

## Tratamiento Térmico de Leche: Influencia del pH y $\text{CaCl}_2$ en la Elaboración de Queso Cuartirolo

Oscar A. Sbodio<sup>(1)</sup>, Esteban J. Tercero<sup>(1)</sup>, Mirta S. Zannier<sup>(1)</sup>, Germán R. Revelli<sup>(2)</sup>

(1) Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química, Instituto de Tecnología de Alimentos, 1° de Mayo 3250, (3000) Santa Fe-Argentina (e-mail: sbodio@fiq.unl.edu.ar)

(2) Laboratorio Integral de Servicios Analíticos, Cooperativa Tampera y Agropecuaria Nueva Alpina Ltda., Av. Italia 143, (2340) Ceres, Santa Fe-Argentina.

Recibido Nov. 02, 2009; Aceptado Ene. 05, 2010; Versión Final recibida Feb. 25, 2010

### Resumen

Con el objeto de mejorar la propiedad de coagular de leche entera tratada bajo condiciones moderadas de temperatura, 10 minutos a 73 °C, se estudió el efecto del pH (6.2-6.6) y la adición de  $\text{CaCl}_2$  (200 y 600 mg L<sup>-1</sup>). El proceso de la coagulación enzimática, con la acidificación de Glucono- $\delta$ -Lactona, fue medido con el método del alambre caliente. A pH 6.4 y 6.6 los coágulos obtenidos a partir de leche entera tratada, mostraron tiempos de coagulación significativamente inferiores ( $P < 0.05$ ), incremento del máximo voltaje y tiempo en el que se alcanza el máximo voltaje, y una marcada disminución del suero drenado, comparado con aquellos coágulos de leche sin tratamiento. En la elaboración de queso cuartirolo, los niveles de pH 6.4 y  $\text{CaCl}_2$  adicionado de 400 mg L<sup>-1</sup>, resultaron en la mejor condición seleccionada para no perder la aceptación del consumidor e incrementar el rendimiento quesero en 8.9%, corregido en base seca.

*Palabras claves:* leche, desnaturalización, coagulación, enzimas, queso

## Thermally Treated Milk: Influence of pH and $\text{CaCl}_2$ on Cuartirolo Cheese-Making

### Abstract

The effect of pH (6.2-6.6) and  $\text{CaCl}_2$  addition (200 - 600 mg L<sup>-1</sup>) was studied, with the objective of improving the coagulation properties of whole milk treated under mild condition of temperature, 10 min at 73 °C. The hot wire method to monitor rennet coagulation induced through acidification with Glucono- $\delta$ -Lactone was employed. At pH 6.4 and 6.6 the coagulum of heated milk presented lower coagulation time ( $P < 0.05$ ), increased maximum voltage and time where they reach maximum voltage, and a decreased in whey separation, compared to those of coagulum produced by unheated milk. The selected conditions of pH 6.4 and  $\text{CaCl}_2$  added 400 mg L<sup>-1</sup>, used in the process of cuartirolo cheese proved to be the best condition to increase the yield in 8.9% on a dry basis, without losing consumer's acceptance.

*Keywords:* milk, denaturation, coagulation, rennet, cheese

## INTRODUCCIÓN

El queso cuartirolo es un queso tradicional de Argentina que contiene altos niveles de humedad y moderadamente bajo contenido en grasa. Es producido a través de la acidificación con bacterias lácticas de leche entera coagulada por acción del cuajo bovino. Recientemente, la manufactura de diferentes tipos de quesos ha recibido considerable atención debido al potencial mejoramiento del rendimiento con la incorporación de proteínas del suero lácteo (Singh y Waungana, 2001). Sin duda, este proceso aumenta el valor biológico del queso y reduce el costo del producto final. En la forma tradicional de elaboración de queso, la caseína contribuye a la estructura de la cuajada mientras que las proteínas solubles quedan retenidas en el suero. La inclusión de éstas genera cambios en las propiedades funcionales del queso modificando su textura. Sin embargo, en un interesante estudio donde las proteínas fueron incluidas en proceso de elaboración de quesos frescos y semiduros se observó un mejoramiento sustancial del rendimiento y del valor nutricional (Hinrichs, 2001). No obstante, para obtener queso de alta calidad nutricional, sin afectar su textura y la aceptación del consumidor, puede ser necesario adaptar las condiciones de los procesos como así también la flora láctica utilizada. Se ha establecido previamente que el calor induce modificaciones en la dispersión de caseínas, afectando su coagulabilidad por acción enzimática. Después de calentar la leche por encima de 60 °C, tienen lugar importantes cambios que incluyen desnaturalización y agregación de proteínas del suero, interacción de proteínas del suero con k-caseína, reacciones de Maillard entre lactosa y proteínas, cambios en la estructura de las micelas y disminución del pH.

