Figura 3.4.9: Imágenes de suspensiones de leche durante la gelificación inducida por EEP7. Condiciones del medio: $[\text{PL}] = 35 \text{ g/L}$; $[\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C. Sonda fluorescente: Rodamina B Roja 0,02 mg/mL. Objetivo utilizado: 20X. Barra de escala: 100 μm .

Como se muestra en las Figuras 3.4.10, 3.4.11 y 3.4.12, la variación de los parámetros microestructurales (DP, GA, E) en función del tiempo se divide en tres etapas, lo que coincide con lo observado en los ensayos de agregación y reología.

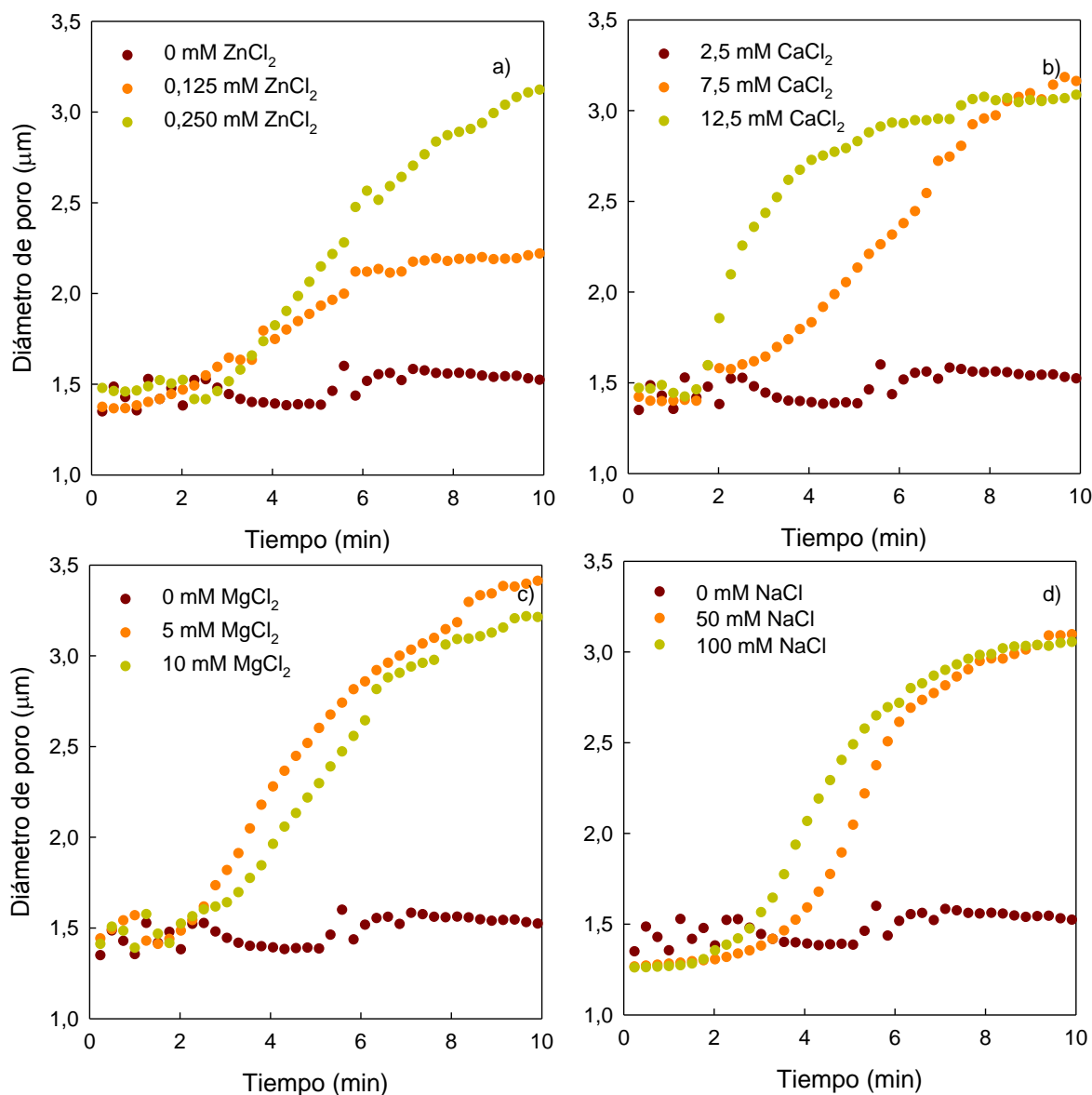


Figura 3.4.10: Variación del DP en función del tiempo durante la gelificación inducida por EEP7. Efecto de distintas concentraciones de a) ZnCl_2 , b) CaCl_2 , c) MgCl_2 y d) NaCl . Condiciones del medio: $[\text{PL}] = 35 \text{ g/L}$; $\text{Tris-HCl } 10 \text{ mM pH } 7,4$; $44 \text{ }^\circ\text{C}$.

En una etapa inicial las proteínas de la leche se encuentran formando un sol, por lo que DP, GA y E no varían en función del tiempo. La segunda etapa se caracteriza por un aumento de los parámetros que describen la microestructura en función del tiempo y en ella ocurre la gelificación. Definimos tiempo de transición sol – gel (t_{s-g}) como el tiempo de inicio de la segunda etapa. A la derivada del parámetro microestructural respecto del tiempo en la segunda etapa la llamamos velocidad de gelificación (v_g). En la tercera y última

etapa, no hay variación significativa de los parámetros microestructurales en función del tiempo.

