



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Moavro, Alfonsina

Estudio de un nuevo queso contenido en tripa con desarrollo superficial de *Penicillium nalgiovense*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Moavro, A. (2019). *Estudio de un nuevo queso contenido en tripa con desarrollo superficial de Penicillium nalgiovense* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/1693>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio de un nuevo queso contenido en tripa con desarrollo superficial de *Penicillium nalgiovense*

TESIS DOCTORAL

Alfonsina Moavro

alfonsina.moavro@unq.edu.ar

Resumen

Penicillium nalgiovense es el starter más utilizado para el desarrollo superficial de embutidos cárnicos. No produce ninguna de las micotoxinas conocidas, sin embargo se conoce que puede producir penicilina. La industria láctea no utiliza esta especie a pesar de haber sido aislada de un queso. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un queso innovador contenido y madurado en tripa con crecimiento superficial de *Penicillium nalgiovense*. Se utilizó una referencia comercial y veinte aislamientos de *P. nalgiovense* biotipo 6, obtenidos de salames artesanales de Buenos Aires y Córdoba. Luego, todas estas cepas fueron confirmadas en su identidad por biología molecular por amplificación de un fragmento del gen que codifica la β -tubulina. Se estudió su variabilidad genética con PCR-ISSR y se realizó un análisis de agrupamiento, obteniendo baja diversidad genética y ningún agrupamiento según el origen geográfico. Todas las cepas mostraron habilidad para crecer en medio tipo queso, estimuladas frente a la adición de NaCl. A nivel enzimático, todas las cepas presentaron actividad proteolítica y lipolítica, variando respecto a la temperatura de incubación. Todas las cepas portaron el gen *penDE* involucrado en la vía de producción de penicilina y lo expresaron in vitro a 25 °C, influenciada tanto por el medio de cultivo como por la disminución de la temperatura de incubación, destacándose las cepas C2, C3, C4, C5, BA3 y BA4 por no presentar actividad inhibitoria en medio tipo queso a 12 °C. Tres de estas cepas se seleccionaron según el análisis de agrupamiento y se usaron, junto con la referencia comercial, para inocular quesos contenidos en tripa elaborados con queso Tybo comercial fundido, en primer lugar con 105 conidios/mL y, en un segundo ensayo con 103 conidios/mL de C5 que fue la cepa que menos penicilina produjo en queso. En ambos ensayos se maduró a 12 °C y 90 % humedad relativa (h.r.), durante 14 días y luego se conservó en condiciones de refrigeración. La penicilina se cuantificó mediante un ELISA competitivo. Se observó que *P. nalgiovense* tiene la capacidad de difundir dicho metabolito a través de la tripa y que la producción del mismo es acumulativa en el tiempo, aún a bajas temperaturas. También se comprobó que el nivel de concentración

inicial de inóculo influyó en el grado de desarrollo micelial y esto en la concentración de penicilina producida.

Se pudo demostrar la factibilidad de embutir y madurar desde tiempo inicial masas lácteas de distintos tipos, trabajando en colaboración con la empresa Cabaña Piedras Blancas y con el INTI, elaborando masas de pasta blanda y semidura. Se optó por seguir trabajando con el salado por inmersión y con la masa del INTI. En estos quesos se observó un drástico descenso en la producción de penicilina respecto al obtenido con queso fundido, cumpliendo con el límite máximo teórico de penicilina, estimado en 180 µg de penicilina/kg. Sin embargo, la considerable pérdida de peso con el tiempo de maduración y el leve cambio del pH sugirieron que las condiciones ensayadas no eran suficientes para que el hongo contribuya en la maduración. Posteriormente, se logró extender la maduración enlenteciendo el proceso de deshidratación al implementar una etapa de envasado el día 14, usando polietileno microperforado que no afectó la viabilidad del hongo ni el aspecto del producto.

Los quesos se caracterizaron físicoquímica, microbiológica y sensorialmente, esta última la llevó a cabo un panel de no videntes y disminuidos visuales del Instituto nacional de tecnología Industrial división Lácteos. Al evaluar el impacto de la temperatura de maduración en los quesos envasados se observó que se puede alcanzar maduraciones similares trabajando la combinación tiempo-temperatura. A nivel sensorial, el producto se caracterizó principalmente por ser elástico y con olor a hongo. Al día 35 se percibió un sabor amargo débil, notas amoniacales y a manteca vieja, con mayor acentuación a 12 °C que a 5 °C. Por inocuidad se decidió seguir utilizando una temperatura post envasado de 5 °C. Los valores de pH, actividad de agua, grasa y nitrógeno total no resultaron adecuados como parámetros de seguimiento de la maduración por no mostrar variaciones significativas. Al hacer el seguimiento del nitrógeno soluble a pH 4,6 por el método de Kjeldahl se obtuvo una tendencia creciente con el tiempo de maduración, con un consecuente índice de maduración de similar comportamiento. Se obtuvo el perfil peptídico con Urea-PAGE, que fue complementado con el análisis de las especies nitrogenadas solubles a pH 4,6 por cromatografía líquida de alta eficacia, y evidenciaron el proceso de degradación de las proteínas y generación de nuevos péptidos con el avance de la maduración. Sin embargo, este proceso enzimático resultó ser más lento que la lipólisis, medida por el índice de lipólisis. Esto se correlacionó con lo obtenido por el panel sensorial que definió descriptores asociados con la rancidez pero no con el amargor, hacia el final del tiempo estudiado. Al medir instrumentalmente el color interno del queso se observó que la diferencia de color aumentó con el avance del tiempo de maduración, con una correlación negativa de la luminosidad con la deshidratación del producto y con la intensidad del color rojo (a^*) y amarillo (b^*) en aumento, sugiriendo aportes por la presencia de compuestos hidrosolubles como la riboflavina y de pigmentos producidos por *P. nalgiovense*.

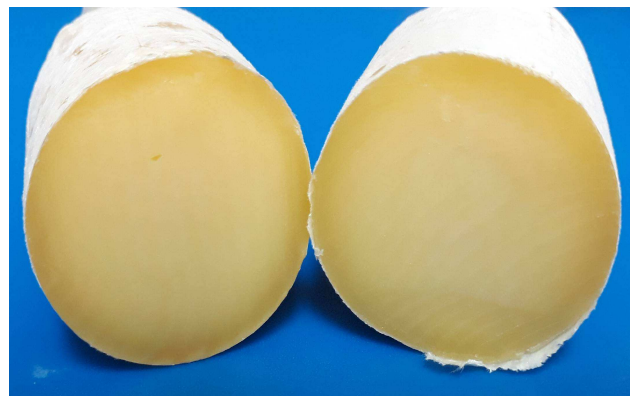
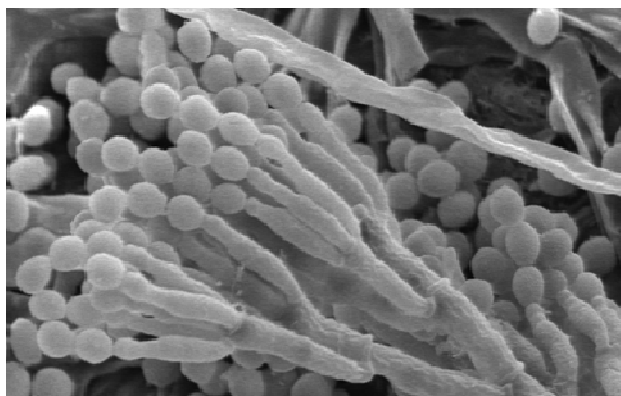
Los quesos se analizaron según los requisitos del Código Alimentario Argentino (CAA) y se incluyó el análisis de anaerobios sulfitos reductores por la condición anaerobia generada por el

embutido. En todos los casos los quesos se encontraron bajo los límites microbiológicos permitidos. Se realizó el seguimiento del desarrollo del hongo en la tripa por recuento de conidios en placa y por cuantificación de biomasa. Por ambos métodos se obtuvo la misma tendencia, con un ascenso hasta el día 14 donde se estabilizó. Luego del envasado no se observó una disminución lo que indica que el hongo se mantiene viable dentro del envase, esto se comprobó con microscopias electrónicas de barrido del micelio desarrollado sobre las tripas que demostraron que las estructuras de los conidios se mantienen a lo largo de la maduración.

A partir de ensayos descriptivos cuantitativo se definió el perfil sensorial del queso resaltando los descriptores elasticidad y firmeza mientras que el sabor amargo no resultó ser un descriptor del producto. Esto sugiere que, en el tiempo y condiciones estudiadas, no ocurre una proteólisis significativa en el mismo. Se propuso una vida útil sensorial del producto de 21 días que se extiende desde el día 14 en el cual se envasa y se expende el producto a una temperatura de conservación de 5 °C, hasta el día 35 en el que se comienza a percibir flavors indeseables. Se calculó la composición proximal del queso al día 21, y según el contenido de humedad y grasa, se lo definió por los criterios del CAA como de baja humedad y graso. Se obtuvo una buena aceptación del queso al realizar un ensayo con consumidores, quienes también manifestaron alta intención de compra.

Por todo lo expuesto, se logró desarrollar y producir a escala piloto un producto innovador que se caracteriza por ser una masa de queso semiduro contenida y madurada en tripa con desarrollo superficial de *Penicillium nalgiovense*.

*ESTUDIO DE UN NUEVO QUESO CONTENIDO EN
TRIPA CON DESARROLLO SUPERFICIAL DE
PENICILLIUM NALGIOVENSE*



Doctorando: Alfonsina Moavro

Directora: Dra. Vanesa Ludemann

Co-Director: Dr. Jorge R. Wagner

2019

AGRADECIMIENTOS

Con esta tesis termina una gran etapa y, como todos los momentos que marcan nuestras vidas, no podríamos hacer pasos firmes sin el apoyo y compañía de quienes nos rodean.

Por ello, quiero agradecer a todos los que me acompañaron desde un principio en este gran desafío.

Agradezco al CONICET por becarme y brindarme la posibilidad de insertarme en el fascinante mundo de la investigación. A la Universidad Nacional de Quilmes, la casa que me cobijó desde mis primeros pasos de educación superior, que le debo no sólo mi formación y mi profesión sino el placer de trabajar con excelentes profesionales de todas las áreas y crecer en la interacción diaria. Agradezco a la Dra. Alejandra Zinni y Cristina Wainmayer, quienes están a cargo del Departamento de CyT y siempre me han dado una palabra de aliento y de confianza. También quiero mencionar a la Dirección de la Carrera Ing. en Alimentos por hacerme partícipe del plantel docente. No puedo olvidarme del personal no docente que siempre está dispuesto a ayudar en lo que surja, desde una lamparita que no anda hasta una hoja para imprimir, muchas gracias Guada, Silvia, Ale, Julia, Lorena, Belén, Magalí, Néstor, Bruno y Hugo. Al personal de la Secretaría de Investigación, de Transferencia Tecnológica y Postgrado por su predisposición para atenderme.

A quienes integran el Programa de “Investigaciones aplicadas al desarrollo del sector alimentario”, Jorge, Vanesa, Gonzalo, Mecha, Juan, Ceci, André S., Gonzalo, Dario, Andrés M., Orlando, Seba, Yeison, Paula, Mariana y Anahí., que desde un principio me abrieron las puertas para trabajar con ellos y a quienes agradezco por compartir y enseñarme día a día. En especial agradezco al Dr. Jorge Wagner, director del Programa y co director mio, gracias Jorge por tu gran generosidad y paciencia, siempre estas para dar la palabra justa y consejos muy valiosos, te admiro y respeto mucho.

A mi directora y amiga, la Dra. Vanesa Ludemann, quien desde que hubo una mínima posibilidad de que siguiera el camino de la investigación me ayudó a emprenderlo. Gracias Vane por todo...por tu paciencia, tu tiempo, tu comprensión, tus consejos, tu dirección, tus retos, tu amor incondicional, por todo eso y mucho más que me hace día a día crecer como profesional y como persona. Gracias por todo tu compromiso y esfuerzo, fuiste la mejor directora que pude haber tenido y me siento muy afortunada por ello. Gracias de corazón, te quiero mucho.

Y gracias Marcelo, por compartir tu idea loca que gestó este tema de tesis.

A los profesionales e Instituciones que colaboraron en objetivos de esta tesis:

- *Dr. Sebastián Stenglein del Laboratorio BIOLAB, Facultad de Agronomía de Azul, por orientarme con la PCR –ISSR.*

- *Marcelo Lizziero y Daniel Fanucci, socio gerente y jefe de planta de Cabaña Piedras Blancas, por permitirnos participar de su producción y proveernos de masa. Y a la Dra. Beatriz Coste por contactarnos con la empresa.*
- *A la Ing. Maria Laura Castells, Bioq. Mariela Zampatti, Ing. Diego Corrales, Ing. Fernando Pino, Lic. Pablo Sanchez, Lic. Germán Aranibar y a todos los integrantes del panel sensorial de INTI Lácteos por trabajar mancomunadamente en la última parte de este proyecto apoyando en la elaboración y evaluación del producto.*
- *A los laboratorios de Microbiología Molecular y Oncología, especialmente a la Dra. Lucrecia Delfederico y Dra. Gisel Ripoll por su guía y asesoramiento y por permitirnos trabajar en sus laboratorios.*

A los Ing. Nicolás Arzu, Melina Castell y Macarena Sanchez Diaz que hicieron su tesis de grado en el contexto de esta tesis doctoral, por su invaluable aporte y compartir tantas horas de trabajo y esfuerzo.

A Romi por acompañarme en los primeros pasos del doctorado, por ser una gran compañera. Y también a Juan, Andrea, Malena, Paula, Gisel con quienes transitó a la par como alumnos doctorales.

A mis amigas de la vida: Naty, Lore, Marce, Pili, Caro, que a pesar de las distancias y contratiempos siempre están a mi lado. A mis amigas que me regaló esta Universidad: Guada, Naty, Iri, Romi, Vane, Margui, Ro y Sofi, gracias por su hermosa amistad que traspasa mucho más que una profesión. Gracias Viole, Elsa, Mari y Jeni por su apoyo y motivación.

Por último, pero no por eso menos importante, al contrario, quiero dedicarle este logro a mi familia que la amo. Principalmente a mis padres, mis principales pilares, gracias por todo el amor que me demuestran a diario. A mis hermanos Matías y Ricardo por ser de fierro y a mis sobrinitos Belén, Cielo y Franco por llenarme de ternura. Caty gracias por ser una gran amiga y estar en todas. A Stella, Iva, Marti y Juli, gracias por tener siempre un matecito listo para compartir a la salida de la uni. A mi familia política por su gran apoyo. Y sobre todo....gracias a vos Hernán, por acompañarme en todas mis decisiones, por ser mi compañero incondicional, por entender y respetar mis tiempos, por ceder tantas horas para terminar este gran proyecto que será el comienzo de tantos otros que encararemos juntos. Te amo!

Gracias a todos porque sin uds. esto no hubiera sido posible,

Alfonsina

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
1. El queso	6
1.1. Definición	6
1.2. Queso Tybo	7
1.3. Queso Brie y queso Camembert	8
1.4. Proceso de elaboración de queso	8
1.4.1. Recepción de leche.....	9
1.4.2. Higienización y estandarización	9
1.4.3. Pasteurización	9
1.4.4. Agregado del fermento	10
1.4.5. Agregado de aditivos y coagulante	10
1.4.6. Coagulación	11
1.4.7. Lirado.....	12
1.4.8. Lavado y semicocción de la masa.....	12
1.4.9. Desuerado	13
1.4.10. Moldeo	13
1.4.11. Prensado.....	13
1.4.12. Salado	13
1.4.13. Tratamientos superficiales	14
1.4.14. Maduración	15
1.4.15. Envasado	16
2. Procesos bioquímicos durante la maduración de los quesos	18
2.1. Evaluación del avance de maduración de los quesos	19
2.1.1. Grado de Proteólisis	19
2.1.2. Pérdida de peso.....	22
2.1.3. pH	22

2.1.4. Lipólisis	23
2.1.5. Determinación del color	23
2.1.6. Evaluación sensorial	25
3. Los mohos y la industria alimentaria	27
4. Micotoxinas y antibióticos	28
4.1 Micotoxinas	29
4.2 Antibióticos	29
4.2.1. Definición y aplicación.....	29
4.2.2. Penicilina	30
5. Género <i>Penicillium</i>	33
5.1. <i>Penicillium nalgiovense</i>	34
5.1.1. Generalidades	34
5.1.2. Identificación morfológica.....	35
5.1.3. Identificación molecular.....	36
6. Estudios de variabilidad genética.....	37
7.1 Cabaña Piedras Blancas.....	38
7.2. Instituto Nacional de Tecnología Industrial	39
7.2.1 Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea	39
OBJETIVO.....	41
<i>CAPÍTULO I: Caracterización fisiológica de cepas de Penicillium nalgiovense para su potencial uso en matrices lácteas</i>	43
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1. Obtención de las cepas de trabajo	44
2.2. Extracción de ADN.....	46
2.3. Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN extraído	47
2.4. Confirmación de la identidad	47
2.5. Estudios de la variabilidad genética	48

2.6. Evaluación de la adición de cloruro de sodio en el crecimiento.....	50
2.7. Screening de la actividad proteolítica y lipolítica.....	50
2.8. Evaluación de la capacidad de producción de penicilina	51
2.8.1 Amplificación y secuenciación del gen penDE	51
2.8.2. Bioensayo para evaluar la producción de penicilina.....	52
2.9. Análisis estadístico	53
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.1. Identificación por método molecular.....	54
3.2. Estudios de la variabilidad genética	55
3.3. Evaluación de la adición de cloruro de sodio en el crecimiento.....	58
3.4 Screening de la actividad proteolítica y lipolítica.....	62
3.5 Evaluación de la capacidad de producción de penicilina	64
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	67
<i>CAPÍTULO II: Evaluación de la producción de penicilina en queso Tybo fundido contenido en tripa.....</i>	<i>69</i>
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	70
2. MATERIALES Y MÉTODOS	70
2.1. Evaluación de la producción de penicilina en queso Tybo fundido contenido en tripa ..	70
2.1.1. Elaboración de los quesos contenidos en tripa.....	70
2.1.2. Preparación de la suspensión de conidios e inoculación	72
2.1.3. Maduración y conservación en refrigeración.....	72
2.1.4. Análisis de los quesos contenidos en tripa	73
2.2. Cinética de producción de penicilina durante la maduración y conservación de quesos contenidos en tripa.	76
2.2.1. Elaboración de los quesos contenidos en tripa.....	76
2.2.2. Preparación de la suspensión de conidios e inoculación	76
2.2.3. Maduración y conservación en refrigeración.....	76
2.2.4. Cinética de análisis de los quesos contenidos en tripa	76

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
3.1. Evaluación de la producción de penicilina en queso Tybo fundido contenido en tripa ..	77
3.2. Cinética de producción de penicilina durante la maduración y conservación de quesos contenidos en tripa.	80
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	83
 <i>CAPÍTULO III: Evaluación de la factibilidad de obtener quesos a partir del embutido e inoculación fúngica superficial de diferentes masas frescas</i>	
1. OBJETIVO ESPECÍFICO	86
2. MATERIALES Y MÉTODOS	86
2.1. Elaboración de quesos con diferentes masas lácteas recién elaboradas en producción a escala piloto e industrial, contenidas en tripa y con desarrollo superficial de <i>P. nalgiovense</i>	86
2.1.1. Trabajo en colaboración con la Empresa Cabaña Piedras Blancas	86
2.1.2. Trabajo en colaboración con la Planta Piloto de INTI Lácteos	88
2.1.3. Acondicionamiento de las cámaras de maduración	92
2.1.4. Preparación de la suspensión de conidios e inoculación	92
2.1.5. Maduración de los quesos contenidos en tripa	92
2.2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los quesos durante el proceso de maduración	93
2.2.1. Control de pérdida de peso.....	94
2.2.2. Determinación del contenido de peso seco y humedad.....	94
2.2.3. Determinación de actividad de agua (a_w)	95
2.2.4. Determinación de pH	95
2.2.5. Recuento de hongos en tripa	95
2.2.6. Cuantificación de penicilina G	95
2.2.7. Análisis estadístico	95
2.3. Estimación del límite máximo teórico de penicilina admitido en queso con desarrollo fúngico superficial.	96
2.3.1. Encuesta a consumidores.....	96

2.3.2. Análisis de los datos recolectados.....	96
2.3.3. Cálculo estimativo del límite máximo teórico.....	96
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
3.1. Quesos obtenidos.....	97
3.2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los quesos durante el proceso de maduración	103
3.2.1. Pérdida de peso.....	103
3.2.2. Humedad	106
3.2.3. Actividad de agua (a_w)	106
3.2.4. pH	107
3.2.5. Recuento de hongos en tripa	107
3.2.6. Contenido de penicilina G	108
3.3. Estimación del límite máximo teórico de penicilina admitido en queso con desarrollo fúngico superficial.	110
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	111
<i>CAPÍTULO IV: Optimización del proceso de maduración de queso elaborado con masa de queso Tybo, contenida en tripa y con desarrollo superficial de <i>Penicillium nalgiovense</i></i>	
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	114
2. MATERIALES Y MÉTODOS	114
2.1. Elaboración de la masa y obtención de los quesos contenidos en tripa	114
2.2. Maduración de los quesos contenidos en tripa	115
2.3. Caracterización de los quesos durante su maduración	116
2.3.1. Muestreo.....	116
2.3.2. Determinaciones fisicoquímicas.....	118
2.3.3. Determinaciones microbiológicas	125
2.3.4 Caracterización sensorial.....	129
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
3.1. Quesos obtenidos.....	131

3.2. Evolución de las variables fisicoquímicas durante la maduración	134
3.2.1. Pérdida de peso.....	134
3.2.2. Humedad	136
3.2.3. Materia grasa	137
3.2.4. Nitrógeno total, nitrógeno soluble a pH 4,6 e índice de maduración.....	138
3.2.5. Cromatografía de especies nitrogenadas solubles a pH 4,6	140
3.2.6. Perfil peptídico por electroforesis (Urea-PAGE)	142
3.2.7. Determinación del pH	145
3.2.8. Determinación de la actividad de agua	146
3.3. Evolución de las variables microbiológicas durante la maduración	146
3.3.1. Investigación de patógenos y recuento de microorganismos indicadores.....	146
3.3.2. Recuento de hongos en tripa	147
3.3.3. Biomasa fúngica en tripa.....	148
3.4. Análisis de caracterización sensorial.....	149
3.4.1. Ensayo de Categorización.....	149
3.4.2. Ensayo descriptivo cuantitativo (QDA)	150
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	154
<i>CAPÍTULO V: Vida útil sensorial y evaluación de la aceptación por consumidores de los quesos desarrollados.....</i>	
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	157
2. MATERIALES Y MÉTODOS	157
2.1. Complementación de la caracterización del proceso de maduración por incorporación de metodología analítica.....	157
2.1.1. Elaboración de la masa y obtención de los quesos contenidos en tripa	157
2.1.2. Maduración de los quesos contenidos en tripa	157
2.1.3. Caracterización de los quesos durante su maduración	158
2.2. Vida útil sensorial	160
2.3. Evaluación por consumidores	161

2.3.1. Obtención de los quesos contenidos en tripa con desarrollo superficial de P. nalgiovense.....	161
2.3.2. Análisis microbiológico y composición proximal del producto	161
2.3.3. Evaluadores y lugar de ensayo	162
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	165
3.1. Complementación de la caracterización del proceso de maduración por incorporación de metodología analítica.....	165
3.1.1. Quesos obtenidos.....	165
3.1.2. Evolución de las variables fisicoquímicas durante la maduración	167
3.1.3. Evolución de las variables microbiológicas durante la maduración	173
3.2. Vida útil sensorial	178
3.2.1. Apariencia.....	178
3.2.2. Aroma	179
3.2.3. Perfil sensorial de los quesos obtenidos	179
3.3. Aceptación por consumidores	181
3.3.1. Obtención de los quesos contenidos en tripa con desarrollo superficial de P. nalgiovense.....	181
3.3.2. Análisis microbiológico y Composición proximal del producto	182
3.3.3. Ensayo con consumidores	183
4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	185
CONCLUSIONES	187
PERSPECTIVAS FUTURAS	189
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191
ANEXOS	201
ANEXO I: Medios de cultivo y reactivos	202
ANEXO II: Instrucciones para técnica de ELISA	206
ANEXO III: Encuesta a consumidores y potenciales consumidores estimar el límite máximo teórico de penicilina admitido en queso con desarrollo fúngico superficial.	207
ANEXO IV: Cuantificación de Penicilina G	208

ANEXO V: Método de Bradford.....	211
ANEXO VI: Cuestionario utilizado para la prueba de aceptación por consumidores.....	212
ANEXO VII: Ensayo Descriptivo Cuantitativo.....	215
ANEXO VIII: Resultados de la encuesta con consumidores.....	216

INTRODUCCIÓN

1. El queso

1.1. Definición

Según lo establecido en el Capítulo VIII, art. 605 del Código Alimentario Argentino (CAA), “Se entiende por Queso el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, 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.

Se entiende por Queso Fresco el que está listo para el consumo poco después de su fabricación. Se entiende por Queso Madurado el que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso”.

Dicho artículo establece la clasificación de los quesos de acuerdo a su contenido de materia grasa en el extracto seco y a su contenido de humedad (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de los quesos según el Código Alimentario Argentino, expresados en base seca

Materia grasa(bs) (%)	Clasificación
No menor al 60 %	Extra graso o Doble crema
Entre 45,0 y 59,9 %.	Grasos
Entre 25,0 y 44,9 %	Semigrasos
Entre 10,0 y 24,9 %.	Magros
Menor al 10,0 %.	Descremados
Humedad (%)	Clasificación
Hasta 35,9 %.	de baja humedad (pasta dura)
Entre 36,0 y 45,9 %.	de mediana humedad (pasta semidura)
Entre 46,0 y 54,9 %.	de alta humedad (pasta blanda o macíos)
No menor al 55%.	de muy alta humedad

Este artículo establece, en su inciso 6, que los criterios microbiológicos de los quesos dependerán de la humedad de los mismos (Tabla 2).

Tabla 2: Criterios microbiológicos de los quesos con hasta el 55 % de humedad

Microorganismo	Criterios de aceptación
Coliformes / g (30 °C)	A) n=5, c=2, m=200, M=1000 B) n=5, c=2, m=1000, M=5000 C) n=5, c=2, m=5000, M=10000 D) n=5, c=2, m=10000, M=100000
Coliformes / g (45 °C)	A) n=5, c=2, m=100, M=500 B) n=5, c=2, m=100, M=500 C) n=5, c=2, m=1000, M=5000 D) n=5, c=2, m=1000, M=5000
Estafilococos coag. positiva / g.	A, B, C y D) n=5, c=2, m=100, M=1000
<i>Salmonella spp</i> / 25 g.	A, B, C y D) n=5, c=0, m=0
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g.	A) NS B, C y D) n=5, c=0, m=0

A) Quesos de baja humedad (<36 %)

B) Quesos de mediana humedad (entre 36 y 46 %)

C) Quesos de alta humedad (entre 46 y 55), exceptuando los quesos cuartirolo, cremoso, criollo y minas frescal

D) Quesos cuartirolo, cremoso, criollo y minas frescal (humedad entre 46 y 55 %)

NS: No Solicitado

1.2. Queso Tybo

Según el artículo 633 del CAA “Con el nombre de queso TYBO se entiende el queso madurado que se obtiene por coagulación de la leche por medio del cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas, complementada o no por la acción de bacterias lácticas específicas”.

El queso Tybo es un queso de mediana humedad y semigraso, de acuerdo con lo establecido en el artículo 605, inciso 2 del CAA, elaborado a partir de leche de vaca.

Deberá responder a las siguientes exigencias:

- *Características sensoriales:* de *consistencia* semidura y elástica; *textura* compacta, lisa y no granulada; *color* blanco amarillento uniforme; *sabor* láctico, suave y ligeramente salado característico; *olor* característico, poco acentuado; sin *corteza* o lisa, consistente, bien formada, sin grietas ni fisuras; sin *ojos* o bien puede presentar algunos pequeños bien diseminados.

- *Forma y peso*: de forma paralelepípeda de sección transversal rectangular, con un peso de 3 a 5 kg.
- *Características fisicoquímicas*: deberá responder a las características de composición y calidad establecidas en el CAA (Tabla 1): semigraso y de mediana humedad.

Respecto a las condiciones de conservación y comercialización deberá mantenerse a una temperatura no superior a 12 °C.

1.3. Queso Brie y queso Camembert

Según el artículo 623 del CAA “Con la denominación de queso Brie y queso Camembert, se entiende el producto de alta humedad, graso, elaborado con leche entera o leche estandarizada, coagulada por cuajo y/o enzimas específicas.

Deberá cumplir con las siguientes exigencias:

- *Masa*: cruda, moldeada, desuerada, salada y madurada en cámara fría.
- *Pasta*: blanda, compacta, untuosa, homogénea; sabor ligeramente picante, aroma característico y pronunciado; color amarillento uniforme.
- *Superficie*: recubierta de mohos de color blanco-grisáceo (*Penicillium candidum* o *Penicillium camemberti*) no veteado.
- *Forma*: cilíndrica achatada.
- Tiempo de maduración: mínimo 3 semanas.
- Denominación: "queso Brie": cuando el peso sea aproximadamente de 2 Kg.

"Queso Camembert": cuando el peso sea menor de 500 g. y su tiempo de maduración inferior a 1 mes.

1.4. Proceso de elaboración de queso

A continuación se detallan las distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Figura 1), muchas de las cuales resultan comunes para la elaboración de gran número de quesos

(Bylund, 1996; Farkye, 2004; Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche, 2005; MAGyP, 2009; Bain et al., 2013).

1.4.1. Recepción de leche

La leche debe provenir de animales sanos. Inmediatamente posterior a su extracción, la leche debe ser enfriada y conservada a 4°C para evitar el crecimiento de microorganismos. Se deben efectuar los correspondientes controles de calidad, para asegurar su pureza e inocuidad, entre otros: acidez (°D), pH, densidad, descenso crioscópico, extracto seco no graso, materia grasa, estabilidad frente al agregado de alcohol y recuento de células somáticas. Si la leche contiene células somáticas del orden de 400,000/mL o mayor, la recuperación de proteínas y de grasa disminuye en forma creciente. En este caso se estaría en presencia de mastitis clínica, lo cual impacta en la disminución de los contenidos de caseína, grasa y lactosa, y aumenta el contenido de proteínas lactoséricas y el pH, impactando negativamente en el rendimiento del queso.

1.4.2. Higienización y estandarización

La leche recepcionada debe ser filtrada y/o centrifugada para eliminar impurezas y compuestos macroscópicos como restos de pastos, ramas, pelos, tierra, etc.

La estandarización consiste en la normalización del contenido graso, es decir ajustar la relación grasa/proteína de acuerdo al contenido de materia grasa correspondiente a la categoría del queso a elaborar, lo cual incide en la velocidad de desuerado y determina el rendimiento potencial de la leche.

1.4.3. Pasteurización

La leche deberá ser sometida a pasteurización o tratamiento térmico equivalente para asegurar fosfatasa residual negativa.

La pasteurización de la leche destinada para la elaboración de quesos, a gran escala se realiza a 70-73 °C por 15-20 segundos en intercambiadores de calor de placas. En producciones

a menor escala, la pasteurización se lleva a cabo en tinas a 63 °C durante 30 minutos o, a su condición equivalente, a 65 °C por 10 minutos.

El objetivo es eliminar los microorganismos patógenos y otros más termosensibles como los coliformes e inactivar la fosfatasa alcalina. Por otro lado, la pasteurización no elimina la peroxidasa, ni esporas o bacterias un poco más termorresistentes.

Culminado el periodo de pasteurización, la leche se enfría hasta aproximadamente 30 °C, momento en el cual se agrega el fermento.

1.4.4. Agregado del fermento

Esta operación consiste en el agregado de cultivos de Bacterias del Ácido Láctico (BAL) que cumplen un rol importante sobre el desarrollo de las características organolépticas y de la calidad higiénica de los quesos. Este diverso grupo microbiano comprende numerosos géneros, destacándose varias especies de *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Pueden ser añadidas como cultivos starter o bien, agregarse involuntariamente como flora adventicia durante el proceso de elaboración (bacterias lácticas no fermento, NSLAB), las cuales desarrollan en todos los quesos madurados y predominan en los de maduración media y prolongada. El fermento a agregar y la cantidad varía según el tipo de queso que se quiere elaborar. La temperatura de desarrollo varía en función de si son mesófilas, 30-37 °C, o termófilas, 35-45 °C.

En el caso de quesos con crecimiento de hongos superficial desedo (por ej. el Brie), estos cultivos pueden agregarse en esta etapa, junto con el cultivo primario.

1.4.5. Agregado de aditivos y coagulante

El artículo 605 del Capítulo VIII del CAA, en su punto 3 detalla la lista de ingredientes y aditivos que pueden ser utilizados, indicando además la clase de queso para la o las cuales están autorizados. Los más utilizados son:

– *Nitrato de sodio o de potasio (NaNO_3 o KNO_3):* Se utiliza para controlar bacterias del género *Clostridium* y Coliformes, causantes de la hinchazón de los quesos por producción de gas. Actúa produciendo cambios en el potencial de óxido-reducción de la leche.

- *Colorantes*: El color amarillo de los quesos se debe principalmente al contenido de caroteno presente en la grasa de la leche, el cual varía durante el año, dependiendo especialmente del forraje. Los colorantes pueden utilizarse para corregir las variaciones estacionales.
- *Conservantes* (como la nisina, natamicina, ácido sórbico, lisozima, entre otros) y *estabilizantes* (como carboximetilcelulosa, carragenina y alginato de potasio), se adicionan con el fin de incrementar la vida útil de los quesos.
- *Enzimas*: Si bien la leche cuenta con una proteasa alcalina nativa muy importante, la plasmina, a nivel tecnológico es necesario el agregado de enzimas, siendo la coagulación enzimática el método tradicionalmente empleado en la elaboración de la mayoría de los quesos. Existen enzimas proteolíticas tanto de origen animal (pepsinas bovinas y porcinas), como de origen microbiano (proteasas fúngicas, etc.) o vegetal (flores de *Cynaracardunculus*, etc.) que poseen la propiedad de coagular la leche. La quimosina o rennina es el coagulante más ampliamente usado, es una peptidasa obtenida del cuajo animal (extraído del cuarto estómago de los rumiantes lactantes), su pH óptimo de acción es 5 y concentraciones moderadas de sal, hasta un 4 %, incrementan la hidrólisis por la quimosina, mientras que concentraciones mayores disminuyen su actividad (Walstra et al., 1999).

Antes de efectuar el agregado de las enzimas coagulantes apropiadas se debe asegurar una acidificación de la leche que dependerá del starter utilizado (pH entre 6,30 – 6,45).

1.4.6. Coagulación

La coagulación consiste en una serie de modificaciones fisicoquímicas de las micelas de caseína (proteína de la leche), que conducen a la formación de un coágulo debido a una acidificación. La *coagulación láctica* o *ácida* es realizada por las bacterias lácticas presentes en la leche cruda o procedentes del fermento, que transforman la lactosa en ácido láctico haciendo descender el pH de la leche. La *coagulación enzimática* se produce cuando se añade a la leche las enzimas coagulantes antes detalladas. En los quesos frescos (coagulación fundamentalmente láctica) se utilizan pequeñas cantidades de cuajo y se opera a temperaturas bajas (15-20 °C) para evitar la actividad óptima de la enzima. En este caso, el cuajo se emplea para facilitar el

desuerado más que por su acción coagulante. En los quesos de coagulación fundamentalmente enzimática (por ej., Gruyere) se añaden cantidades de cuajo muy superiores y se coagula a temperaturas más elevadas (30-35 °C) para acelerar la formación de la cuajada. En estos quesos, los fermentos no deben desarrollarse de inmediato a fin de que no se acidifique la leche sensiblemente durante la coagulación y durante las operaciones del desuerado. Finalmente, en los quesos de coagulación mixta (por ej., Camembert) se emplea una cantidad de cuajo considerable a una temperatura que permita el desarrollo óptimo de los fermentos lácticos (28-32 °C) y que al mismo tiempo garantice al cuajo unas condiciones de acción bastante favorables (González Villarreal, 2002).

1.4.7. Lirado

Una vez obtenido el grado de endurecimiento deseado de la cuajada, se procede a realizar el corte de la misma en granos con un tamaño de 3-15 mm, dependiendo el tipo de queso, con utensilios de diferentes tamaños, denominados liras. Cuanto más pequeño sea el corte del coágulo, mayor será el área de la superficie expuesta y mayor la pérdida de suero.

1.4.8. Lavado y semicocción de la masa

Las operaciones de lavado y semicocción de la masa pueden o no llevarse a cabo dependiendo de la variedad de queso a elaborar. La elevación de la temperatura regula el tamaño y la acidificación de la cuajada, favoreciendo el desuerado y acelerando la formación de enlaces dentro de los granos de la cuajada. En quesos de pasta blanda, luego del corte se hace un filtrado para eliminar el suero. En quesos de pasta más duras, la cuajada cortada es agitada durante 8-10 minutos para eliminar más suero y es sometida a un proceso de calentamiento, aumentando progresivamente la temperatura desde 35 a 43 °C, a razón de 1 °C por minuto. Si la temperatura excede los 44 °C, sólo las bacterias lácticas termófilas son activas y resisten este tratamiento. La sensibilidad de los granos de cuajada decrece a medida que avanza el calentamiento, resultando más firme, elástica y cohesiva. Se libera mucho suero debido a la contracción de los coágulos por el calentamiento, al trabajo mecánico y acidificación. La duración de este proceso depende de la acidez, la firmeza y humedad del producto a elaborar.

Luego, previa remoción parcial del suero, se procede al lavado de la masa por adición de agua caliente, pretendiendo disminuir la concentración de ácido láctico y favorecer la elasticidad del producto.

1.4.9. Desuerado

Para el desuerado, se suele utilizar una malla filtrante sobre la cual se prensa la masa, permitiendo eliminar el suero y el aire contenido en la misma. Las mallas dependen de las tecnologías disponibles, el tipo de coágulo formado y la textura del queso deseada. Pueden ir desde un paño de tela para prensado manual, un escurridor vibratorio o rotatorio, una rejilla en una tina con una bomba que retira el suero escurrido, hasta equipos más sofisticados que operan en continuo y que prensan, cortan, moldean y luego escurren el suero.

1.4.10. Moldeo

La cuajada es cortada en bloques y depositada en moldes con perforaciones con tapa. Además de dar forma y tamaño al queso, esta práctica se efectúa para eliminar parte del suero que queda y facilitar la unión de los granos de cuajada.

1.4.11. Prensado

En quesos de pasta blanda, esta etapa no se realiza, sólo se deja reposar la masa en los moldes individuales hasta obtener la acidificación deseada. En los quesos de pasta más dura, se realiza un prensado en los moldes perforados para ayudar a que se produzca la expulsión final del suero intergranular, darle forma al queso, conseguir una determinada textura, una superficie firme, y la humedad necesaria. Los moldes se apilan unos sobre otros en una prensa vertical, efectuándose el volteo periódico de manera de lograr un prensado uniforme. El tiempo de prensado dependerá del pH final que se alcance en la masa, el cual deberá ser de 5,10-5,20.

1.4.12. Salado

La etapa de salado tiene como objetivo realzar el sabor, aportar a la formación de corteza, actuar como complemento de desuerado, inhibir el desarrollo de la flora indeseable e, indirectamente, actuar sobre la microflora utilizada como fermento.

El salado puede realizarse directamente en la leche, en la cuajada, en la superficie del queso o, lo más comúnmente utilizado en la industria, por inmersión en una salmuera. La sal (NaCl) es el componente principal de la salmuera, y debe complementarse con el agregado de cloruro de calcio (CaCl_2) para favorecer al equilibrio del sistema. Durante el proceso de salado, se produce un intercambio de Ca^{2+} por iones Na^+ en las moléculas de paracaseína lo que hace a la cuajada más suave. Los quesos deberán presentar, antes del ingreso a salmuera, igualdad de temperatura y pH en todo su volumen de modo que los intercambios sean homogéneos. En general, la cuajada se expone a la sal a un pH de 5,2-5,4. Si el pH es inferior habrá más iones H^+ que Ca^{2+} unidos a la molécula de paracaseína y, en consecuencia, habrá suficiente incorporación de iones Na^+ , dando lugar a un queso duro y quebradizo. Por el contrario, con un pH superior, habrá un exceso de iones Ca^{2+} vinculados a la molécula de paracaseína, causando una incorporación excesiva de Na^+ en la molécula, lo que resulta en un queso más bien suave (Guinee y Fox, 2004). Microestructuralmente, los quesos salados tienen fisuras más homogéneas y más pequeñas en comparación con los quesos sin sal (McMahon y Oberg, 1998).

La incorporación de sal en el queso depende no sólo de la concentración de la salmuera sino también de su temperatura, y de la forma, porosidad y peso del queso. Una vez completado el salado, los quesos son extraídos de la salmuera y colocados en la cámara de oreo.