Cuanto más alto es el tratamiento térmico, más acentuada es la disminución de la fuerza del gel que se obtiene y, en ausencia de proteínas solubles, el principal factor de la inapropiada coagulación enzimática, en leche tratada térmicamente, es atribuido a la distribución del calcio entre la fase sérica y la fase micelar (Schreiber, 2001). La leche que ha sido tratada a altas temperaturas muestran prolongados tiempos de coagulación y forman coágulos y finos que retienen más agua que lo normal (Singh y Waungana, 2001). También han sido expuestos que los efectos adversos del tratamiento térmico sobre la coagulación enzimática pueden ser superados, en alguna medida, disminuyendo el pH y ciclos de pH con agregado de CaCl<sub>2</sub> (Lucey et al., 1993). La fuerza iónica, pH, las concentraciones de calcio y proteínas son parámetros que influyen marcadamente la extensión de la desnaturalización de las proteínas del suero (Hiller et al., 1979; Park y Lund, 1984; Dannenberg y Kessler, 1988; Olfield et al., 1998). Por otra parte, pocos trabajos se han llevado a cabo con referencia a quesos frescos a partir de la utilización de leche tratada por temperatura. En Argentina, el queso cuartirolo observa altos índices de consumo, se vende a precios accesibles y además es usado en la preparación de diferentes comidas.

En esta experiencia, estudiamos la influencia del pH y la cantidad necesaria de CaCl<sub>2</sub> que debemos agregar a leche entera, tratada 10 minutos a 73 °C, de manera de lograr un producto que conserve la aceptación del consumidor e incremente el rendimiento en el proceso de elaboración de queso cuartirolo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Ensayo de la coagulación*

La leche cruda utilizada para los ensayos de coagulación fue obtenida del ordeño matutino de un establecimiento comercial (La Turquina S.A., Santa Fe, Argentina), refrigerada entre 5 - 7 °C. Para este ensayo, se recogieron ocho muestras de leche entera, durante la primavera de 2008 (septiembre, octubre y noviembre). Cuatro litros de esta leche fueron volcados en un recipiente de acero inoxidable de 5 L de capacidad y colocados en un baño de agua a 73 °C. Luego de 45 minutos y con suave agitación la leche alcanzó los 73 °C, fue incubada a esa temperatura durante un tiempo adicional de 10 minutos. Cumplido este tiempo, la misma fue enfriada con agua corriente, en aproximadamente 20 minutos y colocada en un baño termostático (Haake type F2, Germany, Berlin) a 38 ± 0,1 °C. Después de alcanzar esta temperatura, se agregaron diferentes cantidades de CaCl<sub>2</sub> (Cicarelli, Santa Fe, Argentina), a saber: 200, 400 y 600 mg L<sup>-1</sup>, y el pH fue ajustado con ácido láctico 85% (Mallinckrodt, Chemical Works, Argentina) a valores de 6,2, 6,4 y 6,6. Es decir calentamos a baja temperatura por un periodo relativamente prolongado. Condición que puede ser reproducida por

la pequeña y mediana industria que utiliza tinajas de 1.000 a 1.500 L de capacidad. El pH fue registrado con un peachímetro (Expandable Ion Analyzer EA 940. Orion Research Incorporated, Cambridge. MA 02139.USA) previamente calibrado con estándares de pH 7,00 y 4,00 (Anedra, San Fernando, Buenos Aires, Argentina).

La cantidad de Glucono- $\delta$ -Lactona (GDL) (Lysactone – Roquette, France) 99% necesaria para alcanzar un pH de 6,25 al momento del corte de la cuajada (aproximadamente entre 20 - 25 minutos después de la adición del coagulante) fue calculada teniendo en cuenta el pH inicial, el CaCl<sub>2</sub> adicionado y la temperatura. Para bajar los pH de 6,6 y 6,4 a 6,25 fueron necesarios agregar 2, 4 y 0,45 g de GDL 99%, respectivamente. Dos litros de leche tratada térmicamente con la adición de CaCl<sub>2</sub> y el ajuste correspondiente de pH, fue mantenida a temperatura constante de 38 °C durante el proceso de coagulación. Un sensor de platino 99% (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, WI, USA) de 0,10 mm de diámetro y 110 mm de longitud fue usado para monitorear el proceso de formación del coágulo como describen previamente Hori (1985) y Sbodio et al. (2002).

El sensor de alambre de platino, el soporte de teflón y el software necesario para procesar la información fueron desarrollados por el grupo de trabajo, de acuerdo al método propuesto por Hori (1985). Después de verificar que el alambre de platino alcanza el nivel estacionario de disipación de calor, se agregaron 0,028 U.R. ml<sup>-1</sup> de coagulante bovino (Calf Rennet, Caglificio Clerici, Italy), calibrado de acuerdo a Berridge (1952), con la correspondiente cantidad de GDL, agitando suavemente por un minuto. Este momento fue registrado como el punto inicial del ensayo. El método del alambre caliente de platino nos provee útil información respecto al proceso de formación del gel, entre ésta se midieron parámetros tales como tiempo de coagulación (TC), máximo voltaje (MV) y el tiempo en el cual se alcanza el máximo voltaje (TVM). El TC fue definido como el tiempo donde la tangente que pasa por la máxima derivada de la curva de voltaje vs tiempo e intercepta la abscisa, de acuerdo a Kopelman y Cogan (1975) y el máximo voltaje fue definido en el momento que el voltaje alcanza el máximo valor.