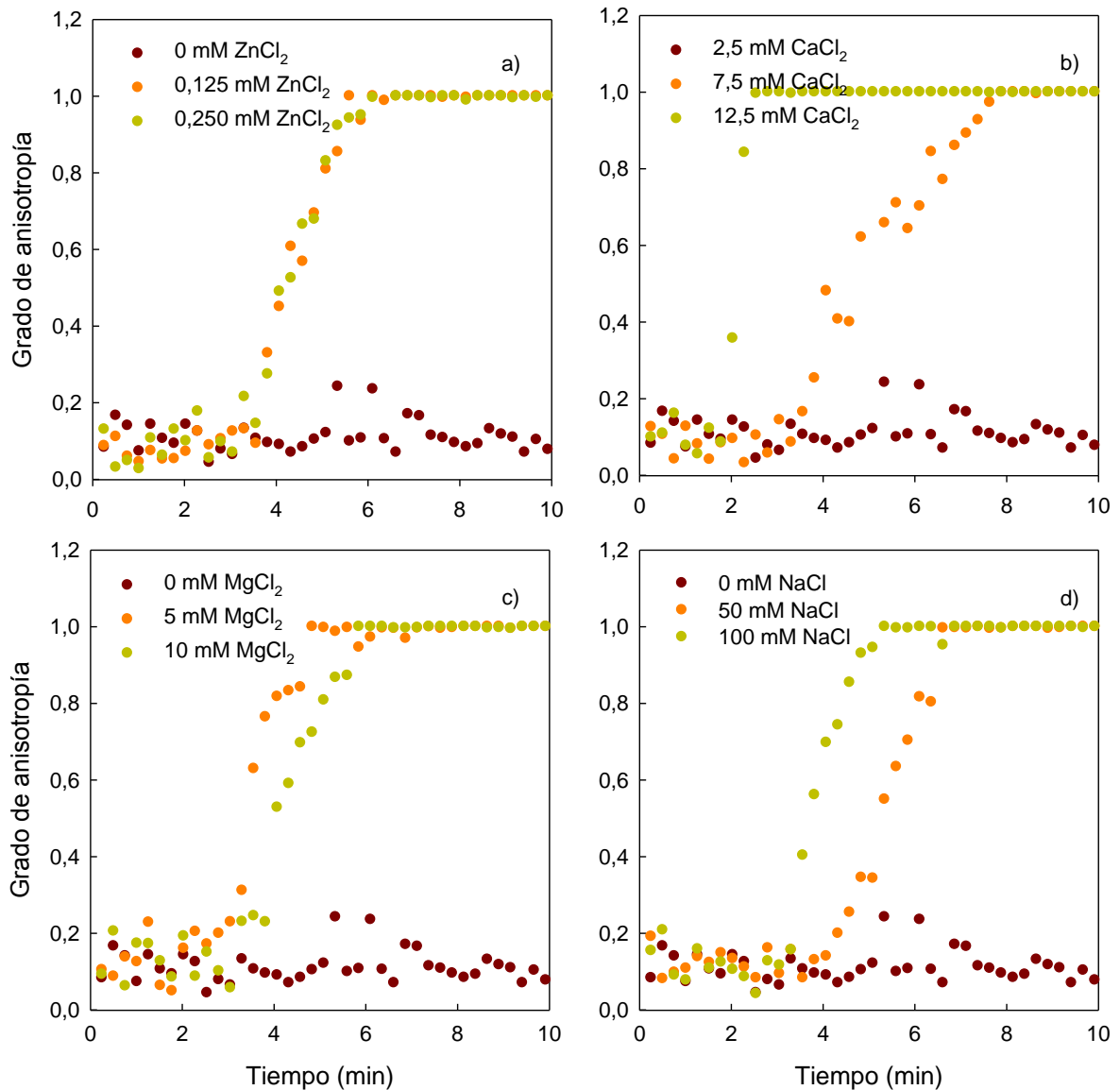


Figura 3.4.11: Variación del GA en función del tiempo durante la gelificación inducida por EEP7. Efecto de distintas concentraciones de a) ZnCl₂, b) CaCl₂, c) MgCl₂ y d) NaCl. Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Las muestras conteniendo CaCl₂ 2,5 mM no gelificaron en el tiempo que duró el ensayo y por esto no hay variación de la microestructura con el tiempo para esta condición.

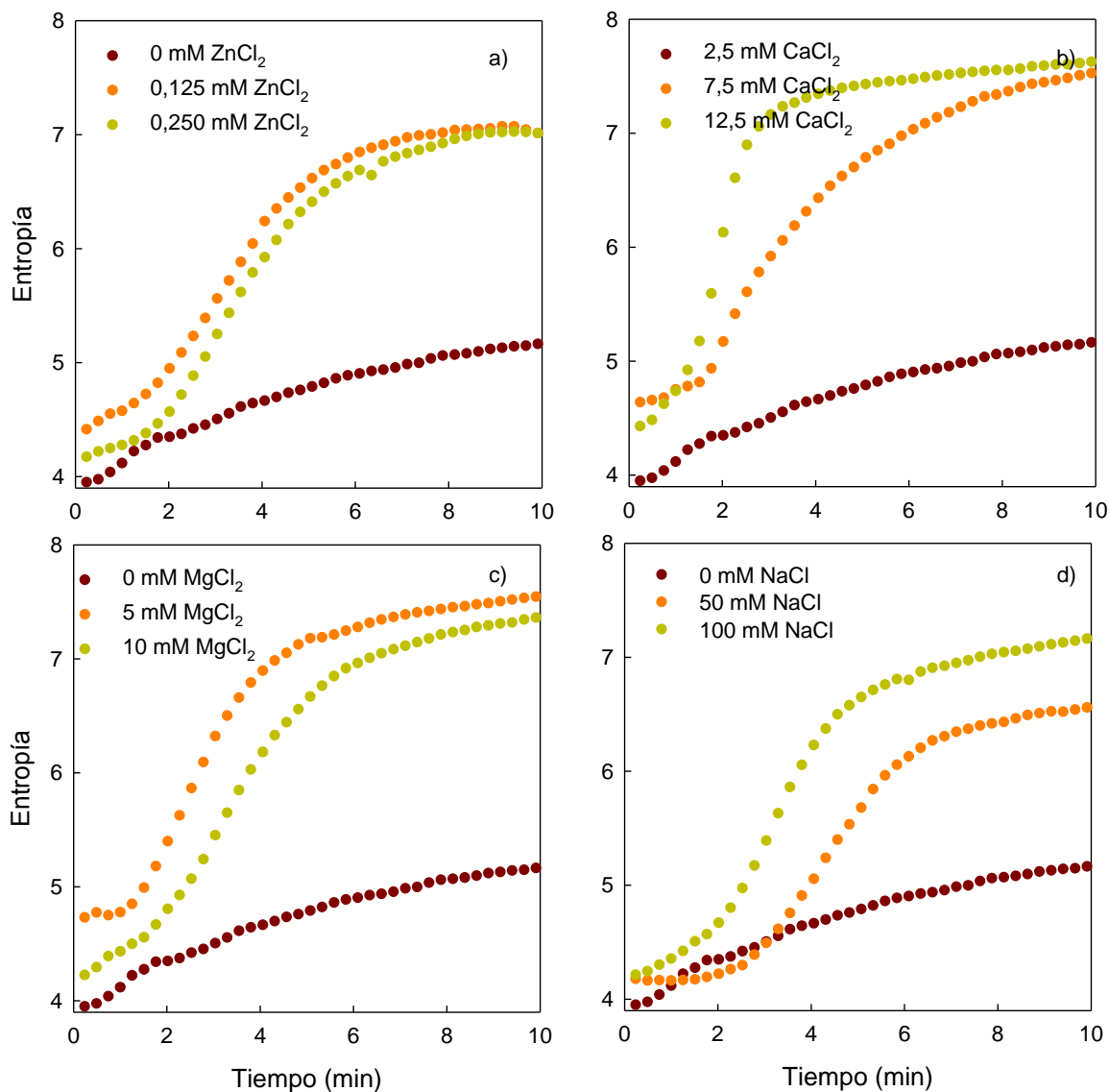


Figura 3.4.12: Variación de la entropía digital en función del tiempo durante la gelificación inducida por EEP7. Efecto de distintas concentraciones de a) ZnCl_2 , b) CaCl_2 , c) MgCl_2 y d) NaCl . Condiciones del medio: $[\text{PL}] = 35 \text{ g/L}$; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

En la Tabla 3.4.6 se muestran los valores de t_{s-g} y v_g calculados a partir de las Figuras 3.4.10, 3.4.11 y 3.4.12. Los t_{s-g} calculados a partir de la variación de DP, E y GA se encuentran correlacionados entre sí (Coeficiente de correlación $> 0,800$; $p < 0,05$). Esto indica que la presencia de las diferentes sales afecta al t_{s-g} de la misma manera, independientemente del parámetro microestructural que se utilice para calcularlo. Los t_{s-g} calculados a partir de la variación de E con el tiempo resultaron significativamente menores ($p < 0,01$) que los t_{s-g} obtenidos a partir de la variación de DP o de GA. Esto

estaría indicando que los cambios en la entropía comienzan con anterioridad a los cambios en DP y GA, lo que podría explicarse por la formación o reestructuración de agregados proteicos solubles (incremento de E sin variación de DP y GA) que luego comienzan a interactuar durante la transición sol-gel (incremento de los tres parámetros). Por otro lado, los t_{s-g} no se correlacionaron con los t_{gel} obtenidos por reología. Además de que las condiciones en las que se llevó cabo la gelificación en ambas técnicas fue diferente, en reología se determinó el tiempo de gelificación mientras que, mediante microestructura, se determinó el tiempo en el cual comienza la transición sol-gel.