1.4.13. Tratamientos superficiales

Existen diversas posibilidades de tratamiento superficial para los quesos de pasta semidura y dura para limitar el desarrollo de contaminación durante la maduración: cobertura mediante film de materia grasa, tratamiento con sorbato de sodio o de potasio, envasado al vacío, tratamiento con natamicina (pimaricina) y pinturas incoloras o coloreadas con agregado de sorbato y natamicina.

Contrariamente, si lo que se desea obtener son quesos con desarrollo fúngico superficial intencional, en vez de aplicar una opción para evitar el desarrollo de contaminación superficial, lo que se aplicará es el inóculo de la cepa deseada, por rociado o por inmersión

(alternativamente al método nombrado en el punto 1.4.4, o bien por inoculación directa mediante pinchazos en la cuajada como es el caso del queso azul.

En Argentina existen dos tipos de quesos legislados según el CAA los cuales utilizan hongos en su producción, uno de ellos es el queso azul en el cual se utiliza *Penicillium roqueforti* y el otro es el queso camembert o brie que utiliza *Penicillium camemberti*.

1.4.14. Maduración

En esta etapa se produce una serie de reacciones y cambios físico-químicos que determinan el aroma, el sabor, la textura, el aspecto y la consistencia del queso. La maduración puede durar desde unas horas, hasta varios meses. Cada tipo de queso tiene una forma de maduración diferente que depende de muchos factores como el tipo de leche y la coagulación. Esta tiene lugar en cámaras de maduración con temperatura y humedad relativa controladas. Cuanto más tiempo permanezca el queso en fase de maduración, más agua perderá, por lo que la textura será más dura y el sabor más fuerte. Una vez acabado el proceso de maduración, se considera que el queso está en su punto óptimo para el consumo. En el punto 2 se profundizará sobre la bioquímica que se desarrolla durante este proceso.

La Maduración se verá afectada por los siguientes factores:

- *Temperatura y humedad:* es recomendable madurar a temperaturas bajas para que los procesos sean lentos y controlados. Cuanto menor es la humedad, las reacciones son más lentas, y para favorecerlas se aumenta la temperatura. La humedad del ambiente debe mantenerse por encima del 85 % h.r., principalmente para los quesos con microflora superficial, que no crecen si se genera una corteza.
- *Contenido de sal:* determina el agua libre, lo cual resulta selectivo para el crecimiento de aquellos microorganismos que resisten las altas concentraciones de sal, como ser *Micrococcus*, levaduras y *Penicillium*. Los quesos recién elaborados presentan mayor concentración de sal en la superficie, difundiéndose hasta llegar al final del período de maduración con una concentración de sal más o menos homogénea en toda la masa. El aumento de la concentración de sal en el interior del queso condiciona la velocidad de los procesos enzimáticos (Olson, 1982).

– *Contenido de oxígeno*: es importante mantener altos niveles de oxígeno en el aire de las cámaras de maduración para quesos de maduración superficial, lo cual se logra utilizando ventilación forzada. Los microorganismos aeróbicos como los hongos, utilizan el oxígeno y cuando este disminuye se produce amoníaco y otros gases.

1.4.15. Envasado

Al culminar la maduración, el queso estará listo para su comercialización, procediendo al envasado y etiquetado. El uso de envases permite extender la vida útil de los alimentos protegiéndolos del entorno, evitando su deshidratación y preservando su calidad.

Una atención especial se merecen los quesos con moho superficial. En estos casos en los que el desarrollo fúngico superficial quiere preservarse, los sistemas de atmósferas modificadas o vacío no resultan adecuados, ya que los envases deben garantizar mínimas concentraciones de oxígeno que permitan la viabilidad celular. Canel et al. (2019) demuestran que el uso de material microperforado permite el intercambio de oxígeno y crea una elevada humedad relativa, permitiendo la viabilidad de *P. nalgiovense* en embutidos secos fermentados. Respecto a quesos madurados con hongos, Floros et al. (2000) y Champagne et al. (2003), puntualizan la dificultad en el diseño de envases compatibles con estos productos, ya que se debe mantener un control en los niveles de O_2 y CO_2 que permita mantener viables los hongos sin ocasionar sabores indeseables. Aguilera et al. (2011) demostraron que una atmósfera modificada con un 2 % de O_2 resulta suficiente para prolongar la vida útil de un queso de pasta blanda con desarrollo fúngico superficial.



Figura 1: Diagrama de bloques del proceso de elaboración de queso.

*Procedimiento a realizar según características del queso a elaborar

2. Procesos bioquímicos durante la maduración de los quesos

Durante la maduración ocurren numerosos cambios bioquímicos que ocasionan que la cuajada se transforme en una masa homogénea y se desarrollen las características organolépticas típicas de cada variedad de queso: aspecto, textura, sabor y aroma (Ardö y McSweeney, 2001).

Las reacciones bioquímicas que suceden durante la maduración suelen agruparse en cuatro categorías: a) proteólisis y catabolismo de aminoácidos, b) lipólisis y catabolismo de ácidos grasos libres, c) glicólisis de lactosa residual y catabolismos del lactato, y d) catabolismo del citrato (Figura 2).

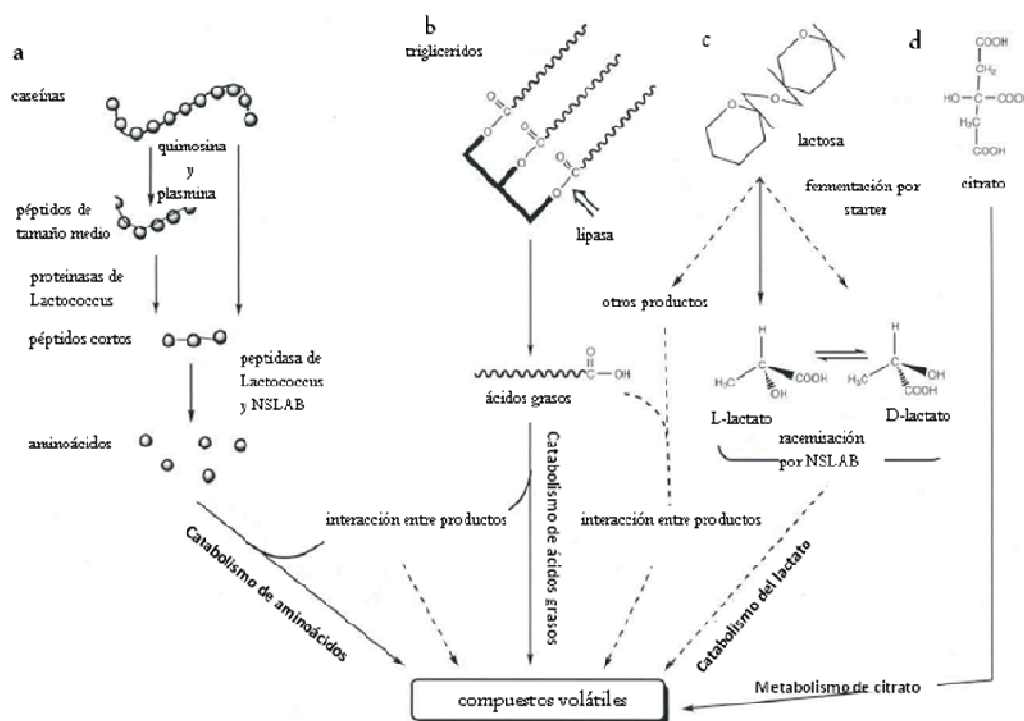


Figura 2: Caminos bioquímicos que ocurren durante la maduración de queso. a) Proteólisis y catabolismo de aminoácidos, b) Lipólisis y catabolismo de ácidos grasos libres, c) Glicólisis de lactosa residual y catabolismo del lactato, d) Catabolismo del citrato

La proteólisis es el evento bioquímico más importante y complejo que se produce durante la maduración de los quesos. La importancia de la misma está dada por su efecto en el desarrollo de textura y flavor del producto. Dentro de la proteólisis se distinguen la proteólisis primaria, responsable de la textura blanda al principio de la obtención de la cuajada, y la

proteólisis secundaria, en la que se generan péptidos pequeños y de alta hidrofobicidad que producen la sensación de amargor. Estos péptidos sirven como substratos precursores para las proteinasas y peptidasas bacterianas y/o fúngicas que los transforman en péptidos aún más pequeños y aminoácidos libres (McSweeney y Sousa, 2000; Ferrandini Banchemo, 2006). Asimismo, el aumento de pH originado por la liberación de amoníaco influye en el sabor y en la textura. Se ha demostrado que la influencia más importante de la proteólisis en el desarrollo del flavor del queso radica en la producción de aminoácidos libres, precursores por excelencia de compuestos de aroma y sabor (McSweeney, 2004).

2.1. Evaluación del avance de maduración de los quesos

Las características del queso que se quiera obtener serán, junto a los requisitos reglamentarios si existieran, los que estipularán el tiempo de maduración a aplicar. Ante la inexistencia de parámetros que establezcan cómo determinar el tiempo óptimo de maduración, debe recurrirse al desarrollo de análisis sensoriales, físicoquímicos y microbiológicos que permitan caracterizar el producto a lo largo de su proceso madurativo.

2.1.1. Grado de Proteólisis

La proteólisis provoca la aparición de nuevos productos con propiedades físicoquímicas diferentes a las de la proteína inicial. El fraccionamiento de estos productos permite determinar la importancia de la proteólisis, la cual se puede evaluar por la medición de diferentes técnicas. Estas se pueden clasificar en 2 grandes grupos: precipitaciones fraccionadas (a pH 4,6 o en presencia de ácido tricloroacético), y separación en función de características físicoquímicas. Estas últimas, a su vez, se pueden dividir en separaciones por carga (electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de urea), pH isoelectrico (isoelectroenfoque) o tamaño (electroforesis en medio SDS).

La determinación fraccionada de los diferentes componentes nitrogenados resultantes de la degradación proteica, tales como el nitrógeno soluble total, no proteico, el titulable en presencia de formol y el amoniacal han servido de índice clásico de la extensión y profundidad

de la maduración del queso (Fernández Salguero et al., 1989). El índice de maduración es la relación en porcentaje entre el nitrógeno soluble y el nitrógeno total, dado que corresponde a aquellas fracciones producidas por hidrólisis enzimática de la caseína (Brito et al., 1995). El método más común para estimar el grado de proteólisis en queso es la determinación del contenido de nitrógeno de las diferentes fracciones, por el método de Kjeldahl.

Las micelas de caseína están formadas por un 92 % de caseína y un 8 % de sales (principalmente fosfato cálcico coloidal, CCP) y contienen el 80 % de la proteína total de la leche. Estudios basados en la movilidad molecular (cromatografía, electroforesis) han puesto de manifiesto que la micela de caseína se compone de cuatro tipos principales de caseínas individuales: α S1-, α S2-, β - y κ -caseína (Ruettimann y Ladisch, 1987; Riel, 1991; Dalglish, 1993; Lomholt, 1996). La Tabla 3 expone la abreviación sugerida, su porcentaje en la leche y el peso molecular para cada tipo de caseína (Farrell et al., 2004).

Tabla 3: Caseínas de la leche: su abreviación, proporción en leche y peso molecular

Proteína (abreviación sugerida)	Composición en leche descremada (g/L)	Peso molecular (Da)
α S1- Caseína (α S1-CN)	12-15	23.615
		23.542
α S2- Caseína (α S2-CN)	3-4	25.226
		24.023
β - Caseína (β -CN)	9-11	23.983
		24.092
κ - Caseína (κ -CN)	2-4	19.037
		19.006

A estos cuatro tipos de caseínas se les puede añadir varios grupos de proteínas minoritarias como la γ -CN, que es un fragmento procedente de la proteólisis de la β -CN (Walstra y Jenness, 1987; Fox y Mulvihill, 1990) y la λ -CN derivada de la α S1-CN (Fox y Mulvihill, 1990).

La plasmina es de gran importancia para la proteólisis primaria de la caseína durante la maduración del queso, actúa preferentemente sobre las caseínas β y α S2, y en menor medida sobre las α S1, degradandolas a γ -CN, proteasa peptona y posiblemente λ -CN (Lawrence et al, 1988; Farkye y Fox, 1992; Broome y Limsowtin, 1998). La κ -caseína es resistente a la acción de la plasmina. En el queso, la influencia de la plasmina se considera generalmente limitada,

siendo responsable de la hidrólisis de la β -caseína en la mayoría de los quesos madurados por bacterias lácticas. Sin embargo, su actividad cobra importancia en algunos quesos, dependiendo fundamentalmente de la temperatura de cocción y del pH durante la maduración (Fox, 2003).

La α_{s1} -CN es la proteína más susceptible al ataque de la quimosina, mientras que las β -CN, la α_{s2} -CN y la *para*- κ -CN han demostrado ser bastante resistentes al ataque del coagulante en el queso (McSweeney y Fox, 1998).

Los hongos poseen un potente sistema proteolítico constituido por metaloproteasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Trieu-Cuot y Gripon, 1982). En quesos de superficie y pasta enmohecida la proteólisis, en los primeros estadios de maduración, se debe fundamentalmente a la acción del cuajo y la plasmina pero durante el crecimiento, desarrollo y esporulación de los hongos, son las enzimas fúngicas quienes dominan la proteólisis (Le Bars y Gripon, 1981).

La electroforesis en gel de poliacrilamida es uno de los análisis más completos incorporados al estudio de maduración de quesos, dando una visión cualitativa y cuantitativa de la proteólisis (Astete, 1989; Brito, 1993). En él, los componentes de la proteína y de los péptidos, son separados debido a que las cuatro caseínas que la conforman tienen pesos moleculares diferentes, distinta secuencia de aminoácidos y grado de fosforilación, para luego ser visualizadas a través de un tinte específico (Van Hekken y Thompson, 1992; Leaver et al., 1993). La principal dificultad asociada con este método es la cuantificación de varios componentes, particularmente en muestras con mayor maduración donde las bandas pueden unirse entre sí. Además, debido a su bajo peso molecular, los péptidos pueden ser expulsados fuera de la matriz del gel durante el tinte (Leaver et al., 1993). Urea-PAGE es una herramienta poderosa para monitorear la proteólisis durante las primeras etapas de la maduración del queso y para comparar patrones de hidrólisis de caseína en quesos elaborados a partir de la leche de diferentes especies (Marcos et al., 1979; Sousa y Malcata, 1997). Esta técnica es ampliamente utilizada para monitorear la proteólisis ya que sirve para determinar proteínas basándose en una combinación de carga y masa. Por el contrario, el dodecilsulfato de sodio (SDS) -Page, es una técnica más utilizada en el área bioquímica, y no tan aconsejable para estudiar proteólisis en

quesos, ya que se basa en la resolución de proteínas en función del tamaño y, en este caso, las caseínas tienen pesos moleculares similares.

Las técnicas cromatográficas, particularmente las cromatografías líquidas de alta performance y rápida resolución (HPLC y FPLC), también han sido utilizadas para el análisis de la proteólisis en quesos. Este sistema, usado para separar y cuantificar las proteínas de la leche, es de alta sensibilidad y permite obtener resultados en poco tiempo (Leaver et al., 1993).

2.1.2. Pérdida de peso

Durante la maduración el queso pierde humedad debido a que se produce la evaporación de agua a través de la superficie. Esto provoca la disminución en su peso y un incremento progresivo del extracto seco. Este fenómeno influye, en gran medida, en los procesos degradativos que ocurren en el interior del producto al posibilitar la solubilidad y difusión de las enzimas y de los productos de la degradación del proceso bioquímico. Es por eso, que los quesos con mayor humedad maduran más rápido que los más secos (Alais, 1985). Además, la pérdida de humedad se evidencia en el endurecimiento del producto. El control de la pérdida de peso usando las mismas unidades en todos los tiempos resulta un buen indicador del avance de este parámetro.

2.1.3. pH

La formación de ácido láctico durante la elaboración y el metabolismo de la lactosa residual en las etapas iniciales de maduración reducen el pH del queso a 5,1-5,3, dependiendo de la variedad. Durante la maduración el pH del queso aumenta debido a la formación de compuestos alcalinos nitrogenados y/o por el catabolismo del ácido láctico. Este parámetro actúa como un modulador de la fermentación y actúa sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas. A pH bajo no hay proteólisis, por lo cual la neutralización por amoníaco y lactatos permiten la maduración en aquellos casos en que se desea este fenómeno. Según Alais (1985), el pH óptimo para la acción de las enzimas en el proceso de las proteólisis es alrededor de 5,2, dependiendo del contenido de sal. Valores elevados de pH aumentan la actividad de los microorganismos y sus enzimas, acelerando los procesos de degradación, en cambio a pH

inferiores a 5 se reduce notablemente la velocidad de degradación de los componentes, consecuentemente los quesos más ácidos maduran más lento (Brito et al., 1995).

2.1.4. Lipólisis

La extensión de la lipólisis durante la maduración varía con la variedad del queso. En quesos tales como Cheddar, Emmental, Gruyere y tipo Gouda, el nivel de lipólisis es bajo, mientras que en quesos madurados con hongos, como los azules, y en quesos duros, se observa una extensa lipólisis. La concentración de ácidos grasos libres (AGL) aumenta durante la maduración y tiene un importante impacto en el flavor del queso. Una determinada concentración de ácidos grasos libres es necesaria en el balance correcto para lograr el flavor óptimo, pero un exceso de los mismos o un balance incorrecto genera off-flavors, especialmente en variedades de quesos suaves. El contenido de AGL puede determinarse por diferentes métodos, entre ellos el colorimétrico por titulación, el de silica gel, cromatografía gaseosa y HPLC (Deeth y Fitzgerald, 1976; Park, 2001; Subramanian y Rodríguez-Saona, 2010).

2.1.5. Determinación del color

El color representa el primer factor organoléptico que percibe el consumidor, permitiéndole tener un criterio de la calidad del alimento, lo que lo convierte en una potente herramienta para el control de calidad. El color puede ser evaluado de forma visual e instrumental. Ambos métodos presentan ventajas e inconvenientes. Los métodos sensoriales son necesarios para conocer la valoración del consumidor, pero no resulta objetivo por ser condicionado por las condiciones de iluminación, el ángulo de observación y las preferencias individuales del observador. Además, el ojo humano distingue cualitativamente el color, pero no lo cuantifica. La ventaja del empleo de métodos instrumentales, colorímetros, para cuantificar el color es que estos son repetibles y objetivos. Su desventaja es que, a menudo, son difíciles de interpretar por las personas no familiarizadas con ellos (Canada, 2001). El colorímetro mide la luz reflejada por el alimento por medio de un foto detector, codificando esta señal en términos de algún sistema de medición lumínico de espacio polar, como es el caso de la Escala de CIE (Comisión Internationale de L'Eclairage) (Chacón Villalobos et al., 2009).

El color de los quesos depende de la composición inicial de la leche, de la manufactura y de las condiciones de maduración (Lucey et al., 2003). Alvarez et al. (2007) estudiaron las correlaciones entre la composición química básica y determinados parámetros de textura y color, obteniendo que al aumentar el contenido acuoso en los quesos mostraban mayor claridad, a mayor contenido de sólidos menor era la luminosidad y, a su vez, que a mayor cantidad de sólidos en los quesos mayor resultaba la saturación del color.

La autoridad en la ciencia de la luz y el color (CIE) ha definido espacios de color, incluyendo CIE XYZ, CIE L*a*b*, y CIE L*u*v*, para comunicar y expresar el color objetivamente. El espacio de color L*a*b*, también referido como CIELAB, es actualmente uno de los espacios de color más populares y uniformes usado para evaluar el color de un objeto por correlacionar los valores numéricos de color consistentemente con la percepción visual humana. El espacio de color L*a*b* utiliza una terna de ejes ortogonales, basado en el modelo de los colores opuestos, y define cada color a partir de unas coordenadas denominadas L* (claridad/oscuridad: 0, negro, a 100, blanco), a* (coordenadas rojo/verde: +a indica rojo; -a indica verde), y b* (coordenadas amarillo/azul: +b indica amarillo; -b indica azul) (Gilbert, 1992). De esta manera, los colores se representan en el espacio a unas distancias proporcionales a las diferencias visuales entre ellos. Según Cassasa y Sari (2006) la llamada “Diferencia de color CIE-LAB” (ΔE^*) cuantifica numéricamente la diferencia de percepción de color, para el ojo humano, entre dos muestras del alimento. La diferencia de color (ΔE^*) viene determinada por la siguiente ecuación (Calvo y Durán, 1997):

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Los valores de ΔE^* obtenidos para una muestra en referencia al estándar permiten evidenciar si el observador podrá o no percibir la diferencia de color. En la Tabla 4, se presenta la relación entre el juicio del observador y ΔE^* (Ramírez Navas et al., 2010).

Tabla 4: Relación entre el juicio del observador y la diferencia de color ΔE .

Diferencia percibida sensorialmente	Valor ΔE^* (instrumentalmente)
Ninguna	0-0,7
Ligera	0,7-2,5
Notable	2,5-3,0
Apreciable	3,0-6,0
Considerable	6,0-12,0
Extraordinaria	12,0

2.1.6. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial es una herramienta muy útil para medir y analizar las características sensoriales del alimento (percibidas por los sentidos de la vista, gusto, tacto, olfato y oído) y su relación con la preferencia del consumidor (Lawlor y Delahunty, 2000), contribuyendo de esta manera a la caracterización y optimización de un nuevo producto.

Las técnicas de evaluación sensorial se realizan en condiciones controladas de laboratorio y son realizadas con evaluadores seleccionados y entrenados previamente (en el caso de los ensayos descriptivos y de discriminación) y con consumidores (en el caso de las pruebas afectivas). Las mismas se pueden clasificar en ensayos de discriminación, descriptivos y afectivos. A continuación, se realiza una breve explicación de cada una de ellas.

2.1.6.1. Ensayos de discriminación

Las pruebas discriminativas son utilizadas para determinar si existe o no diferencia perceptible entre muestras. Son sencillas y prácticas de implementar por lo que ha sido adoptada por la industria en casos en los cuales, por ejemplo, se realizan modificaciones a las formulaciones de producto y se traza como objetivo verificar si el evaluador identifica diferencias. En este tipo de pruebas no es de interés cuantificar la magnitud de las diferencias ni el sentido de éstas (Lawless y Heymann, 1999). Algunos ejemplos de pruebas discriminativas incluyen comparación pareada, triangular, dúo-trío, dos de cinco y de categorización. Los ensayos de categorización tienen como objetivo establecer si existe diferencia y determinar la magnitud de la misma entre dos o más muestras en cuanto a diferentes atributos de interés (opor

ejemplo, olor, textura, flavor entre otros). Se basan en el establecimiento de escalas de respuestas cuya elección dependerá de los objetivos del estudio y de los productos sometidos al mismo. El método estándar que describe la Norma ISO 22935 se basa en que cada evaluador experto evalúa las muestras independientemente y usa una escala de intervalo de cinco puntos para estimar la magnitud de una posible desviación de una especificación de producto preestablecida. Cuando la puntuación de cada evaluador es 3 o inferior, la puntuación se complementa con términos comunes que describen el carácter de la desviación sensorial.

2.1.6.2. Pruebas descriptivas

En las pruebas descriptivas los evaluadores establecen los descriptores que definen las características sensoriales de un producto y utilizan dichos descriptores para cuantificar las diferencias existentes entre varios productos. La caracterización de las muestras mediante esta metodología se realiza con mayor frecuencia por paneles entrenados y pueden ser tanto de carácter cualitativo como cuantitativo. En las descripciones cualitativas se evalúa el producto con respecto a características o descriptores sensoriales sin tener en cuenta la intensidad, mientras que en los cuantitativos se establece el grado en el cual una característica está presente en la muestra. Este tipo de ensayos es útil para actividades de investigación y desarrollo, el establecimiento de especificaciones de producto, la definición de atributos para ensayos con consumidores y para la comparación de los resultados con información derivada de métodos instrumentales y analíticos (Zuluaga Arroyave, 2017).

Las pruebas descriptivas pueden clasificarse en: pruebas descriptivas simples, perfil sensorial cuantitativo descriptivo y perfil de libre elección. El Análisis Descriptivo Cuantitativo, conocido por sus siglas en inglés (QDA), es una metodología validada, confiable y precisa para realizar una caracterización sensorial completa de un producto. Implica seleccionar un grupo de individuos con capacidades sensoriales superiores al promedio de la población, definir los atributos sensoriales a evaluar y su definición y realizar un entrenamiento en el reconocimiento y evaluación con escalas de cada uno de los atributos seleccionados. En esta metodología las

muestras se evalúan por duplicado o triplicado, utilizando escalas no estructuradas de 10 puntos. Los datos se analizan por análisis de varianza, estudiando la concordancia y reproducibilidad del panel y de cada uno de los jueces.

2.1.6.3. Pruebas afectivas

Estas buscan que el panelista exprese el nivel de agrado, aceptación y preferencia de un producto y usualmente utilizan escalas para la calificación de las muestras. Se pueden clasificar en pruebas de aceptabilidad en las cuales el evaluador informa el grado de satisfacción que tiene frente a la muestra y las respuestas pueden ir desde me disgusta muchísimo hasta me gusta muchísimo según el diseño de la escala; y en pruebas de preferencia en las que se indaga al panelista sobre cuál de las muestras prefiere. El principal ejemplo de estas pruebas es el ensayo con consumidores. Entre sus utilidades, permite comparar un producto contra sus competidores, definir formulaciones, estudiar el efecto de variables comerciales o de presentación e identificar la vida útil de un alimento. El número mínimo de consumidores recomendado es de 40.

3. Los mohos y la industria alimentaria

Los hongos filamentosos o mohos, son organismos eucariontes que poseen una distribución cosmopolita en la naturaleza debido a su excelente capacidad enzimática y de crecimiento en amplios rangos de pH y a_w . Son capaces de crecer en todo tipo de alimentos, como cereales, carne, leche, frutas, vegetales, nueces, grasas y sus derivados. Son hongos microscópicos constituidos por una serie de ramas tubulares denominadas hifas cuyo conjunto forma el micelio. Su crecimiento en los alimentos genera varios tipos de alteraciones: sabores desagradables, toxinas, decoloración, podredumbre, presencia de antibióticos o de alérgenos (Gravesen et al., 1994; Tipples, 1995; Filtenborg et al., 1996), lo que implica importantes pérdidas económicas y un posible riesgo para la salud.

A pesar de los aspectos negativos antes mencionados los hongos filamentosos resultan ser agentes de transformación muy útiles para la industria. Desde la antigüedad han sido

utilizados en la elaboración de alimentos, por muchas culturas en todo el mundo. Actualmente se utilizan para la elaboración de gran diversidad de productos fermentados, principalmente quesos y carnes, también en gran variedad de alimentos salados, como la salsa de soja y tempe, y dulces como el Brem de Indonesia (Chávez et al., 2011). Los mohos participan en diferentes aspectos durante la elaboración del producto, contribuyendo a su maduración, evitando el crecimiento de mohos y bacterias indeseables y proporcionando al producto sabores y colores característicos. Por ejemplo, en el queso azul (*Penicillium roqueforti*) y los quesos Camembert y Brie (*Penicillium camemberti*), la presencia de mohos es fundamental, ya que además de otorgarles la apariencia típica y deseable, contribuyen a la formación de la textura y el flavor característico a través de la acción de sus proteasas y lipasas. Otro hongo comúnmente utilizado en la industria alimenticia es el *Penicillium nalgiovense*, siendo la especie más frecuentemente aislada de productos cárnicos madurados con mohos. La mayoría de los mohos implicados en fermentaciones pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Amylomyces* y *Mucor* (Chávez et al., 2011).

4. Micotoxinas y antibióticos

Durante la fase exponencial de crecimiento los de los hongos se producen procesos metabólicos primarios que le proporcionan a las células la energía y las macromoléculas indispensables para su mantenimiento y crecimiento (Owen, 1991; Roussos y Perraud Gaime, 1996). En la fase estacionaria se producen metabolitos secundarios a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones sub-óptimas y de estrés, generalmente debido al agotamiento de nutrientes en el medio y procesos de diferenciación y esporulación (Swanson, 1987). La cantidad formada de estos metabolitos depende del genotipo de la cepa, de los parámetros nutricionales, ambientales y de la historia de desarrollo del moho (Abarca et al., 2000; Moss, 1991). Es por ello, que una especie productora puede tener cepas que no evidencien producción, o puede no evidenciar producción cuando se desarrolla en determinados sustratos o condiciones, ya que los requisitos para el crecimiento del hongo no son

los mismos que para la generación de estos compuestos (Chaparro Pedraza, 2010). Dentro de este grupo, se encuentran las micotoxinas y los antibióticos.

4.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos con diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, producidas por hongos toxicogénicos (Soriano del Castillo, 2015). En la actualidad se conocen más de 300 micotoxinas (Alshannaq y Yu, 2017) de muy diferentes estructuras químicas y diferentes modos de acción en los seres vivos, siendo las más importantes, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, las toxinas producidas por mohos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Arroyo Manzanares et al., 2014). Al ser consumidas por animales y el hombre a partir de alimentos contaminados, originan padecimientos denominados micotoxicosis con efectos tóxicos, teratógenos, inmunosupresores y carcinogénicos, de ahí su gran importancia en el campo de los alimentos y de la salud (Cortés Sánchez y Mosqueda Olivares, 2013). Estos efectos adversos pueden ser agudos o crónicos, y pueden afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario. Los síntomas causados por las micotoxinas suelen ser tan diferentes unos de otros, como lo son las propias estructuras químicas de dichas toxinas (Soriano del Castillo, 2015).

4.2 Antibióticos

4.2.1. Definición y aplicación

Los antibióticos son los metabolitos secundarios más importantes desde el punto de vista farmacéutico y sanitario, previniendo o tratando enfermedades en el hombre, animales y plantas. Estas moléculas biológicamente activas, son definidas como sustancias químicas producidas por organismos vivos (hongos y bacterias) o mediante síntesis química. Tienen una marcada actividad antimicrobiana, es decir, pueden eliminar o evitar el crecimiento de diversos microorganismos alterando diferentes componentes y procesos celulares. Los antibióticos

incluyen un amplio grupo de compuestos, siendo clasificados en base a factores como su estructura química, modo de acción, fuente microbiana, espectro antimicrobiano y modo de producción. La aparición creciente de microorganismos resistentes a antibióticos por su uso indiscriminado, la toxicidad y efectos secundarios en la administración de los mismos y las infecciones por patógenos oportunistas mayoritariamente de origen fúngico, son un problema de salud de gran importancia, principalmente en los pacientes inmunodeprimidos (Newman y Cragg, 2007; Molnár et al., 2010; Marinelli y Genilloud, 2012).

4.2.2. *Penicilina*

Alexander Fleming, mientras estudiaba las variantes de *estafilococos* en el laboratorio descubrió la sustancia antibacteriana a la que llamó “penicilina” por ser producida por un hongo del género *Penicillium* (Restrepo, 1997).

Las penicilinas pertenecen al grupo de los β -lactámicos y su núcleo es el 6-aminopenicilánico, cuya estructura básica consiste en un anillo tiazolidínico unido a un lábil sistema cíclico β -lactámico (Figura 3A). Las penicilinas difieren en la cadena lateral (R), que determina muchas de las características antibacterianas, farmacocinéticas y de solubilidad (Blanca, 1994; Bartlett y Dearden, 1995; Restrepo et al., 1998).

Las penicilinas naturales son las que se obtienen por fermentación de algunos hongos del género *Penicillium* sp., y corresponden a la Bencilpenicilina (Penicilina G sódica y potásica), pentenilpenicilina (Penicilina F), heptilpenicilina (Penicilina K) y parahidroxipenicilina (Penicilina X). Las penicilinas naturales son inestables ante la temperatura y la luz solar, son higroscópicas, se hidrolizan rápidamente, se oxidan fácilmente y son sensibles a las variaciones de pH (Sanjurjo, 1997; Waites et al., 2001). La única de las penicilinas que se utiliza clínicamente es la Penicilina G o Bencilpenicilina (Figura 3B) y corresponden a la sódica, potásica, procainica y benzatínica. Por su eficacia, poca toxicidad y bajo costo, es el antibiótico de elección en las infecciones por microorganismos sensibles a ella, principalmente cocos grampositivos y gramnegativos, y bacilos grampositivos (Seija y Vignoli, 2006).

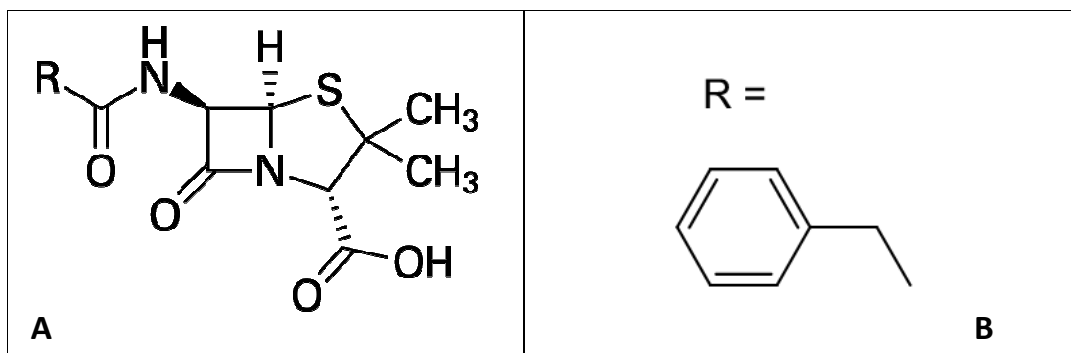


Figura 3: A) Estructura molecular del núcleo de las penicilinas. B) Estructura del grupo acilo de la Penicilina G o Bencilpenicilina.

El uso de penicilina en veterinaria implica un riesgo al quedar como residuos en leche y carne, si no se aplican buenas prácticas agrícolas (Berruga et al., 2016). La presencia de penicilina en alimentos debe evitarse debido a posibles reacciones alérgicas y al desarrollo de resistencias en bacterias patógenas (Laich et al., 2002; Philips et al., 2004; Gamboa, 2009).

Se recomienda que la ingesta diaria admisible (IDA) de alimentos que contengan estos antibióticos garantice menos de 30 μg de penicilina/ persona / día. Por debajo de este valor se considera que no existe riesgo toxicológico para la salud humana (Comisión del Codex Alimentarius, 2017). A partir del IDA, y considerando la ingesta estimada de los alimentos pertinentes, por parte de los seres humanos, se determina el límite máximo de residuos (LMR), que es la concentración (expresada en $\mu\text{g}/\text{kg}$) inocua y admisible de residuos antimicrobianos en los respectivos productos de origen animal. La estimación de este valor debe garantizar que cuando se ingieren los alimentos, no se exceda al IDA (Gómez Ramos, 2014). Los LMRs son regulados y surgen como una medida de protección a los consumidores de los restos de drogas veterinarias en los alimentos, no siendo así por la producción de antibióticos por parte del desarrollo de microorganismos en los mismos. El Codex Alimentarius establece los siguientes límites máximos de residuos de penicilina (Bencilpenicilina / Bencilpenicilina procaínica): 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) en leche y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) en músculos, hígado y riñón (JECFA, 1990; Comisión del Codex Alimentarius, 2017). La Comisión Europea (2009) adopta y regula en leche y músculos, grasa, hígado y riñón, teniendo en consideración esos límites. Según el modelo de dieta típica de la Unión Europea, el cual consiste en 300 g de músculo, 1500 g de leche, 100 g

de hígado y 50 g de riñón, los valores máximos estimados de ingesta diaria para residuos de bencilpenicilina en los LMR son 15 µg / persona / día (músculo), 5 µg / persona / día (hígado), 2,5 µg / persona / día (riñón) y 6 µg / persona / día (leche), dando un total de ingesta diaria máxima teórica (IDMT) de 29 µg / persona / día (JECFA, 1990; Gómez Ramos, 2014; Comisión del Codex Alimentarius, 2017).

En Argentina, el CAA establece el control de bencilpenicilina y bencilpenicilina procaínica, únicamente en leche, considerando 4 µg/kg (ppb) como límite máximo del residuo (CAA, Capítulo VIII, art. 556, 2014).

Algunos hongos como *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium nalgiovense* son conocidos productores de penicilina. Se ha comprobado que *P. nalgiovense* es productor de penicilina F y G (Frisvad y Samson, 2004) y en cantidades comparables con *Penicillium chrysogenum*, pero la generación de la misma varía según la cepa utilizada (Andersen y Frisvad, 1994; Laich et al., 1999). Faber y Geisen (1994) demostraron que la síntesis de penicilina en *P. nalgiovense* está mediada por tres genes: *pcbAB*, *pcbC* y *penDE* (Figura 4). El gen *pcbAB* codifica [8-(L-α-aminoadipyl)-L-cisteina-D-valina] sintetasa, el gen *pcbC* codifica isopenicilina-N-sintetasa y el *penDE* codifica la acil coenzima A: complejo isopenicilina-N-aciltransferasa. Los primers utilizados para realizar la amplificación de un fragmento de cada uno de estos genes son: acv1 y acv2 (el fragmento que amplifica posee 550 pb pertenecientes al gen *pcbAB*), ipns1 e ipns2 (el fragmento que amplifica posee 600 pb pertenecientes al gen *pcbC*) y aat1 y aat2 (el fragmento que amplifica posee 650 pb pertenecientes al gen *penDE*).

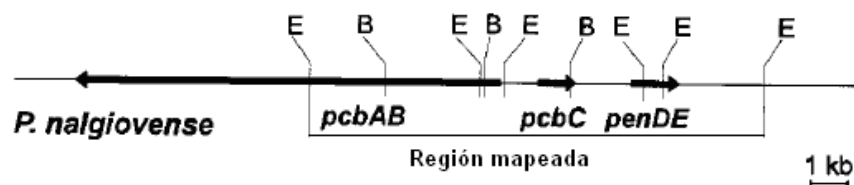


Figura 4: Regiones del ADN con los genes que codifican la producción de penicilina

5. Género *Penicillium*

El género *Penicillium* es muy conocido distribuido en una amplia gama de hábitats, desde el suelo, vegetación, aire, ambientes interiores y diversos productos alimenticios. En la actualidad, la Comisión Internacional de *Penicillium* y *Aspergillus* (ICPA) reconoce 354 especies (Visagie et al., 2014). Es el género de hongos que se encuentra con mayor frecuencia en los alimentos. Este género representa un gran impacto en la vida humana dado que varias de sus especies son patógenos destructivos de cultivos alimentarios (Frisvad y Samson, 2004; Samson et al., 2010), son resistentes a conservantes, muchos son psicrótrofos capaces de causar el deterioro de alimentos refrigerados (Pitt et al., 2000), así como algunas especies son capaces de producir micotoxinas y penicilina en alimentos (Sunesen y Stahnken, 2003). Sin embargo algunas especies tienen impactos positivos debido a su aplicación tecnológica en las industrias farmacéutica, en la fabricación de antibióticos (*P. chrysogenum*), y en la alimentaria, como starters de productos madurados. Las especies de *Penicillium* predomina la micobiota de productos cárnicos curados, y de varios tipos de quesos, como Camembert, Brie y los denominados quesos azules, contribuyendo de diferentes maneras a la maduración del producto (Chávez et al., 2011).

El género *Penicillium* se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada similar a un pincel que termina en células conidiógenas denominadas fiálides. La forma de dicha estructura determina la división taxonómica principal del género en subgéneros. Para determinar el subgénero al que pertenece el aislado de *Penicillium*, debe contarse el número de puntos de ramificación entre las fiálides y el estipe (Figura 5). Existen cuatro subgéneros: *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* y *Penicillium*.

En el subgénero, *Aspergilloides*, hay un punto de ramificación, es decir las fiálides derivan directamente del estipe como un solo verticilo (monoverticilados). Los subgéneros *Furcatum* y *Biverticillium* tienen dos puntos de ramificación (biverticilados) y el subgénero *Penicillium*, comprende a las especies que tienen tres (terverticilados) y a veces cuatro (tetraverticilados), niveles de ramificaciones (Pitt y Hocking, 2009).

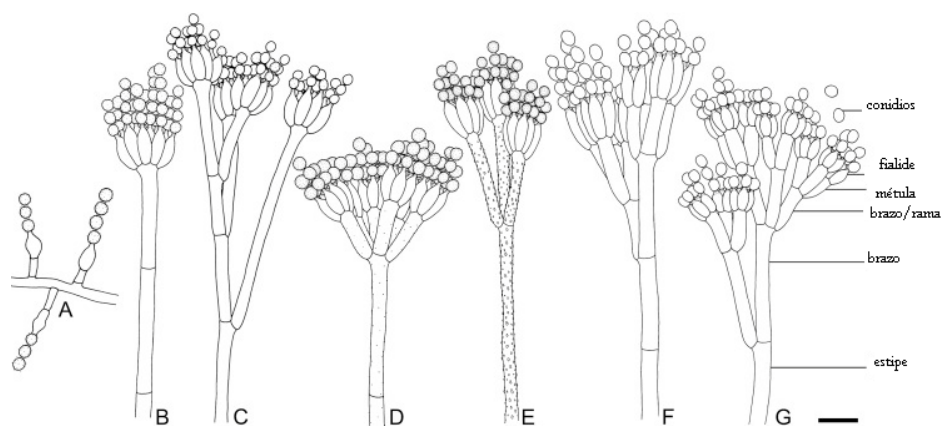


Figura 5: Patrones de ramificación de conidióforos observados en *Penicillium*. A) Conidióforos con fialides solitarias. B) Monoverticilado. C) Irregular. D, E) Biverticilado. F) Terverticilado. G) Tetraverticilado. Barra de escala = 10 μ m. (Fuente: Visagie et al., 2014).