El voltaje entre los dos terminales del alambre de platino, registrado en intervalos de 5 segundos, fue leído con un multímetro de 6 dígitos (2000 Multimeter, Keithley Instruments, Inc., Cleveland. Ohio. U.S.A. 44139). La corriente fue provista por una fuente de 0 a 50 V, 0 a 500 mA (Hewlett Packard 6177C, Santa Clara, CA, USA) con 0,03 de resolución. El voltaje de salida fue registrado antes de la adición de la enzima coagulante, y a través del experimento variando durante el completo ensayo entre 0 y 500 mA.

Para cada condición seleccionada se realizaron seis ensayos con leche entera tratada térmicamente y seis con la misma muestra leche entera sin tratamiento. Las determinaciones de grasa, proteínas totales, lactosa y sólidos totales se llevaron a cabo por espectroscopía de IR de acuerdo a la Norma ISO 9622: 1999. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales se determinó de acuerdo a FIL-IDF 100 B: 1991 y el recuento de células somáticas de acuerdo a FIL-IDF 148: 1995. Para la elaboración de queso cuartirolo se utilizó el procedimiento utilizado por Zalazar y Meinardi (1982). El rendimiento fue corregido de acuerdo a Maubois y Moquot (1967) y Zalazar et al. (1997).

#### *Medida de la separación del suero*

Un ensayo en simultáneo con otra alícuota de 2 L de leche tratada a 73 °C, en las mismas condiciones de agregado de CaCl<sub>2</sub>, pH, temperatura y GDL que aquellos monitorizados por el sensor de alambre de platino fue realizado con el objeto de obtener y medir el volumen el suero producto de la sinéresis espontánea. Una vez obtenido el valor del máximo voltaje del ensayo, indicado por el software en paralelo, medimos el volumen de suero drenado cada diez minutos y por el lapso de una hora. El volumen total drenado durante una hora es el dato que consideramos en la Tabla 1.

#### *Porcentaje de desnaturalización*

Las proteínas del suero de la leche entera desnaturalizadas por calor fueron precipitadas ajustando el pH a 4,6 con HCl 0,1 N, mantenidas en reposo durante 30 minutos y filtradas con papel de filtro S & S 605. Las proteínas no desnaturalizadas que permanecen en el filtrado fueron fraccionadas por

HPLC a temperatura ambiente utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard HP 1050 (Hewlett & Packard GMBH, Waldbronn Analytic Division D 76337) y columnas 0,46 x 25 cm fase reversa C 18, de 5 μ tamaño de partícula y 300 Å de tamaño de poro. Equipada con guarda columna conteniendo el mismo material, VYDAC 214 TP 54. Para la fase móvil se utilizó solvente A: ácido trifluoracético 0,1 N y solvente B: acetonitrilo 60% y trifluoracético 40% en agua. Se utilizó un detector UV a 205 nm.

Tabla 1: Niveles de pH y CaCl<sub>2</sub> y valores promedios y desvío estándar de las respuestas TC, VM, TMV y Suero drenado por el coágulo producido por leche entera tratada y sin tratar.

Condición	Niveles de variables		Respuestas			
	pH	CaCl <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	TC (min)	VM (μVolts)	TMV (min)	Suero (ml)
1 Tratada Sin Tratar	6,6	400	5,6 (0,19)	2.832 (101)	17,3 (2,05)	50 (2,0)
			7,2 (0,25)	2.256 (84)	16,0 (1,83)	77 (3,2)
2* Tratada Sin Tratar	6,4	600	2,8 (0,09)	3.487 (133)	23,6 (2,75)	45 (1,8)
			3,5 (0,12)	3.350 (130)	11,2 (1,27)	63 (2,7)
3 Tratada Sin Tratar	6,2	200	3,9 (0,13)	3.936 (154)	22,7 (2,64)	67 (2,7)
			3,4 (0,11)	4.031 (158)	21,6 (2,54)	87 (3,6)
4 Tratada Sin Tratar	6,2	600	1,4 (0,05)	3.583 (137)	14,5 (1,71)	17 (0,8)
			0,8 (0,03)	3.138 (121)	17,1 (1,93)	51 (1,5)
5 Tratada Sin Tratar	6,6	200	3,7 (0,12)	2.313 (92)	10,2 (1,20)	16 (0,8)
			6,5 (0,23)	2.068 (81)	13,8 (1,64)	87 (4,4)
6* Tratada Sin Tratar	6,4	400	3,4 (0,12)	3.843 (143)	21,6 (2,60)	40 (2,0)
			6,3 (0,22)	2.797 (112)	13,8 (1,63)	67 (3,4)
7 Tratada Sin Tratar	6,4	200	3,3 (0,11)	2.722 (107)	10,1 (1,15)	16 (0,8)
			6,3 (0,21)	2.356 (93)	8,9 (1,07)	62 (2,9)
8 Tratada Sin Tratar	6,2	400	1,0 (0,04)	2.860 (124)	13,7 (1,70)	30 (1,5)
			2,7 (0,09)	3.054 (129)	14,0 (1,67)	62 (2,9)

El porcentaje de desnaturalización fue calculado a partir de la medida de las áreas de los picos de las proteínas del suero α lactoalbumina (αLA) y β lactoglobulinas variantes A y B (βLg A y B) y comparadas con aquellas utilizadas como control (leche entera termizada a 38 °C), de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2.