Tabla 3.4.6: Valores de t_{s-g} y v_g calculados a partir de parámetros obtenidos de imágenes de microscopía confocal en las distintas condiciones ensayadas. Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Sal	[Sal] (mM)	DP (μm)		GA		E	
		t_{s-g} (min)	v_g ($\mu\text{m}/\text{min}$)	t_{s-g} (min)	v_g (min^{-1})	t_{s-g} (min)	v_g (min^{-1})
ZnCl ₂	0,125	1,8 ± 0,7	0,150 ± 0,007	3,0 ± 0,3	0,315 ± 0,007	1,7 ± 0,1	0,59 ± 0,02
	0,250	2,8 ± 0,4	0,300 ± 0,007	3,1 ± 0,4	0,324 ± 0,009	1,8 ± 0,2	1,52 ± 0,05
CaCl ₂	7,5	2,1 ± 0,3	0,259 ± 0,006	2,4 ± 0,5	0,177 ± 0,006	1,2 ± 0,2	0,82 ± 0,01
	12,5	1,5 ± 0,3	0,46 ± 0,05	1,7 ± 0,3	0,97 ± 0,06	1,2 ± 0,2	0,646 ± 0,009
MgCl ₂	5	2,1 ± 0,5	0,37 ± 0,01	2,7 ± 0,5	0,41 ± 0,02	1,3 ± 0,2	0,618 ± 0,004
	10	3,1 ± 0,6	0,350 ± 0,006	3,0 ± 0,4	0,320 ± 0,009	1,8 ± 0,3	0,649 ± 0,006
NaCl	50	3,8 ± 0,4	0,50 ± 0,02	4,0 ± 0,3	0,315 ± 0,005	2,6 ± 0,1	0,569 ± 0,005
	100	2,6 ± 0,4	0,44 ± 0,02	2,4 ± 0,3	0,3231 ± 0,007	2,0 ± 0,2	0,765 ± 0,009

Durante la etapa de gelificación, la variación del GA se correlacionó con la variación de E (Coeficiente de correlación= 0,977; $p < 0,0001$). Sin embargo, la v_g obtenida a partir de la variación del DP no se correlacionó con las v_g obtenidas a partir de la variación de GA y de E. Esto estaría indicando que el DP fue afectado diferencialmente por las sales ensayadas, comparado a los otros dos parámetros microestructurales. Por otro lado, la v_g calculada a partir de la variación de la entropía resultó mayor que las v_g obtenidas a partir de DP y GA. Esto podría deberse a que para el cálculo de DP y GA se utilizan imágenes binarias, mientras que, para el cálculo de E se utilizan imágenes en

escala de grises que contienen más información y por lo tanto, su variación también puede ser mayor.

En la última etapa el GA alcanza el máximo valor mientras que el DP y la E siguen aumentando, lo que sugeriría que, una vez alcanzado el estado de gel, aún ocurren reordenamientos en la estructura.

4.9. Caracterización de geles lácteos inducidos por el extracto enzimático bacteriano

4.9.1. Análisis de color

En la Figura 3.4.13 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de color. El índice de blancura (IB) de los geles dependió del tipo de sal utilizada ($p < 0,001$) y no así de su concentración ($p = 0,594$). Los geles adicionados con CaCl_2 o MgCl_2 presentaron mayor IB que los geles conteniendo ZnCl_2 o NaCl .

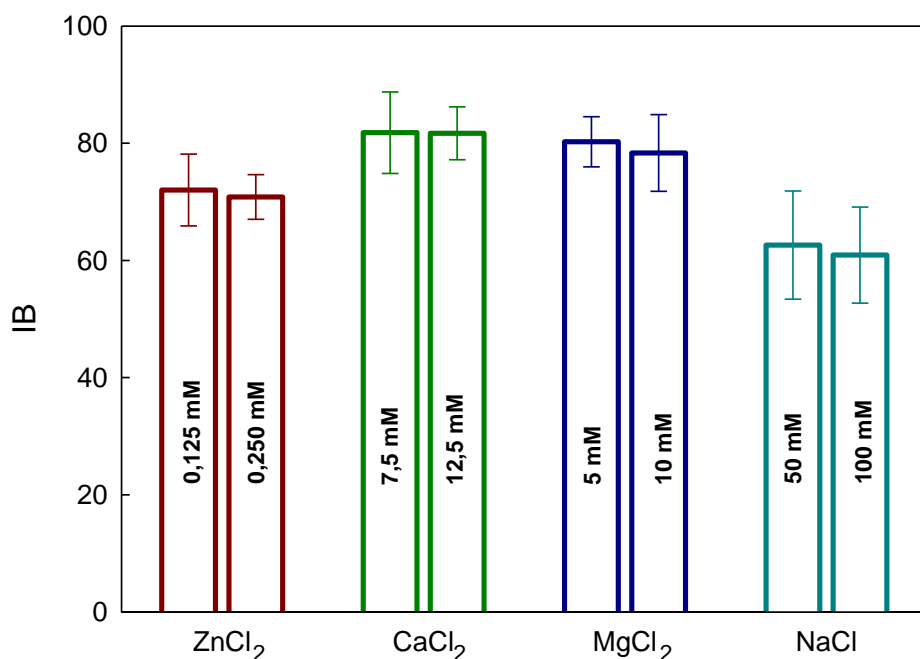


Figura 3.4.13: Efecto de distintas concentraciones de sales sobre el índice de blancura de geles obtenidos por coagulación de leche usando EEP7. Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

El color blanco característico de la leche se debe fundamentalmente a la dispersión de luz causada por las MC (Phadungath, 2005). Cuando se adiciona una sal mineral a la leche, hay una distribución diferencial de los iones que la conforman entre las fases micelar y acuosa. A pH neutro se produce un

aumento de la concentración de iones en la fase acuosa (de la Fuente y col., 2003; Mekmene y col., 2009), modificándose las cargas que rodean a las MC y también su estructura. Los cambios estructurales en las MC debidos a la interacción electrostática entre las CN y los cationes estarían afectando la opacidad de la leche y, por ende, su IB. De hecho, se han publicado resultados que demuestran el efecto de la presencia de sales minerales en el color de yogur (Achanta y col., 2007).

4.9.2. Análisis de textura mecánica

En la Figura 3.4.14 se muestran los valores de fuerza de fractura (FF) y firmeza (FI) obtenidos para los geles lácteos en presencia de distintas concentraciones de sales.