5.1. *Penicillium nalgiovense*

5.1.1. Generalidades

Penicillium nalgiovense fue descrito por primera vez por Laxa en 1932 a partir de un aislado obtenido de queso Ellischauer, un queso similar al Camembert típico de la región de Nalžovy, en República Checa. Además, esta especie fue aislada como parte de la micoflora asociada de quesos duro, semi-duro y semi-blando (Lund et al., 1995). En los últimos años, esta especie ha adquirido importancia biotecnológica en la industria cárnica, debido a su uso generalizado como starter principalmente en embutidos secos fermentados (Ludemann et al., 2004; Galvalisi et al., 2012; Bernáldez et al., 2013). *P. nalgiovense* desarrolla en la superficie del producto como una capa fina homogénea y blanquecina de micelio durante el proceso de maduración. Este micelio contribuye al sabor del producto, regula la pérdida de humedad y evita el desarrollo de especies fúngicas potencialmente micotoxigénicas. Los factores que más influyen en la velocidad de crecimiento de *P. nalgiovense* son la temperatura, la actividad de agua y la concentración de NaCl. *P. nalgiovense* produce una considerable cantidad de pigmentos naranjas y amarillos (nalgiovensina y nalgioxina, respectivamente), cuya producción, al igual que el crecimiento de *P. nalgiovense* se ven estimulados ante el incremento, hasta una concentración del 4 % de NaCl. Si bien, hasta el momento, la aplicación sobre matriz

cárnica es la única aplicación como starter de *P. nalgiovense*, estudios sugieren que posee un metabolismo enzimático, proteolítico y lipolítico, bastante fuerte que puede ser similar al de *P. camemberti* y que podría contribuir al desarrollo de propiedades sensoriales deseables en quesos blandos madurados con mohos (Mrázek et al., 2015). Al respecto, el Laboratorio de Micología de Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes, ha realizado pruebas preliminares que han demostraron la capacidad de crecer de cepas de *P. nalgiovense* y *P. camemberti* sobre queso tybo fundido y contenido en tripa sintética (Cottet et al., 2014).

Si bien, la información reportada es insuficiente para determinar la toxicidad de algunas de las sustancias producidas por *Penicillium nalgiovense*, y las condiciones en las que las cepas productoras podrían generarlas, diversos autores coinciden en que la mayoría de los aislamientos de *Penicillium nalgiovense* tienen muy baja toxicidad y es posible la selección de cepas no toxicogénicas para su utilización como cultivos iniciadores (Fink-Gremmels y Leistner, 1990; Andersen, 1995; Gareis et al., 1999; Pitt y Hocking, 2009; Bourdichon et al., 2012), siendo la generación de penicilina el mayor factor a considerar (Laich et al., 2003).

Por lo tanto, ante nuevas aplicaciones es muy importante seleccionar la cepa más apropiada, de forma de garantizar la colonización del producto y evitar el desarrollo de sustancias no deseables para tal uso.

5.1.2. Identificación morfológica

Para la identificación del *Penicillium nalgiovense* se procede según el procedimiento estandarizado para la identificación de las especies de *Penicillium* descrito por Pitt y Hocking (2009), la cual se basa en la aplicación de criterios macroscópicos (velocidad de crecimiento, color, textura, presencia o ausencia de exudado, producción de pigmentos) y microscópicos (características de conidióforo y conidios). Las cepas se inoculan e incuban durante 7 días sobre tres medios estándar: Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA), Agar Extracto de Malta (MEA) y Agar Nitrato 25 % Glicerol (GN25). Se ensayan tres temperaturas (5, 25 y 37 °C) para CYA, y una sola temperatura (25 °C) para los medios MEA y GN25.

Muchas especies clasificadas dentro del subgénero *Penicillium* son morfológicamente similares y su identificación mediante las técnicas morfológicas tradicionales se dificulta. Por esta razón se utiliza además el Agar Neutro de Creatina Sacarosa (CSN) el cual ayuda a distinguir entre especies estrechamente relacionadas.

5.1.3. Identificación molecular

Existen distintos primers diseñados para diferenciar e identificar molecularmente a nivel especie aislamientos de *Penicillium*. Estos primers amplifican secuencias conservadas del ADN ribosomal que comprenden el gen que codifica la subunidad 5.8S en determinadas especies relacionadas. La región de secuencias espaciadoras internas (ITS –Internal Transcribed Spacer) de los hongos consiste en tres sub regiones: la ITS1 e ITS2 (regiones variables) y el gen 5.8S (región altamente conservada). Los primers ITS4 e ITS5 codifican las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal respectivamente (White et al., 1990; Mahmoud et al., 2016).

Aunque ITS se ha propuesto como un marcador universal para los hongos (Schoch et al., 2012), el ITS de *Penicillium* y otros géneros de ascomicetos no es lo suficientemente variable para distinguir todas las especies estrechamente relacionadas (Dupont et al., 1999). Otros primers que amplifican regiones del gen 5.8S que codifican para el gen de la β -tubulina (*BenA*) (Figura 6) pueden utilizarse como marcadores específicos para analizar *Penicillium* (Samson et al., 2004), ya que su presencia esta relacionada con las características fenotípicas del subgénero. El par de primers más utilizado para amplificar una región del gen 5.8S que codifica la β -tubulina es el conformado por Bt2 (5'-GGT AAC CAA ATC CGT GCT GCT TTC-3') y Bt2 (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass y Donalson, 1995), esta región presenta mayor polimorfismo interespecie permitiendo diferenciar *Penicillium* subgénero *Penicillium* (Glass y Donalson, 1995; Dupont et al., 1999; Panelli et al., 2012; Schoch et al., 2012; Visagie et al., 2014; Perrone et al., 2015).

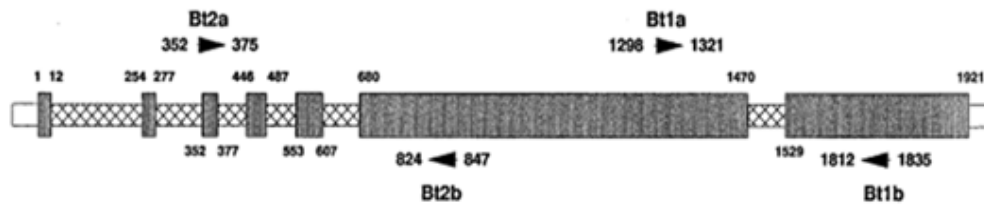


Figura 6: Región del gen 5.8S que codifica la producción de la β -tubulina.

6. Estudios de variabilidad genética

Dentro de una misma especie de hongos se puede encontrar diversidad genética que puede repercutir en las características fisiológicas expresadas *in vivo*. Para determinar la diversidad genética existen técnicas de PCR como el RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) o el ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) que se basan en la amplificación de una región polimórfica del ADN con primers específicos. Estas amplificaciones pueden observarse en una corrida electroforética en gel de agarosa y representan la huella dactilar del ADN analizado. El RAPD amplifica una sección de ADN anónimo utilizando un iniciador de secuencia arbitrario mientras que la ISSR amplifica una sección entre secuencias repetitivas simples en el ADN. Según Salimath et al. (1995) la utilización de ISSR mostró mayor polimorfismo que el RAPD al aplicarlo en plantas *Elusine*. El mismo resultado fue obtenido por Stenglein y Ballati (2006) al aplicarlo en hongos *Phaeoisariopsis griseola*.

Los ISSR son un tipo de marcador genético que permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas. Estas regiones consisten en repeticiones en tandem de secuencias simples como (CT) n ó (CA) n , ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. La presencia o ausencia de bandas del producto amplificado muestra las variaciones intraespecie permitiendo diferenciarlas entre sí. En los casos en que hay ausencia de banda puede deberse a mutaciones y/o inserciones o deleciones suficientemente grandes como para disminuir el tamaño de la banda (González y Aguirre, 2007). Esta técnica presenta las ventajas de no requerir conocimiento previo de la

secuencia a analizar y de que genera patrones específicos y reproducibles debido a sus estrictas condiciones de reacción (Stenglein y Ballati, 2006).

Luego de observar las bandas en un gel de agarosa, se pueden analizar los resultados realizando un dendograma. Un dendograma es una representación gráfica en forma de árbol que resume un proceso estadístico multivariante. Este proceso estadístico multivariante busca agrupar elementos (o variables) tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos (De la Fuente Fernández, 2011).

7. Instituciones colaboradoras.

7.1 Cabaña Piedras Blancas



Cabaña Piedras Blancas es una empresa ubicada en Suipacha, Buenos Aires, que desde 1992 se dedica a la producción de leche de cabra y a la elaboración de quesos especiales de leche de cabra, vaca y oveja en base al modelo Francés de producción “fermier”; el cual consiste en una elaboración artesanal, a pequeña escala, con mucho valor agregado.

Elabora productos diferenciales e innovadores, los cuales son poco comunes en el mercado local debido a las características intrínsecas de los mismos, que atraen a un nicho de consumidores restringido por el precio y hábitos de alimentación. De esta forma se destina a un público selectivo, siendo una de las empresas de especialidades más reconocidas en el mercado Gourmet argentino. Además, es Socio Fundadora del paseo turístico denominado “La Ruta del Queso”, compuesto por varios establecimientos de la zona de Suipacha.

A continuación, se mencionan sus productos, divididos en diferentes categorías según el tipo de leche con el cual se generan.

- Quesos de leche de vaca: madurados con hongos de pasta blanda (Azul, Brie, Camembert y Vacheroleau) y teñido con tinta de calamar (Blackamembert); sin maduración fúngica de pasta semidura (Cheddar Americano y Reblochón), de pasta dura (Provolone), añadido de carbón vegetal (Ligne Noir) y condimentado con pimienta (Pepato). A su vez, dentro de esta categoría hay una línea “Bonne Vie”, la cual posee quesos bajos en lactosa (Camembert bajo en lactosa, Cremoso bajo en lactosa) y un queso bajo en lactosa sin sal (Cremoso bajo en lactosa sin sal).

- Productos de leche de cabra: quesos madurados con hongos (Cabrambrie, Crottin, Saint Julien); quesos sin maduración fúngica de pasta semidura (Chevrotin y Feta), de pasta blanda (Cabrauntar y Lusignan) y teñido con tinta de calamar (Cendre). Leche en polvo y dulce de leche.
- Queso de leche de oveja: sin maduración fúngica y de pasta semidura (Pyrénées).

7.2. Instituto Nacional de Tecnología Industrial



El Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) fue creado mediante el Decreto Ley 17.138 del 27 de diciembre de 1957 y se ubica en el Parque Tecnológico Miguelete en un predio de 19 hectáreas en el Partido de General San Martín, Provincia de Buenos Aires. Actualmente, el INTI está presente con Centros Regionales y Multipropósito en todo el país, que generan investigación y desarrollo en red, con el fin de acompañar e impulsar el crecimiento industrial de cada provincia. Esa expansión le ha permitido cubrir una amplia gama de especialidades industriales, en articulación con universidades, laboratorios estatales, empresas públicas, cámaras empresarias y otras organizaciones, del país y del exterior, vinculadas con la actividad tecnológica (INTI, 2018).

7.2.1 Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea

El Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea (INTI- Lácteos) creado en el año 1968, tuvo como promotores fundadores al Centro de la Industria Lechera, la Junta Intercooperativa de Productores de Leche y el INTI. Actúa como referente para la eficiencia y la productividad de los procesos tecnológicos de las pequeñas y medianas industrias lácteas, la innovación para la obtención de alimentos más saludables, la creación de redes de aseguramiento de la calidad, el diseño de plantas lácteas de baja escala de producción, y la capacitación al ciudadano sobre la tecnología láctea.

El centro cuenta con una planta piloto para la investigación, desarrollo y elaboración de productos lácteos, provista con un moderno equipamiento, a escala piloto, entre ellos 2 tinas queseras de 50 litros, pasteurizador, desnatadora, y todo el resto del equipamiento que permite

reproducir quesos en condiciones que simulan las de un establecimiento industrial y el eventual salto de escala y transferencia de tecnología. El Centro también dispone de laboratorios, de análisis Físicoquímicos, Microbiológicos, y de Evaluación Sensorial. Este último viene trabajando hace más de 15 años en el control de calidad y confección de perfiles sensoriales de diferentes variedades de quesos, elaborados tanto en Argentina como en otros países de Latinoamérica.

OBJETIVO

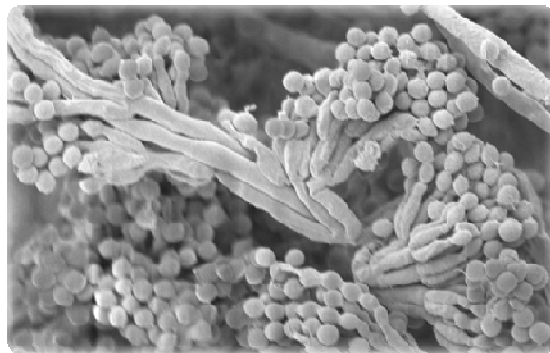
Teniendo en cuenta que:

- ❖ En Argentina sólo existen dos tipos de quesos legislados según el Código Alimentario Argentino que utilizan hongos en su producción. En ellos, la presencia de estos hongos es fundamental, ya que además de otorgarles la apariencia típica y deseable, contribuyen a la formación de la textura y el flavor característico.
- ❖ Actualmente la única aplicación de *Penicillium nalgiovense* es en la industria cárnica para el desarrollo superficial de embutidos, aún cuando fue aislado por primera vez de un queso.
- ❖ Es reducida la actividad de I+D en las empresas lácteas argentinas, limitándose a la adaptación local de desarrollos tecnológicos externos. Desarrollar nuevos productos lácteos con tecnologías tradicionales que puedan transferirse al sector resulta relevante para fomentar la interacción Universidad – Empresa y agregar valor a la industria nacional.
- ❖ En nuestro grupo de trabajo se han realizado pruebas preliminares cuyos resultados fueron prometedores y demostraron la factibilidad de obtener queso tybo fundido contenido en tripa con desarrollo de *Penicillium* sp. superficial.

*El objetivo general propuesto por el presente trabajo es desarrollar un queso innovador contenido y madurado en tripa sintética con crecimiento superficial de *Penicillium nalgiovense*.*

CAPÍTULO I

***Caracterización fisiológica de cepas de
Penicillium nalgiovense
para su potencial uso en matrices
lácteas***



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo de este capítulo fue realizar una caracterización fisiológica con interés tecnológico de diferentes cepas de *Penicillium nalgiovense* y para ello se consideraron los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Confirmar su identidad mediante amplificación del gen de β -tubulina.
- ✓ Estudiar la variabilidad genética entre las cepas utilizando la herramienta molecular ISSR (*inter simple sequence repeats*).
- ✓ Evaluar el efecto del agregado de NaCl en su crecimiento, en agar extracto de malta y medio tipo queso.
- ✓ Evaluar su actividad proteolítica y lipolítica por el método de difusión en agar.
- ✓ Evaluar su portación de genes para la producción de penicilina y su expresión *in vitro*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de las cepas de trabajo

Se utilizaron 21 cepas de cultivos monospóricos de *Penicillium nalgiovense* biotipo 6, depositadas en el cepario del Laboratorio de Micología de Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes. Una de estas cepas corresponde al starter comercial de *P. nalgiovense* Bactoferm® MOLD 600 (Chr. Hansen, Hoersholm, Dinamarca), identificada como SC1. Las demás corresponden a distintas cepas de *P. nalgiovense* aisladas de salames, en los que no se utilizaron cultivos iniciadores para su emplume, elaborados en las dos principales provincias argentinas productoras de embutidos secos fermentados: Córdoba (C) y Buenos Aires (BA) (Tabla 5). Para su reactivación, las 21 cepas fueron crecidas en MEA (Anexo I), a 25 °C por 7 días y mantenidas en picos de flauta del mismo medio, a 4 °C, disponibles para ser usadas en todos los ensayos.

Tabla 5: Aislamientos de trabajo de *P. nalgiovense*, obtenidos de salames de distintas regiones geográficas del país.

ID	Origen
C1	Caroya, Córdoba
C2	Caroya, Córdoba
C3	Caroya, Córdoba
C4	Caroya, Córdoba
C5	Caroya, Córdoba
C6	Caroya, Córdoba
C7	Caroya, Córdoba
C8	Caroya, Córdoba
C9	Caroya, Córdoba
BA1	CABA
BA2	CABA
BA3	Magdalena, Bs. As.
BA4	Magdalena, Bs. As.
BA5	Tandil, Bs. As.
BA6	Tandil, Bs. As.
BA7	Tandil, Bs. As.
BA8	Tandil, Bs. As.
BA9	Tandil, Bs. As.
BA10	Tandil, Bs. As.
BA11	Tandil, Bs. As.
SC1	Starter Comercial

Nota: C: Córdoba, BA: Buenos Aires, SC: Starter Comercial

2.2. Extracción de ADN

Las 21 cepas de *P. nalgiovense* se inocularon a partir de los picos de flauta obtenidos en el apartado 2.1, por tres pinchazos, en tres placas de 9 cm de diámetro con MEA y se incubaron por 7 días a 25 °C. El ADN fue extraído siguiendo la metodología descrita por Stenglein y Balatti (2006), la cual utiliza cetil-trimetil-bromuro de amonio (CTAB). La misma consistió de los siguientes pasos:

1. Se extrajo el micelio de cada placa de crecimiento monospórico utilizando una espátula, se congeló con nitrógeno líquido y se molió rápidamente en un mortero.
2. Se añadió buffer de extracción CTAB (800 µL de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl 20 mM y 1,4 M NaCl pH 8) + 200 µL de CTAB al 10 % + 1 µL de β mercaptoetanol + 0,15 g polivinilpirrolidone (PVP)).
3. Se continuó rápidamente con la homogeneización realizando movimientos giratorios en el mortero.
4. El extracto obtenido se pasó a un eppendorf de 2 mL y se incubó por 30 min a 60 °C.
5. Se añadieron 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (12:1 v/v) y se mezcló durante 5 min por inversión de los tubos.
6. Se centrifugó 5 min a 10000 g (microcentrífuga mySpin6, Thermo Scientific) y el sobrenadante se trasvasó a un eppendorf de 2 mL.
7. Se repitió el paso 5 y 6 dos veces.
8. Se agregaron 600 µL de isopropanol frío y se colocó en el freezer a -20 °C durante una noche con el objeto de provocar la precipitación.
9. Se centrifugó 15 min a 10000 g y se descartó la fase líquida.
10. Se lavó el pellet con 400 µL de etanol al 75 % - acetato de amonio 10 mM y luego se procedió a realizar golpes suaves hasta el desprendimiento del pellet.
11. Se centrifugó 10 min a 10000 g y se descartó la fase líquida.
12. Se lavó el pellet con 300 µL de etanol frío al 70 % y, nuevamente, se golpeó para desprender el pellet.

13. Se centrifugó 5 min, se descartó la fase líquida y, finalmente, se secó el pellet a 60 °C hasta su sequedad.
14. Se resuspendió el pellet (ADN) con 70 µL de buffer TE 1X (Anexo I) y se conservó a -18 °C hasta su utilización.

2.3. Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN extraído

La concentración del ADN obtenido fue medida a 260 nm usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Wilmington, Delaware USA), considerando las relaciones entre los valores de absorbancia a 260 / 280 nm para evaluar la pureza.

La calidad del ADN obtenido se evaluó por electroforesis, con gel de agarosa 0,8 % (p/v) a 80 V por 40 min, sumergido en buffer TAE 1X (40 mM Tris- acetato y 1 mM EDTA, pH 8,0). Los geles se tiñeron con GelRed™ 0,1 µL/mL (Biotium, Hayward, USA) y el ADN fue visualizado con luz UV a 302 nm con un transiluminador (Labnet, U1000, USA).

2.4. Confirmación de la identidad

El ADN genómico de las cepas de *P. nalgiovense* obtenido en 2.2 fue confirmado a nivel molecular. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un termociclador (Eppendorf AG, Alemania) para amplificar un fragmento de la región del gen que codifica la β -tubulina (*BenA*) (Samson et al., 2004), usando los pares de primers Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') y Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass y Donaldson, 1995). Junto a las muestras se analizó un blanco (agua MiliQ) y un control negativo (*Aspergillus ochraceus* (CECT 2092)). Cada reacción de PCR fue llevada a cabo según lo descrito por Canel et al. (2013) con 25 µL de mezcla conteniendo: 2,5 µL de buffer de reacción 10X, 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de mezcla de dNTP (10 µM de cada dNTP), 1 µL de 10 µM de los primers forward y reverse (Invitrogen Argentina), 0,25 µL de Taq ADN polimerasa 50 U (Invitrogen Argentina) y 10 a 20 ng de ADN genómico. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo usando el siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial a 95

°C por 2 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 45 s, y una extensión final a 72 °C por 2 min.

Los fragmentos amplificados fueron separados por corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % (p/v) usando buffer TAE 1X, a 80 V por 40 min. Los geles se tiñeron con 0,1 µL/mL de GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) y el ADN fue visualizado con luz UV a 302 nm con un transluminador (Labnet, U1000, USA). Se utilizó un marcador de peso molecular (Ladder 50 pb Invitrogen) el cual abarca el rango de 50-1000 pb.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc. (República de Corea). El ADN de las terminaciones de los fragmentos sentido y anti sentido fue secuenciado usando el kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) en un secuenciador Applied Biosystems (ABI/Hitachi Genetic Analyzer 3130). Las secuencias se compararon con la base de datos de nucleótidos GenBank del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando la herramienta básica de alineamiento de secuencias de tipo local (BLASTn) (Altschul et al., 1990).

2.5. Estudios de la variabilidad genética

Las 21 cepas fueron analizadas por ISSR para evaluar su diversidad genética y determinar, en caso de haber variabilidad interespecífica, si la misma se correlaciona con el origen geográfico. Esta actividad se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Sebastian Stenglein en el Laboratorio BIOLAB, Facultad de Agronomía de Azul, Provincia de Buenos Aires.

Se trabajó con el ADN extraído (punto 2.2) de los 21 cultivos monospóricos de *P. nalgiovense*. Asimismo se usó como control de grupo externo una cepa de *Penicillium chrysogenum* (PEC 2).

Se utilizaron 8 primers: **Bio3-A5**: AGG (CT)₈, **D**: (AG)₈, **E**: CTC(GT)₈, **F**: CT(GA)₈, **G**: GAG(CAA)₅, **H**: (GCC)₅, **I**: (CAA)₅ y **J**: (CAC)₅. Se seleccionaron los cuatro que resultaron ser los más discriminativos (F, G, H y J) para analizar la diversidad de las cepas de *P.*

nalgiovense. Las amplificaciones se llevaron a cabo con un termociclador XP (Bioer Technology Co., China), según lo descrito por Stenglein y Balatti (2006) con 25 μ L de mezcla conteniendo: 20 ng de ADN genómico, 2,5 μ L de buffer de reacción 10X, 2,5 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ L de mezcla de dNTP (0,2 mM de cada dNTP) (InBio Highway Biología Molecular-UNICEN-Tandil), 1 μ L de 0,4 μ M de primer, 1,25 U de Taq ADN polimerasa (InBio Highway Biología Molecular-UNICEN-Tandil). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo usando el siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 7 min, 33 ciclos a 94 °C por 60 s, la temperatura de apareamiento correspondiente al primer por 75 s, 72 °C por 4 min, y una extensión final a 72 °C por 7 min. La temperatura de apareamiento se programó según el primer utilizado, a 53 °C para los primers F y J, a 52 °C para el primer G y a 66 °C para el primer H. Todas las reacciones fueron realizadas independientemente, por lo menos, dos veces.

Los fragmentos de ADN, productos de la amplificación por PCR de los marcadores de tipo ISSR, fueron separados con un equipo de electroforesis horizontal en gel de agarosa 1,5 % (p/v) usando buffer TBE 1X (45 mM Tris- borato y 1 mM EDTA, pH 8,0) a 80 V por 2 h y los geles se tiñeron con 0,1 μ L/mL de GelRed™ (Biotium, Hayward, USA). El ADN fue visualizado con luz UV a 302 nm con un transluminador (Mayor Science, USA) y las imágenes obtenidas de los geles se fotografiaron con una cámara Kodak (Easy Share Z712 IS (12x, IS). Esos documentos fotográficos se analizaron manualmente y, a partir de ello, se generó una matriz binaria de datos (n x t) donde las n filas representan las variables (fragmentos ISSR) y las t columnas representan los genotipos (OTU- Unidades Taxonómicas Operativas) (Sneath y Sokal, 1973). Así se construyó una matriz básica de datos (MBD) de presencia (1) / ausencia (0), para el análisis de las bandas obtenidas en cada ADN amplificado utilizando los distintos primers (F, G, H y J).

Para el análisis de agrupamiento se utilizó el software NTSYSpc version 2.1 (Rohlf, 1998) el cual, a partir de la MBD construye una matriz de similitud utilizando el coeficiente simétrico 'Simple Matching' y dos coeficientes asimétricos, el de asociación 'Jaccard' y el de 'Dice'. Luego, con la técnica del coeficiente de correlación cofenética (CCC) se midió el grado

de representación de los valores de la matriz similitud por parte de los fenogramas, significando una buena representación a partir del valor 0,8 (Sneath y Sokol, 1973). El análisis de agrupamiento y la generación del dendrograma se realizó utilizando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Means) (Sneath y Sokal, 1973).

2.6. Evaluación de la adición de cloruro de sodio en el crecimiento

Las cepas se inocularon por pinchazo central en placas de 4,5 cm de diámetro con MEA con distintas concentraciones de NaCl (0, 5, 10, 15 y 30 g de NaCl / kg MEA), por duplicado. Se ajustó la actividad de agua (a_w) a 0,97 con glicerol, midiendo con LabSwift- a_w (Novasina, Switzerland) a 25 °C, equipo calibrado con las soluciones saturadas estándares de las sales LiCl, NaBr, KCl correspondientes a una humedad relativa de 11 %, 58 % y 84 %, respectivamente. Luego se incubaron por 18 días a 25 °C. A los 3, 4, 5, 6, 8, 11 y 18 días de incubación se procedió a registrar la coloración, tanto del anverso como del reverso de cada una de las colonias crecidas, como también el promedio del diámetro de las mismas, obtenido a partir de su medición en dirección vertical y horizontal.

Se calculó la velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) utilizando el software DMFIT (Dynamic Modelling Version 2.1) que se ajusta a la función sigmoidea descrita por Baranyi y Roberts (1994).

Se repitió la experiencia utilizando como medio de cultivo el medio tipo queso modificado, que es un agar semi sintético de queso descrito por Hansen y Nielsen (1997), modificado en su concentración de NaCl (1,5 % en vez de 2,6 %) (MQM) (Anexo I). Las placas se incubaron a 25 °C por 6 días, tiempo en el cual se registró el promedio del diámetro (mm) obtenido para cada colonia.

2.7. Screening de la actividad proteolítica y lipolítica

La actividad proteolítica y lipolítica se estudió por el método de difusión en agar. Se procedió a preparar una suspensión de conidios para cada una de las 21 cepas de *P. nalgiovense*.

Para ello, a partir de los cultivos frescos (sección 2.1) se tomó conidios raspando la superficie, se los colocó en tubos de ensayo con solución 0,1 % de Tween 80 en agua estéril y se los cuantifico con cámara de Neubauer para luego hacer las diluciones correspondientes. Se sembró en medio MQM, 5 μ L de las suspensiones conteniendo 10^6 conidios/mL. Las placas se incubaron a 12 °C por 11 días y, por otro lado a 25 °C por 7 días.

Pasado el tiempo de incubación, se obtuvieron plugs de los micelios desarrollados de 6 mm de diámetro y 5 mm de profundidad y se transfirieron a tubos de ensayo con agar tributirina (AT) (Larsen y Jensen, 1999) y agar caseína (Ludemann et al., 2004), modificado (ACm) con el agregado de 15 g NaCl / kg. Los tubos se incubaron por 5 días a 12 °C y a 25 °C, según la temperatura utilizada inicialmente para el crecimiento de la cepa en MQM. Se utilizaron plugs de MQM sin inocular y tubos con AT y ACm sin plugs como controles negativos y de medio, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La actividad lipasa y proteasa extracelular se evidenció por la hidrólisis presente en el agar y se expresó como volumen (cm^3), obtenido a partir de las medidas de diámetro de tubo y profundidad de la zona de hidrólisis en el agar.

2.8. Evaluación de la capacidad de producción de penicilina

2.8.1 Amplificación y secuenciación del gen *penDE*

Se llevaron a cabo reacciones de PCR con el ADN genómico extraído en el punto 2.2 de las 21 cepas de *P. nalgiovense* para amplificar uno de los tres genes (*penDE*) involucrados en la ruta biosintética de la producción de penicilina (Laich et al., 1999). Junto a las muestras se analizó un blanco (agua MiliQ), un control negativo (*Aspergillus ochraceus* (CECT 2092)) y un control positivo (*P. chrysogenum* (PEC2)) de hongo productor de penicilina. Se utilizaron los primers con las siguientes secuencias: *aat1* (5'ACCAAAGAGAACCTGATCCGGTTAA3') y *aat2* (5'ATGAC AAACATCTCATCAG GGTGG3') (Farber y Geisen, 1994).

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf AG, Alemania) con 50 μ L de mezcla conteniendo: 5 μ L de buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4,

500 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de los primers forward y reverse (Genbiotech, Argentina), 1U de Taq ADNpolimerasa (Invitrogen Argentina) y 20 ng de ADN genómico. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo usando el siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 65 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados se separaron en gel de agarosa al 1,2 % (p/v) usando buffer TBE 1X a 80 V por 40 min. Los geles se tiñeron con 0,1 µL/mL de GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) y cada amplicón se visualizó con luz UV a 302 nm usando un transluminador (Labnet, U1000, USA). Se utilizó como marcador de peso molecular un marcador con incrementos discretos de 100 pb (Ladder 100 pb, Genbiotech, Argentina).

La purificación y secuenciación fue realizada por Genbiotech (EEUU). Las secuencias se compararon de igual forma que en la sección 2.4 y se alinearon utilizando el software ClustalIW (versión 1.81).

2.8.2. Bioensayo para evaluar la producción de penicilina

Con el objeto de evaluar la expresión de los genes de penicilina se realizó el bioensayo por difusión en placa descrito por Laich et al. (2002) tanto a 25 °C como a 12 °C, ya que si bien la primera es la temperatura óptima de crecimiento de *P. nalgiovense*, se lo pretende utilizar para el desarrollo de quesos que serán madurados a 12 °C, aproximadamente.

A partir de cultivos frescos (sección 2.1) se inocularon, por triplicado, los 21 aislamientos de *P. nalgiovense* en placas de Petri con MEA, CYA y MQM (Anexo I) y se incubaron a 25 °C durante 7 días. Por otro lado, se procedió de igual forma pero sólo usando MQM e incubando a 12 °C por 14 días. Luego, de forma de estandarizar el tamaño a tomar, con ayuda de un sacabocado en forma estéril se obtuvieron 4 plugs de 6 mm de diámetro con el desarrollo fúngico superficial de todos los medios, dos se depositaron sobre una placa de Petri con agar tripticasa soja 1 % (TSA 1 %) (Anexo I) y los otros dos plugs sobre TSA 1 % adicionado con 400 µL de enzima β-lactamasa por cada 100 mL de TSA 1 %. Se utilizó la enzima β-lactamasa para verificar que la actividad antimicrobiana se debió a la presencia de

penicilina y no de cualquier otro factor. Dicha enzima se obtuvo a partir del sobrenadante esterilizado por filtración de un cultivo de *Bacillus cereus* β -lactamasa positivo (BEC1) crecido en 100 mL de medio caldo tripticasa soja (TSB) (Anexo I) a 30 °C por 24 h y 250 r.p.m. en un agitador orbital (Thermo Forma 481, Forma Scientific), adicionado de penicilina a una concentración de 50 U.mL⁻¹. Las placas se incubaron durante 24 h a 12 °C ó 25 °C, según la condición inicial de crecimiento del hongo, para lograr que el micelio cubra la superficie del cilindro y la penicilina difunda al medio.

Se agregó una sobrecapa de TSA 1 % con *Micrococcus luteus* (3,33 % v/v de una suspensión (medio TSB) de absorbancia 0,89 a 600 nm), teniendo la precaución de no cubrir los plugs por encima de la superficie. En aquellas placas que se agregó la enzima en la base, se repitió el agregado de enzima en la sobrecapa. Se incubó durante 3 h a 4 °C para favorecer la difusión del antimicrobiano al agar y luego a 37 °C durante 24 h para favorecer el crecimiento del *M. luteus*.

Como control negativo se utilizó plugs de los 3 medios sin inocular. Como controles positivos se usaron discos de penicilina de concentración 10 U (Britania, Argentina) y plugs de *P. chrysogenum* (PEC2), hongo productor de penicilina. Finalmente, se procedió a medir el halo de inhibición (mm), en dirección vertical y horizontal para obtener un valor promedio.

2.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos detallados en los apartados 2.6, 2.7 y 2.8.2 fueron analizados mediante análisis de varianza y las medias se compararon utilizando el test de Tukey para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) usando el software InfoStat, version 2017 (InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación por método molecular

La extracción del ADN fue exitosa en todos los aislamientos analizados, observándose en el gel una única banda que confirma la integridad del ADN (Figura 7).

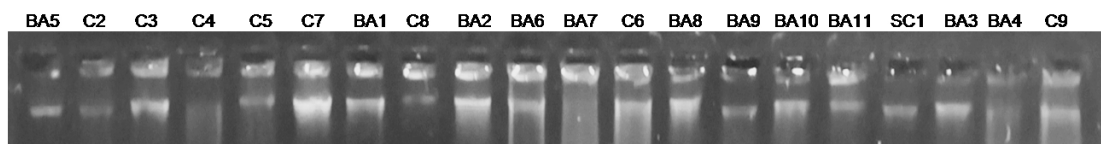


Figura 7: Gel de integridad perteneciente a la extracción de ADNs de las cepas de *P. nalgiovense*.

La identificación morfológica de las 21 cepas de *P. nalgiovense* biotipo 6 se confirmó por amplificación del fragmento del gen de la β -tubulina (*BenA*). Para todas las cepas se obtuvo un producto de 460 pares de bases (pb), aproximadamente. A partir de la comparación realizada de las secuencias obtenidas con respecto a otras de *P. nalgiovense* disponibles en la base de datos del GenBank, se demostró un alto nivel de identidad (> 98 %). El éxito de esta identificación molecular a nivel de especie se atribuye al uso de primers que amplifican regiones que codifican para el gen de la β -tubulina (*BenA*) (Samson et al., 2004; Visagie et al., 2014; Perrone et al., 2015).

Se ha encontrado una elevada homología con las cepas de *P. nalgiovense* depositadas por Canel et al. (2013), aisladas de Córdoba - Argentina, siendo estos los únicos registrados en el GenBank en América Latina. Los mismos poseen también, en su mayoría, una similitud con los hongos provenientes de países europeos, dentro de los que se pueden encontrar a países como Francia, Alemania, Países Bajos y Gran Bretaña que se caracterizan por su trabajo con embutidos secos fermentados cárnicos.

3.2. Estudios de la variabilidad genética

Se evaluó la diversidad genética entre las 21 cepas de *P. nalgiovense* usando cuatro marcadores de tipo ISSR (F, G, H y J). Se amplificó un total de 53 fragmentos de ADN, de los cuales 21 de ellos resultaron ser polimórficos. La mayor variabilidad se obtuvo con el primer G (42.7 %) (Figura 8 y 9).

En base al total de fragmentos amplificados con todos los primers, se analizó la similitud entre ellos utilizando los tres coeficientes de asociación. Los tres presentaron un CCC mayor a 0,98 lo que indica una alta correlación de los datos obtenidos.

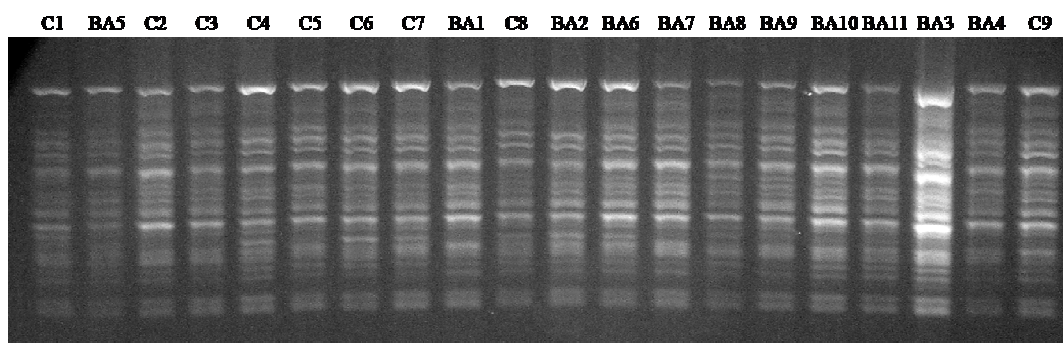


Figura 8: Productos de amplificación obtenidos para distintas cepas de *P. nalgiovense* utilizando el primer G.

Se analizaron los datos y se seleccionó el coeficiente de “Jaccard” por mostrar mayor variabilidad genética entre cepas respecto al obtenido por los coeficientes “DICE” y “simple matching”. El dendrograma obtenido (Figura 9) a partir del análisis de agrupamiento resolvió 20 haplotipos que fueron agrupados en dos clusters principales (I y II), diferenciando claramente la cepa BA2 (cluster I) del resto con un coeficiente de similitud de 0,80. Por su parte, el cluster II se subdividió en dos subclusters (A y B) con un coeficiente de similitud de 0,83. El subcluster A contiene solamente a las cepas C3 y C5 (con 0,91 de similitud), mientras que el subcluster B incluye a las 19 cepas restantes de *P. nalgiovense* que tienen como lugares de origen tanto a Córdoba como a Buenos Aires. Por lo tanto, no se observó una agrupación respecto al origen geográfico de las cepas. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores, quienes tampoco han obtenido agrupamiento respecto al origen geográfico con marcadores de

tipo ISSR (Mishra et al., 2004; Bayraktar et al., 2007; Dinolfo et al., 2010; AI-Wadai et al., 2013).

Es importante resaltar que el starter comercial presentó una similitud elevada con las cepas en estudio. Aún cuando la similitud génica de *P. chrysogenum* con *P. nalgiovense* es bien conocida (Geisen, 1995; Banke et al., 1997; Samson et al., 2004; Houbraken et al., 2012), *P. chrysogenum* actuó correctamente como grupo externo en el dendrograma, indicando la adecuabilidad de los primers utilizados para el análisis de diversidad génica.

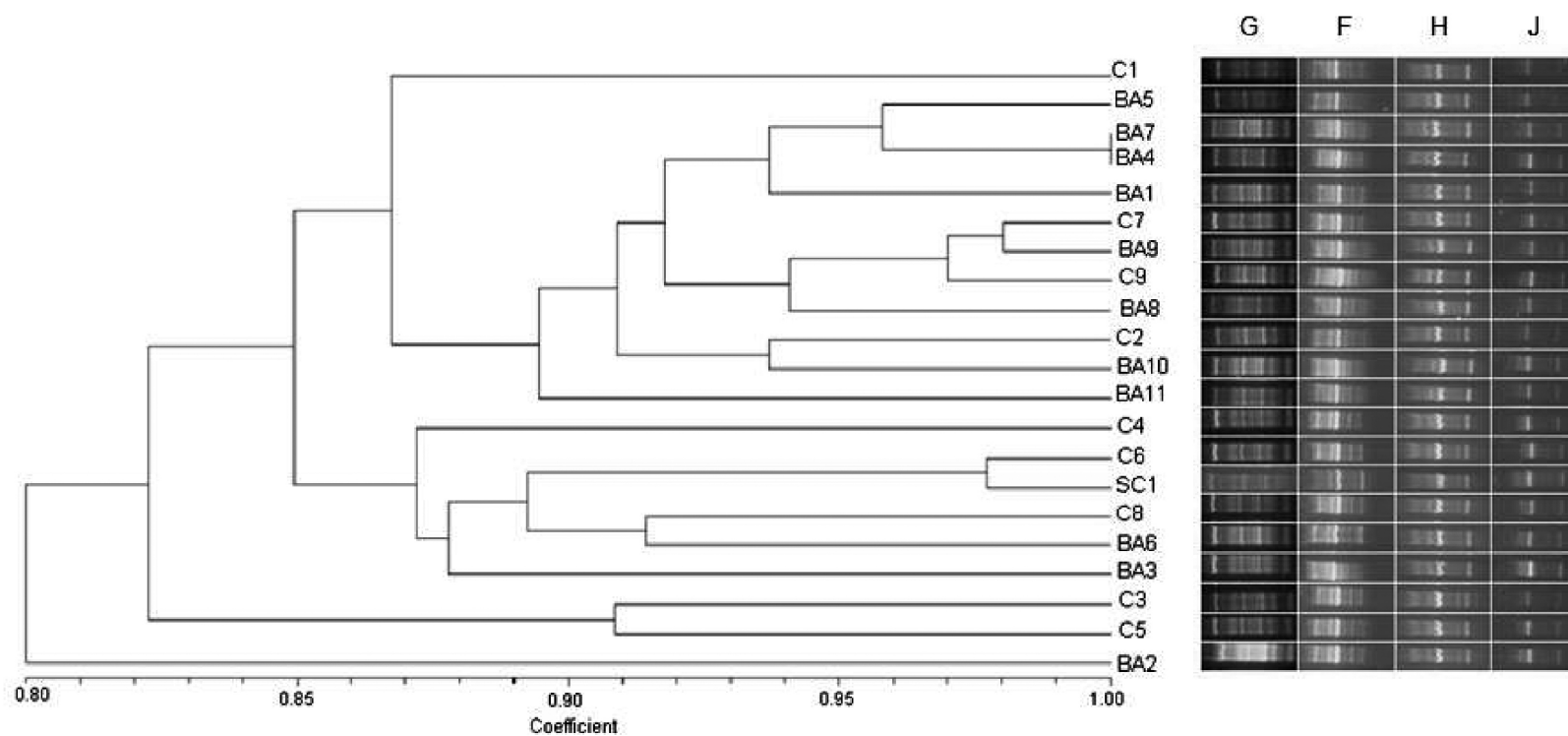


Figura 9: Dendrograma obtenido del análisis de agrupamiento de las 21 cepas de *P. nalgiovense* biotipo 6, usando los cuatro marcadores ISSR más discriminativos (F, G, H and J) y el coeficiente Jaccard.