$$\% \text{ de desnaturalización} = \frac{\sum (\alpha \text{ LA})_c - \sum (\alpha \text{ LA})}{\sum (\alpha \text{ LA})_c} \cdot 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ de desnaturalización} = \frac{\sum (\beta \text{ Lg A} + \text{B})_c - \sum (\beta \text{ Lg A} + \text{B})}{\sum (\beta \text{ Lg A} + \text{B})_c} \cdot 100 \quad (2)$$

El nitrógeno total y el nitrógeno no-proteico contenidos en la fracción soluble del suero fueron determinados utilizando el Método de Kjeldahl (Kjeldahl Nitrogen Method, AOAC, 1980), utilizando un equipo Tecator System 1004 Distilling Units (Sweden).

El porcentaje de desnaturalización de la leche tratada fue calculado a partir de la fracción de nitrógeno soluble total (NST) al que se le restó el nitrógeno no-proteico (NNP) y comparado con la fracción obtenida a partir de la leche control (leche entera termizada a 38 °C) de acuerdo a la ecuación 3.

$$\% \text{ de desnaturalización} = \frac{\sum (\text{NST} - \text{NNP})_c - \sum (\text{NST} - \text{NNP})}{\sum (\text{NST} - \text{NNP})_c} \cdot 100 \quad (3)$$

La comparación de los valores medios y desvíos estándares de TC, VM, TVM, suero drenado y porcentaje de desnaturalización fue llevada a cabo utilizando t de Student a P < 0,05.

El queso cuartirolo, luego de un periodo de maduración de 20 días fue evaluado por un panel de cinco miembros entrenados en propiedades organolépticas, de manera de establecer la diferencia entre quesos elaborados con leche que sufrieron el tratamiento térmico y aquellos obtenidos a partir de leches sin tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la composición general de leche entera utilizada observó los siguiente resultados: grasa:  $3,25 \pm 0,10\%$ , proteínas totales:  $3,06 \pm 0,08\%$ , lactosa:  $4,88 \pm 0,07\%$ , sólidos totales:  $11,80 \pm 0,35\%$ , recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales:  $3,8 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$  UFC ml<sup>-1</sup> y recuento de células somáticas:  $206.000 \pm 89.000$  CS ml<sup>-1</sup>. Los niveles indicados corresponden a leche de primera calidad de la zona. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado y los resultados se expresan en valor medio y el desvío estándar a partir del análisis de ocho muestras de leche entera.

Los niveles de  $\alpha$  lactoalbumina ( $\alpha$  LA) determinados por HPLC corresponden a 705,2 (61) y 891,4 (77) mg L<sup>-1</sup>, los de  $\beta$  lactoglobulinas A + B ( $\beta$  Lg A + B) a 2.523,5 (230) y 3.128 (278) mg L<sup>-1</sup> para leche tratada y sin tratar, respectivamente. Teniendo en cuenta estos resultados se calcularon los porcentajes de desnaturalización con las ecuaciones 1 y 2. Los mismos alcanzaron 19,3% cuando consideramos  $\alpha$  LA y/o  $\beta$  Lg. Al considerar la sumatoria  $\alpha$  LA más  $\beta$  Lg (A + B), el porcentaje calculado fue de 20,1%. Los valores de nitrógeno soluble total (NST) determinados por Kjeldahl corresponden a 959,5 (56) y 1.215 (59) mg L<sup>-1</sup> para leche tratada y sin tratar, respectivamente. Los números entre paréntesis representan la desviación estándar correspondiente a ocho determinaciones. El nitrógeno no-proteico observó valores constantes, el promedio usado para calcular el % de desnaturalización corresponde a un valor medio de  $38 \pm 1,62$  mg L<sup>-1</sup> de suero. El porcentaje de desnaturalización, calculado de acuerdo a la ecuación 3 observó un valor de 20,9%.

El índice calculado utilizando el NST es ligeramente más elevado que aquel calculado por indicadores obtenidos por HPLC en coincidencia con Parris y Baginski (1991). Trabajos previos, realizados por Law y Leaver (2000) mostraron que el grado de desnaturalización puede ser bastante constante cuando el ensayo es realizado a pH 6,65 (pH nativo de la leche entera). En suma, la distribución de proteínas del suero entre agregados y aquellas unidas a las micelas de caseínas es casi constante para leches que han sufrido un tratamiento entre 70 °C y 90 °C (en esta experiencia 10 minutos a 73 °C) como refieren Vasbinder et al. (2003). La Tabla 1, muestra las respuestas de los cuatro parámetros característicos de la coagulación por cuajo bovino: TC, VM, TMV y el volumen de suero producido por el coágulo durante los primeros 60 minutos después de alcanzar el máximo voltaje, en leche entera con y sin tratamiento 10 minutos a 73 °C. En ensayos previos, el grupo de trabajo observó que las dos variables consideradas pH y CaCl<sub>2</sub> adicionado, influenciaban las respuestas (datos no publicados). Los parámetros medidos fueron obtenidos luego de considerar el voltaje como la respuesta más importante, aún más importante que el TC, en virtud de que puede afectar significativamente el rendimiento quesero, en concordancia con Bynum y Olson (1982) y Garnot et al. (1982).