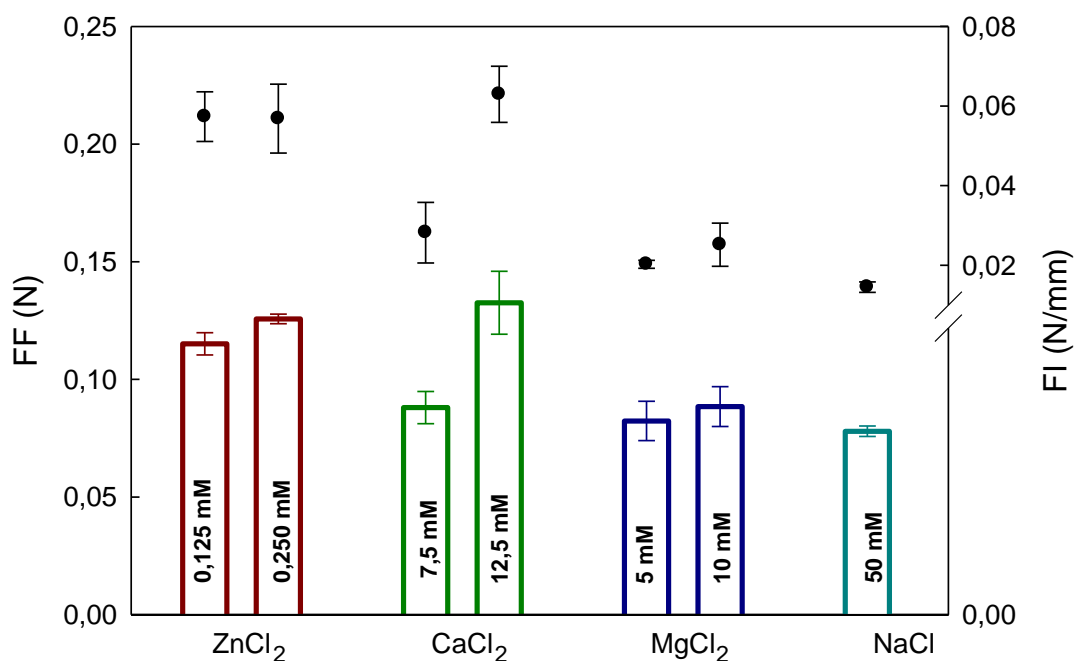


Figura 3.4.14: Efecto de distintas concentraciones de sales sobre la textura mecánica de geles obtenidos por coagulación de leche usando EEP7. Los gráficos de barras corresponden a valores de fuerza de fractura (FF) y los gráficos de puntos a valores de firmeza (FI). Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Los geles obtenidos con EEP7 resultaron más débiles que los obtenidos con quimosina (Galante, 2016). En concordancia con los resultados obtenidos por reología, se concluye que el elevado grado de proteólisis alcanzado en los geles inducidos por EEP7 es el responsable de la textura laxa obtenida. Esto no sólo se debería a la proteólisis inespecífica desempeñada por EPP7, sino

también a las condiciones de pH y temperatura en las que se llevó a cabo la coagulación (Jaros y col., 2008; Jacob y col., 2011).

Los geles obtenidos en presencia de $ZnCl_2$ o $CaCl_2$ 12,5 mM resultaron los más fuertes y firmes ($p < 0,001$). A partir de los resultados de espectroscopía de fluorescencia concluimos que los cationes Zn^{2+} y Ca^{2+} , con mayor afinidad por las CN, causaron cambios estructurales más significativos que Mg^{2+} y Na^+ en las MC. Esto produjo la formación de MC más grandes que, al coagular, formarían geles con mayor FF y FI. En presencia de NaCl 100 mM, los geles obtenidos fueron tan laxos que no fue posible determinar valores de FF y FI a partir de las curvas de fuerza en función de la distancia penetrada. La interacción electrostática entre los iones Ca^{2+} y los grupos Ser-P de las CN es importante para la formación y estabilidad de la estructura de las MC (Horne, 2006). La adición de NaCl a la leche produce un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre y una disminución en la concentración de Ca^{2+} unido a CN (Mekmene y col., 2009). La liberación de Ca^{2+} de la fase micelar causaría la desestabilización de las MC, dificultando la formación de un gel por coagulación enzimática.

Tabla 3.4.7: Valores de desplazamiento obtenidos a partir de curvas de fuerza vs. distancia de los ensayos de penetración. Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Catión	Concentración (mM)	Desplazamiento (mm)
ZnCl ₂	0,125	2,2 ± 0,2
	0,25	2,3 ± 0,2
CaCl ₂	7,5	2,7 ± 0,9
	12,5	2,2 ± 0,3
MgCl ₂	5	3,8 ± 0,4
	10	3,6 ± 0,8
NaCl	50	5,2 ± 0,6
	100	-

Se registró el desplazamiento como la distancia penetrada correspondiente a la FF. Los valores de desplazamiento para las distintas condiciones ensayadas se muestran en la Tabla 3.4.7. En presencia de $ZnCl_2$ o $CaCl_2$ se obtuvieron desplazamientos de fractura significativamente menores ($p < 0,01$), indicando que en estas condiciones no sólo se forman geles más fuertes y firmes, sino también, más rígidos.

4.9.3. Análisis microestructural

4.9.3.1. Diámetro de poro

En la Figura 3.4.15 se muestran las distribuciones de los DP de los geles inducidos por EEP7 en las distintas condiciones ensayadas. La distribución de los DP de los geles en todas las condiciones ensayadas es asimétrica, sesgada hacia la derecha. En presencia de $CaCl_2$ o $MgCl_2$, los geles obtenidos resultaron más compactos, con menores DP.

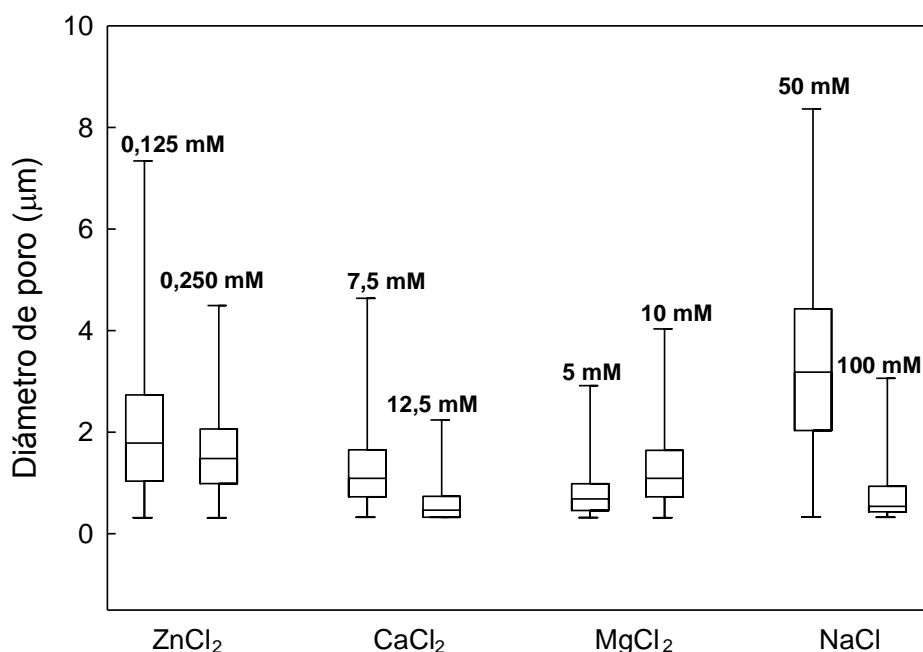


Figura 3.4.15: Variación del DP calculado a partir de imágenes tridimensionales de los geles lácteos inducidos por EEP7. Efecto de distintas concentraciones de las sales en estudio. Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Los cationes divalentes tienen mayor capacidad de apantallar las cargas negativas de las CN a pH 7,4 que los cationes monovalentes. El apantallamiento producido por los cationes divalentes en concentraciones

superiores a 2,5 mM disminuye la repulsión entre proteínas y facilita su interacción, dando lugar a la formación de geles más compactos.

Los geles fortificados con ZnCl_2 presentaron mayores DP debido a las bajas concentraciones de sal con las que se trabajó. Los geles formados en presencia de NaCl 50 mM presentaron los mayores DP. Esto podría deberse a la liberación del Ca^{2+} constituyente de las MC que causa la formación de geles menos fuertes y firmes que, además, presentan mayor DP. En presencia de NaCl 100 mM las MC se encuentran desestabilizadas y no ocurre la formación de un gel, por esto los DP determinados resultaron muy pequeños, ya que corresponden a la leche fluida.

4.1.1.1. Grado de anisotropía

Uno de los objetivos de la industria de los alimentos procesados es estudiar la microestructura de los ingredientes durante su procesamiento. Conocer, por ejemplo, la organización espacial de las unidades (proteínas) que forman un alimento es fundamental para crear características deseadas en el producto final (Manski y col., 2007). El grado de anisotropía GA de un material es una medida de la orientación espacial de sus unidades. Altos valores de GA (el máximo es 1) indican que las unidades presentan orientación preferencial mientras que pequeños valores de GA sugieren microestructuras sin orientación preferencial (isotrópicas) (Doube y col., 2010). Las estructuras anisotrópicas son comunes en alimentos ricos en proteínas y debido a la gran aceptación de este tipo de alimentos en la actualidad, la anisotropía es una característica microestructural que se considera atractiva (Manski y col., 2007).