3.3. Evaluación de la adición de cloruro de sodio en el crecimiento

Se observó un efecto estimulante ante el agregado de concentraciones crecientes de NaCl en las 21 cepas evaluadas, tanto en la tasa de crecimiento como en la coloración del reverso de las colonias. La figura 10 ejemplifica este comportamiento, específicamente sobre el crecimiento.

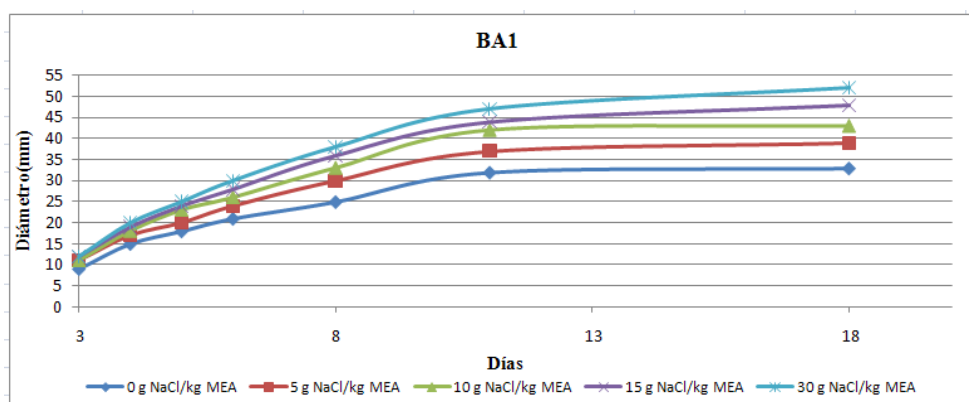


Figura 10: Diámetros de colonia (mm) obtenidos, en función del tiempo, para la cepa BA1 crecida en MEA con distintas concentraciones de NaCl (5, 10, 15 y 30 g de NaCl / kg MEA).

Los mayores diámetros finales se obtuvieron en el caso de MEA con 3 % de NaCl, excepto algunos casos como C3, C5, C6, C8, BA2 y BA6 en los cuales el diámetro máximo se presentó con el agregado de 15 y 30 g de NaCl / kg MEA indistintamente. El mayor diámetro obtenido al día 18 fue en el aislamiento BA3 y los menores fueron en los aislamientos C6 y BA10 (Figura 11).

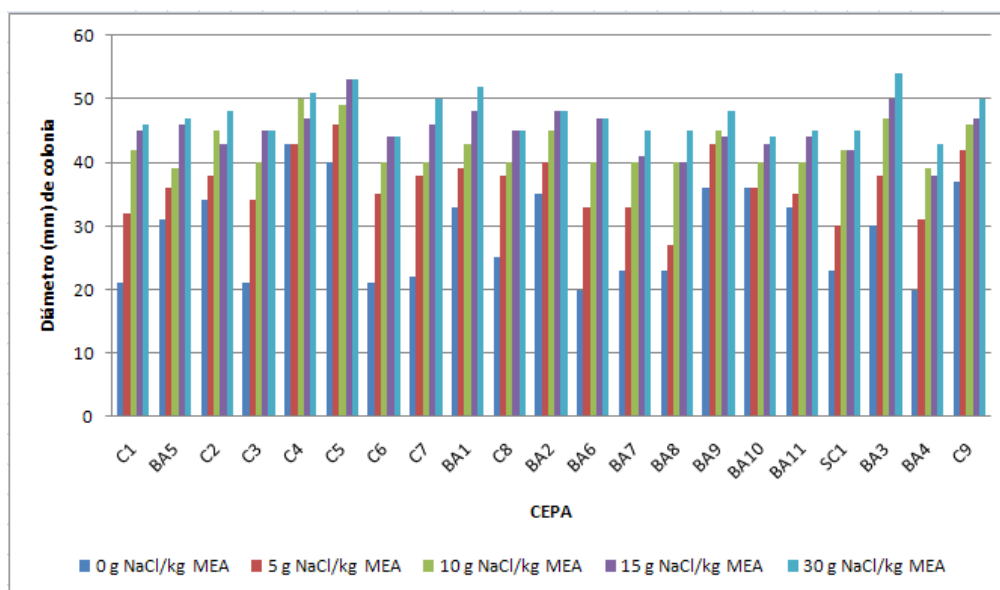


Figura 11: Comparación de los diámetros de colonias (mm) obtenidos al día 18 de incubación, para todas las cepas de *P. nalgiovense* crecida en MEA con distintas concentraciones de NaCl (5, 10, 15 y 30 g de NaCl / kg MEA).

La misma tendencia se observó con los valores de máximas velocidades de crecimiento ($\mu_{\max}$) donde en el 62 % de las cepas el máximo valor de $\mu_{\max}$ se obtuvo con 30 g NaCl / Kg con valores de $\mu_{\max}$ entre $4,75 \pm 0,02$ y $3,48 \pm 0,01$ mm/día, el 33 % de las cepas tuvo su valor máximo de $\mu_{\max}$ con 15 g NaCl / Kg con valores de $\mu_{\max}$ entre $4,52 \pm 0,02$ y $3,85 \pm 0,01$ mm/día, mientras que sólo el 5 % tuvo su valor máximo de $\mu_{\max}$ con 10 g NaCl / Kg con un valor de $4,30 \pm 0,03$ mm/día (Tabla 6). En concordancia con estos resultados, otros trabajos (Chávez, 2011; Frisvad y Samson, 2004) han reportado que la mayoría de las especies del subgenero *Penicillium* toleran muy bien hasta 50 g NaCl / kg, siendo *P. nalgiovense* uno de los que crece más rápido en dicha condición. Considerando que los $\mu_{\max}$ obtenidos con estas dos concentraciones no difieren significativamente y que hay una tendencia a reducir el consumo de NaCl en alimentos, se decidió trabajar con 15 g NaCl/kg.

Tabla 6: Valores de velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) obtenidos para los 21 *P. nalgiovense* crecidos en MEA con diferentes concentraciones de NaCl (0, 5, 10, 15 y 30 g /Kg MEA).

ID	NaCl (g/Kg)				
	0	5	10	15	30
C1	0,79 ± 0,01 ^{aA}	2,80 ± 0,02 ^{cdeB}	3,48 ± 0,02 ^{cdC}	4,26 ± 0,08 ^{cdefghD}	4,43 ± 0,05 ^{ikD}
C2	1,80 ± 0,01 ^{eA}	3,55 ± 0,04 ^{iB}	3,90 ± 0,02 ^{ijC}	4,52 ± 0,02 ^{hD}	4,48 ± 0,02 ^{klD}
C3	1,03 ± 0,01 ^{bcA}	2,99 ± 0,02 ^{gB}	3,83 ± 0,07 ^{hiC}	4,49 ± 0,03 ^{ghD}	4,60 ± 0,00 ^{mD}
C4	2,28 ± 0,06 ^{ghA}	3,55 ± 0,03 ^{iB}	3,97 ± 0,02 ^{jkC}	4,09 ± 0,02 ^{cdefghC}	4,27 ± 0,01 ^{hiD}
C5	3,04 ± 0,07 ^{iB}	2,55 ± 0,04 ^{bA}	3,58 ± 0,01 ^{efgC}	4,01 ± 0,02 ^{cdefghD}	4,21 ± 0,03 ^{ghE}
C6	1,05 ± 0,02 ^{bcA}	2,69 ± 0,01 ^{bcdB}	3,48 ± 0,03 ^{cdeC}	3,82 ± 0,01 ^{abcdeD}	4,01 ± 0,02 ^{deE}
C7	1,22 ± 0,03 ^{cdA}	2,95 ± 0,03 ^{fgB}	4,27 ± 0,02 ^{IC}	4,29 ± 0,02 ^{defghC}	4,41 ± 0,01 ^{ikD}
C8	1,16 ± 0,04 ^{bcdA}	2,37 ± 0,01 ^{aB}	4,04 ± 0,03 ^{kC}	4,42 ± 0,01 ^{ghD}	4,58 ± 0,02 ^{lmE}
C9	2,44 ± 0,02 ^{hiA}	2,94 ± 0,08 ^{efgA}	4,30 ± 0,03 ^{IB}	4,42 ± 0,60 ^{ghB}	4,42 ± 0,02 ^{ikB}
BA1	3,04 ± 0,05 ^{jA}	3,60 ± 0,03 ^{iB}	4,26 ± 0,02 ^{IC}	4,37 ± 0,01 ^{fghC}	4,73 ± 0,03 nD
BA2	2,63 ± 0,02 ^{iA}	3,30 ± 0,03 ^{iB}	4,04 ± 0,02 ^{kC}	4,34 ± 0,01 ^{efghD}	4,75 ± 0,02 ^{nE}
BA3	1,93 ± 0,02 ^{efA}	3,63 ± 0,05 ^{iB}	3,86 ± 0,02 ^{hiC}	4,05 ± 0,05 ^{cdefghD}	4,04 ± 0,04 ^{efD}
BA4	1,07 ± 0,19 ^{bcA}	3,33 ± 0,09 ^{iB}	3,64 ± 0,01 ^{gB}	4,12 ± 0,07 ^{cdefghC}	4,34 ± 0,02 ^{ijC}
BA5	2,04 ± 0,04 ^{fA}	2,97 ± 0,02 ^{fgB}	3,49 ± 0,01 ^{defC}	3,85 ± 0,01 ^{abcdefD}	3,85 ± 0,03 ^{cdD}
BA6	0,96 ± 0,05 ^{abA}	2,82 ± 0,02 ^{defB}	3,59 ± 0,02 ^{fgC}	3,98 ± 0,05 ^{cdefghD}	4,14 ± 0,05 ^{fgE}
BA7	1,36 ± 0,05 ^{dA}	2,67 ± 0,03 ^{bcB}	3,78 ± 0,03 ^{hC}	3,78 ± 0,02 ^{abcdC}	4,22 ± 0,03 ^{ghD}
BA8	1,06 ± 0,02 ^{bcA}	2,98 ± 0,03 ^{gB}	3,81 ± 0,02 ^{hiC}	3,72 ± 0,02 ^{abcD}	3,91 ± 0,01 ^{cdE}
BA9	2,00 ± 0,01 ^{efA}	3,15 ± 0,02 ^{hB}	3,26 ± 0,01 ^{bC}	3,34 ± 0,02 ^{aD}	3,48 ± 0,01 ^{aE}
BA10	2,32 ± 0,03 ^{ghA}	2,36 ± 0,02 ^{aA}	2,90 ± 0,01 ^{aB}	3,42 ± 0,01 ^{abC}	3,54 ± 0,01 ^{aD}
BA11	2,14 ± 0,06 ^{fgA}	2,27 ± 0,01 ^{aB}	3,16 ± 0,02 ^{bC}	3,37 ± 0,01 ^{aD}	3,66 ± 0,01 ^{bE}
SC1	1,06 ± 0,02 ^{bcA}	2,64 ± 0,02 ^{bB}	3,38 ± 0,01 ^{cC}	3,96 ± 0,01 ^{bdefgD}	4,05 ± 0,04 ^{efD}

Medias seguidas de diferentes letras minúsculas en la misma columna indica diferencia significativa (test de Tukey test. $p < 0.05$).

Medias seguidas de diferentes letras mayúsculas en el mismo renglón indica diferencia significativa (test de Tukey test. $p < 0.05$). C:

Córdoba, BA: Buenos Aires, SC: Starter Comercial

Respecto al efecto del NaCl sobre la pigmentación del reverso de las colonias de *P. nalgiovense*, se observó que aumenta la intensidad del color anaranjado con el aumento

gradual de la concentración de NaCl (Figura 12), lo cual podría ser consecuencia de la estimulación por parte de esta sal para la producción del pigmento nalgiovensina. Este resultado concuerda con Chávez et al. (2011). El aislamiento C8 es una excepción, ya que se produjo poca pigmentación y muy clara en todas las condiciones estudiadas, siendo esta una particularidad frente a las características de la especie según lo describe Pitt y Hocking (2009).

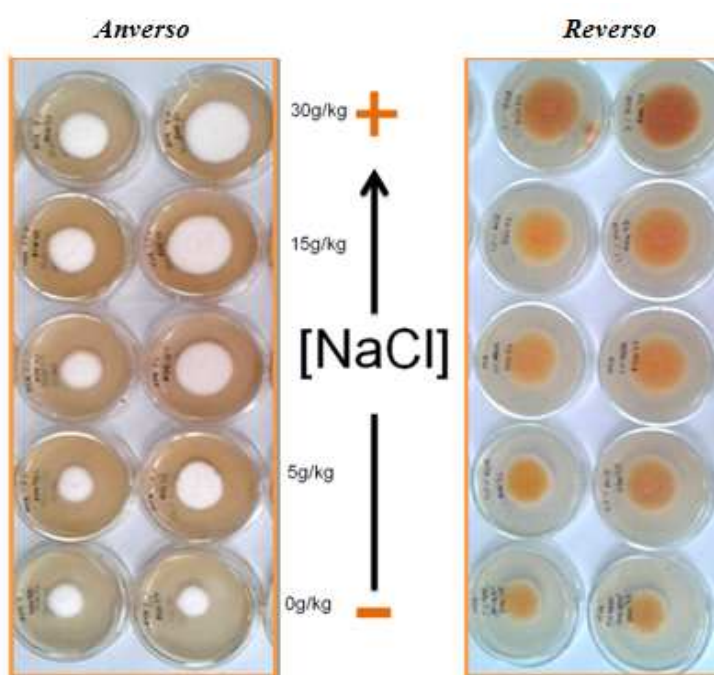


Figura 12: Comparación de los diámetros de colonias (mm) y la producción de nalgiovensina (reverso) obtenidos al día 18 de incubación para las cepas 23 y 24 a diferentes concentraciones de NaCl (0, 5, 10, 15 y 30 g de NaCl / kg MEA).

Se corroboró que la matriz láctea es un buen sustrato para el crecimiento del hongo *P. nalgiovensense* evidenciándose su aptitud para el desarrollo en medio tipo queso (Figura 13). Hansen y Nielsen (1997) obtuvieron el mismo resultado al hacer crecer hongos pertenecientes al género *Penicillium* en medio tipo queso. Como puede observarse, los diámetro alcanzados al día 6 en el medio queso modificado son similares a

los obtenidos en el medio óptimo (MEA) con particularidades en los aislamientos BA10 y BA11 que presentaron un mayor diámetro en el medio tipo queso.

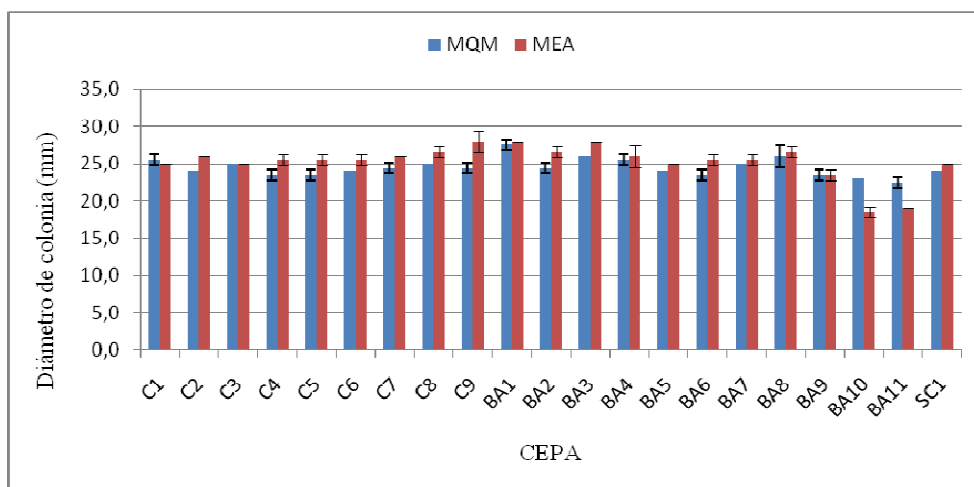


Figura 13: Comparación de los diámetros finales obtenidos al día 6 en las 21 cepas de *P. nalgiovense* crecidas en MEA y MQM con 15 g NaCl/kg de medio.

A partir del análisis de varianza se pudo determinar que existe diferencia significativa entre los valores de diámetro final de las 21 cepas de *P. nalgiovense* obtenidos al crecerlos en MQM con 15 g NaCl/kg durante 6 días.

En ninguna de las condiciones evaluadas se observó correlación ni tendencias de los resultados en relación con el origen geográfico de las cepas.

3.4 Screening de la actividad proteolítica y lipolítica

Los 21 aislamientos mostraron tener actividad proteolítica y lipolítica a 25 y 12 °C (Tabla 7). El aumento de la temperatura produjo estimulación sobre ambas actividades enzimáticas, con excepción del aislamiento C3 que tuvo el mismo comportamiento a ambas temperaturas para actividad proteolítica.

Los valores de actividad proteolítica, tanto a 12 como a 25 °C mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). A 12 °C se obtuvo un volumen promedio de proteólisis de 1,8 cm³ con un máximo de 2,6 cm³ (cepa C7) y un mínimo de 1,3 cm³ (cepa

SC1), mientras que a 25 °C se obtuvo un volumen promedio de 2,8 cm³, con un máximo de 3,6 cm³ (cepa C3) y un mínimo de 1,7 cm³ (cepa C8).

Tabla 7: Actividad proteolítica (A) y lipolítica (B) extracelular, expresada en cm³, de las 21 cepas de *P. nalgiovense* crecidas en MQM a 12 °C and 25 °C.

A) ID	Actividad proteolítica (cm ³)		B) ID	Actividad lipolítica (cm ³)	
	12 °C	25 °C		12 °C	25 °C
C1	2,5 ± 0,2 ^{fgA}	3,6 ± 0,1 ^{dB}	C1	3,0 ± 0,2 ^{gA}	4,0 ± 0,3 ^{bB}
C2	1,8 ± 0,3 ^{abcdeA}	3,0 ± 0,1 ^{bcdB}	C2	2,8 ± 0,3 ^{fgA}	4,8 ± 0,3 ^{dB}
C3	1,8 ± 0,2 ^{bcdA}	1,8 ± 0,2 ^{aA}	C3	2,5 ± 0,3 ^{defgA}	3,8 ± 0,3 ^{bB}
C4	2,0 ± 0,3 ^{defA}	2,7 ± 0,1 ^{bcB}	C4	2,9 ± 0,1 ^{gA}	3,9 ± 0,2 ^{bB}
C5	1,8 ± 0,2 ^{bcdA}	2,6 ± 0,2 ^{bcB}	C5	2,4 ± 0,1 ^{cdefgA}	4,0 ± 0,2 ^{bB}
C6	1,5 ± 0,3 ^{abcdA}	2,4 ± 0,3 ^{abB}	C6	2,7 ± 0,1 ^{efgA}	3,7 ± 0,2 ^{bB}
C7	1,4 ± 0,3 ^{abA}	3,1 ± 0,2 ^{bcdB}	C7	2,6 ± 0,0 ^{defgA}	3,7 ± 0,2 ^{bB}
C8	2,6 ± 0,1 ^{gA}	1,8 ± 0,3 ^{aB}	C8	2,8 ± 0,1 ^{fgA}	3,7 ± 0,3 ^{bB}
C9	1,4 ± 0,1 ^{abcA}	2,7 ± 0,2 ^{bcB}	C9	2,8 ± 0,3 ^{fgA}	3,9 ± 0,1 ^{bB}
BA1	1,3 ± 0,2 ^{aA}	3,0 ± 0,2 ^{bcdB}	BA1	1,6 ± 0,2 ^{aA}	3,4 ± 0,3 ^{abB}
BA2	1,9 ± 0,1 ^{cdeA}	2,6 ± 0,3 ^{bcdB}	BA2	2,2 ± 0,3 ^{abcdeA}	3,7 ± 0,2 ^{bB}
BA3	1,9 ± 0,1 ^{cdeA}	2,8 ± 0,1 ^{bcdB}	BA3	2,6 ± 0,2 ^{defgA}	4,1 ± 0,3 ^{bcB}
BA4	1,7 ± 0,2 ^{abcdeA}	3,1 ± 0,3 ^{bcdB}	BA4	1,6 ± 0,3 ^{aA}	4,7 ± 0,2 ^{cdB}
BA5	1,4 ± 0,0 ^{abcA}	3,3 ± 0,2 ^{cdB}	BA5	2,8 ± 0,2 ^{efgA}	3,5 ± 0,1 ^{abB}
BA6	1,5 ± 0,1 ^{abcdA}	2,9 ± 0,4 ^{bcdB}	BA6	2,7 ± 0,1 ^{efgA}	3,6 ± 0,1 ^{abB}
BA7	1,5 ± 0,1 ^{abcdA}	2,6 ± 0,4 ^{bcB}	BA7	2,7 ± 0,1 ^{efgA}	2,9 ± 0,2 ^{aA}
BA8	2,1 ± 0,2 ^{efgA}	3,1 ± 0,4 ^{bcdB}	BA8	1,8 ± 0,2 ^{abcA}	3,8 ± 0,2 ^{bB}
BA9	1,9 ± 0,1 ^{bcdA}	2,6 ± 0,2 ^{bcB}	BA9	2,3 ± 0,1 ^{bcdA}	3,7 ± 0,1 ^{bB}
BA10	1,5 ± 0,0 ^{bcdA}	2,7 ± 0,5 ^{bcB}	BA10	2,0 ± 0,3 ^{abcdA}	4,0 ± 0,3 ^{bB}
BA11	2,1 ± 0,1 ^{efgA}	2,7 ± 0,1 ^{bcB}	BA11	1,9 ± 0,2 ^{abc}	3,7 ± 0,3 ^b
SC1	1,6 ± 0,2 ^{abcdeA}	2,7 ± 0,2 ^{bcB}	SC1	1,7 ± 0,1 ^{abA}	3,6 ± 0,2 ^{bB}

Medias seguidas de diferentes letras minúsculas en la misma columna indica diferencia significativa (test de Tukey test, $p < 0.05$). Medias seguidas de diferentes letras mayúsculas en el mismo renglón indica diferencia significativa (test de Tukey test, $p < 0.05$). C: Córdoba, BA: Buenos Aires, SC: Starter Comercial

Respecto a la actividad lipolítica, a 12 °C se obtuvo un volumen promedio de lipólisis de 2,4 cm³ con un máximo de 3,5 cm³ (cepa C1) y un mínimo de 1,7 cm³ (cepa BA11), mientras que a 25 °C se obtuvo un volumen promedio de 3,8 cm³, con un máximo

de 4,8 cm³ (cepa C2) y un mínimo de 3,1 cm³ (cepa BA7). Al igual que con la actividad proteolítica, se obtuvo diferencia significativa con la actividad lipolítica a 25 °C, por el contrario, a 12 °C no se obtuvo diferencia significativa de actividad lipolítica entre las distintas cepas. Resultados similares obtuvieron otros autores, Larsen y Jensen (1999), Papagianni (2014) y Alapont et al. (2015) estudiaron la actividad enzimática a 25 °C de diferentes especies de *Penicillium*, resultando ser *P. nalgiovense* una de las especies con mayor actividad enzimática, lo cual sugiere su potencialidad para ser usada como starter. Por otro lado, pocos trabajos se refieren al estudio de la actividad enzimática a 12 °C. Galvalisi et al. (2012), evaluaron 11 especies de *Penicillium* y no encontraron ninguna, incluida *P. nalgiovense*, que produjera lipasas extracelulares a 12 °C.

No se observó tendencia relacionada con el origen geográfico de las cepas para ninguna de las dos actividades enzimáticas ni las temperaturas evaluadas.

3.5 Evaluación de la capacidad de producción de penicilina

El gen *penDE* es uno de los tres genes involucrados en la biosíntesis de penicilina, codifica para isopenicillin N (IPN) acyltransferase, y está presente siempre en los casetes génicos de *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum* y *Aspergillus nidulans* (Laich et al., 1999). Así fue usado en este trabajo como método de screening para evidenciar la potencial producción de penicilina en los aislamientos bajo estudio.

La amplificación de los 21 ADN extraídos de las cepas de *P. nalgiovense*, utilizando los primers *aat1* y *aat2*, permitió obtener una única banda de 750 pb (Figura 14). Al comparar los productos secuenciados de las cepas con la base de datos del GenBank se obtuvo una alta similitud (> 94 %) con el gen *penDE* de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 acyl-coenzyme A (referencia de acceso al Gen Bank: XM_002569066), indicando que las 21 cepas de *P. nalgiovense* en estudio poseen en su genotipo el gen *penDE*.



Figura 14: Gel obtenido para los productos de PCR de cepas de *P. nalgiovense* evaluadas. M: marcador de peso molecular, C-: control negativo (*Aspergillus ochraceus*), B1: blanco, C+: hongo productor de penicilina (*P. chrysogenum*).

A partir del bioensayo por difusión en placa se verificó que todas las cepas estudiadas inhibieron el crecimiento de *Micrococcus luteus* a 25 °C. La exitosa inactivación de la sustancia excretada por *P. nalgiovense* por el agregado de la enzima β -lactamasa evidenció que dicha sustancia se trataba de penicilina (Figura 15).

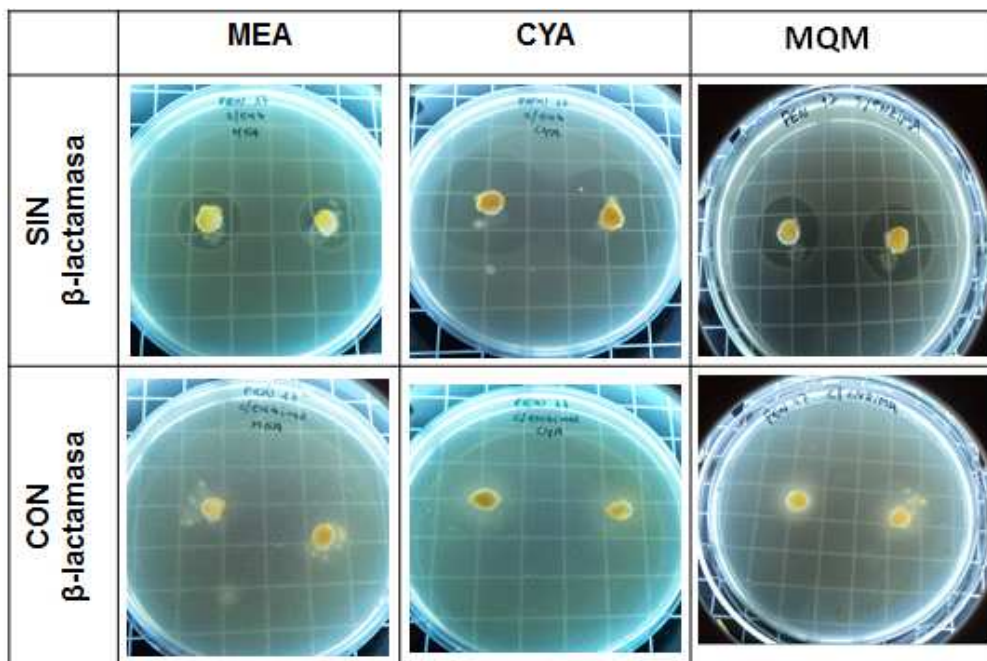


Figura 15: Actividad antimicrobiana de la cepa BA2, crecida a 25 °C en, MEA, CYA y MQM con y sin el agregado de la enzima β -lactamasa.

Respecto a la zona de inhibición obtenida sobre los tres medios, se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los aislamientos, excepto en C3, BA7, BA9 y SC1 (Tabla 8A). El medio CYA fue el que más estimuló la producción de penicilina, dicho fenómeno podría deberse a la presencia de trazas de zinc y cobre en la composición del medio (Smith, 1949). La menor estimulación se obtuvo con el MEA.

En cuanto a la variabilidad entre las 21 cepas, también se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$), pero no se encontró ninguna correlación con el origen geográfico de las mismas. La cepa BA9 se diferencia del resto por obtener los mayores halos de inhibición en los tres medios de cultivo estudiados.

Al repetir la experiencia anterior con agar MQM a 12 °C se obtuvo un descenso significativo ($70 \% \pm 5 \%$) de la actividad inhibitoria. Además, cabe resaltar que las cepas C2, C3, C4, C5, BA3 y BA4 se distinguieron por no mostrar actividad antimicrobiana en esas condiciones evaluadas (Tabla 8B).

Es importante destacar que el starter comercial (SC1) mostró ser productor de penicilina.

Tabla 8: Halos de inhibición (mm) del crecimiento de *Micrococcus luteus* por la producción de penicilina de las 21 cepas de *P. nalgiovense* crecidas a 25 ° C (A) en MEA, CYA y MQM, y en MQM a 25 ° C y 12 ° C (B).

A)	ID	25 °C			B)	ID	25 °C	12 °C
		MEA	CYA	MQM			MQM	
	C1	15.5 ± 0.7 ^{efA}	32.5 ± 0.7 ^{aC}	22.5 ± 0.7 ^{cdB}		C1	22.5 ± 0.7 ^{cdB}	7.5 ± 0.7 ^{abcA}
	C2	7.0 ± 0 ^{abA}	33.0 ± 0 ^{abC}	23.5 ± 0.7 ^{cdeB}		C2	23.5 ± 0.7 ^{cdeB}	6.0* ± 0 ^{aA}
	C3	11.0 ± 0 ^{edA}	32.5 ± 7.0 ^{abB}	31.5 ± 0.7 ^{ghB}		C3	31.5 ± 0.7 ^{ghB}	6.0* ± 0 ^{aA}
	C4	10.5 ± 0.7 ^{cdA}	33.5 ± 0.7 ^{abcC}	26.5 ± 0.7 ^{fb}		C4	26.5 ± 0.7 ^{fb}	6.0* ± 0 ^{aA}
	C5	15.0 ± 0 ^{fa}	33.5 ± 0.7 ^{abcC}	21.5 ± 0.7 ^{cb}		C5	21.5 ± 0.7 ^{cb}	6.0* ± 0 ^{aA}
	C6	13.5 ± 0.7 ^{efA}	32.5 ± 0.7 ^{aC}	22.5 ± 0.7 ^{cdB}		C6	22.5 ± 0.7 ^{cdB}	7.25 ± 0.35 ^{abcA}
	C7	13.5 ± 0.7 ^{efA}	34.5 ± 0.7 ^{abcC}	25.5 ± 0.7 ^{efB}		C7	25.5 ± 0.7 ^{efB}	8.25 ± 0.35 ^{bcA}
	C8	13.5 ± 0.7 ^{efA}	33.5 ± 0.7 ^{abcC}	30.5 ± 0.7 ^{gB}		C8	30.5 ± 0.7 ^{gB}	10.5 ± 0.7 ^{eA}
	C9	14.0 ± 0 ^{efA}	36.0 ± 0 ^{cC}	33.5 ± 0.7 ^{hB}		C9	33.5 ± 0.7 ^{hB}	7.5 ± 0.7 ^{abcA}
	BA1	14.5 ± 0.7 ^{efA}	34.5 ± 0.7 ^{abcC}	25.5 ± 0.7 ^{efB}		BA1	25.5 ± 0.7 ^{efB}	7.5 ± 0.7 ^{abcA}
	BA2	13.5 ± 0.7 ^{efA}	32.5 ± 0.7 ^{aC}	22.5 ± 0.7 ^{cdB}		BA2	22.5 ± 0.7 ^{cdB}	7.5 ± 0.7 ^{abcA}
	BA3	12.5 ± 0.7 ^{deA}	33.5 ± 0.7 ^{abcC}	24.5 ± 0.7 ^{defB}		BA3	24.5 ± 0.7 ^{defB}	6.0* ± 0 ^{aA}
	BA4	13.5 ± 0.7 ^{efA}	33.5 ± 0.7 ^{abcC}	24.5 ± 0.7 ^{defB}		BA4	24.5 ± 0.7 ^{defB}	6.0* ± 0 ^{aA}
	BA5	6.5 ± 0.7 ^{aA}	35.0 ± 0 ^{abcC}	14.5 ± 0.7 ^{aB}		BA5	14.5 ± 0.7 ^{aB}	7.0 ± 0 ^{abA}
	BA6	11.0 ± 0 ^{cdA}	35.5 ± 0.7 ^{bcC}	32.5 ± 0.7 ^{ghB}		BA6	32.5 ± 0.7 ^{ghB}	10.0 ± 0 ^{deA}
	BA7	18.5 ± 0.7 ^{gA}	32.5 ± 0.7 ^{aB}	32.5 ± 0 ^{ghB}		BA7	32.5 ± 0 ^{ghB}	8.0 ± 0.7 ^{bcA}
	BA8	9.0 ± 0 ^{bcA}	34.5 ± 0.7 ^{abcC}	17.0 ± 0 ^{abB}		BA8	17.0 ± 0 ^{abB}	7.0 ± 0 ^{abA}
	BA9	25.0 ± 0 ^{ia}	41.5 ± 0.7 ^{dB}	40.5 ± 0.7 ^{iB}		BA9	40.5 ± 0.7 ^{iB}	11.0 ± 0 ^{eA}
	BA10	20.5 ± 0.7 ^{ghB}	35.0 ± 0 ^{abcC}	17.5 ± 0.7 ^{bA}		BA10	17.5 ± 0.7 ^{bB}	8.75 ± 0.35 ^{cdA}
	BA11	21.5 ± 0.7 ^{hB}	32.5 ± 0.7 ^{aC}	16.5 ± 0.7 ^{abA}		BA11	16.5 ± 0.7 ^{abB}	7.5 ± 0.7 ^{abcA}
	SC1	10 ± 0 ^{ca}	33.5 ± 0.7 ^{abcB}	32.5 ± 0.7 ^{ghB}		SC1	32.5 ± 0.7 ^{ghB}	7.0 ± 0 ^{abA}
	C+	43.0 ± 0.7	43.0 ± 0	45.0 ± 0		C+	45.0 ± 0	45.0 ± 0
	C+H	22.5 ± 0.7	40.0 ± 0	40.0 ± 0		C+H	40.0 ± 0	9.0 ± 0
	C-	6.0* ± 0	6.0* ± 0	6.0* ± 0		C-	6.0* ± 0	6.0* ± 0

C+ control de penicilina, C+H control de hongo productor de penicilina, C- control de medio, * No se observe halo.

Medias seguidas de diferentes letras minúsculas en la misma columna indica diferencia significativa (test de Tukey test. $p < 0.05$). Medias seguidas de diferentes letras mayúsculas en el mismo renglón indica diferencia significativa (test de Tukey test. $p < 0.05$). C: Córdoba, BA: Buenos Aires, SC: Starter Comercial.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

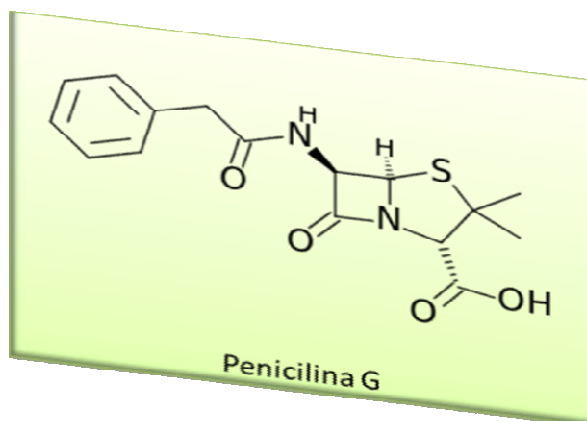
De este primer capítulo se puede concluir que, si bien las 21 cepas de *Penicillium nalgiovense* provienen de distintas regiones geográficas del país, su comportamiento fisiológico no responde a un agrupamiento según su origen. Asimismo, entre cepas, la variabilidad genética fue muy baja.

Todas las cepas mostraron habilidad de crecimiento en medio tipo queso, presentando una estimulación frente a la adición de cloruro de sodio, corroborándose así que el queso es un sustrato aceptable para *P. nalgiovense*. A nivel enzimático, todas las cepas presentaron actividad proteolítica y lipolítica, variando la respuesta respecto a la temperatura de incubación. Al evaluar la producción de penicilina todas las cepas demostraron ser portadoras del gen *penDE* y lo expresaron *in vitro* por medio de la técnica de difusión en agar. Cabe aclarar que la actividad inhibitoria obtenida se vio influenciada tanto por el medio de cultivo como por la disminución de la temperatura de incubación, destacándose las cepas C2, C3, C4, C5, BA3 y BA4 por no presentar actividad inhibitoria en medio tipo queso a 12 °C.

Considerando la alta homología entre cepas y todo lo anteriormente descrito, se seleccionaron las cepas C5, BA3 y BA4, como representantes de los distintos subcluster obtenidos, para seguir trabajando en la investigación y desarrollo del producto deseado. Para dicha selección se priorizó a las cepas no productoras de penicilina en agar queso a 12 °C. Además, se seguirá trabajando con SC1 como control comercial.

CAPÍTULO II

Evaluación de la producción de penicilina G en queso Tybo fundido contenido en tripa



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo de este capítulo fue evaluar la producción de penicilina en queso Tybo fundido contenido en tripa y para ello se consideraron los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Evaluar distintas cepas de *P. nalgiovense* en queso Tybo fundido contenido en tripa, de forma de seleccionar la de mejor adaptación al producto y cumpla con la menor capacidad de producción de penicilina.
- ✓ Evaluar la cinética de producción de penicilina durante la maduración del queso.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Evaluación de la producción de penicilina en queso Tybo fundido contenido en tripa

2.1.1. Elaboración de los quesos contenidos en tripa

Se embutió queso Tybo marca “El Puente”, elaborado por Usina Láctea El Puente S.A., RNPA N° 04-034752 (Ordoñez, Córdoba). Para ello se picó y luego se fundió durante 10 min a 75 °C en olla de teflón, sobre disco de hierro de forma de homogeneizar el calor, obteniéndose una masa uniforme y elástica. Se la embutió en tripa de colágeno de 40 mm de calibre (previamente hidratada por 5 min con agua a temperatura ambiente), utilizando una embutidora vertical manual (SANTINI V3, Italia). Luego se efectuó el atado con hilo de algodón, realizando doble nudo cada 10 cm, aproximadamente, y se pinchó la superficie de todos los quesos para evitar la retención de burbujas de aire,

indeseables al promover el crecimiento bacteriano y disminuir el del hongo por evitar el contacto con la matriz láctea (Figura 16).



Figura 16: Elaboración de los quesos contenidos en tripa: Picado (A-C), fundido (D-G), hidratación de la tripa (H), embutido (I-K), queso embutido (L), pinchado (M).

2.1.2. Preparación de la suspensión de conidios e inoculación

Se preparó una suspensión de conidios para cada una de las cepas de *P. nalgiovense* seleccionadas en el Capítulo I: C5, BA3, BA4 y SC1, y de *Penicillium chrysogenum* (PEC 2) como control positivo de producción de penicilina. Para ello se repicaron las cepas desde un cultivo fresco (Capítulo I, punto 2.1) en MEA y luego de ser incubadas a 25 °C por 7 días se recogieron los conidios por raspado, con agua destilada estéril con 0,1 % de Tween 80. Se procedió a cuantificar con cámara de Neubauer y se realizaron las respectivas diluciones para obtener, en todos los casos, una concentración final en el orden de 10^5 conidios/mL, que posteriormente se verificó realizando un recuento por siembra en superficie en agar dicloran glicerol 18 % (DG18) (Anexo I). Para cada cepa a evaluar se inocularon, por rociado, dos quesos contenidos en tripa, a razón de 1 mL por queso.