En esta experiencia, consideramos al volumen de suero drenado durante 60 minutos después de que el coágulo alcanzó el máximo voltaje, como un parámetro crítico al momento de elegir los niveles de pH y CaCl<sub>2</sub> a agregar, con el propósito de restaurar la coagulabilidad de la leche bajo tratamiento térmico. Además de estas consideraciones, los valores de las variables fueron seleccionados de acuerdo a aquellos niveles usados por la industria quesera en la producción de queso cuartirolo (pH: 6,6 y temperatura: 37 - 38 °C) para coagular en un tiempo de 6 - 7 minutos. Un total de ocho ensayos fueron llevados a cabo usando las mismas condiciones para leche tratada y aquellas sin tratamiento, teniendo presente como valor de referencia de pH 6,4 sugerido por Okigbo et al. (1985) donde las condiciones para obtener la máxima firmeza del coágulo son pH 6,4, temperatura 37 °C y concentración de enzima coagulante 0,02 U.R. ml<sup>-1</sup>.

Los resultados están expresados en promedios y los números entre paréntesis representan los desvíos estándares de seis ensayos. (\*) corresponden a las dos condiciones seleccionadas (2 y 6).

En general, el tratamiento térmico de la leche resulta en prolongados TC y reducción de la fuerza de geles coagulados por renina (Banks, 1990; Dalgleish, 1992) y deterioro en la formación de la cuajada (Walstra y Jenness, 1984; Singh y Waungana, 2001). En el presente ensayo, los TC resultantes de coagular a pH 6,2, con el agregado de las tres diferentes cantidades de CaCl<sub>2</sub> observan valores bajos, tanto en leches tratadas como en aquellas sin tratar, en coincidencia con Singh et al. (1988) y Lucey et al. (1999), que mostraron TC más cortos e incremento de la firmeza, con un máximo a pH 6,2, probablemente debido a la reducción de fuerzas de repulsión de cargas e incremento del Ca<sup>++</sup>. A pH 6,4 y 6,6, con el mismo agregado de CaCl<sub>2</sub> observamos niveles más elevados de TC que aquellos observados a pH 6,2. Lo interesante de estas observaciones, es que el TC de las leches tratadas térmicamente son significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) que aquellos producidos, por la leche sin tratar. Esto podría explicarse, sosteniendo que a estos niveles de desnaturalización, la adición de CaCl<sub>2</sub> tiene un efecto mayor que el efecto producido por la desnaturalización. Esto mostraría el impacto directo que el pH tiene sobre el TC y también la influencia indirecta del agregado de CaCl<sub>2</sub> toda vez que su adicción aumenta el Ca<sup>++</sup> y baja el pH (Jen y Ashworth, 1970; Sbodio et al., 2002).

También deberíamos tener en cuenta al método utilizado, toda vez que el método del alambre caliente determina el TC de manera incruenta. Sin duda, son necesarias más investigaciones para aclarar con mayor profundidad esta observación. Waungana (1995) mostró que la adición de CaCl<sub>2</sub> resultó en una disminución del TC y formación de geles más fuertes tanto en leches calentadas (4 segundos a 140 °C) como aquellas sin calentar, en coincidencia con nuestros hallazgos. Sin embargo, posteriormente Waungana et al. (1996) observaron que el incremento de hasta 60% de desnaturalización de  $\beta$  lactoglobulinas tiene poco efecto sobre el TC, incluso considerando hasta el 20% de desnaturalización no se observaron cambios del TC.

La Tabla 1 muestra que los niveles más altos de voltajes fueron obtenidos a pH 6,2 y pH 6,4 y los más bajos a pH 6,6 en coincidencia con Okigbo et al. (1985). Waungana et al. (1996) sostienen que el G' de los geles producidos por renina es mucho más sensible a la presencia de  $\beta$  lactoglobulinas desnaturalizadas que el TC. Los valores de G' disminuyen casi linealmente con el incremento en el grado de desnaturalización de  $\beta$  lactoglobulinas de 10% a 65% y, además el agregado CaCl<sub>2</sub> tiene mayor efecto sobre el G' en leches calentadas a 140 °C durante 4 segundos (Waungana, 1995). En este ensayo, con el 20% de desnaturalización, cuando bajamos el pH de leche tratada a pH 6,4 y agregamos 600 mg de CaCl<sub>2</sub> se incrementó el voltaje en 3,9%, y con el agregado de 400 mg CaCl<sub>2</sub> el incremento del voltaje fue de 27,2% en coincidencia con Waungana (1995). La leche tratada y coagulada a pH 6,4 necesitó más tiempo para alcanzar el máximo voltaje, independientemente del CaCl<sub>2</sub> agregado, sugiriendo la necesidad de modificar las condiciones del proceso en función de que el tiempo de corte de la cuajada debería realizarse cuando se alcance el máximo voltaje. Esto significa que la leche tratada en las condiciones del ensayo, coagula en menor tiempo y alcanza el máximo voltaje en un tiempo más prolongado que la leche sin tratamiento, modificando el tiempo de corte. Como se esperaba, el tratamiento produce durante la primer hora luego de alcanzar el máximo voltaje, que el coágulo drene menos suero que aquel proveniente de leche sin tratar. Esta disminución del drenaje es debida a la retención causada por las proteínas desnaturalizadas y la grasa que se han incorporado al coágulo.