En la mayoría de las condiciones ensayadas no se obtuvieron diferencias significativas del GA, siendo su valor promedio $\text{GA} = 0,76 \pm 0,03$, correspondiente a una microestructura anisotrópica normalmente encontrada en geles (Wolf y col., 2000). Sin embargo, en presencia de CaCl_2 12,5 mM, la anisotropía resultó significativamente menor ($p < 0,05$), $\text{GA} = 0,3 \pm 0,1$. A modo de ejemplo, en la Figura 3.4.16 se muestran los *stacks* y las imágenes tridimensionales de los geles en presencia de dos concentraciones de CaCl_2 ensayadas. Como se observa en la Figura 3.4.16 b), la presencia de CaCl_2 12,5 mM generó un gel muy compacto, con una superficie más uniforme, perdiendo la estructura fibrosa responsable de la anisotropía.

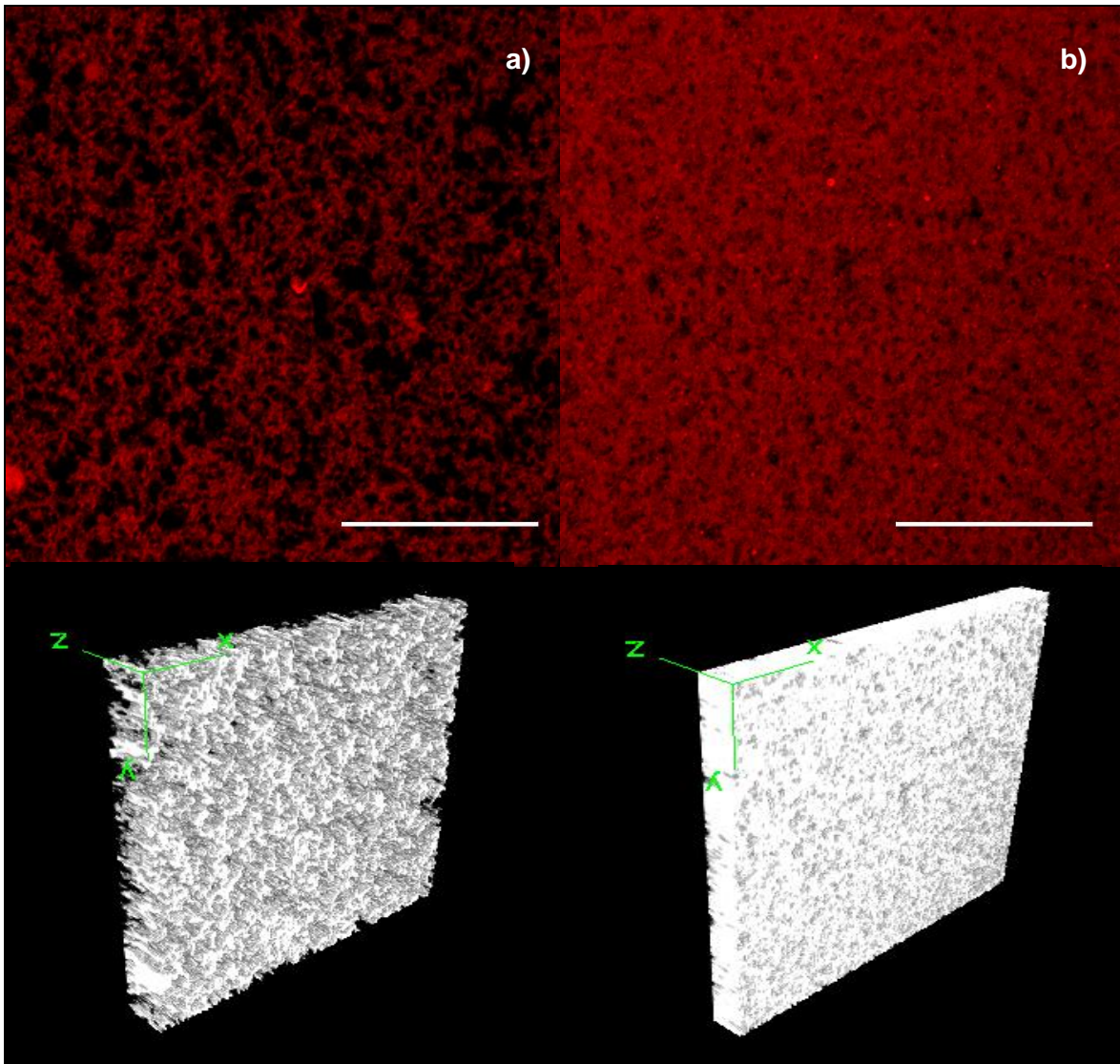


Figura 3.4.16: *Stacks* e imágenes tridimensionales de los geles inducidos por EEP7 en presencia de CaCl_2 a) 7,5 mM y b) 12,5 mM. Condiciones en las que fueron obtenidos los geles: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C. Sonda fluorescente: Rodamina B Roja 0,002 mg/mL. Objetivo utilizado: 60X (con aceite de inmersión). Barra de escala: 30 μm .

4.1.1.2. Textura digital

En la Tabla 3.4.8 se muestran los valores de entropía (E) digital obtenidos a partir de los *stacks* de los geles en las distintas condiciones ensayadas. La E es una medida de la variabilidad en la distribución de niveles de grises en una imagen, por lo tanto, su variación podría relacionarse con cambios estructurales en el gel.

Tabla 3.4.8: Valores de E obtenidos a partir del procesamiento digital de *stacks* de imágenes de geles en presencia de las distintas sales en estudio. Condiciones del medio: [PL] = 35 g/L; Tris-HCl 10 mM pH 7,4; 44 °C.

Catión	Concentración (mM)	Entropía digital
ZnCl ₂	0,125	5,3 ± 0,2
	0,25	6,3 ± 0,2
CaCl ₂	7,5	6,3 ± 0,3
	12,5	5,8 ± 0,3
MgCl ₂	5	6,6 ± 0,4
	10	6,8 ± 0,3
NaCl	50	3,7 ± 0,6
	100	6,4 ± 0,4

Sólo en presencia de ZnCl₂ 0,125 mM o de NaCl 50 mM se obtuvieron valores de entropía significativamente menores ($p < 0,001$). Se encontró una correlación negativa entre estos resultados y los de DP (Coeficiente de correlación de Pearson= -0,852; $p < 0,01$). Por lo tanto, los cambios en E estarían relacionados con cambios estructurales debidos a la interacción electrostática entre cationes y CN que, además, afectan la porosidad de los geles resultantes.