2.1.3. Maduración y conservación en refrigeración

Los quesos embutidos e inoculados con cada aislamiento fueron cubiertos con bolsas de nylon, para evitar la contaminación cruzada entre ellos, previendo dejar abierta la base para garantizar condición de aerobiosis. Posteriormente, fueron colgados dentro de una cámara de incubación (MyC-Lab 100, Argentina) que fue previamente desinfectada con solución de hipoclorito de sodio al 10 % y UV (Figura 17). Se verificó la limpieza de la misma realizando un muestreo ambiental con Agar Extracto de Levadura, Glucosa, Cloranfenicol (YGC) (Britania, Argentina) expuestas por 15 min. Se incubaron por 7 días a 25 °C. La maduración se llevó a cabo en condiciones controladas a 12 °C y 90 % h.r., durante 14 días por ser el tiempo en el cual, en experiencias anteriores, se logró obtener una cobertura total y homogénea de toda la superficie. Las condiciones fueron monitoreadas con un termohigrómetro digital Nyceto Modelo TH812.

Luego de la maduración, los quesos de un mismo aislamiento fueron colocados en sobres de papel y almacenados en refrigeración a 5 °C y 60 % h.r. por 7 días, con el objeto de reproducir el proceso completo de la cadena productiva.



Figura 17: Acondicionamiento para la maduración de los quesos contenidos en tripa

2.1.4. Análisis de los quesos contenidos en tripa

Luego de la maduración y la etapa de refrigeración de los quesos (21 días desde su elaboración), se procedió a evaluar la producción de penicilina y a realizar el recuento de hongos en tripa. Se estudiaron dos quesos madurados con cada cepa de *P. nalgiovense*, como también con el control positivo de *P. chrysogenum*. De cada queso se cortó una rodaja central de 5 cm (Figura 18) y se extrajo la tripa que se reservó para realizar el recuento de hongos (sección 2.1.4.1). El queso correspondiente a esa rodaja se utilizó para el análisis de penicilina (sección 2.1.4.2) para lo cual se cortó en cubos y luego se picó con una procesadora (Hr 1372, Philips) lavada previamente con abundante agua para eliminar cualquier residuo de penicilina que pudiera haber quedado de ensayos anteriores, ya que es soluble en agua.



Figura 18: Rodaja central de 5 cm de queso contenido en tripa, muestreada para el análisis

2.1.4.1. Recuento de hongos en tripa

La tripa apartada anteriormente se utilizó para realizar el recuento de hongos. Para esto se cortó en condiciones estériles dos cuadrados, de forma de tener el duplicado de recuento correspondiente, de 5 cm de lado cada uno. A cada cuadrado se le agregó 200 mL de agua de peptona 0,1 %, luego se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en superficie en DG18, las diluciones -4, - 5 y -6. Tras 7 días de incubación a 25 °C, se hizo el recuento correspondiente y se lo expresó como UFC/cm² de tripa. Las distintas morfologías obtenidas fueron identificadas según Pitt y Hocking (2009).

2.1.4.2. Análisis cuantitativo de penicilina mediante inmunoensayo enzimático

A partir de los quesos picados se cuantificó penicilina mediante un Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), competitivo, utilizando el kit comercial RIDASCREEN® Penicillin ((R-Biopharm AG, Germany)) Art. Nr. R2921. El mismo está validado para el análisis cuantitativo de penicilinas en leche, productos lácteos derivados (leche condensada, bebidas de suero, manteca, queso, cuajada, crema, crema agria, crema fresca, yogur, kéfir), alimentos para bebés, suero (bovino, porcino) y carne (carne de res, cerdo, aves de corral).

Como control negativo del ensayo se utilizó queso Tybo fundido del mismo lote del cual se elaboraron los quesos. Por otro lado, se realizó un control de recuperación de

penicilina en la matriz láctea a analizar. Para ello, se preparó una solución de penicilina G sódica (Sigma P3032) de concentración 0,6 mg/L, de la cual se tomó 0,05 mL y se homogeneizó con 5 g de queso Tybo previamente fundido, enfriado y picado, lográndose una concentración en el queso a analizar equivalente a 6 µg/kg (concentración próxima al límite establecido en leche (4 µg/kg) y consistente con el límite de detección del kit (2,5 g/kg)).

En todos los casos (quesos de estudio, control negativo y control de recuperación) se realizaron dos extracciones, las cuales fueron analizadas por duplicado con la técnica ELISA, según descripción del fabricante del kit. El método consiste en una extracción seguida del ensayo ELISA propiamente. Brevemente, para la extracción se realizó una homogeneización con stomacher (60 s), de 5 g de queso picado y 20 mL de agua destilada estéril, seguido de una centrifugación por 10 min a 4000 g y 4 °C (centrífuga Avanti J-26 XP, Beckman Coulter). Se tomó 0,25 mL de la fase acuosa ubicada en la parte más baja de la interfase inferior y se mezcló con 0,75 mL del buffer de muestra (diluido 1:4 con agua destilada) provisto por el kit. A continuación, se procedió a realizar la técnica ELISA según instrucciones del proveedor (Anexo II), utilizando 6 patrones que se obtuvieron reconstituyendo el vial provisto por el kit y luego realizando sucesivas diluciones para obtener las concentraciones 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 µg/L. Además se incorporó la concentración 0 µg/L. La absorbancia se midió a 450 nm con un espectrofotómetro (R-Biopharm AG, Germany) y los datos fueron introducidos en el software RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. No. Z9996), que arrojó los resultados de la cuantificación.

2.2. Cinética de producción de penicilina durante la maduración y conservación de quesos contenidos en tripa.

2.2.1. Elaboración de los quesos contenidos en tripa

Para evaluar la cinética de producción de penicilina se realizó una nueva elaboración de quesos siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.1.1, obteniendo quesos contenidos en tripa, de 10 cm de largo y con 40 mm de diámetro.

2.2.2. Preparación de la suspensión de conidios e inoculación

La suspensión de conidios se preparó a partir de la cepa *P. nalgiovense* C5, según el procedimiento descrito en la sección 2.1.2, lográndose una suspensión de 10^3 conidios/mL. Los quesos contenidos en tripa se inocularon por rociado a razón de 1 mL por queso.

2.2.3. Maduración y conservación en refrigeración

Los quesos contenidos en tripa se colgaron dentro de la incubadora y se maduraron durante 14 días a temperatura y humedad relativa controlada: 12 °C y 90 % h.r. Se inspeccionaron las condiciones con un termohigrómetro digital Nicety Modelo TH812. Posteriormente fueron envueltos, de forma individual, con papel de aluminio, y almacenados en refrigeración por 16 días a 5 °C y 90 % h.r.

2.2.4. Cinética de análisis de los quesos contenidos en tripa

Durante la maduración y conservación en refrigeración de los quesos contenidos en tripa se tomaron muestras a los 9, 14, 17, 21, 28 y 30 días de elaborados para realizar los análisis de recuento de hongos y cuantificación de penicilina según se describió en la sección 2.1.4. Para la cuantificación de penicilina se analizaron 3 quesos por tiempo, a cada uno de ellos se les efectuó una extracción y se analizó la misma por duplicado con la técnica ELISA. Al igual que en el ensayo anterior, como control negativo se utilizó queso Tybo fundido del mismo lote del cual se elaboraron los quesos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de la producción de penicilina en queso Tybo fundido contenido en tripa

Las 4 cepas usadas de *P. nalgiovense* (C5, BA3 y BA4 y SC1) crecieron sobre la superficie de la tripa, no encontrándose diferencias en cuanto a su apariencia general, pero estas sí fueron detectadas respecto al control positivo fúngico (*P. chrysogenum*), el cual, a pesar de originar una buena cobertura en el queso, resultó estar menos adherido a la tripa, siendo más sensible al desprendimiento por la manipulación.

Se verificó que la limpieza de las cámaras resultó eficaz, obteniendo en todos los casos un recuento de hongos menor a 1 UFC/cm²/15 min.

Luego del almacenamiento refrigerado a 5 °C durante 7 días, no se exhibieron cambios visuales en cuanto al crecimiento del hongo sobre la tripa ni a la apariencia general. Tampoco se evidenció exudado, por lo que el envoltorio resultó ser adecuado para la conservación (Figura 19).

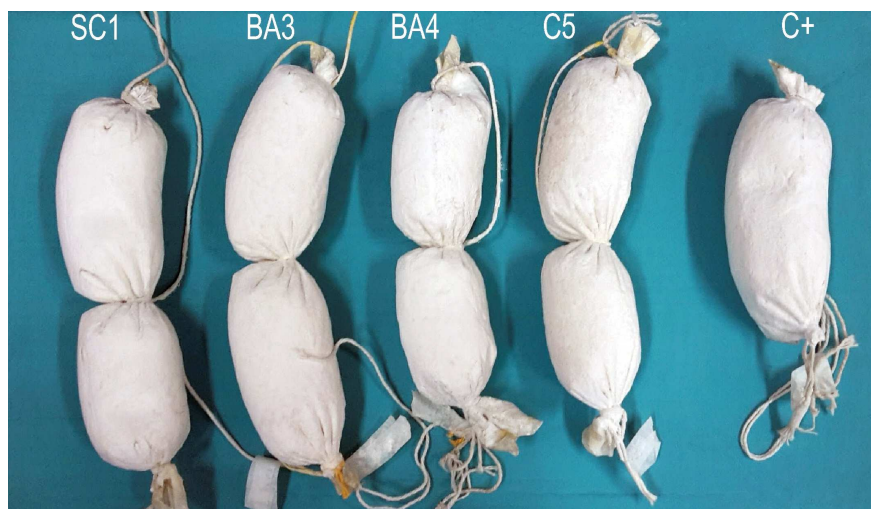


Figura 19: Quesos contenidos en tripa elaborados con queso Tybo fundido e inoculados con 10^5 conidios /queso de las cepas SC1, BA3, BA4 y C5. Madurados por 14 días a 12 °C y 90 % h.r., y luego por 7 días a 5 °C y 60 % h.r.

Todos los quesos mostraron una buena apariencia al corte, resultando ser una masa elástica y no adherente (Figura 20). No hubo presencia de ojos en la matriz, por lo que se descarta fermentación de microorganismos productores de gas, como bacterias coliformes y *Clostridium* sp. (García Garibay et al., 2004).



Figura 20: Queso contenido en tripa elaborados con queso Tybo fundido e inoculados con 10^5 conidios/queso

En cuanto al control de recuperación de penicilina, se logró un valor de 116,6 % (Anexo IV B), lo cual es concordante con lo especificado por el fabricante (115 %), por lo que se garantiza que el ensayo fue realizado correctamente y que la matriz no tiene efectos interferentes.

Con este ensayo de cuantificación se pudo constatar que todos los quesos contenidos en tripa e inoculados con las cepas de *P. nalgiovense* obtenidos, luego de 21 días de maduración y conservación, contienen penicilina (Tabla 9, Anexo IV A). Esto indicaría la habilidad de *P. nalgiovense* para difundir dicho metabolito a través de la tripa y ser retenido en la matriz, fenómeno que también se ha observado en salames (Laich et al., 1999).

Dado que el queso contenido en tripa correspondiente al aislamiento C5, fue el que menor cantidad de penicilina generó de los cuatro aislamientos de *P. nalgiovense* estudiados, se decide continuar la investigación y desarrollo del producto con esta cepa.

La tabla 9 también representa el recuento realizado en la tripa de los quesos madurados. En ella se puede observar que, para todos los casos, se obtuvieron valores en el orden de 10^7 UFC/cm².

Sólo se obtuvo una morfología característica confirmada por la identificación como *P. nalgiovense*. No se observó contaminación con otros hongos ambientales por lo que se advierte la excelente actividad competitiva de *P. nalgiovense*. Esto coincide con resultados obtenidos por otros autores (Berwal y Dincho, 1995; Lund et al., 1995; Nielsen et al., 1998; Bernáldez et al., 2013; Cordero et al., 2015; Rodríguez et al., 2015).

Tabla 9: Resultados de los análisis de recuento de hongos y cuantificación de penicilina de los quesos obtenidos.

<i>ID</i>	<i>Penicilina G en queso (µg/kg) *</i>	<i>Recuentos de P. nalgiovense (UFC/cm²)</i>
C -	3,3 ± 0	NA
BA4	> 80	$1,4 \times 10^7 \pm 8,8 \times 10^6$
C5	$58,9 \pm 1,2$	$4,6 \times 10^7 \pm 2,9 \times 10^7$
SC1	> 80	$2,5 \times 10^7 \pm 5,2 \times 10^6$
BA3	> 80	$7,0 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$
C+ H	$45,9 \pm 13,3$	$3,7 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$

BA4, C5, SC1 y BA3: aislamientos de *P. nalgiovense*, C+ H: *P. chrysogenum*, C R: Control de recuperación de penicilina, C-: Control negativo.

*Los valores exhibidos están restados por el control negativo y tienen en consideración los efectos interferentes de la matriz.

Para las próximas experiencias se propone inocular los quesos con una solución de conidios de menor concentración que la utilizada para este ensayo, de forma de disminuir el desarrollo micelial del hongo sobre la tripa, ya que se observó que la cobertura obtenida en esta experiencia fue excesiva y esto podría influir en la cantidad de penicilina producida (Figura 21).



Figura 21: Apariencia de la tripa obtenida luego de 21 días de maduración, excesivamente inoculada con *P. nalgiovense*.

3.2. Cinética de producción de penicilina durante la maduración y conservación de quesos contenidos en tripa.

Al inocular los quesos elaborados con la cepa C5, en concentración de 10^3 conidios/queso y luego madurarlos a 12 °C y 90 % h.r., el hongo germinó al día 7 de maduración, obteniéndose al día 14 una cobertura total y homogénea pero en un nivel controlado y deseable comparado con lo obtenido en el ensayo anterior (Figura 22).

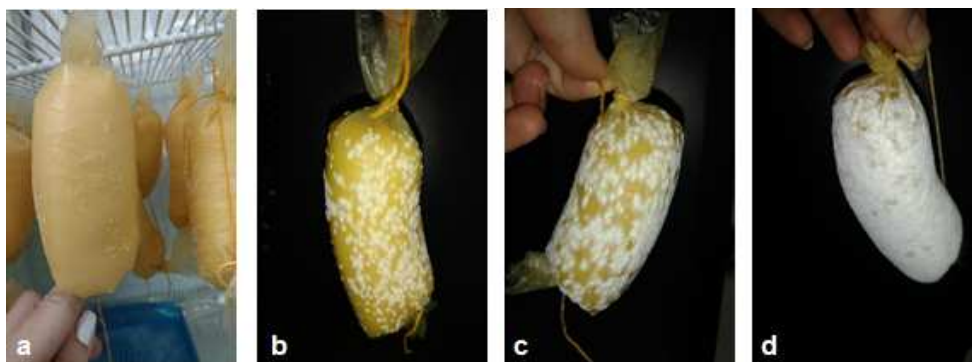


Figura 22: Apariencia de los quesos contenidos en tripa durante la maduración, transcurridos los días: a) 7, b) 9, c) 11 y d) 14.

En ese momento, los quesos se pasaron a su etapa de conservación en refrigeración, donde macroscópicamente se mantuvo el emplume (Figura 23). Respecto a

la apariencia al corte de los quesos contenidos en tripa, en los diferentes tiempos estudiados se observó que la masa láctea fue uniforme, sin agujeros, elástica y no adherente.

En la Tabla 10 (Anexo IV C) se encuentran los valores de la cuantificación de penicilina en los quesos contenidos en tripa. El valor obtenido al día 9 estuvo por debajo del límite inferior de detección del kit (2,5 g/kg) siendo la producción de penicilina creciente a partir del final de la maduración (día 14). Esto es consistente con bibliografía, Soriano del Castillo (2015) advierte que los metabolitos secundarios se generan cuando el crecimiento del hongo es lento y sostenido. Esta característica se verificó con el recuento de UFC en la tripa de los quesos (Tabla 10) ya que se demostró que del día 9 al día 14 se incrementó el desarrollo fúngico (observado también en la figura 23), obteniéndose un orden de UFC mayor, y posteriormente, cuando los quesos se conservaron en refrigeración, estos recuentos se incrementaron levemente, estancándose en valores del mismo orden que el logrado al final de la maduración. Lessard et al. (2012) observaron un comportamiento similar al elaborar quesos inoculados con *P. camemberti* y madurados con una humedad relativa constante de 90 %, a 12 °C por 9 días y luego a 4 °C por 22 días. Ellos obtuvieron recuentos que alcanzaron un máximo de $1,14 \times 10^7$ UFC/cm² al día 18 de maduración, habiendo estado 9 días a temperatura de refrigeración.

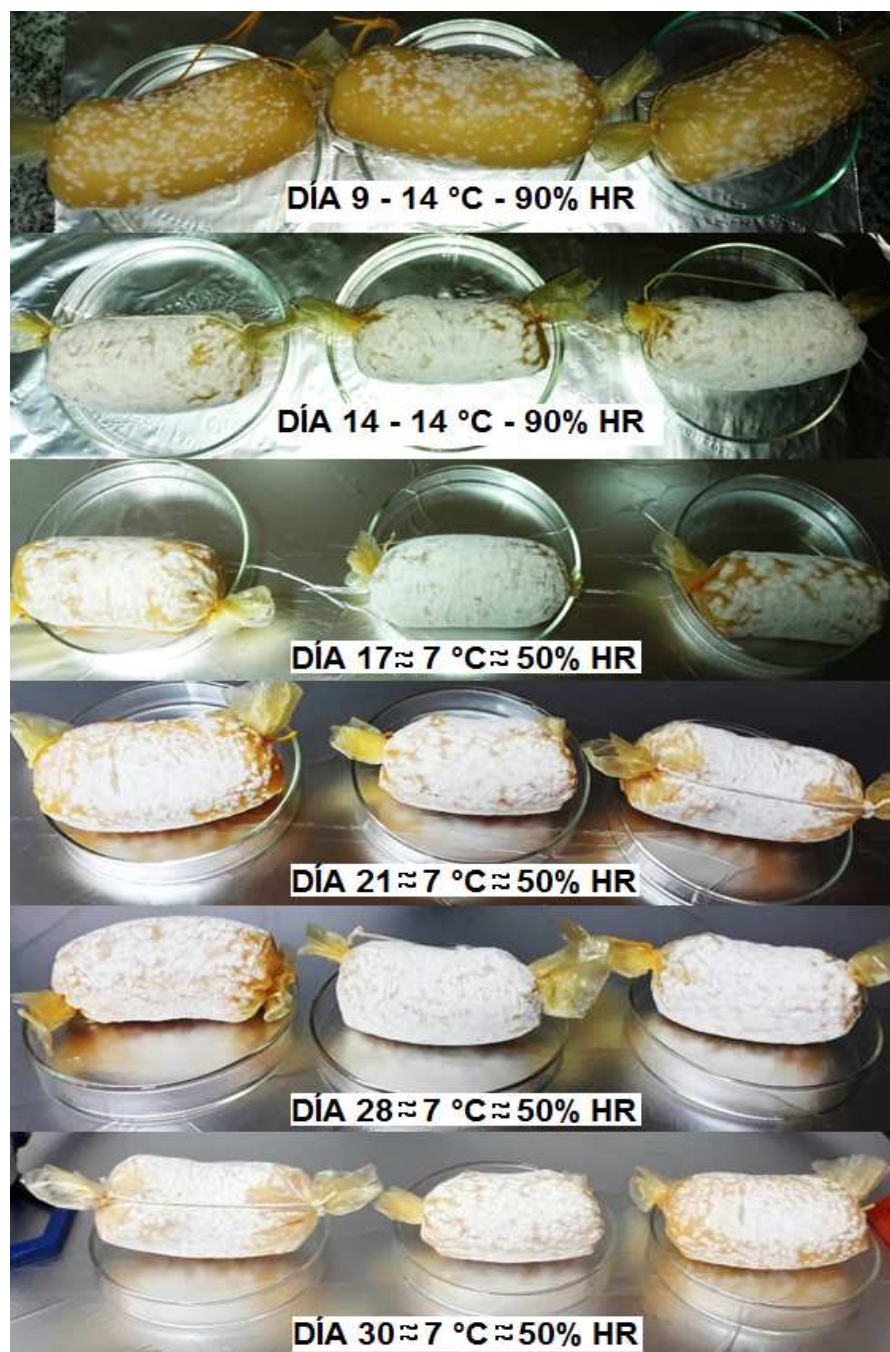


Figura 23: Apariencia de los quesos contenidos en tripa utilizados para la cuantificación de penicilina, en los distintos tiempos de maduración y conservación en refrigeración.

Tabla 10: Cuantificación de penicilina ($\mu\text{g/kg}$) en los quesos contenidos en tripa y recuento de hongos de los distintos tiempos estudiados

Muestreo	Penicilina G en queso ($\mu\text{g/kg}$)	<i>Penicillium nalgiovense</i> (C5) (UFC/cm ²)
C -	< 2,5	-
DÍA 9	< 2,5	$2,89 \times 10^6 \pm 1,10 \times 10^6$
DÍA 14	$5,6 \pm 0,7$	$2,27 \times 10^7 \pm 4,63 \times 10^6$
DÍA 17	$7,0 \pm 0,8$	$2,75 \times 10^7 \pm 7,26 \times 10^6$
DÍA 21	$10,4 \pm 0,5$	$3,08 \times 10^7 \pm 9,56 \times 10^6$
DÍA 28	$14,5 \pm 2,5$	$5,07 \times 10^7 \pm 1,69 \times 10^7$
DÍA 30	$21,5 \pm 1,2$	$7,50 \times 10^7 \pm 8,66 \times 10^6$

C -: Control negativo. Los valores de penicilina G exhibidos tienen en consideración los efectos interferentes de la matriz.

Se observó que al disminuir la concentración del inóculo inicial, el desarrollo micelial se redujo y esto impactó en el nivel de producción de penicilina, lo cual se evidenció al comparar el valor de la cepa C5 ($10,4 \pm 0,5 \mu\text{g/kg}$) con su correspondiente de la sección 3.1 ($58,9 \pm 1,2 \mu\text{g/kg}$). Además, se obtuvo que la producción de penicilina fue acumulativa en el tiempo, aún en condiciones de refrigeración, indicando que *P. nalgiovense* es metabólicamente activo en dicha condición, lo cual lleva a considerar la conservación en refrigeración como parte del proceso de maduración. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mrázek et al. (2015) quienes observaron que *P. nalgiovense* seguía metabólicamente activo sobre un queso blando aún después de una maduración prolongada de 49 días a 6 °C, dado que conservaban su actividad proteolítica.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

En el presente capítulo se pudo demostrar que las cuatro cepas de *P. nalgiovense* evaluadas produjeron penicilina en los quesos inoculados, seleccionándose la cepa C5 por

ser la que menor cantidad produjo. Se observó que *P. nalgiovense* tiene la capacidad de difundir dicho metabolito a través de la tripa y que la producción del mismo es acumulativa en el tiempo, aún a bajas temperaturas. Finalmente, se observó que el nivel de concentración inicial del inóculo influyó en el control del grado de desarrollo micelial obtenido en el emplume al día 14 y ello impactó en la concentración de penicilina producida.

CAPÍTULO III

***Evaluación de la factibilidad de
obtener quesos a partir del
embutido e inoculación fúngica
superficial de diferentes masas
frescas***



1. OBJETIVO ESPECÍFICO

El objetivo de este capítulo fue evaluar la factibilidad de obtener quesos utilizando diferentes masas lácteas frescas, contenidas en tripa e inoculadas superficialmente con *Penicillium nalgiovense*. Para ello se consideraron los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Obtener quesos, contenidos en tripa, con diferentes masas lácteas recién elaboradas en producción a escala piloto e industrial.
- ✓ Evaluar parámetros fisicoquímicos y microbiológicos durante la maduración de los quesos obtenidos.
- ✓ Estimar el límite máximo teórico de penicilina admitido en queso con desarrollo fúngico superficial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Elaboración de quesos con diferentes masas lácteas recién elaboradas en producción a escala piloto e industrial, contenidas en tripa y con desarrollo superficial de *P. nalgiovense*.

2.1.1. Trabajo en colaboración con la Empresa Cabaña Piedras Blancas

Se trabajó con la empresa Cabaña Piedras Blancas (Introducción, sección 7.1), la cual proveyó de sus instalaciones, insumos y personal para la elaboración de dos tipos de masas lácteas, características de los quesos que se producen en ese establecimiento. Una de ellas es de pasta blanda (PB) y se utiliza para la obtención de quesos Camembert y Brie, la otra es de pasta semidura (SP) y tiene como destino la producción de quesos Morbier. La Figura 24 resume el proceso de elaboración de ambas masas, evidenciando tanto las etapas que tienen en común como en las que se diferencian.

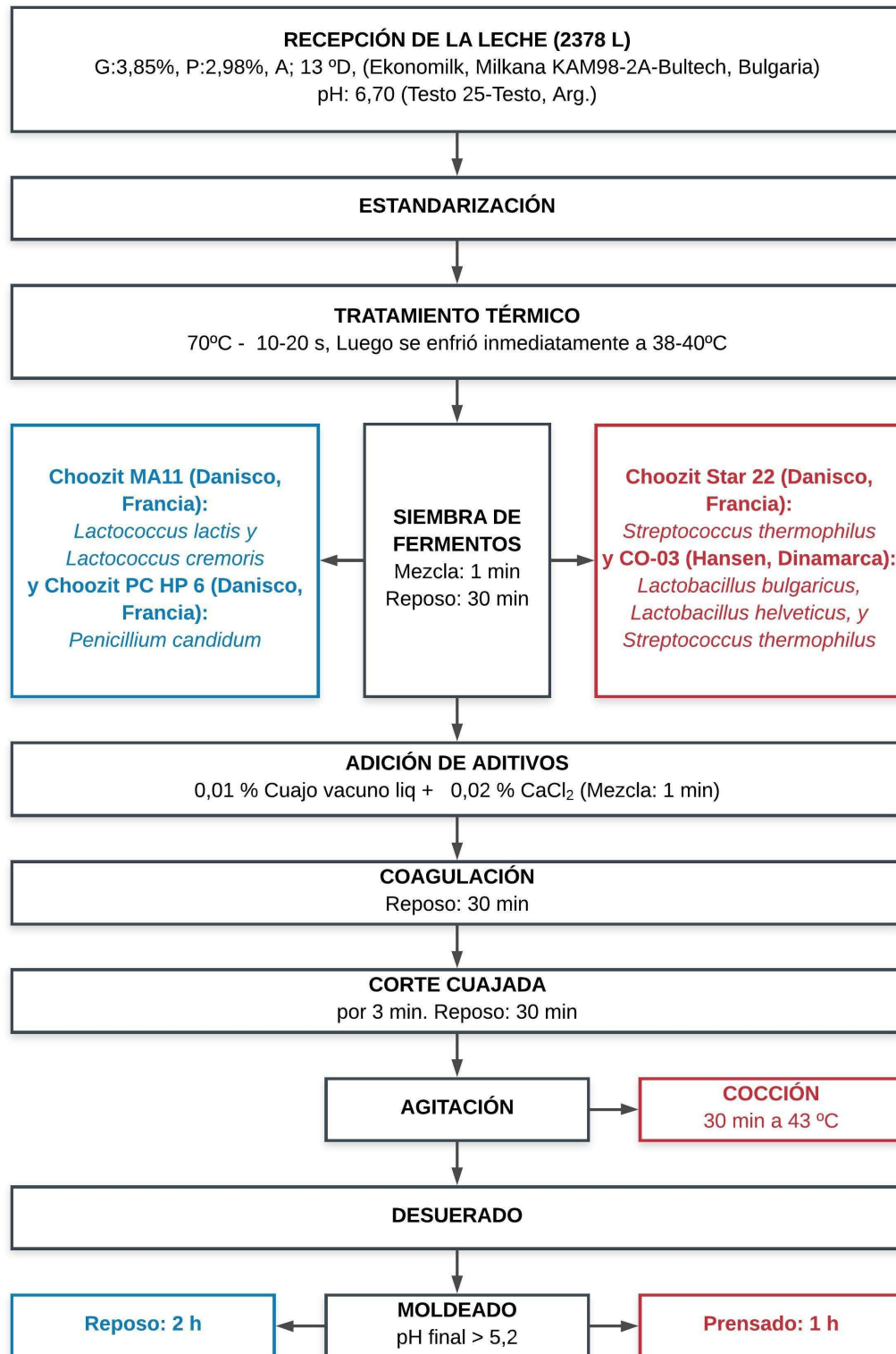


Figura 24: Diagrama de flujo del proceso de elaboración de las masas en Cabaña Piedras Blancas. Negro: pasos en común, Color: pasos diferenciados (azul: pasta blanda (PB), rojo: pasta semidura (SP)). G: grasa, P: proteínas, A: acidez.

Con el objeto de determinar el modo de salazón más apropiado para el producto final, la mitad de cada una de las pastas se separó y se la saló directamente agregando NaCl (1,5 %) homogeneizando con mezclado manual, la otra mitad se reservó para embutir directamente y salar luego por inmersión (sección 2.2). Los quesos salados en la masa se identificaron como PBS (pasta blanda salada con NaCl 1,5 %) y SPS (pasta semidura salada con NaCl 1,5 %).

La pasta blanda se mantuvo en su molde y la semidura en la prensa hasta alcanzar un pH de 5,2. Luego, se tomaron dos moldes de cada una y se destinaron a la elaboración de los quesos contenidos en tripa.

2.1.2. Trabajo en colaboración con la Planta Piloto de INTI Lácteos

Se trabajó en la Planta Piloto del Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea (INTI -Lácteos) (Introducción, sección 7.2). La elaboración de la masa del queso se realizó según la receta de elaboración de queso “Tybo” utilizada por el INTI (Figura 25). Los quesos obtenidos con esta pasta de queso semiduro Tybo se identificarán a partir de aquí como TSP.

Tanto las masas obtenidas en Cabaña Piedras Blancas como en el INTI-Lácteos (secciones 2.1.1 y 2.1.2) se embutieron en tripas de colágeno de 40 mm de calibre (previamente hidratada por 5 min con parte del suero retirado durante el filtrado), utilizando una embutidora vertical manual (SANTINI V3, Italia). Luego se efectuó el atado con hilo de algodón, realizando doble nudo cada 10 cm, aproximadamente, y se pinchó la superficie de todos los quesos para evitar la retención de burbujas de aire, favorecer el desuerado y la penetración de la salmuera. En el caso de los quesos elaborados en INTI-Lácteos, los mismos se dejaron a temperatura ambiente con el objetivo de lograr el descenso de pH hasta el pH de la salmuera. Luego de 3 h el pH no logró descender de 5,39, igualmente se procedió al salado. Excepto los quesos obtenidos con masa de Cabaña Piedras Blancas salados directamente, al resto se los saló por

inmersión en salmuera de 22° Baumé y pH 5,2, durante 45 min a 14 °C. Finalmente se dejaron orear por 15 min.

Las Figuras 26 y 27 muestran un registro fotográfico de ambas producciones.



Figura 25: Elaboración de masa de queso Tybo en la Planta Piloto del Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea (INTI Lácteos).
G: materia grasa, P: proteína, A: acidez



Figura 26: Elaboración de las masas lácteas en Cabaña Piedras Blancas. (A) tanque de pasteurización, (B) coagulación, (C) desuerado, (D y E) moldeado de pasta semidura (SP), (F) prensado de masa de pasta semidura, (G) masa de pasta blanda (PB) moldeada, en reposo, (H e I) embutido y atado, (J) oreo.



Figura 27: Elaboración de masa de queso Tybo en en la Planta Piloto de INTI Lácteos. (A) tinas de pasteurización, (B) coagulación, (C) corte de cuajada, (D) lirado, (E) lavado y cocción de la masa, (F) grano obtenido tras la cocción (G y H) filtrado y (I y J) masa prensada, (K) embutido, (L) salado en salmuera y (M) oreado.

2.1.3. Acondicionamiento de las cámaras de maduración

En todos los casos, los quesos obtenidos fueron transportados refrigerados, hasta el Laboratorio de Micología de Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes. Se los colgó en cámaras de incubación (MyC-Lab 100, Argentina) previamente desinfectada con solución de hipoclorito de sodio al 10 % y UV.

Las cámaras fueron recubiertas internamente con una camisa plástica diseñada para tal fin, de forma de mantener estables las condiciones de incubación. Se utilizó una solución saturada de BaCl_2 de forma de lograr un ambiente con 90 % h.r. (Roos, 1995). Se verificó la limpieza de las mismas realizando un muestreo ambiental con agar YGC (Britania, Argentina) expuestas por 15 min. Se incubaron por 7 días a 25 °C.

2.1.4. Preparación de la suspensión de conidios e inoculación

Se efectuó el procedimiento descripto en Capítulo II, Sección 2.1.2, lográndose una suspensión de conidios de *P. nalgiovense* (C5) de 10^3 conidios/mL que se inoculó por rociado a razón de 1 mL por queso (Figura 28A).

De los quesos obtenidos con masa elaborada en INTI-Lácteos, se apartaron 3 sin inocular y fueron tratados con natamicina (500 mg/L) para realizar el control de pérdida de peso sin inóculo.

2.1.5. Maduración de los quesos contenidos en tripa

Los quesos fueron madurados en condiciones de temperatura y humedad controladas. Se verificó utilizando un termohigrómetro digital TFA Modelo Ex HT05 (Figura 28B).

Todos los quesos se maduraron durante 14 días, a 12 °C y 90 % h.r. Adicionalmente, los quesos elaborados con masa obtenida por el INTI-Lácteos se mantuvieron en condiciones de refrigeración (5 °C y 60 % h.r.) por 16 días más para evaluar la producción de penicilina.

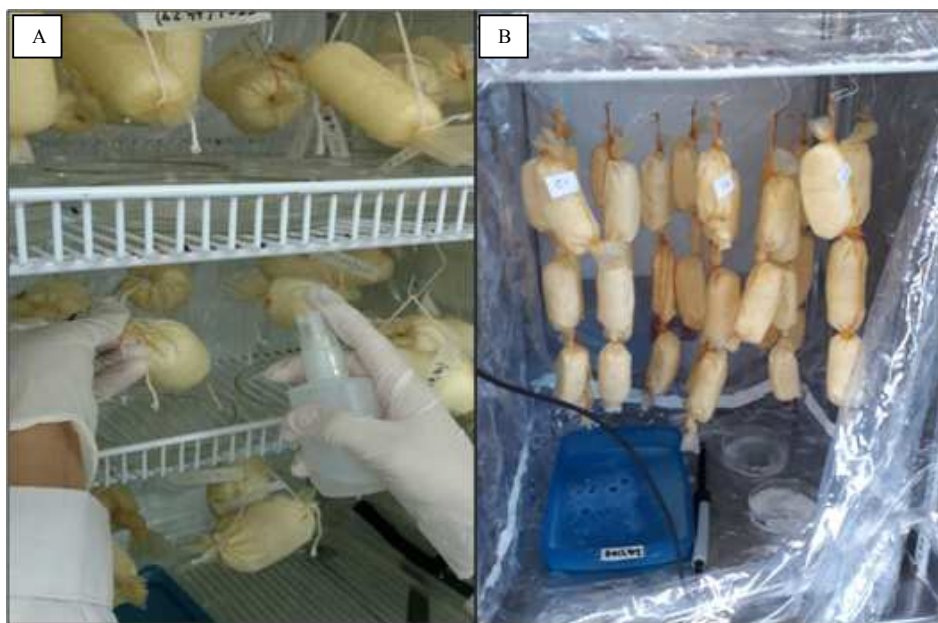


Figura 28: (A) Inoculación por rociado de los quesos contenidos en tripa.
(B) Maduración de los quesos en cámara acondicionada.

2.2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los quesos durante el proceso de maduración

Durante los 14 días de maduración, se realizaron muestreos a los 1, 5, 8, 11 y 14 días de maduración para el caso de los quesos obtenidos con masa de Cabaña Piedras Blancas, y a los 1, 5 y 14 días para los quesos obtenidos con masa de INTI-Lácteos. En todos los casos se realizaron determinaciones de a_w , pH, humedad y recuento de hongos en tripa.

En el caso de los quesos elaborados con masa obtenida en INTI-Lácteos, a la muestra correspondiente al día 14 de maduración también se le realizó cuantificación de penicilina, como así también a las muestras refrigeradas tomadas a los 21 y 30 días de elaboración, es decir a los 7 y 16 días de refrigerados respectivamente.

En cada muestreo se analizaron dos muestras. Se retiró la tripa en condiciones de esterilidad para los análisis de recuento de hongos y la masa del queso se picó con una

procesadora (Hr 1372, Philips) para ser utilizada en el resto de las determinaciones a continuación detalladas:

2.2.1. Control de pérdida de peso

Se destinaron 3 unidades para el seguimiento de la pérdida de peso. Cada unidad fue pesada en diferentes días distribuidos durante el tiempo de maduración, además de los días de muestreo seleccionados. En el caso de los quesos obtenidos con la masa elaborada en INTI-Lácteos, también se hizo el seguimiento en paralelo con los quesos controles (sin inocular). Finalmente se calculó el porcentaje de descenso de peso para cada condición.

2.2.2. Determinación del contenido de peso seco y humedad

El método empleado fue el de secado en estufa, de acuerdo a la Norma ISO 5534 IDF4. Para ello, en primer lugar se procedió a preparar la cápsula con 20 g de arena que, junto con una varilla de vidrio, se secó en estufa a 102 ± 1 °C por 1 h, luego se dejó enfriar en desecador y se pesó. Se agregó 3 g de muestra y se pesó nuevamente. Se homogenizó la muestra y la arena con ayuda de la varilla y se secó en estufa a 102 ± 1 °C, aproximadamente 1,5 h y, luego de enfriar en desecador se volvió a pesar. El procedimiento se repitió hasta obtener peso constante (diferencia entre dos pesadas sucesivas no mayor a 2 mg). Finalmente, se registró el peso exacto de la placa con la muestra seca, y se calculó el extracto seco de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% ES (p/p) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Donde,

m_0 : peso (g) de la cápsula preparada (placa con tapa, arena y varilla después del secado).

m_1 : peso (g) de la cápsula preparada y la muestra antes de secar.

m_2 : peso (g) de la cápsula preparada y la muestra después de secado.

El contenido de Humedad se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% Humedad (p/p) = 100 - \% ES$$

2.2.3. Determinación de actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) se midió con el equipo LabSwift-aw, Novasina® (Suiza), el cual consiste en un sistema basado en el método de célula electrolítica, donde la resistencia eléctrica del electrolito varía con la humedad del entorno, permitiendo una medida directa del valor de actividad de agua. El equipo se calibró con soluciones saturadas estándares, provistas por el proveedor, de las sales LiCl, NaBr, KCl correspondientes a humedades relativas de 11 %, 58 % y 84 %, respectivamente. El ensayo se realizó por triplicado.

2.2.4. Determinación de pH

La determinación del pH se realizó utilizando un pHmetro Orion Modelo 710 con electrodo de punta, calibrado con buffers de pH 4 y 7 (Merck, Alemania). La medición se realizó por triplicado.

2.2.5. Recuento de hongos en tripa

Se realizó el recuento de hongos en tripa, según el procedimiento descripto en el Capítulo II, sección 2.1.4.1, utilizando cuadrados de 2 cm de lado. El recuento se realizó por duplicado con dos fragmentos de cada tripa.

2.2.6. Cuantificación de penicilina G

Se analizaron dos quesos en cada uno de los tiempos, así como también en el control negativo. Como control negativo se utilizó quesos contenidos en tripa, sin inocular, extraídos en el primer muestreo. Se realizaron dos extracciones por queso, y las mismas se analizaron por duplicado con la técnica ELISA, según se describió en el Capítulo II, sección 2.1.4.2.

2.2.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y las medias se compararon utilizando el test de Tukey para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) usando el software InfoStat, version 2017 (InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

2.3. Estimación del límite máximo teórico de penicilina admitido en queso con desarrollo fúngico superficial.

2.3.1. Encuesta a consumidores

Se realizó una encuesta (Anexo III) para determinar la ingesta diaria de consumidores y potenciales consumidores de quesos madurados con hongos superficiales, como Camembert y Brie. Para ello se utilizó la herramienta libre “Formularios de Google”, que permite confeccionar encuestas y compartirlas, por mail o por medio de redes sociales. Asimismo, se realizó de forma manual en la vía pública.

2.3.2. Análisis de los datos recolectados

Todas las respuestas provenientes de las encuestas online fueron descargadas de Google, con extensión .CSV (comma-separated values), lo que permitió representar los datos en una tabla de datos de Microsoft Excel®, agregando también las respuestas de las encuestas completadas manualmente.

Debido a que un factor importante en la alimentación es la edad, se separaron las respuestas en base al rango etario de los encuestados (menores de 18 años, entre 18 y 30 años, entre 31 y 45 años y mayores de 46 años). Posteriormente, se calculó el porcentaje de elección de las opciones de cada pregunta.