Luego de considerar al máximo voltaje logrado, sugerencias de técnicos queseros y particularmente el volumen de suero drenado que razonablemente fue elegido entre 28 y 40% de suero retenido, considerando esta retención como un moderado potencial de acidificación, se seleccionaron las condiciones de las corridas 2 y 6 expuestas en la Tabla 1, estas son: pH 6,4 CaCl<sub>2</sub> 600 mg L<sup>-1</sup> y pH 6,4 CaCl<sub>2</sub> 400 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Usando estas condiciones, las respuestas observadas en leche tratada térmicamente y coagulada bajo la condición 2 alcanzan un VM de 3.487  $\mu$ V y 45 ml de suero drenado y 3.350  $\mu$ V de VM y 63 ml de suero drenado obtenido a partir de leche sin tratamiento, de lo que deducimos que 18,6 ml de suero quedaron retenidos en la cuajada. Para la condición 6 los VM observados fueron 3.843 y 2.797  $\mu$ V y el suero drenado 40 ml y 67 ml, para leche tratada y sin tratar, respectivamente. Claramente, el coágulo producido con leche entera tratada en la condición 2 retuvo 28,6% más de suero comparado con aquel retenido por el coágulo de leche sin tratamiento. Considerando la condición 6, en ella el coágulo retuvo 27 ml de suero, es decir 40% más que el retenido por el coágulo producido por la leche control.

Los resultados obtenidos luego de mantener la leche entera 10 minutos a 73 °C al pH nativo de la leche (6,65) nos permite sugerir, en coincidencia con Vasbinder y de Kruif (2003), que bajo estas condiciones experimentales hay una cobertura parcial de las micelas de caseína y que hay un significativo porcentaje de agregados solubles de proteínas del suero y complejos formados por k-caseína y proteínas del suero desnaturalizadas. Muestras de leches con gran proporción de agregados producen geles con los más altos G' que aquellas donde la mayoría de las proteínas séricas desnaturalizadas estaban asociadas con las micelas de caseínas (Anema et al., 2004; Rodríguez del Angel y Dalgleish, 2006). Bajo estas condiciones, se puede proponer que los agregados de proteínas solubles en el suero de la leche tratada puede comportarse como un material ligante, similar a lo que ocurre con un gel ácido (Famelart et al., 2004; Lucey et al., 1999) induciendo agregaciones a medida que se aproxima el punto isoeléctrico de las proteínas del suero.

Los volúmenes de suero drenado verifican que los coágulos producidos con leche calentada retienen un moderado porcentaje de suero (28,6% en la condición 2 y 40% en la condición 6) comparado al producido con leche sin tratar. Sí hay más suero retenido con leche tratada que el producido por leche sin tratar, se puede inferir que hay un incremento de la lactosa en la cuajada, que puede provocar una mayor velocidad de acidificación que en el proceso normal de producción industrial. En esta experiencia la cuajada observa valores de pH de 6,25 cuando se alcanza el máximo voltaje. En el proceso tradicional, la cuajada es acidificada hasta pH 5,1 - 5,2 y posteriormente sumergida en baño frío de salmuera a 5 - 7 °C. Lucey et al. (2001) reportaron que geles combinados elaborados con leche calentada tuvieron menor separación de suero con mejoramiento de la firmeza. Esto podría explicar el significativo incremento del voltaje en coágulos logrados a partir de leche calentada en comparación a aquellos resultados de leche sin calentar. Sin duda, más estudios deben ser llevados a cabo, bajo estas condiciones experimentales, para determinar si los agregados solubles de k-caseína y las proteínas solubles desnaturalizadas contribuyen a mejorar el voltaje.

Desde que el objetivo principal de este estudio fue mejorar la producción de queso cuartirolo, decidimos reproducir las condiciones en elaboraciones de queso en planta piloto. De esa manera realizamos seis ensayos, a saber: dos bajo la condición 2, dos bajo la condición 6, ambos con leche calentada 10 minutos a 73 °C y dos ensayos más con leche sin tratamiento térmico de acuerdo a las condiciones citadas en Materiales y Métodos, coagulando a pH 6,6 y a 38 °C de temperatura, utilizando cuajo bovino (800 IMCU, Calf Rennet, Caglificio Clerici, Italy) en una concentración de 0,028 U.R. ml<sup>-1</sup> y con el agregado de 200 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> (Cicarelli, Santa Fe, Argentina). El corte de la cuajada se realizó cuando ésta alcanzó el máximo voltaje. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado. Estas elaboraciones mostraron que aquellos quesos producidos bajo las condiciones 2 y 6 observaron un contenido de humedad más alto (58,5%) que el obtenido bajo las condiciones tradicionales (55,4%). Luego de cumplimentar el proceso de maduración durante 20 días, un grupo de especialistas de cinco miembros entrenados en propiedades organolépticas observaron una calidad aceptable en el queso producido bajo la condición 6, pH 6,4 y 400 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> agregado. El rendimiento fue mayor, siendo para la misma condición, y corregido por humedad, un 8,9% más alto que en el queso producido con leche sin tratamiento térmico. La Fig. 1 ilustra las curvas de coagulación enzimática de leche tratada 10 minutos a 73 °C y aquella sin tratamiento obtenidas bajo la condición 6 (pH 6,4 y adición de CaCl<sub>2</sub> de 400mg.L<sup>-1</sup>). Los resultados de la evaluación sensorial no mostraron diferencias significativas entre los quesos producidos bajo la condición seleccionada y aquellos obtenidos bajo las condiciones tradicionales.