5. Conclusión



La presencia de las sales en estudio afectó no sólo al tamaño y a la carga de las micelas de caseína, sino también a la estructura de las caseínas individuales. La afinidad específica de los cationes constituyentes de las sales ensayadas por las caseínas demostró cumplir un rol fundamental en este cambio estructural. Los cationes con mayor afinidad por las caseínas afectaron más su estructura, aumentando la turbidez de las suspensiones de leche. Por otro lado, las sales en estudio afectaron diferencialmente la actividad proteolítica del extracto enzimático producido por *Bacillus sp. P7*. Independientemente de esto, la agregación de las micelas de caseína inducida por el extracto resultó más rápida en condiciones en que las micelas eran más grandes. Se obtuvieron geles lácteos a partir de la coagulación de leche inducida por el extracto enzimático bacteriano. La presencia de las sales en estudio modificó ciertas propiedades físicas de los geles lácteos obtenidos, como su color, microestructura y elasticidad, entre otras. La interacción electrostática entre los cationes divalentes ensayados y las caseínas tendría un rol fundamental en el desarrollo de estas características.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberkane, A.; Cuenca-Estrella, M.; Gomez-Lopez, A.; Petrikkou, E.; Mellado, E.; Monzon, A.; Rodriguez-Tudela, J. L.; y Network, E. (2002) Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 719–722.
- Acacio, C.; Rodrigues, G.; Araujo, R.; Rodrigues, A. G.; y Pina-Vaz, C. (2004) A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J. Med. Microbiol.* 53: 783–786.
- Achanta, K.; Aryana, K. J.; y Boeneke, C. A. (2007) Fat free plain set yogurts fortified with various minerals. *LWT-Food Sci. Technol.* 40: 424–429.
- Ageitos, J. M.; Vallejo, J. A.; Sestelo, A. B. F.; Poza, M.; y Villa, T. G. (2007) Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *J. Appl. Microbiol.* 103: 2205–2213.
- Agudelo Gómez, D. A. y Bedoya Mejía, O. (2005) Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Rev. Lasallista Investig.* 2: 38–42.
- Alcântara, L. A. P.; Fontan, R. da C. I.; Bonomo, R. C. F.; Souza, Jr., E. C. de; Sampaio, V. S.; y Pereira, R. G. (2012) Density and dynamic viscosity of bovine milk affect by temperature and composition. *Int. J. Food Eng.* 8: 556–568.
- Alves, L. S.; Merheb-Dini, C.; Gomes, E.; Da Silva, R.; y Gigante, M. L. (2013) Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. *J. Dairy Sci.* 96: 7490–7499.
- Andrews, A. T. (1983) Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50: 45–55.
- Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79–89.
- Aquilanti, L.; Kahraman, O.; Zannini, E.; Osimani, A.; Silvestri, G.; Ciarrocchi, F.; Garofalo, C.; Tekin, E.; y Clementi, F. (2012) Response of lactic acid bacteria to milk fortification with dietary zinc salts. *Int. Dairy J.* 25: 52–59.
- Areces, L. B.; Bonino, M. B. D. J.; Parry, M. A. A.; Fraile, E. R.; Fernández, H. M.; y Cascone, O. (1992) Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37: 283–294.

- Augustin, M. A. y Williams, R. P. W. (2006) Nutritional mineral fortification of milk. Patente en Estados Unidos.
- Baomy, J. J. y Brule, G. (1988) Effect of pH and ionic strength on the binding of bivalent cations to β -casein. *Lait* 68: 409–417.
- Bayram, T.; Pekmez, M.; Arda, N.; y Yalçın, A. S. (2008) Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta* 75: 705–709.
- Berridge, N. J. (1952) An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *J. Dairy Res.* 19: 328–329.
- Bienvenue, A.; Jiménez-Flores, R.; y Singh, H. (2003) Rheological properties of concentrated skim milk: importance of soluble minerals in the changes in viscosity during storage. *J. Dairy Sci.* 86: 3813–3821.
- Blakesley, R. W. y Boezi, J. A. (1977) A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 82: 580–582.
- Bordin, G.; Cordeiro Raposo, F.; De la Calle, B.; y Rodriguez, A. R. (2001) Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 928: 63–76.
- Bourne, M. (2002) Food texture and viscosity: concept and measurement. 2° Ed., Academic Press, New York.
- Castilho, L. R.; Medronho, R. A.; y Alves, T. L. M. (2000) Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 71: 45–50.
- Chakraborty, A. y Basak, S. (2008) Interaction with Al and Zn induces structure formation and aggregation in natively unfolded caseins. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 93: 36–43.
- Chang, P. K.; Horn, B. W.; Abe, K.; y Gomi, K. (2014) *Aspergillus*. En: Encyclopedia of Food Microbiology. 2° Ed., Academic Press, New York, pp. 77-81.
- Código Alimentario Argentino (2006) Capítulo VIII – Alimentos Lácteos. *Código Aliment. Argentino* 323–416.
- Corrêa, A. P. F.; Daroit, D. J.; y Brandelli, A. (2010) Characterization of a keratinase produced by *Bacillus sp.* P7 isolated from an Amazonian

- environment. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 64: 1–6.
- Costa, N. E.; Hannon, J. A.; Guinee, T. P.; Auty, M. A. E.; McSweeney, P. L. H.; y Beresford, T. P. (2010) Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 93: 3469–3486.
- Cruz, A. G.; Faria, J. A. F.; Pollonio, M. A. R.; Bolini, H. M. A.; Celeghini, R. M. S.; Granato, D.; y Shah, N. P. (2011) Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends Food Sci. Technol.* 22: 276–291.
- Cupp-Enyard, C. (2008) Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Divine, R. D.; Sommer, D.; Lopez-Hernandez, A.; y Rankin, S. A. (2012) Short communication: Evidence for methylglyoxal-mediated browning of Parmesan cheese during low temperature storage. *J. Dairy Sci.* 95: 2347–2354.
- Doube, M.; Kłosowski, M. M.; Arganda-Carreras, I.; Cordelières, F. P.; Dougherty, R. P.; Jackson, J. S.; Schmid, B.; Hutchinson, J. R.; y Shefelbine, S. J. (2010) BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* 47: 1076–1079.
- Doyle, W. (1962) Operations useful for similarity-invariant pattern recognition. *J. ACM* 9: 259–267.
- El-Bendary, M. A.; Moharam, M. E.; y Ali, T. H. (2007) Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus*. *J. Appl. Sci. Res.* 3: 695–699.
- Everard, C. D.; O'Callaghan, D. J.; Mateo, M. J.; O'Donnell, C. P.; Castillo, M.; y Payne, F. A. (2008) Effects of cutting intensity and stirring speed on syneresis and curd losses during cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* 91: 2575–82.
- Farrell, H. M.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G. T.; Brown, E. M.; Butler, J. E.; Creamer, L. K.; Hicks, C. L.; Hollar, C. M.; Ng-Kwai-Hang, K. F.; y Swaisgood, H. E. (2004) Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87: 1641–1674.
- Fazouane-Naimi, F.; Mechakra, A.; Abdellaoui, R.; Nouani, A.; Daga, S. M.; Alzouma, A. M.; Gais, S.; y Penninckx, M. J. (2010) Characterization and

- cheese-making properties of rennet-like enzyme produced by a local Algerian isolate of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnol.* 24: 258–269.
- Ferreira, T. y Rasband, W. (2012) ImageJ user guide: IJ 1.46 r revised edition.
- Fields, R. (1971) The measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochem. J.* 124: 581–590.
- Fiszman, S. M. y Salvador, A. (1999) Effect of gelatine on the texture of yoghurt and of acid-induced milk gels. *Zeitschrift fuer Leb. -Untersuchung und -forsch.* 208: 100–105.
- Fonseca, R. A.; Lazzaroni, S.; Risso, P.; Brandelli, A.; y Rozycki, S. (2013) Desarrollo de un postre lácteo utilizando una proteasa microbiana. En, *XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Fox, P. (1963) Potentiometric determination of salt in cheese. *J. Dairy Sci.* 46: 744–745.
- Fox, P.; Guinee, T.; Cogan, T.; y McSweeney, P. L. H. (2000) *Fundamentals of cheese science*. 1° Ed., Springer US, New York.
- Galante, M. (2016) *Innovación en la elaboración de productos lácteos*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- Galante, M.; Pavón, Y.; Lazzaroni, S.; Soazo, M.; Costa, S.; Boeris, V.; Risso, P.; y Rozycki, S. (2017) Effect of cholesterol-reduced and zinc fortification treatments on physicochemical, functional, textural, microstructural and sensory properties of soft cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 70: 533–541.
- Garcia, J. S.; De Magalhães, C. S.; y Arruda, M. A. Z. (2006) Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta* 69: 1–15.
- Gatti, C. A.; Risso, P. H.; y Zerpa, S. M. (1998) Study of the inhibitory effect of hydrophobic fluorescent markers on the enzymic coagulation of bovine casein micelles: action of TNS. *Food Hydrocoll.* 12: 393–400.
- Gaucheron, F. (2005) The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 473–483.
- Giongo, J. L.; Lucas, F. S.; Casarin, F.; Heeb, P.; y Brandelli, A. (2007) Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 375–382.
- Gunasekaran, S. y Ak, M. M. (2000) Dynamic oscillatory shear testing of foods—selected applications. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 115–127.
- Haralick, R. M.; Shanmugam, K.; y Dinstein, I. H. (1973) Textural features for