2.3.3. Cálculo estimativo del límite máximo teórico

La estimación del límite máximo teórico del antibiótico en el alimento debe ser de tal manera que, cuando se ingiere en condiciones normales, no se exceda el IDA. La penicilina tiene un IDA de 30 μg de penicilina/ persona / día. Según los LMRs y el modelo de dieta típica del Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), la ingesta diaria máxima teórica (IDMT) del antibiótico es de 29 μg de penicilina/ persona / día (Introducción, sección 4.2.1). A partir de ello y teniendo en cuenta el consumo promedio de quesos madurados con hongos superficiales calculado a partir de las encuestas realizadas (sección 2.3.1), se estimó el límite máximo teórico de penicilina en este tipo de alimento. Posteriormente, se efectuó el

cálculo de la IDMT considerando la composición de la canasta básica alimentaria argentina (INDEC, 2004), y se realizó una nueva estimación del límite máximo teórico de penicilina en quesos madurados con hongos superficiales.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Quesos obtenidos

En las figuras 29, 30 y 31 se muestra el aspecto externo e interno de los quesos obtenidos para los tres tipos de masas evaluadas en los diferentes muestreos realizados. Se pudo observar que el crecimiento del hongo fue visible al día 5 de maduración, llegando a cubrir totalmente la tripa al día 14.

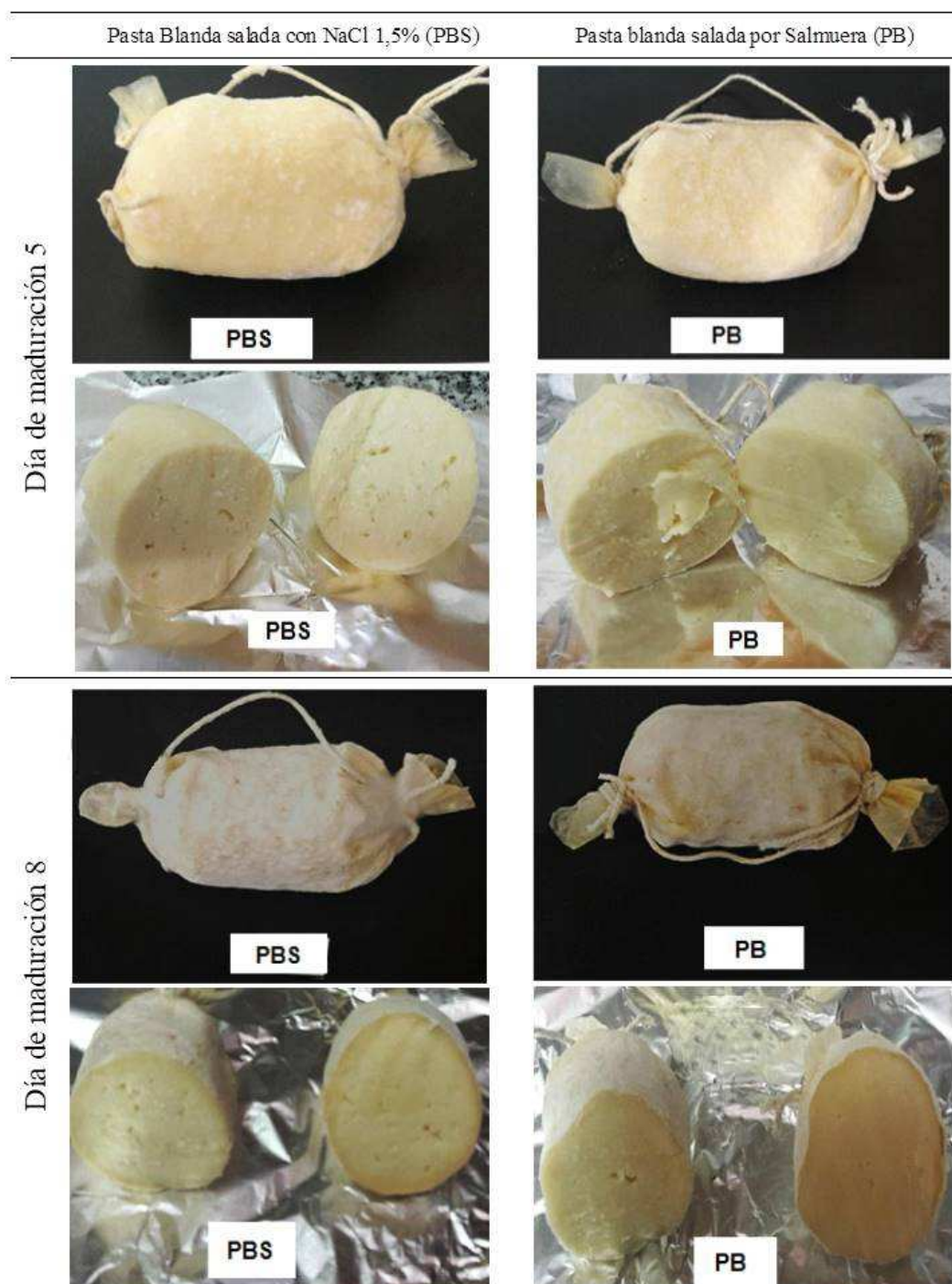
Se puede apreciar que el color blanco del micelio de *P. nalgiovense* que cubre la tripa no se vio alterado durante el proceso de maduración. Esto se logró gracias al buen poder competitivo de *P. nalgiovense* frente a hongos contaminantes ambientales (Nielsen et al., 1998; Scolari et al., 2003). Asimismo, no se observó impregnación superficial en el queso por parte del pigmento nalgiovensina producido por *P. nalgiovense*, y cuya producción se estimula en condiciones ricas en sodio y proteína. Distintos fueron los resultados obtenidos por Mrázek et al. (2015) quienes obtuvieron coloración anaranjada a rojizo sobre quesos con desarrollo de *P. nalgiovense*. Esto conduce a considerar que la tripa actúa como barrera, evitando la pigmentación del queso.

Los quesos elaborados a partir de pasta semidura (SP, SPS y TSP) presentaron una forma cilíndrica más compacta y uniforme que los obtenidos con pasta blanda (PB y PBS). También se pudo observar que en los quesos salados por inmersión en salmuera se formó una corteza, a partir del día 8, 11 y 14 para los quesos SPS, PBS y TSP, respectivamente. Esto se puede atribuir a la diferencia de presión osmótica entre la salmuera utilizada y los quesos introducidos en ella, lo cual permitió el ingreso de cloruro de sodio a la matriz, al mismo tiempo que favoreció el egreso

de agua desde la misma (Ramírez Navas et al., 2017) generando productos con menor contenido acuoso inicial en comparación con los salados de forma directa sobre la masa.

Se obtuvo un incremento en la dureza de los quesos con el tiempo, consistente con la pérdida de humedad.

En cuanto a la apariencia interna, los quesos obtenidos en INTI-Lácteos resultaron con una masa firme y homogénea, mientras que los obtenidos en Cabaña Piedras Blancas presentaban ojos pequeños, de forma cilíndrica y bordes lisos, características atribuibles a los ojos biológicos. Si bien no se descarta el crecimiento de microorganismos indeseables, es muy probable que se deba a la fermentación de los cultivos añadidos durante la elaboración, ya que estos no fueron eliminados en ninguna etapa del proceso.



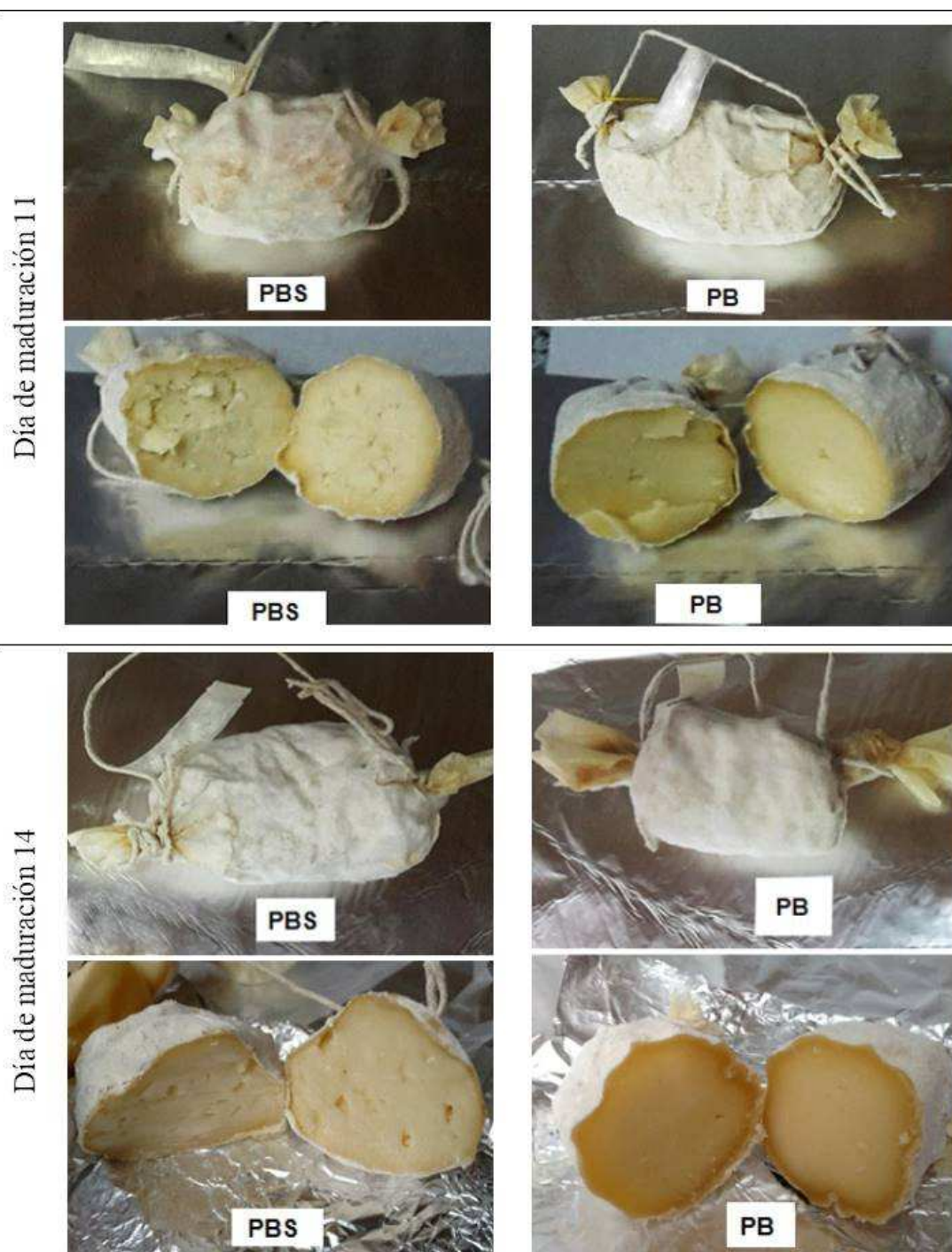
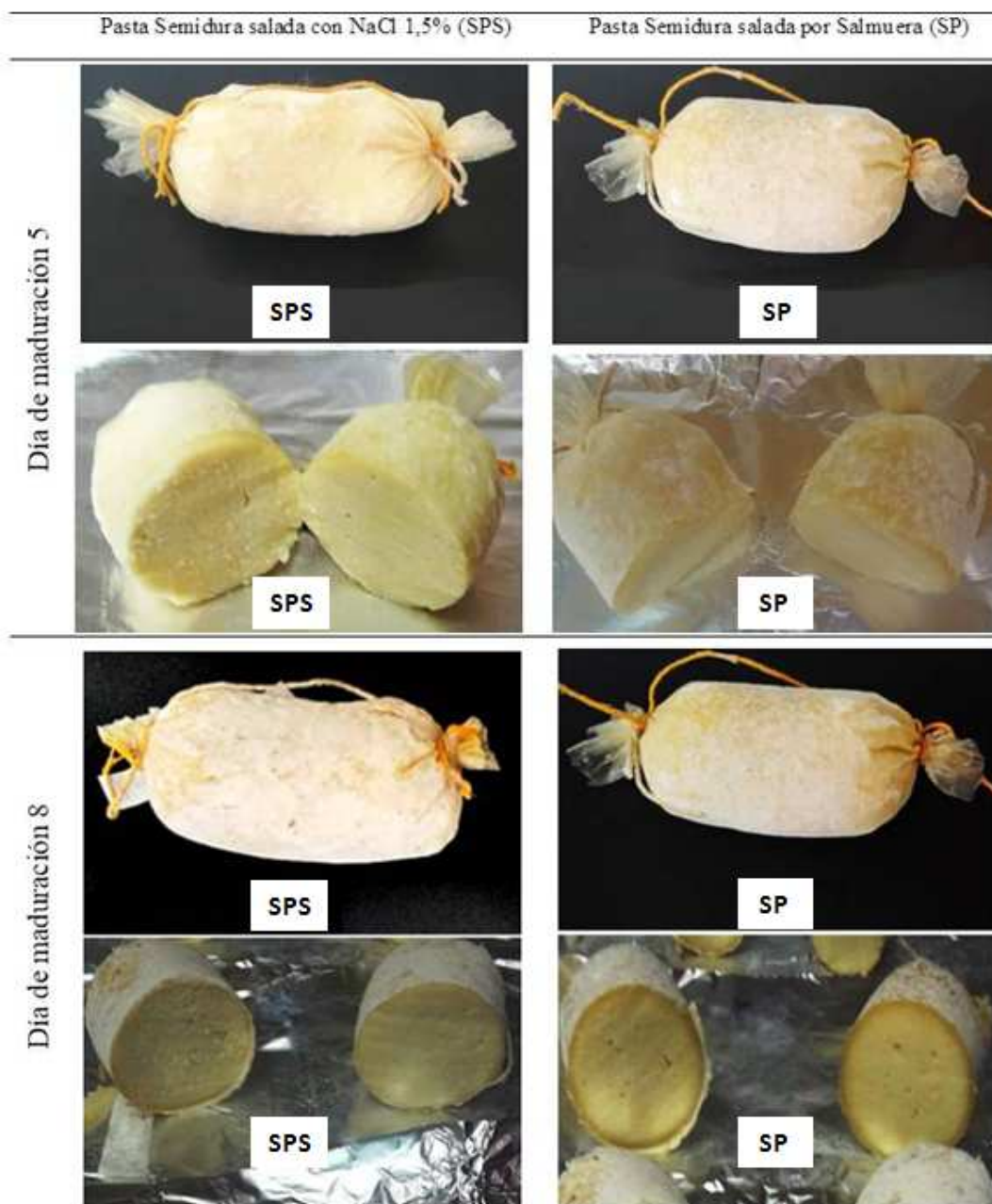


Figura 29: Aspecto externo y al corte a los 5, 8, 11 y 14 días de maduración de los quesos elaborados con masa de Cabaña Piedras Blancas. Quesos de pasta blanda salados con NaCl 1,5 % (PBS) y por salmuera (PB).



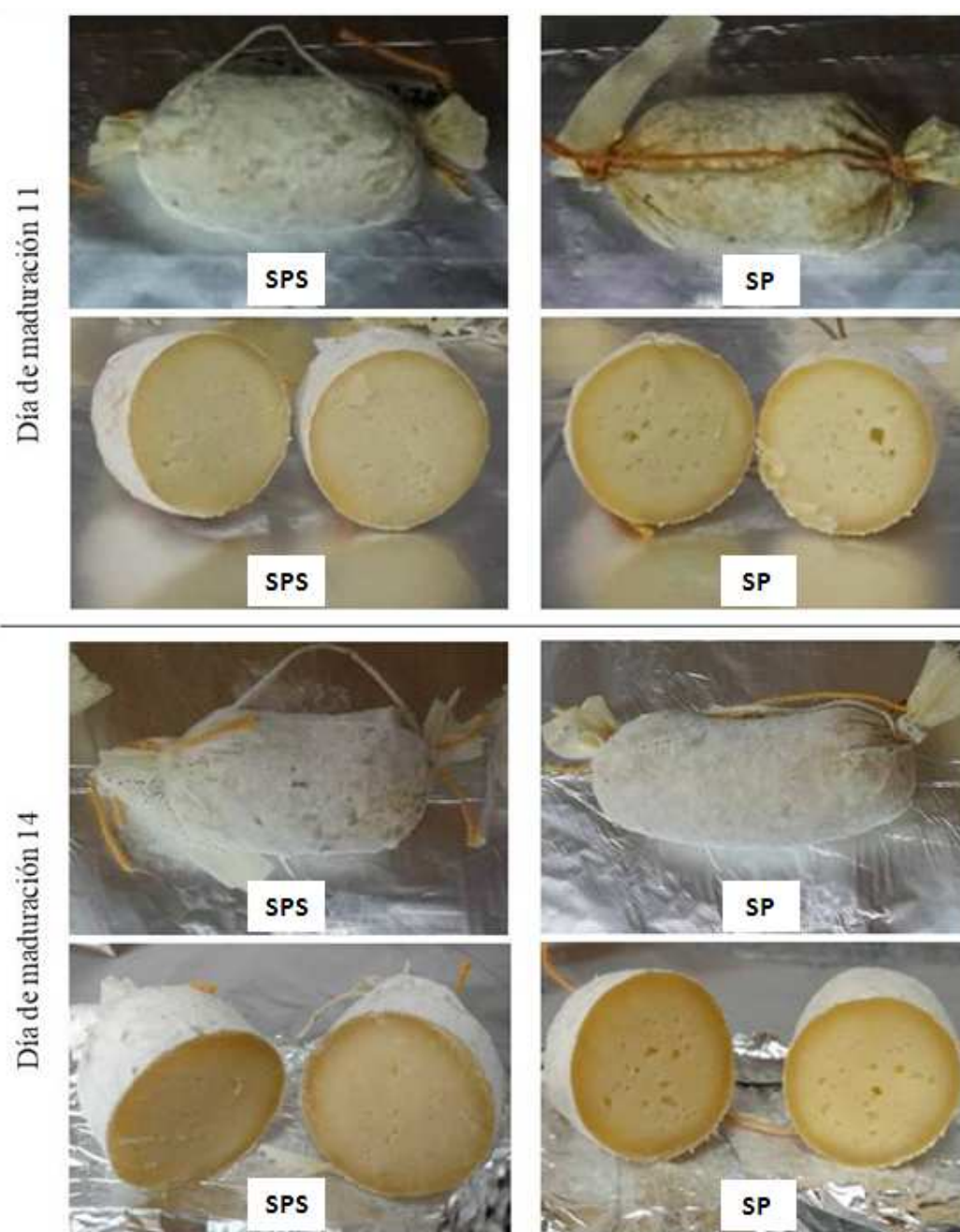


Figura 30: Aspecto externo y al corte a los 5, 8, 11 y 14 días de maduración de los quesos elaborados con masa de Cabaña Piedras Blancas. Quesos de pasta semidura salados con NaCl 1,5 % (SPS) y por salmuera (SP)

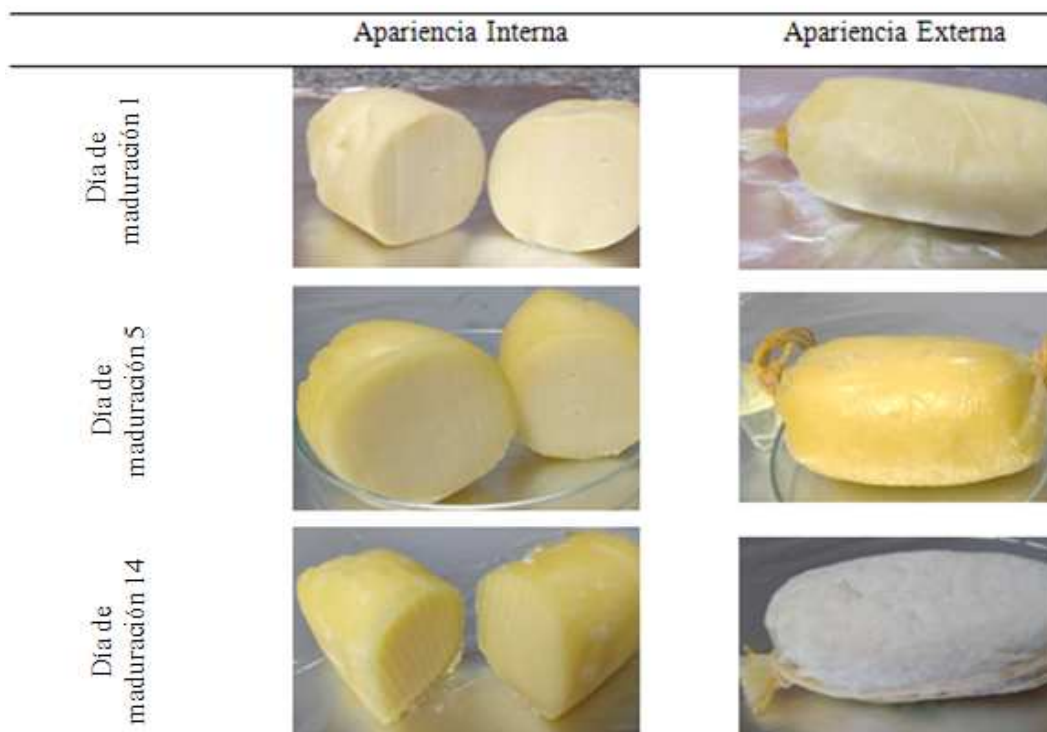


Figura 31: Aspecto externo e interno de los quesos elaborados con pasta semidura de queso Tybo en INTI-Lácteos (TSP). Muestras realizadas a los 1, 5 y 14 días de elaborados.

3.2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los quesos durante el proceso de maduración

3.2.1. Pérdida de peso

Las Figuras 32 y 33 representan gráficamente los porcentajes de pérdida de peso en función del tiempo de maduración. En todos los casos se observó una marcada tendencia lineal con un coeficiente de determinación, R^2 , superior a 0,98 lo que señala una importante correlación con el tiempo de maduración. Se obtuvo mayor velocidad de deshidratación promedio en los quesos elaborados con masas blandas ($1,29 \pm 0,06$ g/día (PB), $1,32 \pm 0,07$ g/día (PBS)) respecto a los con masas semiduras, siendo entre estos últimos las masas de Cabaña Piedras Blancas las que mostraron mayor velocidad de deshidratación ($1,05 \pm 0,09$ g/día (SP), $1,16 \pm 0,09$ g/día (SPS) y de $0,76 \pm 0,02$ g/día (TPS)).

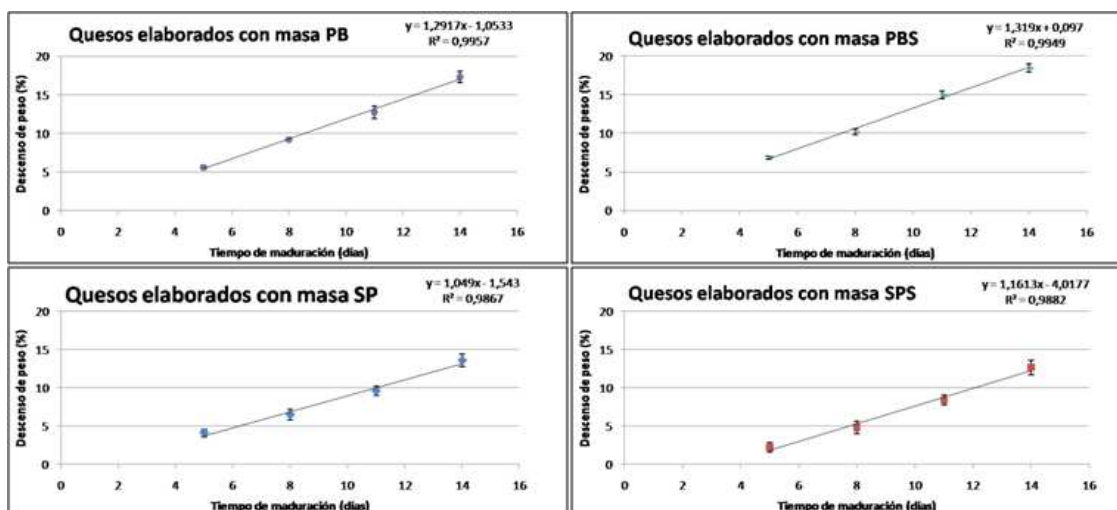


Figura 32: Porcentaje de pérdida de peso durante la maduración de los queso obtenidos con masas de Cabaña Piedras Blancas. (PBS y SPS: pasta blanda y semidura, respectivamente, saladas directamente con NaCl 1,5 %, PB y SP: pasta blanda y semidura, respectivamente, saladas por inmersión en salmuera).

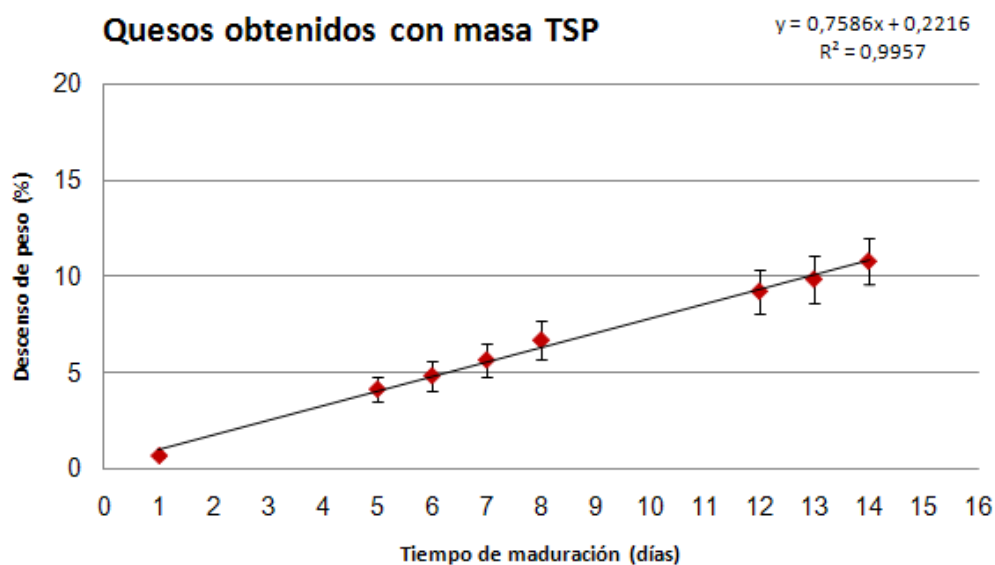


Figura 33: Porcentaje de pérdida de peso durante la maduración de los queso obtenidos con masa de queso semiduro de queso Tybo (TSP) elaborada en INTI-Lácteos.

Al comparar el descenso de peso de los quesos elaborados con masa en INTI-Lácteos inoculados y sin inocular (Figura 34), se observó una mayor velocidad de deshidratación en los

quesos controles (sin inocular) con un valor promedio de $0,85 \pm 0,06$ respecto a los inoculados con un valor promedio de $0,76 \pm 0,02$. Puede apreciarse el efecto protector de *P. nalgiovense* frente al proceso de deshidratación, fenómeno más evidente al final del proceso de maduración (día 14) donde el micelio cubrió completamente toda la superficie del queso y su deshidratación comienza a mostrar una tendencia a aplacarse respecto a los controles que están en ascenso. Este efecto protector del crecimiento fúngico se suma a otros descriptos por otros autores como ser: tener efecto protector contra la oxidación por consumir oxígeno y realizar el micelio un efecto de barrera que reduce la penetración de oxígeno y de luz (Bruna et al., 2003) que, a su vez, impacta sobre la estabilidad del color. Todo esto se suma al efecto protector frente al crecimiento de otros microorganismos contaminantes y/o patogénicos (Scolari et al., 2003).

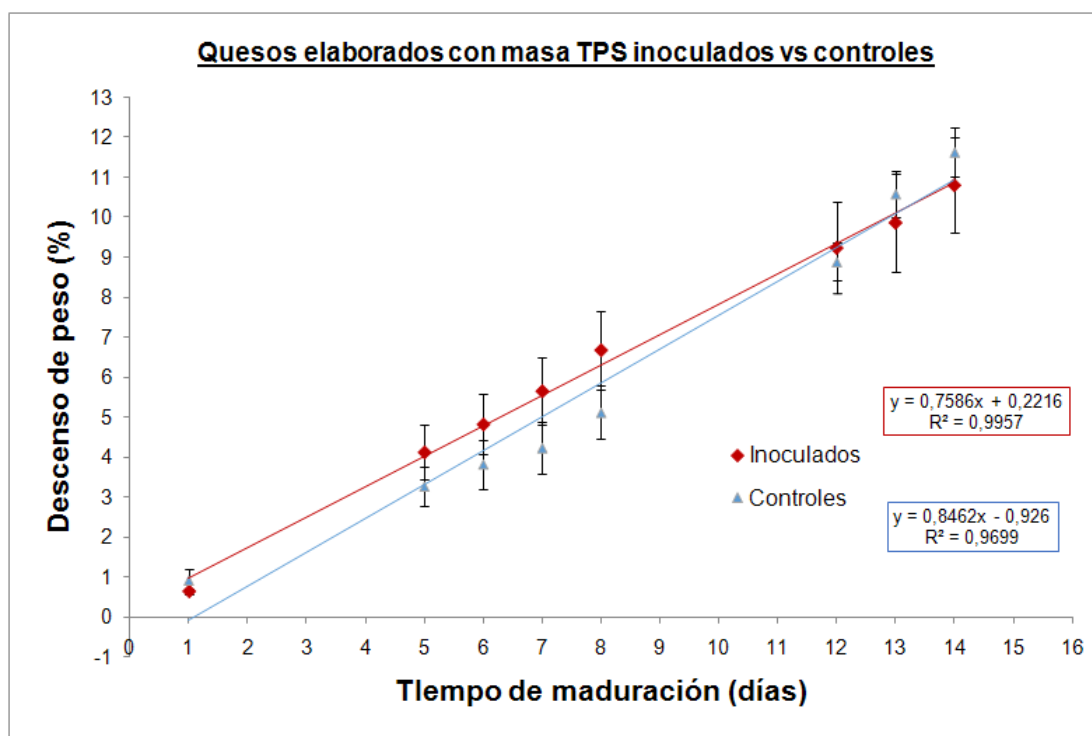


Figura 34: Porcentaje de pérdida de peso durante la maduración de los queso obtenidos con masa de queso semiduro de queso Tybo (TSP) elaborada en INTI-Lácteos, inoculados y sin inocular

3.2.2. Humedad

La tabla 11 muestra los porcentajes de humedad obtenidos al tiempo final de maduración (día 14). Los quesos que se elaboraron con masas de quesos semiduros (SP, SPS y TSP) mostraron una humedad final característica de quesos duros, mientras que los quesos elaborados con la masa de queso de alta humedad (PB y PBS) dieron como resultado humedades relacionadas con quesos de pasta semidura, según lo establecido por el CAA (Introducción, Tabla 1), lo cual se correlacionaría con la diferente humedad inicial de las distintas masas.

Tabla 11: Porcentajes de humedad obtenidos al día 14 de maduración en los quesos de cada condición, en los distintos tiempos estudiados.

Masa origen	% Humedad (día 14)	Clasificación según el C.A.A
PB	38,97 ± 3,78	Pasta semidura
PBS	38,86 ± 1,12	Pasta semidura
SPS	32,60 ± 0,84	Pasta dura
SP	31,63 ± 0,12	Pasta dura
TSP	35,84 ± 0,12	Pasta dura

3.2.3. Actividad de agua (a_w)

La tabla 12 muestra los resultados de a_w obtenidos en cada muestreo. Se puede observar una disminución de los valores de a_w con el transcurso de la maduración, posiblemente debida a la deshidratación anteriormente mencionada.

Tabla 12: Valores de a_w obtenidos para las condiciones estudiadas en los distintos tiempos

MUESTREO	a_w				
	PBS	PB	SPS	SP	TSP
DÍA 1	0,98 ± 0	0,98 ± 0	0,98 ± 0	0,98 ± 0	0,95 ± 0
DÍA 5	0,96 ± 0	0,96 ± 0	0,96 ± 0	0,96 ± 0	0,95 ± 0
DÍA 8	0,96 ± 0	0,96 ± 0	0,96 ± 0	0,96 ± 0	NA
DÍA 11	0,95 ± 0	0,95 ± 0	0,95 ± 0	0,95 ± 0	NA
DÍA 14	0,95 ± 0	0,95 ± 0	0,95 ± 0	0,95 ± 0	0,94 ± 0

Quesos obtenidos con masas elaboradas en Cabaña Piedras Blancas (PBS= Pasta blanda salada con NaCl 1,5%; PB = Pasta blanda salada por salmuera; SPS =Pasta Semidura salada con NaCl 1,5%; SP = Pasta semidura salada por salmuera); Quesos obtenidos con masa elaborada en INTI-Lácteos: TPS=pasta semidura de Tybo.

3.2.4. pH

Respecto al pH, se observó una tendencia creciente de los valores con el transcurso de la maduración (Tabla 13), con diferencias significativas entre los tipos de masa elaboradas en Cabañas Piedras Blancas ($p < 0,05$) al día 14 de maduración, siendo menor en la pasta semidura respecto a la blanda. Este fenómeno no puede atribuirse al recuento de hongos superficiales (Tabla 14) ya que se mantiene en el mismo orden en ambos casos, pero sí podría asociarse a la diferente capacidad de penetración de las hifas a través de la tripa, facilitada en los quesos de pasta blanda (PB) por ofrecer menos resistencia. Al tener el hongo mayor penetración a través de la tripa las enzimas proteolíticas actúan en mayor medida sobre ella y es mayor la liberación de metabolitos que influyen en el pH.

Tabla 13: Valores de pH obtenidos para las condiciones estudiadas en los distintos tiempos

MUESTREO	pH				
	PBS	PB	SPS	SP	TSP
DÍA 1	5,23 ± 0,01	5,20 ± 0,03	5,32 ± 0,01	5,29 ± 0,01	5,30 ± 0
DÍA 5	5,35 ± 0,02	5,37 ± 0,01	5,38 ± 0,03	5,38 ± 0,03	5,30 ± 0
DÍA 8	5,36 ± 0,03	5,38 ± 0,02	5,38 ± 0,02	5,38 ± 0,02	NA
DÍA 11	5,42 ± 0,07	5,39 ± 0,03	5,42 ± 0,03	5,42 ± 0,03	NA
DÍA 14	5,80 ± 0,05 ^a	5,83 ± 0,03 ^a	5,47 ± 0,02 ^b	5,47 ± 0,02 ^b	5,30 ± 0,01

Quesos obtenidos con masas elaboradas en Cabaña Piedras Blancas (PBS= Pasta blanda salada con NaCl 1,5 %; PB = Pasta blanda salada por salmuera; SPS =Pasta Semidura salada con NaCl 1,5 %; SP = Pasta semidura salada por salmuera); Quesos obtenidos con masa elaborada en INTI-Lácteos: TPS=pasta semidura de Tybo.

3.2.5. Recuento de hongos en tripa

La tabla 14 muestra la evolución de los recuentos de hongo en tripa en función del tiempo para los quesos obtenidos con las diferentes masas. Se observó que al día 14 de maduración el recuento llegó al orden de 10^7 UFC/cm², excepto en los quesos elaborados a partir de pasta blanda y salados de forma directa sobre la masa (PBS), en los que se alcanzó valores en el orden de 10^8 UFC/cm². Como puede observarse en la Tabla 11, el porcentaje de humedad de los quesos PBS y PS en el día 14, si bien es mayor que en los demás quesos, no son diferentes.

Por lo que el mayor recuento de hongos se puede atribuir a la mayor humedad de la matriz y el tipo de salazón. La mayor humedad favorece el desarrollo y esporulación del hongo en tanto que el salado directo benefició el contacto de la matriz con el hongo, debido a que no se formó una corteza como en el caso de los salados con salmuera.

Tabla 14: Recuento de hongos realizado sobre la tripa de los quesos de cada condición, en los distintos tiempos estudiados.

Recuentos de hongos (UFC/cm ²)					
Día	PBS	PB	SPS	SP	TSP
1	<62,5±0	<62,5±0	<62,5±0	<62,5±0	<62,5±0
5	4,56x10 ⁶ ±3,87x10 ⁶	1,18x10 ⁷ ±9,01x10 ⁶	1,82x10 ⁷ ±0	1,27x10 ⁷ ±0	<62,5±0
8	5,28x10 ⁷ ±5,91x10 ⁶	1,37x10 ⁷ ±3,82x10 ⁶	4,27x10 ⁷ ±6,58x10 ⁶	3,46x10 ⁷ ±2,62x10 ⁶	NA
11	4,38x10 ⁸ ±1,37x10 ⁸	1,91x10 ⁷ ±1,27x10 ⁶	1,58x10 ⁷ ±3,46x10 ⁶	2,57x10 ⁷ ±2,45x10 ⁶	NA
14	6,19x10 ⁸ ±2,31x10 ⁸	1,23x10 ⁷ ±3,25x10 ⁶	6,10x10 ⁷ ±6,43x10 ⁶	3,19x10 ⁷ ±6,49x10 ⁶	1,7x10 ⁷ ±9,0x10 ⁶

Quesos obtenidos con masas elaboradas en Cabaña Piedras Blancas (PBS= Pasta blanda salada con NaCl 1,5 %; PB = Pasta blanda salada por salmuera; SPS =Pasta Semidura salada con NaCl 1,5 %; SP = Pasta semidura salada por salmuera); Quesos obtenidos con masa elaborada en INTI-Lácteos: TPS=pasta semidura de Tybo.

3.2.6. Contenido de penicilina G

Respecto a la cuantificación de penicilina G, se obtuvo una tendencia creciente con el transcurso del tiempo (Tabla 15, Anexo IV D), lo cual es consistente con ensayos anteriores. Sin embargo, al comparar las cantidades a tiempo final (día 30), se obtuvo una disminución del 76,3 % respecto al ensayo anterior (Figura 35). Cabe aclarar que no se siguió cuantificando la producción de penicilina G posterior al día 30 de maduración ya que la vida útil del producto se vio limitada a ese tiempo por la deshidratación.

Tabla 15: Cuantificación de penicilina G ($\mu\text{g/kg}$) a los 14, 21 y 30 días de maduración.

Muestreo	Penicilina G en queso ($\mu\text{g/kg}$)
C -	< 2,5
DÍA 14	< 2,5
DÍA 21	$3,6 \pm 0,7$
DÍA 30	$5,1 \pm 0,5$

C -: Control negativo. Los valores de penicilina G exhibidos tienen en consideración los efectos interferentes de la matriz

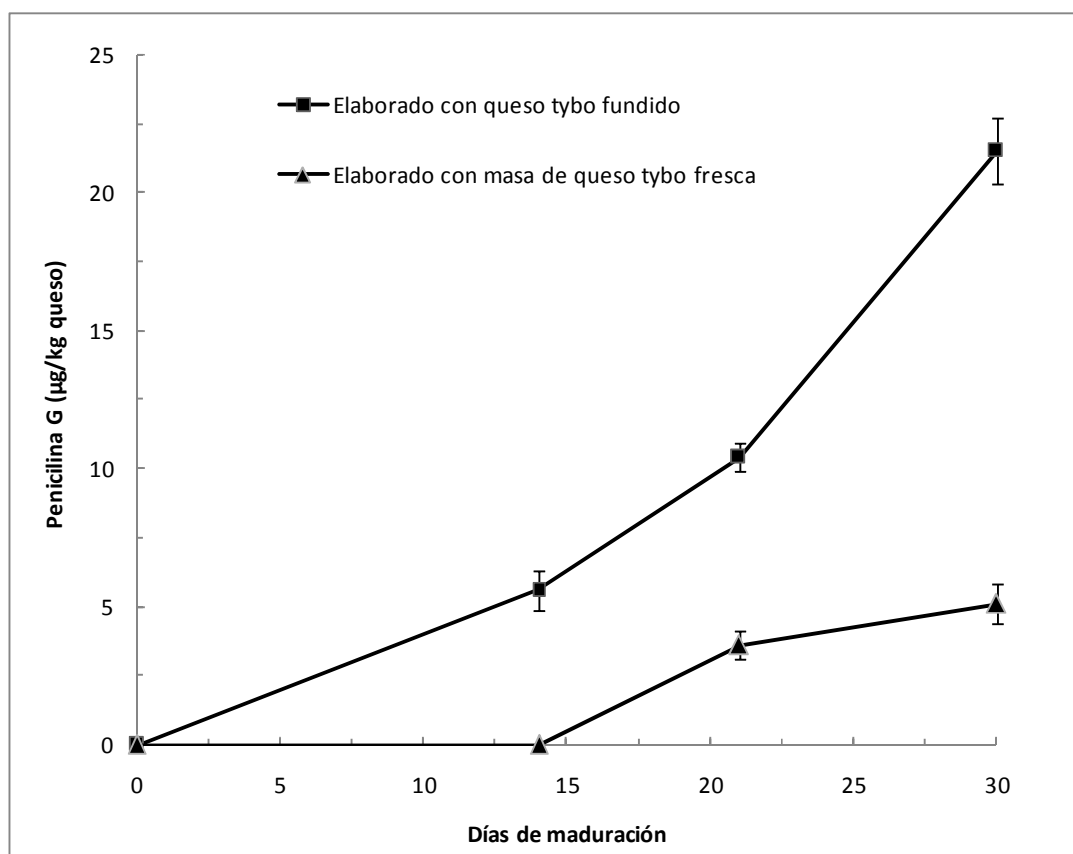


Figura 35: Producción de penicilina G en queso contenido en tripa, con desarrollo superficial de *P. nalgiovense* (C5) elaborado con queso Tybo fundido -■-, elaborado con masa de queso Tybo fresca -▲-, a 12 °C y 90 % h.r. por 14 días y luego a 5°C y 60 % h.r. por 16 días.