## CONCLUSIÓN

La recuperación de la capacidad de coagular enzimáticamente de la leche entera bajo moderadas condiciones de tratamiento térmico puede ser lograda, para este tipo de queso, bajando el pH a 6,4 y agregando CaCl<sub>2</sub> en una concentración de 400 mg L<sup>-1</sup>. Los valores obtenidos de máximo voltaje, tiempo en el que se alcanza el voltaje máximo y el volumen de suero drenado por el coágulo pueden ser indicadores importantes al momento de elegir las mejores condiciones para producir queso, determinar el tiempo de corte y predecir las necesarias modificaciones, toda vez que hay retención de suero y la acidificación de la cuajada puede ser acelerada. El método del alambre caliente resultó un método simple y práctico que podría ser utilizado en diferentes tipos de quesos.

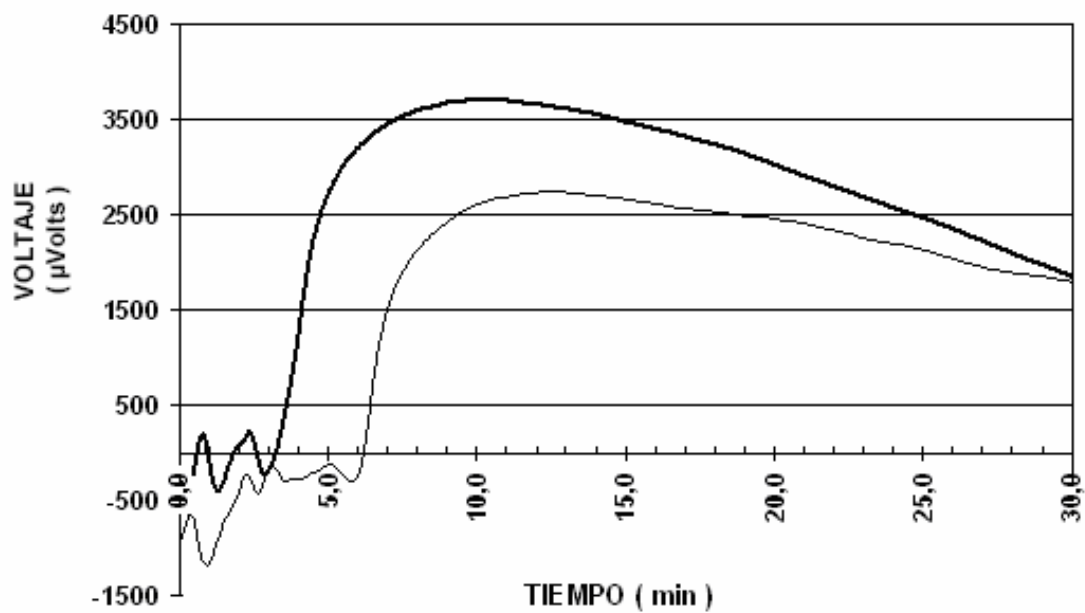


Fig. 1: Relación entre las curvas de voltaje vs tiempo producidos durante la coagulación enzimática de leche entera con y sin tratamiento térmico. La línea negra oscura representa la leche tratada. Los niveles de variables corresponden a pH: 6,4 y CaCl<sub>2</sub> agregado de 400 mg L<sup>-1</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al aporte del proyecto de la Universidad Nacional del Litoral (CAI + D N° 12/H415, 2005). Los autores agradecen al establecimiento La Turquina S.A. por la provisión de las muestras de leche y al Lic. Victor René Coutaz por su asistencia técnica.

## REFERENCIAS

- Anema, S.G., S.K. Lee, E.K. Lowe y H. Klostermeyer, Rheological properties of acid gels prepared from heated pH adjusted skim milk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 337-343 (2004).
- Association of Official Analytical Chemists, *Official method of analysis*, 13<sup>th</sup> ed. 47.021-47.023 (1980).
- Banks, J.M. Improving cheese yield by the incorporation of whey powder *Dairy Industries International*, 55(4), 37-39 (1990).
- Berridge, N.J. Some observations on the determination of the activity of rennet, *Analyst.*, 57-77 (1952).
- Bynum, D.G. y N.F. Olson, Influence of curd firmness at cutting on cheddar cheese yield and recovery of milk constituents, *Journal of Dairy Science*, 65, 2281-2290 (1982).
- Dalgleish, D.G. The enzymatic coagulation of milk. In P.F. Fox, *Advanced dairy chemistry, Volume 1, Proteins* (pp 579-620) London: Elsevier Science Publishers Ltd. (1992).
- Dannenber, F. y H.G. Kessler, Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk, *Journal of Food Science*, 53, 258-263 (1988).
- Famelart, M.H., J. Tomaszewski, M. Piot y S. Pezennec, Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems, *International Dairy Journal*, 14, 313-321 (2004).
- Garnot, O., T.C. Rank y N.F. Olson, Influence of protein and fat contents of ultra filtered milk on rheological properties of gels formed by quymosin, *Journal of Dairy Science*, 66, 2267-2275 (1982).