- image classification. *Syst. Man Cybern. IEEE Trans.* 610–621.
- Hashem, A. M. (2000) Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour. Technol.* 75: 219–222.
- Haskard, C. A. y Li-Chan, E. C. Y. (1998) Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2671–2677.
- Haug, A.; Høstmark, A. T.; y Harstad, O. M. (2007) Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Dis.* 6: 25.
- Hertz-Fowler, C. y Pain, A. (2007) Specialist fungi, versatile genomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 332–333.
- Hildebrand, T. y Rügsegger, P. (1997) A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J. Microsc.* 185: 67–75.
- van den Hombergh, J. P. T. W.; van de Vondervoort, P. J. I.; Fraissinet-Tachet, L.; y Visser, J. (1997) *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol.* 15: 256–263.
- Horne, D. S. (1998) Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* 8: 171–177.
- Horne, D. S. (2006) Casein micelle structure: models and muddles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11: 148–153.
- Horne, D. S. (2002) Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7: 456–461.
- Horne, D. S. (1987) Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 83: 259.
- Hummel, B. C. W.; Schor, J. M.; Buck, F. F.; Boggiano, E.; y De Renzo, E. C. (1965) Quantitative enzymic assay of human plasminogen and plasmin with azocasein as substrate. *Anal. Biochem.* 11: 532–547.
- Ibáñez, R. A.; Waldron, D. S.; y McSweeney, P. L. H. (2015) Effect of pectin on the composition, microbiology, texture, and functionality of reduced-fat Cheddar cheese. *Dairy Sci. Technol.* 1–20.
- Jacob, M.; Jaros, D.; y Rohm, H. (2011) Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Technol.* 64: 14–33.
- Jaros, D.; Seidler, K.; y Rohm, H. (2008) Enzymatic coagulation of milk: animal

- rennets and microbial coagulants differ in their gelation behaviour as affected by pH and temperature. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43: 1721–1727.
- Johnson, M. E.; Chen, C. M.; y Jaeggi, J. J. (2001) Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced-fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 84: 1027–1033.
- Kahraman, O. y Ustunol, Z. (2012) Effect of zinc fortification on Cheddar cheese quality. *J. Dairy Sci.* 95: 2840–2847.
- Kamini, N. R.; Mala, J. G. S.; y Puvanakrishnan, R. (1998) Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochem.* 33: 505–511.
- Katsiari, M. C.; Voutsinas, L. P.; Alichanidis, E.; y Roussis, I. G. (1997) Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy J.* 7: 465–472.
- Kjeldahl, J. (1883) A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z. Anal. Chem* 22: 366–382.
- Kuaye, A. Y. (1994) An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chem.* 49: 207–211.
- Kumar, A.; Grover, S.; Sharma, J.; y Batish, V. K. (2010) Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 243–258.
- Kwak, H. S.; Jung, C. S.; Shim, S. Y.; y Ahn, J. (2002) Removal of Cholesterol from Cheddar Cheese by β -Cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7293–7298.
- de la Fuente, M. A.; Montes, F.; Guerrero, G.; y Juárez, M. (2003) Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yoghurts. *Food Chem.* 80: 573–578.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lakowicz, J. R. (2007) Principles of fluorescence spectroscopy. 3^o Ed., Springer US, New York.
- Lane, C. N.; Fox, P. F.; Johnston, D. E.; y McSweeney, P. L. H. (1997) Contribution of coagulant to proteolysis and textural changes in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 7: 453–464.
- Law, B. A. y Tamime, A. Y. (2011) Technology of cheesemaking. 2^o Ed., John

- Wiley & Sons, New York.
- Lawrence, R. C.; Gilles, J.; y Creamer, L. K. (1993) Cheddar cheese and related dry-salted cheese varieties. En, *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 2° Ed., Springer US, New York, pp 1-38.
- Lemes, A. C.; Pavón, Y.; Lazzaroni, S.; Rozycki, S.; Brandelli, A.; y Kalil, S. J. (2016) A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus sp.* P45 applied in cream cheese development. *LWT - Food Sci. Technol.* 66: 217–224.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Lucey, J. A. (2002) Formation and physical properties of milk protein gels. *J. Dairy Sci.* 85: 281–294.
- Lynch, C. M.; McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.; Cogan, T. M.; y Drinan, F. D. (1997) Contribution of starter *lactococci* and non-starter *lactobacilli* to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* 77: 441–459.
- Mahadik, N. D.; Puntambekar, U. S.; Bastawde, K. B.; Khire, J. M.; y Gokhale, D. V (2002) Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem.* 38: 715–721.
- Mancilla Canales, M.; Apestequía, A.; Renata, R.; Brandelli, A.; Folmer Corrêa, A. P.; Risso, P. H.; y Riquelme, B. D. (2015) Modelización fisicomatemática de la interacción entre micelas de caseína y enzimas bacterianas. *Asoc. Física Argentina* 26: 118–120.
- Mancuso, W. y Teran, J. C. (2008) El sector lácteo argentino. En, *XXI Curso Internacional de Lechería para profesionales de América Latina*.
- Mandujano-González, V.; Villa-Tanaca, L.; Anducho-Reyes, M. A.; y Mercado-Flores, Y. (2016) Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Rev. Iberoam. Micol.* 33: 76–82.
- Manski, J. M.; van der Goot, A. J.; y Boom, R. M. (2007) Advances in structure formation of anisotropic protein-rich foods through novel processing concepts. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 546–557.
- McSweeney, P. L. H. (2004) Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57: 127–144.
- McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1997) Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77: 41–76.

- Mei, J.; Feng, F.; y Li, Y. (2016) Effective of different homogeneous methods on physicochemical, textural and sensory characteristics of soybean (*Glycine max L.*) yogurt. *CyTA - J. Food* 15: 1–6.
- Mekmene, O.; Le Graët, Y.; y Gaucheron, F. (2009) A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. *Food Chem.* 116: 233–239.
- Melilli, C.; Lynch, J. M.; Carpino, S.; Barbano, D. M.; Licitra, G.; y Cappa, A. (2002) An empirical method for prediction of cheese yield. *J. Dairy Sci.* 85: 2699–2704.
- Mellema, M.; Heesakkers, J. W. M.; Van Opheusden, J. H. J.; y Van Vliet, T. (2000) Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry. *Langmuir* 16: 6847–6854.
- Merheb-Dini, C.; Garcia, G. A. C.; Penna, A. L. B.; Gomes, E.; y Da Silva, R. (2012) Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. *Food Chem.* 130: 859–865.
- Morison, K. R.; Phelan, J. P.; y Bloore, C. G. (2013) Viscosity and non-newtonian behaviour of concentrated milk and cream. *Int. J. Food Prop.* 16: 882–894.
- Moynihan, A. C.; Govindasamy-Lucey, S.; Jaeggi, J. J.; Johnson, M. E.; Lucey, J. A.; y McSweeney, P. L. H. (2014) Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 97: 85–96.
- Odgaard, A. (1997) Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 20: 315–328.
- Palou, E.; López-Malo, A.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Welte-Chanes, J.; y Swanson, B. G. (1999) Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. *J. Food Sci.* 64: 42–45.
- Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 81–84.
- Pang, Z.; Deeth, H.; Sharma, R.; y Bansal, N. (2015) Effect of addition of gelatin on the rheological and microstructural properties of acid milk protein gels. *Food Hydrocoll.* 43: 340–351.
- Paranthaman, R.; Alagusundaram, K.; y Indhumathi, J. (2009) Production of

- protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.* 5: 308–312.
- Pesic, M. B.; Barac, M. B.; Stanojevic, S. P.; Ristic, N. M.; Macej, O. D.; y Vrvic, M. M. (2012) Heat induced casein–whey protein interactions at natural pH of milk: A comparison between caprine and bovine milk. *Small Rumin. Res.* 108: 77–86.
- Phadungath, C. (2005) Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27: 201–212.
- Philippe, M.; Le Graët, Y.; y Gaucheron, F. (2005) The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. *Food Chem.* 90: 673–683.
- Pihlanto, A. (2006) Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16: 1306–1314.
- Pokorny, D.; Cimerman, A.; y Steiner, W. (1997) *Aspergillus niger* lipases: induction, isolation and characterization of two lipases from a MZKI A116 strain. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2: 215–222.
- Pomastowski, P.; Sprynskyy, M.; y Buszewski, B. (2014) The study of zinc ions binding to casein. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 120: 21–27.
- Preetha, S. y Boopathy, R. (1994) Influence of culture conditions on the production of milk-clotting enzyme from *Rhizomucor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 527–530.
- Preetha, S. y Boopathy, R. (1997) Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 573–578.
- Rao, M. A. (2010) Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications. 2° Ed., Springer US, New York.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; y Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231–1237.
- Reps, A.; Jêdrychowski, L.; Wisniewska, K.; y Jankowska, A. (2006) Application of a coagulating preparation obtained with *Rhizomucor miehei* N in cheese-making. *Pakistan J. Nutr.* 5: 97–101.
- Ridler, T. W. y Calvard, S. (1978) Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* 8: 630–632.

- Risso, P. H.; Relling, V. M.; Armesto, M. S.; Pires, M. S.; y Gatti, C. A. (2007) Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. *Colloid Polym. Sci.* 285: 809–817.
- Rogosa, M.; Mitchell, J. A.; y Wiseman, R. F. (1951) A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal *lactobacilli*. *J. Bacteriol.* 62: 132.
- Sagar, A. J. y Pandit, M. W. (1983) Denaturations studies on bovine pancreatic ribonuclease: effect of trichloroacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 743: 303–309.
- Salcedo-Chávez, B.; Osuna-Castro, J. A.; Guevara-Lara, F.; Domínguez-Domínguez, J.; y Paredes-López, O. (2002) Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6515–6520.
- Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J. C.; y Van Dijck, P. (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 426–435.
- Shah, M. A.; Mir, S. A.; y Paray, M. A. (2014) Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Sci. Technol.* 94: 5–16.
- Silva, H. L. A.; Balthazar, C. F.; Esmerino, E. A.; Vieira, A. H.; Cappato, L. P.; Neto, R. P. C.; Verruck, S.; Cavalcanti, R. N.; Portela, J. B.; Andrade, M. M.; Moraes, J.; Franco, R. M.; Tavares, M. I. B.; Prudencio, E. S.; Freitas, M. Q.; Nascimento, J. S.; Silva, M. C.; Raices, R. S. L.; y Cruz, A. G. (2017) Effect of sodium reduction and flavor enhancer addition on probiotic Prato cheese processing. *Food Res. Int.* 99: 247–255.
- Singh, G. y Muthukumarappan, K. (2008) Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 1145–1152.
- Singh, T. K.; Drake, M. A.; y Cadwallader, K. R. (2003) Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2: 166–189.
- Soazo, M.; Pérez, L. M.; Rubiolo, A. C.; y Verdini, R. A. (2015) Prefreezing application of whey protein-based edible coating to maintain quality attributes of strawberries. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50: 605–611.
- Soetan, K. O.; Olaiya, C. O.; y Oyewole, O. E. (2010) The importance of mineral

- elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African J. Food Sci.* 4: 200–222.
- Soodam, K.; Ong, L.; Powell, I. B.; Kentish, S. E.; y Gras, S. L. (2015) Effect of calcium chloride addition and draining pH on the microstructure and texture of full fat Cheddar cheese during ripening. *Food Chem.* 181: 111–118.
- Sousa, M. J.; Ardö, Y.; y McSweeney, P. L. H. (2001) Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11: 327–345.
- Standard, I. (1955) Determination of the percentage fat in cheese. Irish standard 69. *Inst. Ind. Res. Stand. Dublin, Irel.*
- Standard, I. D. F. (2004) 4, Cheese and Processed Cheese–Determination of the Total Solids Content (Reference Method). *Int. Dairy Fed. Brussels, Belgium.*
- Terzaghi, B. E. y Sandine, W. E. (1975) Improved medium for lactic *streptococci* and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29: 807–813.
- Theron, L. W. y Divol, B. (2014) Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 8853–8868.
- Thorn, D. C.; Ecroyd, H.; Carver, J. A.; y Holt, C. (2015) Casein structures in the context of unfolded proteins. *Int. Dairy J.* 46: 2–11.
- Tippetts, M.; Martini, S.; Brothersen, C.; y McMahon, D. J. (2012) Fortification of cheese with vitamin D3 using dairy protein emulsions as delivery systems. *J. Dairy Sci.* 95: 4768–74.
- Tsioulpas, A.; Lewis, M. J.; y Grandison, A. S. (2007) Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. *J. Dairy Res.* 74: 167–173.
- Vahčić, N.; Hruškar, M.; Marković, K.; Banović, M.; y Colić Barić, I. (2010) Essential minerals in milk and their daily intake through milk consumption. *Mljekarstvo* 60: 77–85.
- Vishwanatha, K. S.; Rao, A. G. A.; y Singh, S. A. (2010) Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1849–1859.
- Wagner, D.; Sidhom, G.; Whiting, S. J.; Rousseau, D.; y Vieth, R. (2008) The bioavailability of vitamin D from fortified cheeses and supplements is equivalent in adults. *J. Nutr.* 138: 1365–1371.
- Walker, R. F.; Jackway, P.; y Longstaff, I. D. (1995) Improving co-occurrence

- matrix feature discrimination. En, *DICTA'95, 3rd Conference on Digital Image Computing: Techniques and Application*.
- Wilkesman, J. y Kurz, L. (2009) Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent Pat. Biotechnol.* 3: 175–184.
- Wolf, B.; Scirocco, R.; Frith, W. J.; y Norton, I. T. (2000) Shear-induced anisotropic microstructure in phase-separated biopolymer mixtures. *Food Hydrocoll.* 14: 217–225.
- Yam, K. L. y Papadakis, S. E. (2004) A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *J. Food Eng.* 61: 137–142.
- Yasar, K. y Guzeler, N. (2011) Effects of coagulant type on the physicochemical and organoleptic properties of Kashar cheese. *Int. J. dairy Technol.* 64: 372–379.
- Yegin, S. y Dekker, P. (2013) Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Sci. Technol.* 93: 565–594.
- Yegin, S.; Fernandez-Lahore, M.; Salgado, A. J. G.; Guvenc, U.; Goksungur, Y.; y Tari, C. (2011) Aspartic proteinases from *Mucor spp.* in cheese manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 949–960.
- Zulueta, A.; Maurizi, A.; Frígola, A.; Esteve, M. J.; Coli, R.; y Burini, G. (2009) Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.* 19: 380–385.