3.3. Estimación del límite máximo teórico de penicilina admitido en queso con desarrollo fúngico superficial.

Se encuestaron un total de 200 personas, con poblaciones homogéneas entre los distintos grupos etarios: 16 % menores de 18 años, 37 % entre 18 y 30 años, 25 % entre 31 y 45 años y 22 % mayores a 45 años. Se pudo observar que la preferencia por los quesos con desarrollo fúngico aumenta conforme a la edad.

Por otra parte, dentro del grupo etario menor a 18 años fue predominante la elección del consumo de 30 g de queso (1 rebanada), en comparación con los restantes grupos, donde se informaron consumos superiores, siendo preponderante la ingesta de 30 a 100 g del alimento. Ninguna persona admitió ingerir más de 500 g de queso, por vez de consumo. Esto significa que es inusual la ingesta de más de 500 g de quesos madurados con hongos superficiales. A partir de estos resultados, se pudo determinar que el promedio de consumo de los encuestados corresponde al rango de 30 a 100 g del producto.

Debido a que la penicilina puede estar presente en otros alimentos como residuo veterinario (leche, músculos, riñones e hígado) el consumo de estos alimentos en la dieta normal puede adicionar penicilina a la ingesta diaria. Según el Comité Mixto (FAO/WHO) de Expertos en Aditivos (JECFA, 1990) la canasta de alimentos (diaria por persona para estos alimentos es: músculo (300 g), leche (1500 g), hígado (100 g) y riñón (50 g). Al multiplicar estos valores por sus respectivos LMRs, se obtiene una IDMT de 29 μg de penicilina/ persona / día. Por lo cual resta la ingesta de 1 μg de penicilina/ persona / día para alcanzar el IDA del antibiótico. Utilizando este valor y teniendo en cuenta el límite superior del rango de consumo promedio de los quesos madurados con hongos superficiales (100 g), se estimó un límite máximo teórico de 10 μg de penicilina/kg de queso (10 ppb). Este número asegura no sobrepasar el IDA de penicilina ante un consumo normal del alimento en cuestión, junto con el consumo de los alimentos de origen animal mencionados.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la IDMT sólo da una indicación aproximada de la exposición alimentaria, ya que supone que la penicilina está siempre presente en la dosis máxima (LMR), que las personas ingieren durante todos los días de sus vidas los alimentos según el consumo estimado en la canasta de alimentos y que la cantidad del antibiótico en los alimentos no cambia debido al almacenamiento, cocinado o a las técnicas de elaboración (Codex Alimentarius, 2014). Por este motivo, si bien el límite máximo teórico estimado de penicilina en quesos madurados con hongos superficiales es de 10 ppb, en la práctica existiría un amplio margen de seguridad respecto al IDA del antibiótico.

Debido a que la canasta de alimentos de la FAO/WHO no tiene en cuenta regiones específicas, el límite máximo teórico de penicilina estimado a partir de la canasta básica alimentaria argentina es muy diferente. Según datos del INDEC (2004) la composición de la canasta (diaria) para un adulto equivalente es: músculo (209 g), hígado y riñón (9 g) y leche (309 g). Al multiplicar los valores diarios por sus respectivos LMRs, se obtiene una IDMT de 12 µg de penicilina/ persona / día, por lo tanto, resta la ingesta de 18 µg de penicilina/ persona / día para alcanzar el IDA del antibiótico. Con este valor y considerando el límite superior del rango de consumo promedio de los quesos madurados con hongos superficiales (100 g), se estimó un límite máximo teórico de 180 µg de penicilina/kg de queso (180 ppb).

4. CONCLUSIONES PARCIALES

En el presente capítulo se pudo demostrar la factibilidad de embutir y madurar desde tiempo inicial masas lácteas de distintos tipos. El grado de cobertura del emplume y el recuento superficial de *P. nalgiovense* resultaron ser indicadores importantes del tiempo de maduración, señalando como tiempo mínimo 14 días. Se eligió la técnica de salado por inmersión para aplicar en futuras elaboraciones. Si bien se observó un efecto protector de *P. nalgiovense* contra la deshidratación respecto a los controles, en todos los casos se obtuvo una considerable pérdida de peso con el tiempo de maduración. Es de destacar el drástico descenso que se obtuvo en la producción de penicilina respecto a ensayos anteriores, cubriendo con un amplio margen el límite

máximo teórico permitido estimado en 180 μg de penicilina/kg para el consumo en nuestro país de quesos madurados con hongos superficiales. Los valores de pH solo mostraron una leve tendencia creciente hacia el final del tiempo estudiado lo que llevaría a pensar que las condiciones ensayadas no son suficientes para que el hongo contribuya en la maduración del queso, lo cual motiva a contemplar estrategias para potenciar la actividad proteolítica del hongo.

Si bien las tres masas ensayadas mostraron ser adecuadas para la obtención de los quesos, se decidió continuar trabajando con una masa de queso semiduro por resultar con un aspecto más firme y homogéneo. De las dos masas de queso semiduro ensayadas (Morbier y Tybo) se optó por continuar trabajando con la de queso Tybo ya que, al ser una masa más insípida y sin un sabor marcado se considera más interesante y alcanzable cambiar el flavor de un queso de estas características respecto a otro que ya se caracteriza por sí mismo. Además, a nivel Institución, se considera que poder trabajar en una planta semi industrial (INTI-Lácteos) brinda cierta versatilidad respecto al volumen a producir y al control de los parámetros a estudiar.

CAPÍTULO IV

***Optimización del proceso de
maduración de queso con masa de
queso Tybo, contenida en tripa y con
desarrollo superficial de *Penicillium
nalgiovense****



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En el Capítulo III se observó una marcada deshidratación de los quesos, condicionando al producto a tener una vida útil extremadamente corta. Teniendo en cuenta esto, surgen los objetivos específicos del presente capítulo:

- ✓ Evaluar la factibilidad de envasar los quesos con material microperforado para enlentecer el proceso de deshidratación y así favorecer la proteólisis fúngica.
- ✓ Evaluar el impacto de la temperatura de maduración en los quesos envasados.
- ✓ Caracterizar mediante ensayos fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales los quesos madurados a través del tiempo de maduración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Elaboración de la masa y obtención de los quesos contenidos en tripa

Se elaboró masa de queso según la receta para queso Tybo en la Planta Piloto del Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea (INTI Lácteos) procediendo de igual manera que en el Capítulo III, sección 2.1.2. Considerando que en la producción anterior no se logró descender el pH de la masa ya embutida al pH de la salmuera (5,2), en esta producción se dejó la masa sumergida en el suero a 42 °C hasta alcanzar dicho pH, recién entonces se procedió a filtrarla y embutirla. Luego se procedió al embutido de la masa, atado y salado (Capítulo III, sección 2.1.2). La mitad de los quesos obtenidos se consideraron controles sin inocular, para lo que se los roció con 1 mL por queso de una solución de natamicina (500 mg/L), con el objeto de simular el proceso de inoculación y de protegerlos de una posible contaminación ambiental. La otra mitad se inoculó según el procedimiento detallado en el Capítulo III, sección 2.1.4.

2.2. Maduración de los quesos contenidos en tripa

Todos los quesos obtenidos, inoculados y controles, se maduraron en el Laboratorio de Micología de Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). Para ello se utilizaron dos cámaras acondicionadas según lo descrito en el Capítulo III, sección 2.1.3. Se verificó la limpieza de las mismas realizando un muestreo ambiental con agar YGC (Britania, Argentina) expuestas por 15 min. Se incubaron por 7 días a 25°C.

Se reservaron 4 quesos inoculados (Q) y 4 controles (C) para realizar el seguimiento de peso durante todo el proceso de maduración.

En una primera etapa, todos los quesos se maduraron a 12 °C y 90 % h.r. por 14 días. En el día 14, tiempo en el cual se ha demostrado que se obtiene un emplume total y homogéneo en toda la superficie del queso, se procedió a incorporar una etapa de envasado con el objetivo de disminuir la excesiva deshidratación ocurrida en el ensayo anterior. Para ello, los quesos se colocaron sobre bandejas plásticas de PVC de 14 cm de largo, 3 cm de alto y 5 cm de ancho (AIQ S.A, Argentina), a las que se les realizaron microperforaciones para favorecer el paso del oxígeno. Estas se colocaron dentro de sobres de polietileno, de 70 µm de espesor y microperforado (6 poros/cm²), que luego se cerraron utilizando una termoselladora (Dasa mod. FS-200, Argentina) (Figura 36). Los 8 controles de peso se colocaron en envases que podían abrirse y volverse a cerrar para poder realizar las pesadas correspondientes.

Posteriormente al envasado, en una segunda etapa los quesos se maduraron a dos diferentes temperaturas, 5 °C y 12 °C, ambas a 90 % h.r.

La figura 37 presenta el diagrama de flujo que expone el proceso de elaboración y maduración de los quesos.

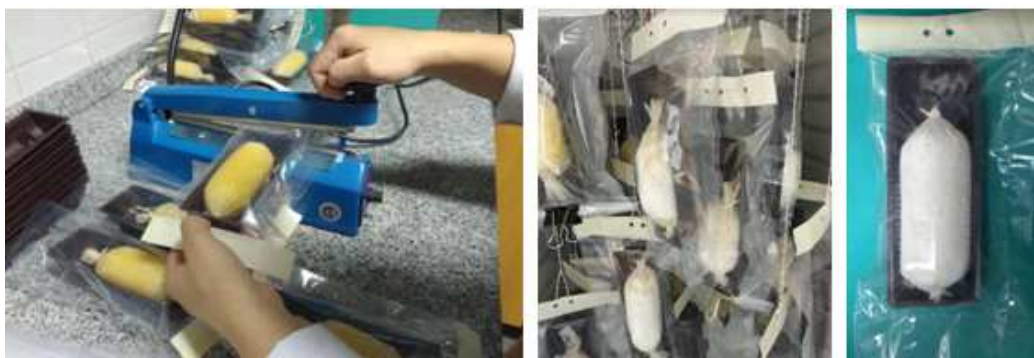


Figura 36: Envasado de los quesos contenidos en tripa con desarrollo superficial de *P. nalgiovense*, madurados por 14 días a 12 °C y 90 % h.r.

2.3. Caracterización de los quesos durante su maduración

2.3.1. Muestreo

Como se detalló anteriormente en la Introducción (sección 2), durante la maduración ocurren numerosos cambios bioquímicos y fisicoquímicos que definen las características organolépticas típicas de cada variedad de queso. Para realizar el seguimiento de dichos fenómenos y caracterizar los quesos obtenidos, se analizaron diferentes parámetros durante su maduración.

Se realizaron muestreos a los días 1, 3, 6, 14, 21 y 35 de maduración. En ellos se realizaron determinaciones de a_w , pH, nitrógeno total y fracciones nitrogenadas, humedad, materia grasa, y los controles microbiológicos correspondientes. También se realizó el recuento de mohos superficiales y se determinó la biomasa fúngica de la tripa por peso seco para conocer la cinética de crecimiento fúngico durante la maduración. A partir del día 14 se realizó la evaluación sensorial de las muestras, a cargo del equipo de sensorial del INTI-Lácteos.

En cada muestreo se analizaron dos muestras de cada condición (inoculados, controles y las distintas temperaturas, según corresponda).

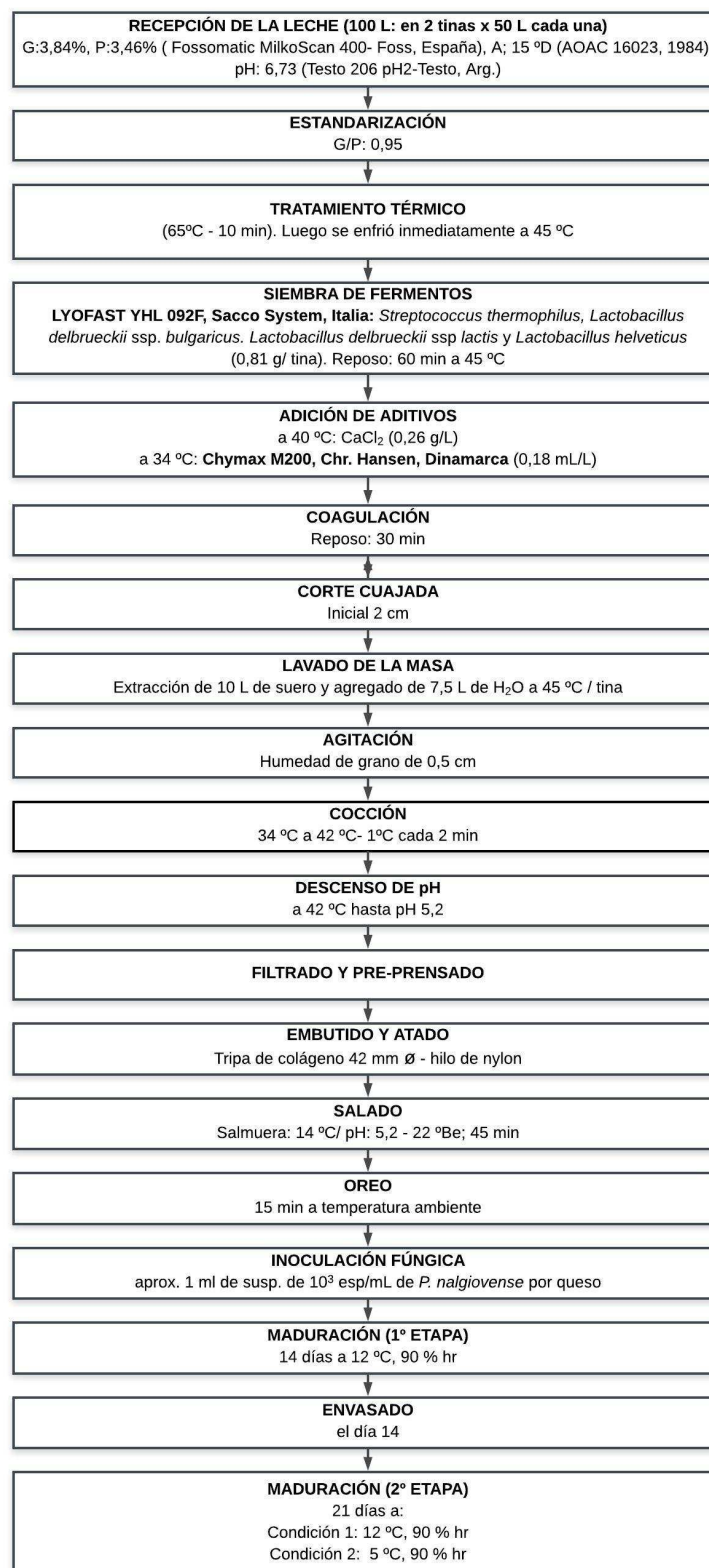


Figura 37: Diagrama de flujo del proceso de obtención de los quesos contenidos en tripa madurados desde tiempo inicial, con desarrollo superficial de *P. nalgiovense*. G: materia grasa, P: proteína, A: acidez

Para ello, en cada muestreo, se retiró la tripa en condiciones estériles y se reservó la parte interna de los quesos. Las tripas se utilizaron para el recuento de hongos y la determinación de biomasa fúngica por peso seco. En condiciones de esterilidad se muestreo el queso para los análisis microbiológicos. El queso restante se cortó en cubos, se picó con una procesadora (Hr 1372, Philips) y se utilizó para las determinaciones fisicoquímicas. Además, se determinó el porcentaje de pérdida de peso durante el período de maduración, pesando las unidades reservadas para tal fin (sección 2.2).

A continuación se detallan brevemente las metodologías de análisis utilizadas para cada determinación de caracterización microbiológica, fisicoquímica y sensorial.

2.3.2. Determinaciones fisicoquímicas

2.3.2.1. Pérdida de peso

Se destinaron 8 unidades (4 inoculadas y 4 sin inocular) para el seguimiento de la pérdida de peso. Luego del envasado, 4 unidades (2 inoculadas y 2 sin inocular) se mantuvieron a 5 °C y las otras 4 a 12 °C. Cada unidad fue pesada en diferentes días distribuidos durante el tiempo de maduración, además de los días de muestreo seleccionados. Finalmente se calculó el porcentaje de descenso de peso referido al peso inicial para cada condición.

2.3.2.2. Humedad

El método empleado fue el de secado en estufa, de acuerdo a la Norma ISO 5534 IDF4 (2004). Se procedió según lo detallado en el Capítulo III, sección ítem 2.2.2.

2.3.2.3. Materia grasa

El contenido de materia grasa se determinó volumétricamente mediante el método ácido butirométrico según Van-Gulik descrito en la Norma ISO 3433 IDF 222:2008. Este método consiste en tratar una determinada cantidad de muestra en un butirómetro para queso según Van Gulik, que corresponde a los requisitos de la Norma ISO 3432 IDF 221, con ácido sulfúrico (δ =1,522 g/mL) y alcohol iso-amílico. El ácido ataca la muestra disolviendo las sustancias

proteicas y liberando la grasa, y el alcohol facilita la separación de la misma mediante la utilización de la fuerza centrífuga. El contenido en materia grasa del queso analizado se lee directamente en la escala del butirómetro y se expresa como gramos de materia grasa en 100 g de queso.

Se colocaron 15 mL de ácido sulfúrico ($\delta=1,522$ g/mL) en un butirómetro para queso según Van Gulik, cerrado en el extremo de la escala. Se pesó $3,0 \pm 0,02$ g de queso y se introdujo en la copita del butirómetro. El butirómetro cerrado se colocó en un baño María a 75°C con la escala hacia arriba, agitando de vez en cuando hasta que el queso quedara completamente disuelto. Después, se añadió 1 mL de alcohol amílico a través de la abertura de la escala y ácido sulfúrico hasta la marca del 15 % de la escala. Se cerró, se mezcló y se atemperó durante 5 min en un baño María a 65°C . El butirómetro se retiró del baño y se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm en una centrifuga para butirómetros (CGU 3012, Rolco, Argentina). Se llevó nuevamente a 65°C y se realizó la lectura del contenido en grasa en el extremo inferior del menisco ajustando la columna de grasa (Figura 38). El contenido de materia grasa del queso analizado se expresó como materia grasa en 100 g de queso (%), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de grasa (\%p/p)} = \frac{(L \times 3)}{m}$$

Este valor se utilizó para el cálculo de la materia grasa en el extracto seco del queso, según la siguiente fórmula:

$$\text{Materia grasa en el extracto seco (\%p/p)} = \frac{\frac{(L \times 3)}{m}}{ES} \times 100$$

Donde,

L : lectura del butirómetro.

3: peso (g) de queso para el cual está graduado el butirómetro para dar el %.

m : peso (g) de muestra (~ 3 g).

ES : contenido de extracto seco del queso

El análisis de cada muestra se realizó por duplicado.



Figura 38: Butirómetro de Van Gulik con la muestra pesada.

2.3.2.4. Determinación de contenidos de nitrógeno total, nitrógeno soluble e índice de maduración

Para calcular el índice de maduración se determinaron los contenidos de nitrógeno total (NT) y de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6). Estos contenidos en sí mismos brindaron además información de la composición de los quesos obtenidos.

El contenido de nitrógeno total se determinó mediante el método de Kjeldahl AOAC 991.20 (1991). Este método consiste en someter a la muestra de queso a un tratamiento oxidativo con H_2SO_4 concentrado en presencia de una mezcla de sales que elevan el punto de ebullición del ácido y catalizadores que sirven para el transporte de oxígeno y formación de complejo con el grupo amino. Durante el proceso, el nitrógeno orgánicamente enlazado se convierte en sulfato de amonio. Al alcalinizar la solución digerida, a partir del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ formado, se libera NH_3 el cual se transporta con ayuda de una destilación por arrastre con vapor de agua a un recipiente que contiene una solución acuosa de H_3BO_3 4 % p/v. A continuación, se realiza una titulación con una solución valorada de H_2SO_4 y se procede a calcular el valor de nitrógeno total.

Se pesó aproximadamente 0,5 g de queso y se colocó en un balón Kjeldahl de 500 mL. Se adicionó 10 g de K_2SO_4 , 1 g de $CuSO_4$, 5 H_2O , 6 perlas de vidrio y 20 mL de H_2SO_4 concentrado. La muestra se digirió hasta que el líquido se tornó translúcido de color débilmente azul-verdoso y sin presencia de materias carbonosas. Una vez frío se agregó 275 mL de agua destilada y material poroso. Luego se conectó el balón al equipo de destilación por medio de una trampa adecuada. Mediante la ampolla de decantación vecina a la trampa de destilación, se agregó cuidadosamente una solución de NaOH (40 % p/v) hasta formación de un precipitado pardo oscuro para alcalinizar el medio. Se inició la destilación por arrastre con vapor. El destilado se recogió en un erlenmeyer con 50 mL de ácido bórico (4 % p/v) y 6 gotas de indicador Mortimer (indicador combinado compuesto por 0,016 % p/v rojo de metilo y 0,083 % p/v verde de bromocresol en etanol 96 % v/v).

Se continuó la destilación hasta alcanzar aproximadamente los 150 mL en el erlenmeyer colector. Finalmente, se realizó la titulación en forma manual del borato de amonio formado, con una solución valorada de H_2SO_4 0,0997 N hasta viraje del indicador. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado.

Se realizó un blanco donde se llevó a cabo el mismo procedimiento antes descripto exceptuando el agregado de la muestra.

El contenido de nitrógeno total (NT) de las muestras, expresado como porcentajes, se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% NT \text{ (p/p)} = \frac{(V_M - V_B) \times N_A}{M} \times 0,014007 \times 100$$

Donde,

V_M : volumen (mL) gastado de H_2SO_4 en la titulación de la muestra

V_B : volumen (mL) gastado de H_2SO_4 en la titulación del blanco

N_A : normalidad del H_2SO_4 en meq/mL (0.0997 N)

0,014007: masa (g) de un miliequivalente de nitrógeno

M :masa (g) de la muestra utilizada en el análisis

A partir del contenido de nitrógeno total obtenido puede calcularse el contenido de proteína bruta con ayuda de un factor de conversión correspondiente para productos lácteos 6,38.

La fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6) incluye proteínas del lactosuero (excluyendo a las caseínas las cuales precipitan a dicho pH por corresponder a su punto isoeléctrico), todos los péptidos de hasta 30-35 residuos de aminoácidos, aminoácidos libres y compuestos tales como aminas, urea y amoníaco. La determinación de la fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 se realizó según Gripon et al., 1975). Se pesó aproximadamente 10 g de la muestra de queso y se agregó 40 mL de una solución de citrato de sodio 0,5 M de pH 7. Se homogeneizó por 120 s en stomacher (easyMix, AES, Francia) y se llevó a un baño térmico a 40 °C durante 30 min. Se dejó enfriar y luego se llevó a un volumen de 200 mL con agua. La preparación se trasvasó a un vaso de precipitado y se agregó gota a gota ácido acético glacial bajo agitación hasta alcanzar un pH de 4,6. La solución se llevó a un volumen final de 250 mL y se filtró para obtener dos fracciones, una soluble y otra insoluble. La fracción soluble se utilizó para la determinación de nitrógeno soluble a pH 4,6 mientras que la insoluble se almacenó a una temperatura de -18 °C hasta el momento de su utilización (sección 2.3.2.5). Se tomó una alícuota de 10 mL de la fracción soluble con una pipeta de doble aforo y se determinó el contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl detallado en el análisis de nitrógeno total. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado.

Para el cálculo del porcentaje de NS-pH 4,6 en las muestras se utilizó la siguiente expresión:

$$\% NS (p/p) = (V_M - V_B) \times N_A \times 0,014007 \times \frac{100}{V_A} \times \frac{250}{M}$$

Donde,

V_M : volumen (mL) gastado de H_2SO_4 en la titulación de la muestra

V_B : volumen (mL) gastado de H_2SO_4 en la titulación del blanco, en mL.

V_a : volumen de la fracción soluble utilizado para la digestión (10 mL).

N_A : normalidad del H_2SO_4 en meq/mL (0.0997 N).

0,014007: masa (g) de un miliquivalente de nitrógeno.

M : masa (g) de la muestra utilizada en el análisis (en la preparación de la suspensión).

Una vez obtenidos los valores de nitrógeno total y soluble a pH 4,6 se calculó el índice de maduración como el porcentaje de nitrógeno soluble respecto del total, quedando expresado como:

$$\text{Índice de maduración (\%)} = \frac{NS - pH4,6}{NT} \times 100$$

Según Sousa et al. (2001) el índice de maduración constituye un parámetro de utilidad para evaluar, de manera general, el grado de proteólisis de las caseínas en el queso. Sin embargo, las proteasas endógenas y de microorganismos pueden también actuar además sobre las proteínas del lactosuero (McSweeney, 2004).

2.3.2.5. *Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia de especies nitrogenadas solubles a pH 4,6*

Este análisis se realizó en el Laboratorio de Cromatografía y Ensayos Especiales del INTI-Lácteos. Se realizó un análisis de la fracción soluble obtenida anteriormente (sección 2.3.2.4), por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Se filtró 1000 μ L de muestra con filtros de 0,22 μ m de poro, 13 mm diámetro (magma nylon hidrofílico, GE Osmonics, Países Bajos). El análisis se llevó a cabo mediante en un equipo de inyección automática marca (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, Alemania) en columna PLRP-S 300Å (Polymer Laboratories Inc, Reino Unido) de tamaño de partícula 8 μ m, 150 x 4,6 mm con elución en gradiente de solvente A (0,1 % v/v ácido trifloroacético (TFA) en agua) y B (0,1 % v/v TFA en acetonitrilo). Los compuestos fueron detectados a $\lambda = 226$ nm. Los análisis fueron llevados a cabo a 40 °C a un flujo de 1 mL/min. El equipo está integrado al software Chem Station LC 3D Syst. Rev: 8.04.03 SP1.

2.3.2.6. Perfil peptídico por electroforesis (Urea-PAGE)

El residuo insoluble a pH 4,6 obtenido en la sección 2.3.2.3 se analizó por electroforesis. Esta fracción está compuesta principalmente por las caseínas sin degradar y los grandes péptidos producidos por la actividad proteolítica del coagulante y la plasmina (Ardö, 1999). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida con agregado de urea, dado que ésta disocia las distintas caseínas de la micela, permitiendo la separación de las mismas según su carga y masa (Upadhyay et al., 2004). Esta técnica es ampliamente utilizada para monitorear la proteólisis primaria en los quesos. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado.

Se utilizó leche en polvo descremada como control, para lo cual se reconstituyó 10 g en 100 mL de agua y se le agregó gota a gota ácido acético glacial bajo agitación hasta alcanzar un pH de 4,6. La mezcla se mantuvo en agitación durante 20 min, luego se centrifugó a 1500 rpm (Sigma 3-18 KS, Sigma, Alemania) durante 20 min y posteriormente se filtró con papel de filtro, descartando el líquido. Se reservó a -18 °C hasta el análisis.

La electroforesis se llevó a cabo mediante el sistema Mini-PROTEAN (BIO-RAD, USA). Se realizó a partir de un gel de separación con 6 % de acrilamida/ bisacrilamida (de una solución al 30 %) y un gel de apilamiento con 4,2 % acrilamida/ bisacrilamida (de una solución al 30 %).

Se tomó 50 mg del precipitado de las muestras (sección 2.3.2.3) y de la leche para control, y se les agregó 3 mL de una solución de Urea- β -mercaptoetanol. Se colocó 200 μ L de la solución obtenida en un tubo eppendorf junto con 200 μ L de solución desnaturizante y glicerol. Se sembró 100 μ g de proteínas en cada calle, cuantificada según Bradford (1976) (Anexo V), y se usó albumina sérica bovina (BSA) para electroforesis (Sigma-Aldrich, USA) como referencia. Se procedió a realizar la corrida electroforética (100 V) de la muestra, utilizando como buffer de corrida Tris-glicina pH 8,4. El final de la corrida se evidenció por la llegada del frente de avance al final de la placa, lo que se pudo apreciar gracias al colorante azul de bromofenol presente en la solución desnaturizante. Las bandas de proteínas se revelaron, sumergiendo los geles con solución diluida de colorante. Luego se procedió a eluir el exceso de colorante mediante

repetidos lavados con solución decolorante, compuesta por ácido acético, etanol y glicerol, hasta obtener una clara resolución. La preparación de los geles y reactivos utilizados se detallan en el Anexo I.

Se tomaron fotografías de los geles y se procesaron con el software ImageJ 1.8.0_112, (National Institutes of Health, USA).

2.3.2.7. Determinación del pH

La medición de pH se realizó según lo descrito en el Capítulo III, sección 2.2.4.

2.3.2.8. Determinación de la actividad de agua (a_w)

Para la medición de la actividad acuosa se procedió según lo detallado en el Capítulo III, sección 2.2.3.

2.3.3. Determinaciones microbiológicas

2.3.3.1. Investigación de patógenos y recuento de microorganismos indicadores

Los quesos se analizaron según los requisitos del CAA (Introducción, Tabla 2). Además, se incluyó el análisis de anaerobios sulfitos reductores por tratarse de un producto que, por el proceso de embutido, en su interior se encuentra en condición anaerobia.

En todos los muestreos se realizó el análisis de microorganismos indicadores mientras que la investigación de patógenos se realizó solamente al inicio y final del proceso de maduración, días 1 y 35, respectivamente.

Para el análisis de indicadores, se pesaron 10 g de cada queso, por duplicado, y se colocó en bolsas estériles con 90 mL de peptona 0,1 % p/v. Se homogeneizó en stomacher (easyMix, AES, Francia) por 60 s y se realizaron las diluciones seriadas correspondientes con el mismo diluyente, para luego sembrar en los respectivos medios de cultivo según el microorganismo target, como se indica a continuación:

- Coliformes /g (30 °C)

Se sembró en profundidad, con agregado de sobrecapa, utilizando agar violeta cristal rojo neutro bilis lactosa (VRBL) (Britania, Argentina). Las placas se incubaron invertidas por 24 h a 30 °C. Se procedió a realizar el recuento de las colonias típicas (color rojo oscuro, de tamaño igual o mayor a 0,5 mm de diámetro).

- Coliformes /g (45 °C).

Se realizó el mismo procedimiento que para Coliformes a 30 °C, incubando las placas por 24 h a 45°C. Las colonias típicas tienen las mismas características de crecimiento en este medio que para los coliformes a 30 °C.

- *Estafilococos* coagulasa positiva /g.

Se sembró en superficie en placas con Agar Baird-Parker (BP) (Britania, Argentina). Las placas se incubaron por 48 h a 37 °C y luego se procedió al recuento de las colonias típicas las cuales son de color negro brillante, convexas, con un halo opaco de lipólisis rodeado de un halo transparente de proteólisis. En caso de detectarse colonias típicas se las sometió a la prueba de coagulasa utilizando plasma de conejo inoculado con un cultivo overnight en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Oxoid, Inglaterra) de las colonias presuntivas aisladas. Las colonias presuntivas se confirman como *Estafilococos* coagulasa positivo si se produce la coagulación del plasma.

- Anaerobios sulfitos reductores

Se utilizaron tubos con 10 mL de agar sulfato polimixina sulfadiazina (SPS) (Merck, Alemania), hervidos a baño María para fundir y eliminar el oxígeno. Una vez atemperados a 45 °C, se sembró 1 mL de las diluciones correspondientes vaciando la pipeta desde el fondo del tubo hasta antes de llegar a la superficie. Una vez solidificado el agar, se colocó un tapón de SPS. Los tubos se incubaron por 48 h a 35 °C. Luego de la incubación se procedió al recuento de las colonias típicas, de color negro.

Para la investigación de patógenos, se realizó un método rápido de screening utilizando kits de inmunocromatografía del tipo de flujo lateral sobre membrana, con un formato de tiras,

basados en inmunoensayo sandwich que utiliza anticuerpos específicos marcados con partículas de oro. A medida que la muestra se mueve por capilaridad desde el bloque filtrante hacia el bloque de oro-anticuerpo, el reactivo de oro-anticuerpo se liga específicamente al microorganismo en cuestión y se mueve con el líquido de la muestra hasta la membrana. La muestra pasa a través de la línea de prueba, donde el anticuerpo inmovilizado captura el complejo microorganismo-anticuerpo-oro, causando así la formación de un “sándwich” de anticuerpo-microorganismo y la aparición de color rojo en la línea de prueba. Para la interpretación del resultado debe verse, al menos, una línea roja (en la posición del control), indicando el correcto desempeño del kit. Si no aparece ninguna línea roja el test queda invalidado y se debe repetir. Si sólo se observa una línea (control), entonces la muestra es negativa. La aparición de una línea roja por debajo de la línea de control indica que la muestra es positiva y se debe confirmar por el método de referencia (Figura 39).



Figura 39: Interpretación de resultados del método de screening por inmunoensayo lateral flow: izq: resultado negativo (una línea roja en esta posición indica el correcto funcionamiento del kit), der: resultado positivo.

A continuación se detalla el procedimiento de análisis realizado para cada patógeno:

- *Salmonella* spp /25 g.

Se utilizó el Kit DuPont™ Lateral Flow System *Salmonella* AD. Para ello, se colocó 25 g de queso en una bolsa estéril con 225 mL del medio de enriquecimiento primario provisto por el kit. Se homogeneizó durante 60 s en stomacher (easyMix, AES, Francia) y se incubó a 42 °C

durante 24 h. Transcurrida la incubación se tomó 0,1 mL del cultivo y se transfirió a un tubo eppendorf con 1 mL de medio de enriquecimiento secundario del kit. Se incubó 24 h a 42 °C. Luego de la incubación, se transfirieron 500 µL a un tubo de ensayo corto, con una tira reactiva del kit. Se dejó actuar por 10 min y se procedió a interpretar el resultado. Ante un resultado positivo presuntivo se confirmó según el método estandarizado ISO 6579:2002.

- *Listeria monocytogenes*/25g

Se utilizó el kit RapidChek® *Listeria*, Romer Labs. Se colocó 25 g de queso en una bolsa estéril con 225 mL del caldo de enriquecimiento para *Listeria* (según formulación UVM) (Acumedia, Neogen, USA). Se homogeneizó durante 60 s en stomacher (easyMix, AES, Francia) y se incubó a 30 °C durante 24 h. Luego, se transfirió 0,1 mL del enriquecimiento de UVM a un tubo con 10 mL de caldo Fraser (Merck, Alemania) previamente adicionado con 0,1 mL de citrato férrico. Los tubos se incubaron a 35 °C durante 24 h. Tras la incubación, se transfirieron 500 µL del medio a un tubo de ensayo corto, y se llevó a hervor por 15 min. Una vez frío se colocó una tira reactiva del kit y luego de 10 min se interpretó el resultado. Ante un resultado positivo presuntivo se confirmó según el método estandarizado ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004.

2.3.3.2 Recuento de hongos en tripa

Se realizó el recuento de hongos en tripa, según el procedimiento descrito en el Capítulo II, sección 2.1.4.1, utilizando cuadrados de 2 cm de lado. El recuento se realizó por duplicado con dos fragmentos de cada tripa. La identificación de las colonias obtenidas se realizó según Pitt y Hocking (2009).

2.3.3.3 Cuantificación de biomasa fúngica

Se cuantificó la biomasa fúngica presente en la tripa por método gravimétrico, por duplicado. Para ello, la tripa restante de separar para realizar el recuento (sección 2.3.1) se midió y se colocó en una bolsa. Se agregó 20 mL de agua destilada y se homogeneizó en stomacher (easyMix, AES, Francia) por 60 s. El líquido se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min (Sigma 3-18 KS, Sigma, Alemania). Se descartó el sobrenadante, el pellet se re suspendió con agua

destilada y se trasvasó a un frasco de vidrio previamente secado a 105 °C y pesado (peso exacto). La preparación se colocó en estufa a 105 ± 1 °C y se secó hasta la evaporación completa del agua, durante aproximadamente 4 h. Se dejó enfriar en desecador a temperatura ambiente y se pesó (peso exacto). Finalmente, se registró el peso exacto del frasco con la muestra seca, y se calculó el extracto seco de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Biomasa fúngica (g micelio/cm}^2 \text{ tripa)} = m_1 - m_0 / \text{cm}^2 \text{ tripa}$$

Donde,

m_0 : peso (g) del frasco de vidrio vacío seco.

m_1 : peso (g) del frasco de vidrio y el pellet después de secado.

2.3.4 Caracterización sensorial

El ensayo fue realizado por el panel del INTI-Lácteos, el cual fue seleccionado y entrenado según Normas FIL-IDF 99-2009 e ISO 8586. Dicho panel estuvo conformado por 8 personas no videntes y disminuidas visuales (5 mujeres y 3 hombres) entre 25 y 55 años, y 5 personas videntes (2 mujeres y 3 hombres) entre 35 y 55 años. La evaluación se realizó en cabinas sensoriales informatizadas con el software FIZZ, version 2.50 to 278 (Biosystemes, France) (Figura 40).



Figura 40: Evaluadores en cabinas de evaluación sensorial (INTI-Lácteos)

Para la evaluación de la apariencia externa se utilizaron los quesos enteros, sin pelar, mientras que para el resto de las evaluaciones los quesos se pelaron, se cortaron en rodajas de aproximadamente 1 cm de ancho y se dispusieron sobre platos plásticos. Las muestras se atemperaron a 15 °C.

2.3.4.1 Ensayo de Categorización

Se llevó a cabo un ensayo de categorización para diferenciar los quesos inoculados respecto a los controles y entre las diferentes condiciones de maduración según lo establecido en la Norma FIL-IDF 99-3: 2009. Los atributos evaluados fueron: olor, textura y flavor. Para la puntuación de cada atributo se utilizó la siguiente escala:

- 5- Concordancia con el requisito sensorial preestablecido.
- 4- Mínima desviación del requisito sensorial preestablecido.
- 3- Desviación perceptible requisito sensorial preestablecido.
- 2- Desviación considerable del requisito sensorial preestablecido
- 1- Desviación muy considerable del requisito sensorial preestablecido.

2.3.4.2 Ensayo descriptivo cuantitativo (QDA)

Se realizó la determinación de perfiles de textura y flavor utilizando la técnica QDA (Análisis Descriptivo Cuantitativo por sus siglas en inglés) según lineamientos de Lavanchy et al. (1994) para la evaluación de quesos de pasta dura y semidura. El análisis sensorial se realizó a partir del día 14 de maduración, al ser el día en el que el emplume alcanzó el aspecto deseado. Los descriptores evaluados fueron: apariencia externa (forma del queso y emplume), apariencia interna (homogeneidad del color y de la pasta), flavor (intensidad de olor y aroma característicos, gusto salado, ácido y amargo, sensación picante, persistencia global, gusto residual) y textura (elasticidad, firmeza, friabilidad, adherencia, solubilidad e impresión de humedad).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Quesos obtenidos

Se obtuvo un total de 102 quesos (9,98 kg) con un peso promedio por unidad de 97,89 g. Todos los quesos se maduraron durante 35 días en condiciones controladas. Se verificó que la limpieza de las cámaras resultó eficaz, obteniendo en todos los casos un recuento de hongos menor a 1 UFC/cm²/15 min.

Durante la primera etapa de maduración (hasta el día 14), las condiciones de maduración se mantuvieron dentro de las propuestas, ya que en la cámara de los quesos inoculados se registró un promedio de $12,2 \pm 1,1$ °C y $90,3 \pm 5,1$ % h.r., mientras que en la cámara de los quesos controles (sin inocular) se obtuvo un promedio de $12,4 \pm 0,3$ °C y $90,7 \pm 1,1$ % h.r. En la segunda etapa de maduración, post envasado (desde el día 14), si bien las temperaturas de las cámaras se mantuvieron dentro de las propuestas, la humedad relativa en ambas cámaras se mantuvo por debajo de lo deseado, obteniendo en la cámara seteada a 12 °C un promedio de $10,9 \pm 1,2$ °C y $85,6 \pm 3,6$ % h.r, y en la seteada a 5 °C un promedio de $4,3 \pm 0,9$ °C y $80,8 \pm 1,9$ % h.r.

El crecimiento de *P. nalgiovense* sobre la superficie de la tripa comenzó a observarse a partir del día 6 de maduración, obteniéndose un emplume homogéneo, sin contaminaciones, en toda la superficie de los quesos, a partir del día 14, lo cual coincide con lo observado en los ensayos del Capítulo III.

Los quesos controles, sin inocular y tratados superficialmente con natamicina (500 mg/L), demostraron hasta el día 14 un buen desempeño, sin embargo antes del día 35 tuvieron que ser descartados por evidenciarse contaminación fúngica.