- Hiller, R.M., R.L. Lyster y G.C. Cheeseman, Thermal denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulins in cheese whey: Effect of total solid concentration and pH, *Journal of Dairy Research*, 46, 95-102 (1979).
- Hinrichs, J. Incorporation of whey proteins in cheese, *International Dairy Journal*, 11, 495-503 (2001).
- Hori, T. Objective measurements of the process of curd formation during rennet treatment of milk by the hot wire methods, *J. Food Sci.*, 50, 911-917 (1985).
- Jen, J.J. y U.S. Ashworth, Factors influencing the curd tension of rennet coagulated milk. Salt balance, *Journal of Dairy Science*, 60, 1256-1267 (1970).
- Kopelman, I.J. y U. Cogan, Determination of clotting power of milk clotting enzymes, *Journal of Dairy Science*, 59, 196-199 (1975).
- Law, A.J.R. y J. Leaver, Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 672-679 (2000).
- Lucey, J.A., C. Gorry y P.F. Fox, Methods for improving the rennet coagulation properties of heated milk. In cheese yield and factors affecting its control, Special issue 9402, *International Dairy Federation Brussels*, 448-456 (1993).
- Lucey, J.A., P.A. Munro y H. Singh, Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels, *International Dairy Journal*, 9, 275-279 (1999).
- Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh y P.A. Munro, Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid, *International Dairy Journal*, 11, 559-565 (2001).
- Maubois, J. y G. Mocquot, Comment ramener à la même teneur en substance sèche des fabrications de fromage en vue de comparer les "rendements respectifs du lait en fromage, *Revue Laitière Française*, 239, 15-18 (1967).
- Okigbo, L.M., G.H. Richardson, R.J. Brown y C.A. Ernstrom, Interaction of calcium, pH, temperature, and chymosin during milk coagulation, *Journal Dairy Science*, 68, 3135-3142 (1985).
- Oldfield, D.J., H. Singh y M.W. Taylor, Association of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin with the casein micelles in skim milk heated in an ultra-high temperature plant, *International Dairy Journal*, 8, 765-770 (1998).
- Park, K.H. y D.B. Lund, Calorimetry study of thermal denaturation of  $\beta$  lactoglobulin, *Journal of Dairy Science*, 67, 1699-1706 (1984).
- Parris, N. y M.A. Baginski, A rapid method for the determination of whey protein denaturation, *Journal of Dairy Science*, 74, 58-64 (1991).
- Rodriguez del Angel, C. y D.G. Dalgleish, Structures and some properties of soluble protein complexes formed by heating of reconstituted skim milk powder, *Food Research International*, 39, 472-479 (2006).
- Sbodio, O.A., E.J. Tercero, R. Coutaz y E. Martinez, Optimizing processing conditions for milk coagulation using the hot wire method and response surface methodology, *Journal of Food Science*, 67(3), 1097-1102 (2002).
- Schreiber, R. Heat-induced modifications in casein dispersions affecting their rennetability, *International Dairy Journal*, 11, 553-558 (2001).

Singh, H., S.I. Shalabi, P.F. Fox y A. Barry, Rennet coagulation of heated milk: influence of pH adjustment before or after heating, *Journal of Dairy Research*, 55, 205-215 (1988).

Singh, H. y A. Waungana, Influence of heat treatment of milk on cheese making properties, *International Dairy Journal*, 11, 543-551 (2001).

Vasbinder, A.J. y G.D. de Kruif, Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH, *International Dairy Journal*, 13, 669-677 (2003).

Vasbinder, A.J., A.C. Alting y C.G. de Kruif, Quantifications of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids and Surfaces, Biointerfaces*, 31(1-4), 115-123 (2003).

Walstra, P. y R. Jenness, *Dairy Chemistry and Physics*, New York: Wiley (1984).

Waungana, A. Rennet coagulation properties of heated milks, Master of Thechnology thesis, Massey University, Palmerston North, New Zealand (1995).

Waungana, A., H. Singh y R.J. Bennet, Influence of danaturation and aggregation of  $\beta$  lactoglobulin on rennet coagulation properties of skim milk and ultrafiltered milk, *Food Research International*, 29, 715-721 (1996).

Zalazar, C.A. y C.A. Meinardi, Esperienze sulla caseificazione e maturazione del formaggio "Cremoso Argentino", *Sci. Tec. Lati. Cas.*, 33, 509-516 (1982).

Zalazar, C.A., C.A. Meinardi, E. Hynes y S. Bernal, Performance of fermentation produced chymosin and other milk-clotting enzymes in the elaboration of "cremoso argentine" cheese, *Microbiologie Aliments Nutrition*, 15, 333-338 (1997).