El aspecto interno de los quesos mostró una masa uniforme sin ojos mecánicos ni biológicos.

Las Figuras 41, 42 y 43 muestran imágenes del aspecto externo e interno de los quesos obtenidos en los diferentes muestreos realizados.

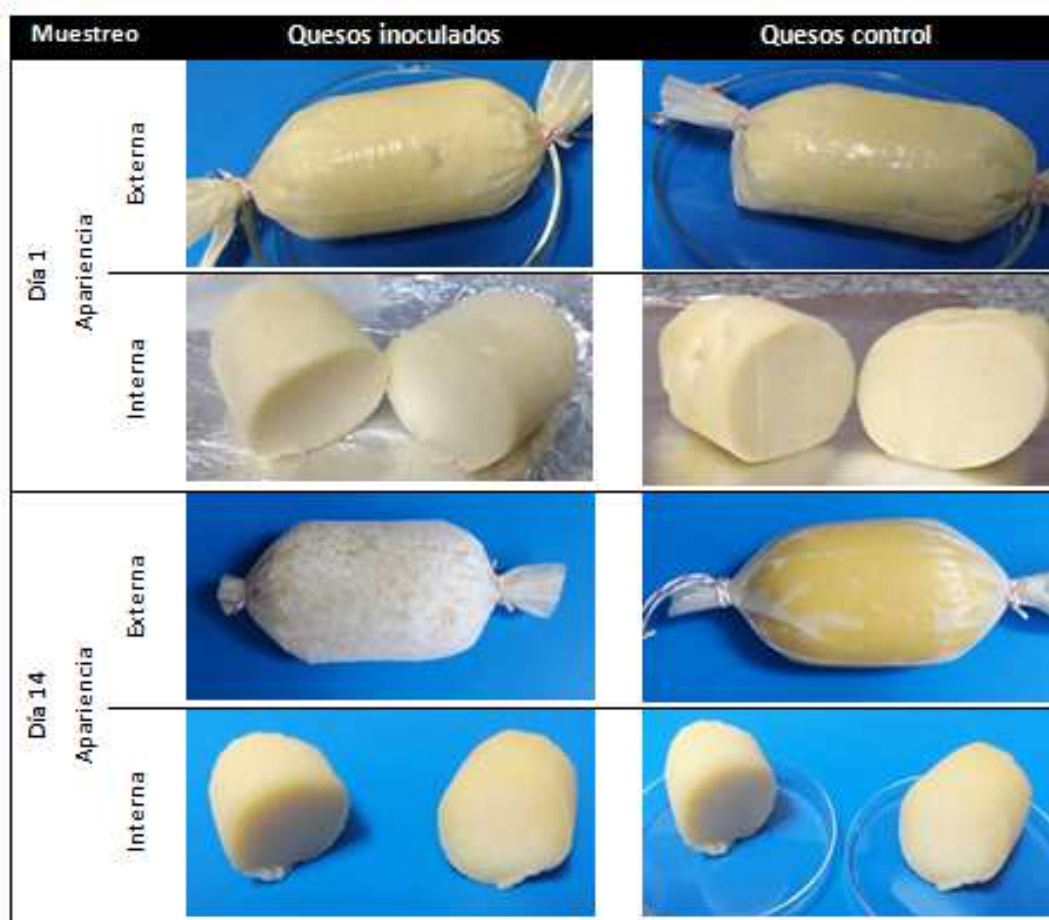


Figura 41: Aspecto externo e interno de los quesos inoculados y controles, obtenidos al día 14 de maduración

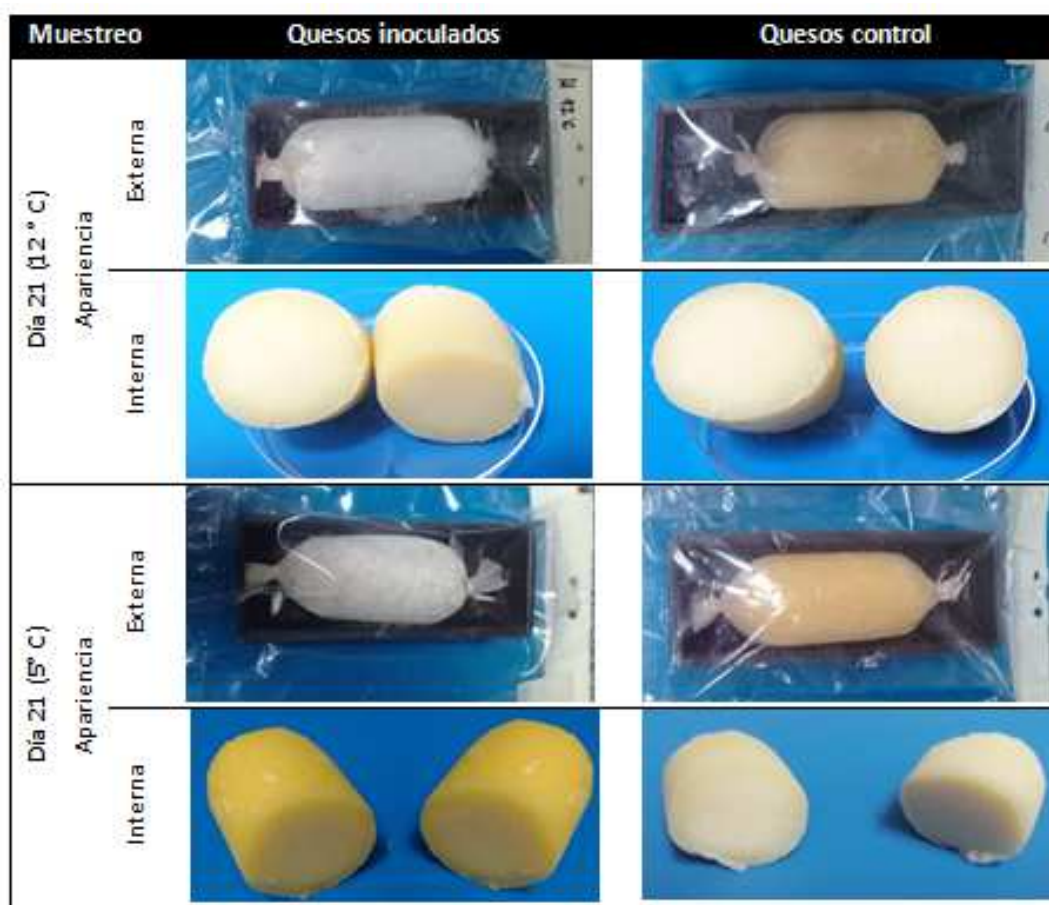


Figura 42: Aspecto externo e interno de los quesos inoculados y controles, obtenidos al día 21 de maduración, a 5 °C y 12 °C (post envasado).

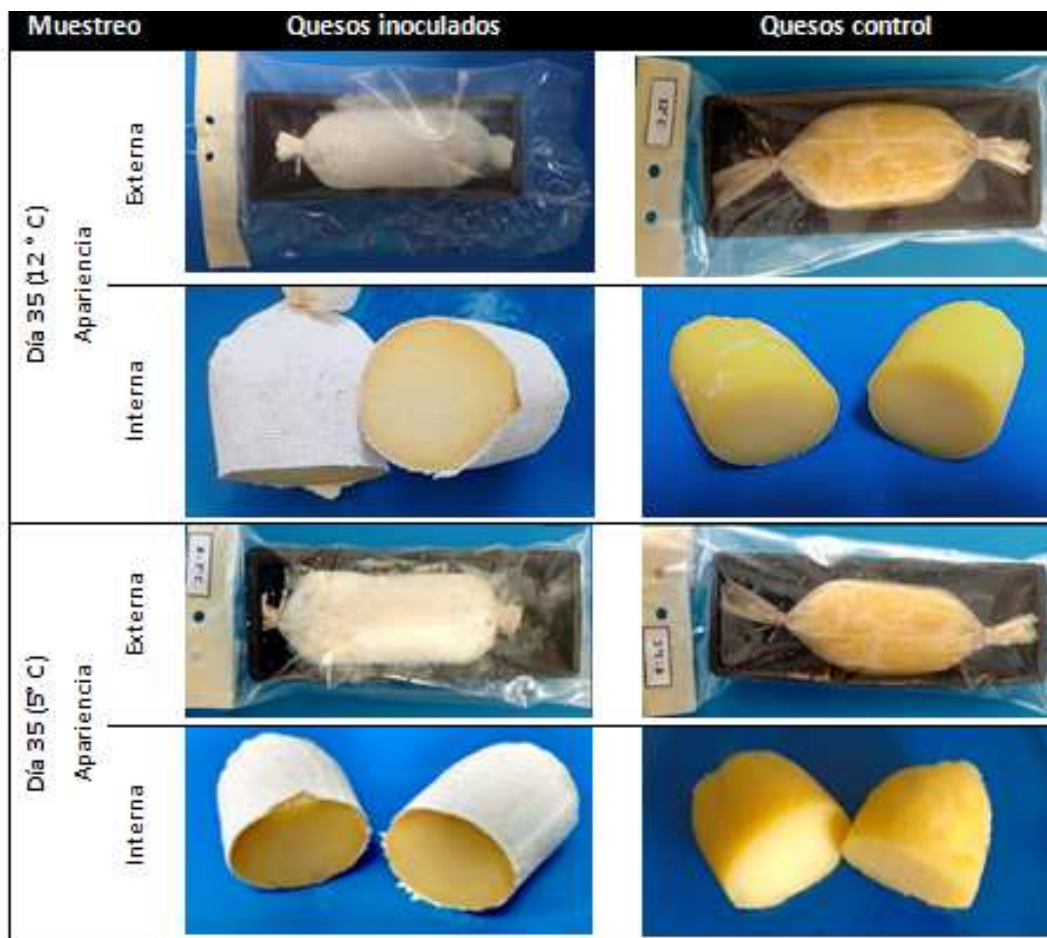


Figura 43: Aspecto externo e interno de los quesos inoculados y controles, obtenidos al día 35 de maduración, a 5 °C y 12 °C (post envasado).

3.2. Evolución de las variables fisicoquímicas durante la maduración

3.2.1. Pérdida de peso

Se pesaron las mismas unidades durante las etapas de pre y post envasado. Luego del envasado los controles de peso se colocaron en envases que podían abrirse y volverse a cerrar para poder realizar las pesadas correspondientes. La Figura 44 muestra la evolución del porcentaje promedio de la pérdida de peso referida al peso inicial. En todos los casos se observó que la pendiente de la curva (velocidad de deshidratación) disminuyó significativamente tras el envasado. Puede observarse que tanto a 12 como a 5 °C, los controles perdieron más peso que los inoculados, esto fortalece lo ya expuesto en el Capítulo III (sección 3.2.1) respecto al efecto protector por parte del hongo. Como puede observarse, se obtuvo un comportamiento

reproducibile al comparar los resultados con los obtenidos al día 14 en la primera producción de INTI-Lácteos (Capítulo III, sección 3.2) donde la velocidad de deshidratación promedio fue de $0,76 \pm 0,02$ g/día mientras que en la segunda producción fue de $0.81 \pm 0,03$ g/día.

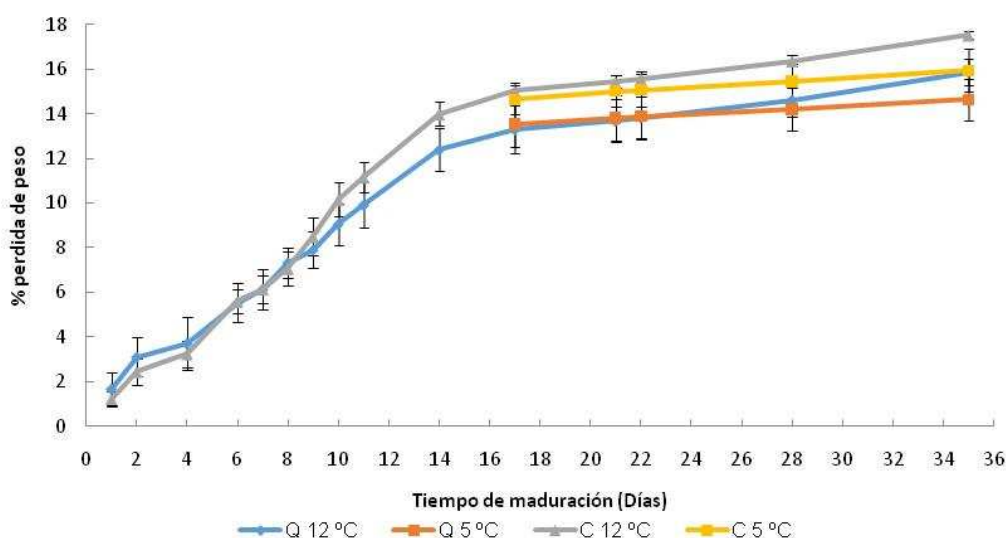


Figura 44: Evolución del porcentaje de pérdida de peso durante la maduración de los quesos inoculados (Q) y los controles (C).

Por otro lado, al comparar los controles de peso de ambas producciones al día 21 a 12 °C, se observó que la velocidad promedio de deshidratación se redujo un 28,6 % al contemplar la etapa de envasado, siendo en la primera producción (sin envasado) de $0,63 \pm 0,02$ g/ día y en la segunda (con envasado) de $0,18 \pm 0,05$ g/día (Figura 45). Estos resultados sugieren que el envasado resultó efectivo para disminuir drásticamente la pérdida de peso debida a la deshidratación, alcanzando con éxito el objetivo planteado. Picque et al. (2010) observaron resultados similares al comparar la pérdida de peso del queso Camembert envasado y sin envasar, obteniendo una reducción del 22,43 % en la velocidad promedio de deshidratación con el envasado luego de 23 días de maduración (a 12 °C y 95 % h.r por 12 días y luego a 6 °C).

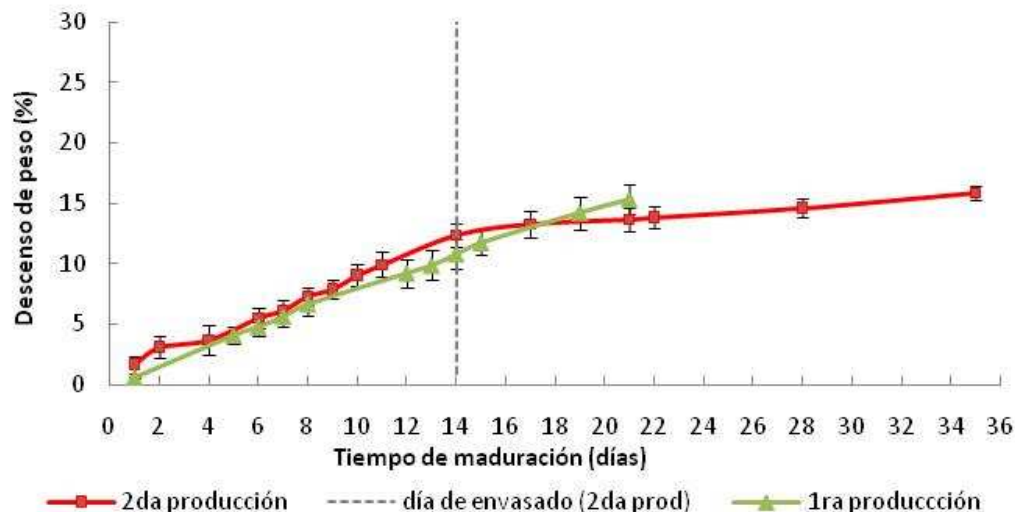


Figura 45: Comparación de la evolución del porcentaje de pérdida de peso durante la maduración en quesos inoculados (12 °C).

3.2.2. Humedad

La humedad inicial (día 1) promedio de los quesos fue de $40,22 \pm 0,09$ % h.r. (Tabla 16). Al final del tiempo de maduración estudiado (día 35), los quesos inoculados madurados a 12 °C y a 5 °C alcanzaron un porcentaje de humedad final de $34,72 \pm 1,72$ % y $32,47 \pm 0,56$ % respectivamente, y los controles madurados a 5 °C obtuvieron un valor de $34,50 \pm 1,44$ % clasificándose, en todos los casos, como quesos de “*baja humedad*”, según lo establecido en el C.A.A (Introducción, Tabla 1). Los controles madurados a 12 °C no se analizaron debido a que presentaron contaminaciones.

Tabla 16: Humedad (%) obtenida durante la maduración de los quesos inoculados (Q) y controles (C)

Día de maduración	Humedad (%)					
	Quesos inoculados (Q)			Quesos controles (C)		
	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)
1	40,54 ± 0,06			39,90 ± 0,13		
3	41,21 ± 0,04			40,91 ± 0,16		
6	35,78 ± 1,05			40,65 ± 0,28		
14	33,8 ± 1,01			34,38 ± 0,43		
21		35,72 ± 1,14	36,97 ± 2,38		36,84 ± 1,73	34,67 ± 1,80
35		34,72 ± 1,72	32,47 ± 0,56		ND	34,50 ± 1,44

(ND) No Determinado por haber descartado las muestras por contaminación fúngica

3.2.3. Materia grasa

Todas las condiciones presentaron poca variación del porcentaje de materia grasa en el extracto seco en el tiempo de maduración estudiado (Tabla 17). Durante todo el ensayo se obtuvo un valor promedio para los quesos inoculados de $52,7 \pm 0,5$ % y de $52,4 \pm 1,2$ % para los controles. Según lo establecido en el CAA (Introducción, Tabla 1) los quesos obtenidos se clasifican como “grasos”.

Tabla 17: Materia grasa (%), expresada en extracto seco, obtenida durante la maduración de los quesos inoculados (Q) y controles (C)

Día de maduración	Grasa (ES)(%)					
	Quesos inoculados (Q)			Quesos controles (C)		
	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)
1	52,97 ± 0			52,16 ± 0,35		
3	53,15 ± 0,60			53,07 ± 0		
6	52,35 ± 0			52,16 ± 1,65		
14	52,37 ± 0,83			52,64 ± 0,22		
21		53,39 ± 0,13	52,83 ± 0,25		52,64 ± 0,22	52,55 ± 0,65
35		52,14 ± 1,10	52,49 ± 1,17		ND	51,91 ± 3,06

(ND) No Determinado por haber descartado las muestras por contaminación fúngica

3.2.4. Nitrógeno total, nitrógeno soluble a pH 4,6 e índice de maduración

El *nitrógeno total* en base seca mostró poca variación durante todo el ensayo (Tabla 18) obteniéndose un valor promedio de $6,69 \pm 0,13$ % para los quesos inoculados y de $6,71 \pm 0,15$ % para los controles. A partir de estos valores se obtuvo un porcentaje de proteínas promedio en base seca de $42,68 \pm 0,82$ % para los quesos inoculados y de $42,81 \pm 0,95$ % para los controles.

Tabla 18: Valores de nitrógeno total (%), expresados en extracto seco, obtenidos durante la maduración de los quesos inoculados (Q) y controles (C).

Día de maduración	Nitrógeno Total (ES) (%)					
	Quesos inoculados (Q)			Quesos controles (C)		
	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)
1	$6,59 \pm 0,04$			$6,53 \pm 0,04$		
3	$6,56 \pm 0,01$			$6,54 \pm 0,02$		
6	$6,53 \pm 0,03$			$6,57 \pm 0,01$		
14	$6,85 \pm 0,01$			$6,85 \pm 0,02$		
21		$6,83 \pm 0,06$	$6,70 \pm 0,09$		$6,91 \pm 0,06$	$6,70 \pm 0,01$
35		$6,81 \pm 0,07$	$6,68 \pm 0,10$		ND	$6,69 \pm 0,01$

(ND) No Determinado por haber descartado las muestras por contaminación fúngica

Desde el día 14 de maduración, los quesos inoculados, tanto a 12 °C como a 5 °C, presentaron valores de *nitrógeno soluble a pH 4,6* superiores a los controles. Como puede observarse en la Tabla 19 los quesos inoculados madurados a 12 °C presentaron una tendencia creciente del valor de nitrógeno soluble a pH 4,6 con el tiempo de maduración. Sin embargo el aumento de dicho valor se observa a partir del día 3 donde aún no hay desarrollo fúngico por lo que la maduración no puede atribuirse exclusivamente a la participación del hongo. Por otro lado en los quesos inoculados, madurados a 5 °C, se obtuvieron prácticamente los mismos valores de nitrógeno soluble a los días 21 y 35 de maduración.

Estos resultados sugieren sobre la participación de otros microorganismos en el proceso de maduración. Los mismos podrían provenir de la flora agregada intencionalmente de BAL

durante la elaboración del queso, como también de las bacterias lácticas no fermento que ingresan involuntariamente como flora adventicia. Estas últimas predominan en la maduración media a avanzada por lo que sería más adecuado atribuir dichos cambios a las BAL que en los primeros días de maduración oxidan el lactato (McSweeney, 2004) hasta que se vea solapada por la participación del hongo al colonizar la superficie del queso.

Tabla 19: Valores de nitrógeno soluble (%), expresados en extracto seco, obtenidos durante la maduración de los quesos inoculados (Q) y controles (C).

Día de maduración	<i>Nitrógeno soluble (ES) (%)</i>					
	Quesos inoculados (Q)			Quesos controles (C)		
	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)
1	0,39 ± 0,01			0,38 ± 0,01		
3	0,46 ± 0,02			0,45 ± 0,04		
6	0,53 ± 0,03			0,49 ± 0,03		
14	0,59 ± 0,01			0,41 ± 0,01		
21		0,63 ± 0	0,59 ± 0,07		0,50 ± 0	0,48 ± 0,01
35		0,68 ± 0,01	0,56 ± 0,01		ND	0,48 ± 0,01

(ND) No Determinado por haber descartado las muestras por contaminación fúngica

Con los resultados de nitrógeno total y de nitrógeno soluble a pH 4,6 se obtuvo una tendencia para el índice de maduración coincidente con la del nitrógeno soluble a pH 4,6 (Figura 46).

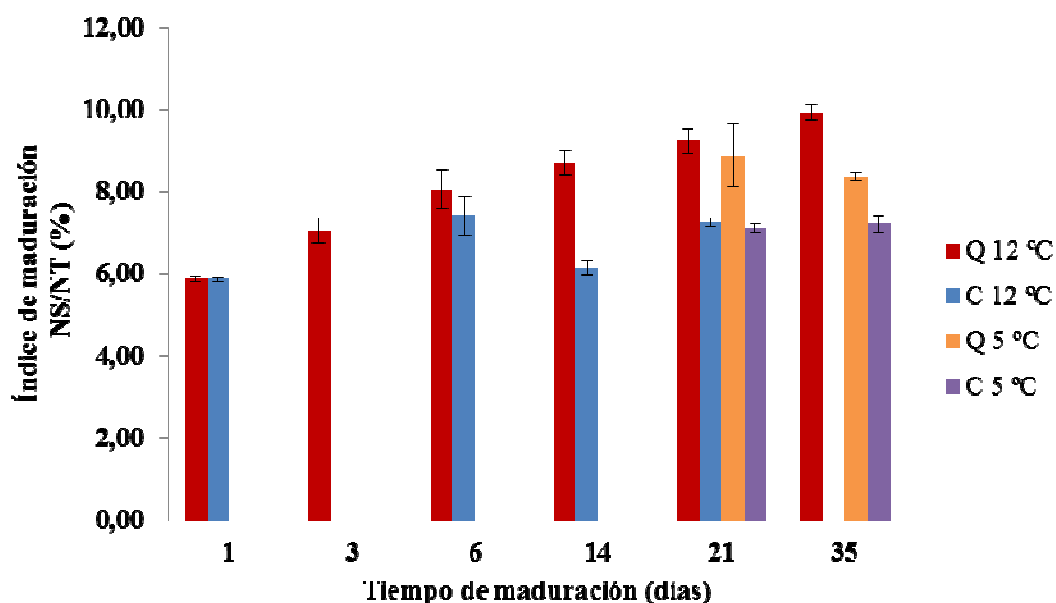


Figura 46: Evolución del índice de maduración (NS/NT). (Q: quesos inoculados; C: controles)

3.2.5. Cromatografía de especies nitrogenadas solubles a pH 4,6

La Figura 47 muestran los distintos perfiles peptídicos de la fracción soluble a pH 4,6 obtenidos a partir de los quesos analizados por cromatografía líquida de alta eficacia. Como puede observarse los perfiles peptídicos obtenidos a partir de los quesos sin inocular a lo largo de todo el tiempo estudiado (35 días) no mostraron variaciones en ninguna de las condiciones de maduración evaluadas (Figura 47: A, C, E, G, I).

Se pudo observar que en la etapa de pre envasado, es decir hasta el día 14 de maduración, tanto los controles como los quesos inoculados mostraron perfiles peptídicos muy similares (Figura 47: A-D).

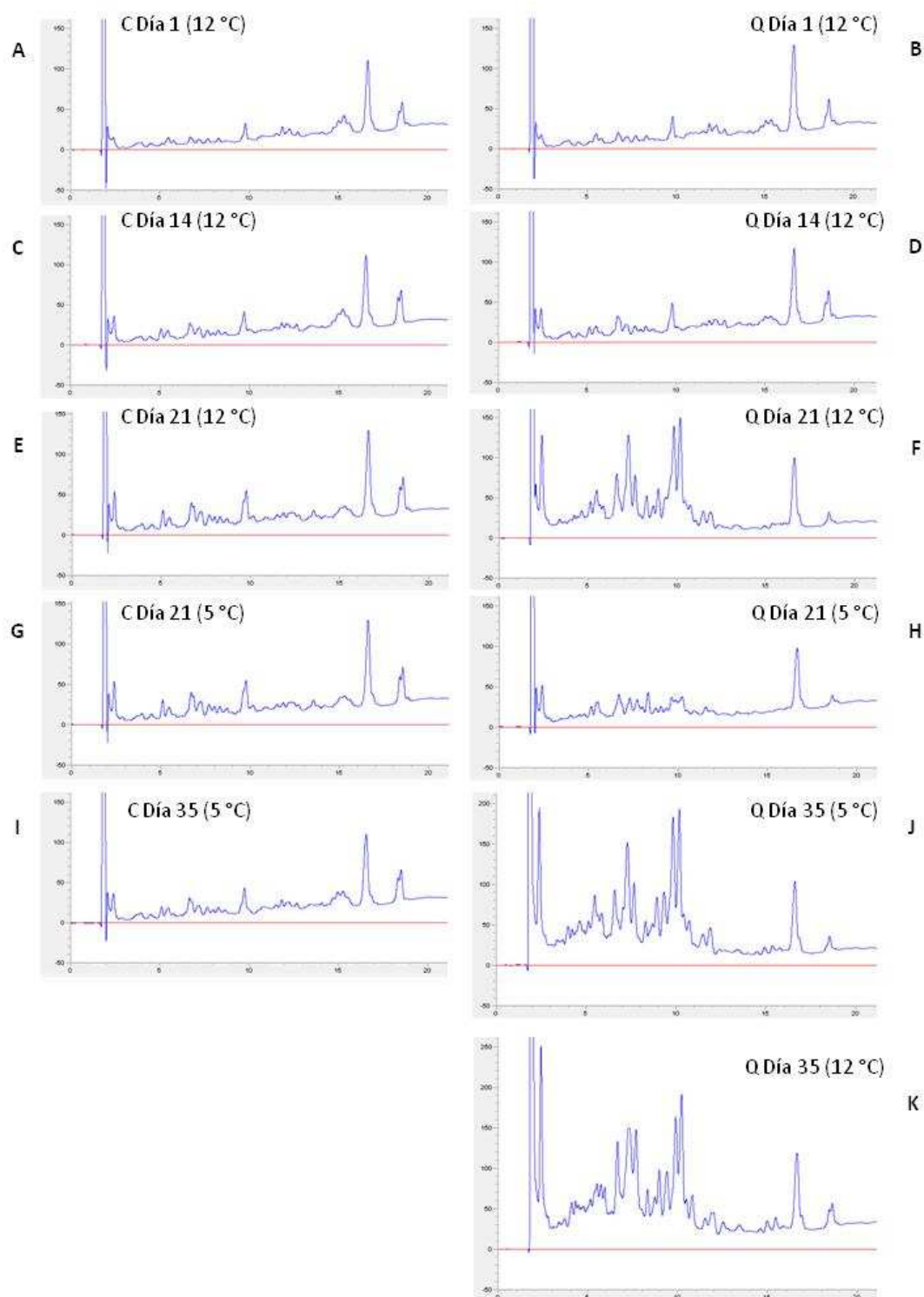


Figura 47: Perfil peptídico de la fracción soluble a pH 4,6 de los controles (C) y quesos inoculados (Q) a los distintos tiempos y temperaturas evaluados: A-D: Etapa pre envasado (12 °C); E-K: Etapa post envasado (a 12 y 5 °C).

A partir del día 21 de maduración (post envasado), los quesos inoculados comenzaron a diferenciarse de los controles respecto a su perfil peptídico (Figura 47: E-K). En cuanto a los quesos inoculados, se observó que a partir del día 21 las unidades maduradas a 12 °C comenzaron a exhibir un perfil peptídico más desarrollado, pero no ocurrió lo mismo con los madurados a 5 °C que mostraron un comportamiento más similar al de los controles. Los factores que sugieren cambios en el perfil peptídico se basan en el aumento de la cantidad de péptidos definidos por el incremento de la cantidad de picos (área debajo de la curva), y por la mayor variedad de pesos moleculares y de carga, dado que se observa un aumento muy significativo del número de picos (Figura 47: F, H, J y K), básicamente a bajos tiempos de retención, lo que demostraría estar ante la generación de especies peptídicas de menor tamaño, por lo tanto mayor proteólisis (Subramanian y Rodríguez-Saona, 2010). Al día 35, a 12 °C, este comportamiento se hace más notorio observándose mayor amplitud y número de picos (Figura 47: K).

Como puede observarse en la figura 47, imágenes F y J, el perfil peptídico obtenido para las muestras del día 21 de quesos inoculados, madurados a 12 °C, resulta comparable con el obtenido para los quesos inoculados, madurados a 5 °C al día 35. Esto sugiere que el proceso madurativo ocurre con mayor lentitud a 5 °C que a 12 °C, pero que con el tiempo adecuado se puede alcanzar un punto similar de maduración. Los controles con 35 días de maduración a 12 °C no se analizaron porque presentaron contaminaciones.

Los resultados obtenidos demuestran que esta técnica cromatográfica resulta más sensible que otras ensayadas para evidenciar los cambios proteolíticos ocurridos durante la maduración de los quesos (Polo et al., 1985; Leaver et al., 1993; Farrell et al., 2004; Fernandez et al., 2007; Siufe et al., 2010; Calzada Gomez, 2014).

3.2.6. Perfil peptídico por electroforesis (Urea-PAGE)

Las muestras fueron procesadas para su análisis electroforético obteniéndose el perfil proteico correspondiente a la fracción insoluble a pH 4,6.

Como puede apreciarse en la Figura 48 no se observó proteólisis en los quesos control en ninguna de las condiciones estudiadas a lo largo del tiempo de maduración dado que las corridas obtenidas en cada muestreo resultaron coincidentes con el control de leche en polvo.

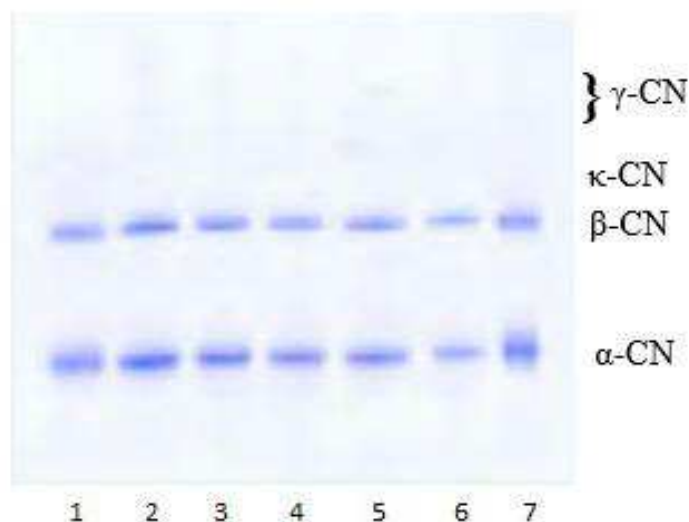


Figura 48: Electrofotograma obtenido por análisis con Urea-PAGE de las fracciones proteicas insolubles a pH 4,6 de los controles (C) : (1) LPC, Leche en Polvo Control; (2) C1 a 12 °C; (3) C14 a 12°C; (4) C21 a 5°C; (5) C35 a 5 °C, (6) C21 12°C ; (7) LPC, Leche en Polvo Control.

En cuanto a los quesos inoculados, se observó que recién a partir del día 21 a 12 °C (Figuras 49 (6) y 50(6)) comienza a evidenciarse la degradación de las α y β caseínas (disminución de la intensidad de sus bandas y aparición de nuevas), asociada a un aumento de la concentración de γ -caseína y de fragmentos de la α_{s1} , siendo esta mayor el día 35 a 12 °C (Figuras 49 (7) y 50 (7)). Esto es coincidente con otros autores que sostienen que las fracciones de α_{s1} y β caseínas disminuyen significativamente durante los dos primeros meses, por acción del coagulante residual y de la plasmina, respectivamente (Bertola et al., 1992; McSweeney, 2004; Sihufe et al., 2010). Los espectros obtenidos del análisis de los geles con el procesador de imágenes ImageJ muestran que los picos iniciales de α y el β caseína se van deformando conforme aparecen nuevos picos de menor tamaño (señalados con flecha) asociados a las nuevas bandas observadas en el gel (Figura 50). Este comportamiento resulta coincidente al observado

en el análisis de la fracción soluble a pH 4,6 por la técnica de HPLC, a medida que se observa una degradación de las caseínas (Urea-PAGE) se ve simultáneamente un aumento en la cantidad de picos del perfil peptídico asociado a la formación de nuevos péptidos (HPLC).

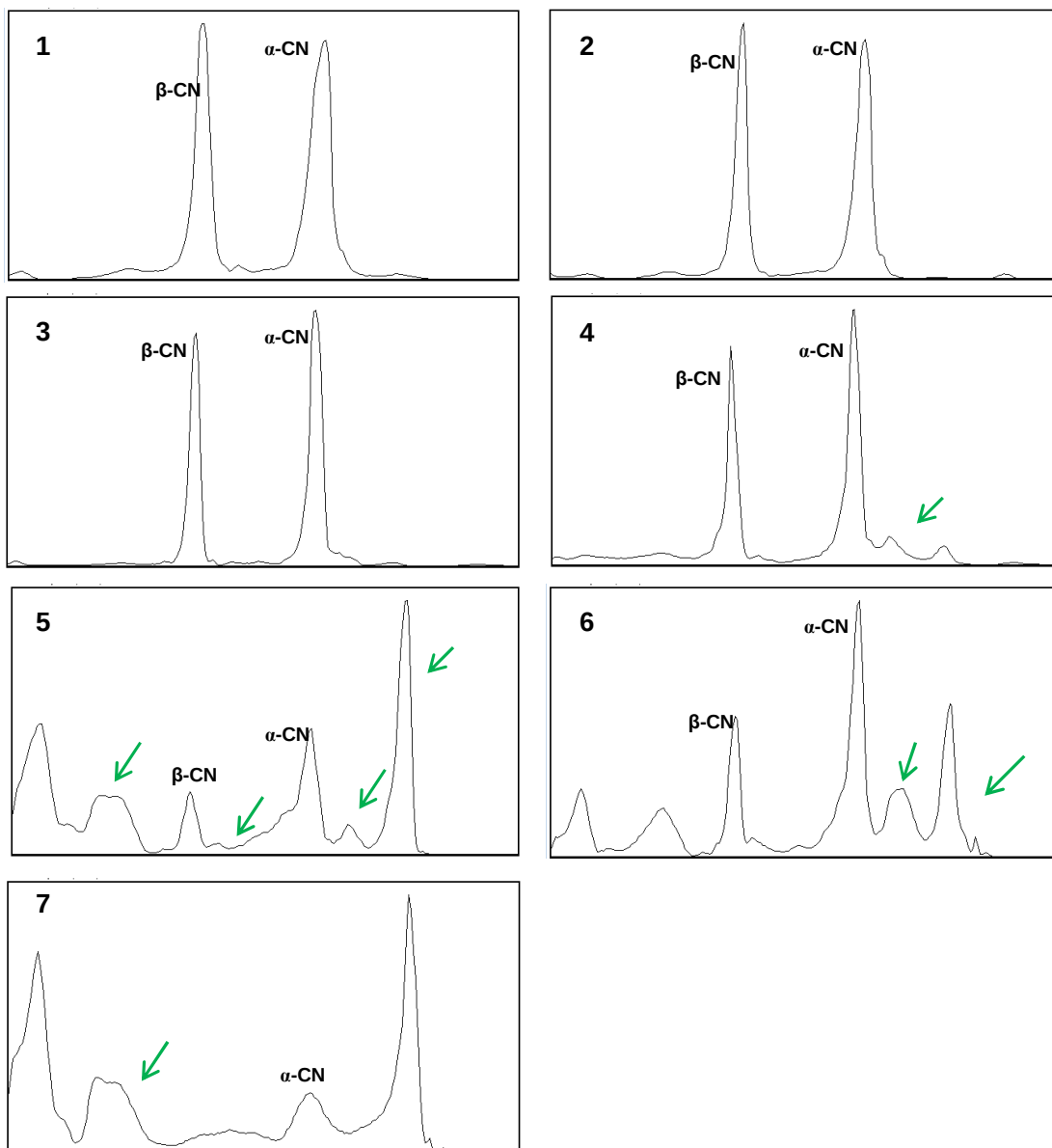


Figura 49: Perfil obtenido por Urea-PAGE de las fracciones proteicas insolubles a pH 4,6 de los quesos inoculados (Q) analizadas por el procesador de imágenes ImageJ: (1) LPC, Leche en Polvo Control; (2) Q1 a 12 °C; (3) Q14 a 12 °C; (4) Q21 a 5 °C; (5) Q35 a 5 °C; (6) Q21 a 12 °C; (7) Q35 a 12 °C.

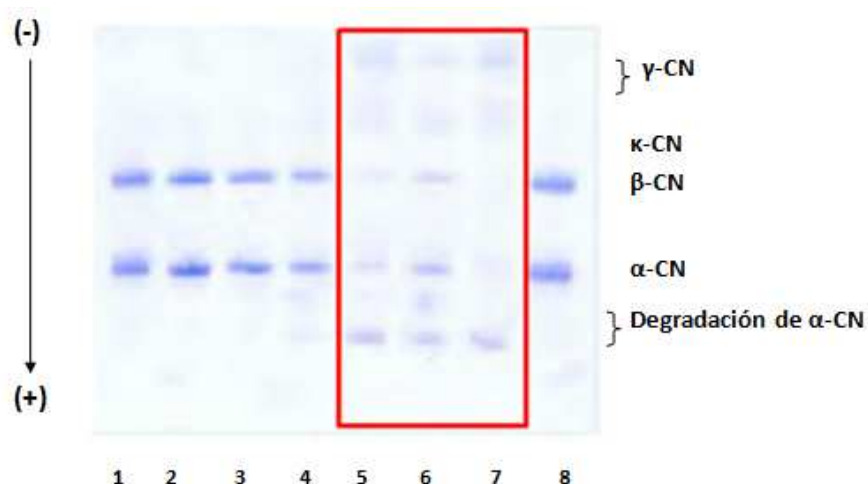


Figura 50: Electrofotograma obtenido por análisis con Urea-PAGE de las fracciones insolubles a pH 4,6 de los quesos inoculados (Q): (1) LPC, Leche en Polvo Control; (2) Q1 a 12 °C; (3) Q14 a 12 °C; (4) Q21 a 5 °C; (5) Q35 a 5 °C; (6) Q21 a 12°C; (7) Q35 a 12°C; (8) LPC, Leche en Polvo Control.(Q: queso inoculados; C: controles).

3.2.7. Determinación del pH

El pH presentó poca variación en el tiempo de maduración estudiado (Tabla 20), obteniéndose un valor promedio de $5,54 \pm 0,03$ y de $5,50 \pm 0,02$ para quesos inoculados y controles, respectivamente. Los resultados obtenidos señalan que, en el tiempo estudiado, aún no hay contribución proteolítica significativa de los hongos en la matriz asociada a un aumento del pH.

Tabla 20: Valores de pH obtenidos durante la maduración de los quesos inoculados (Q) y controles (C)

Día de maduración	pH					
	Quesos inoculados (Q)			Quesos controles (C)		
	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)
1	5,56 ± 0,04			5,53 ± 0,05		
3	5,53 ± 0,02			5,53 ± 0,04		
6	5,55 ± 0,02			5,53 ± 0,02		
14	5,44 ± 0,07			5,43 ± 0,07		
21		5,50 ± 0,10	5,59 ± 0,01		5,49 ± 0,05	5,55 ± 0,05
35		5,60 ± 0,02	5,53 ± 0,06		ND	5,49 ± 0,01

(ND) No Determinado por haber descartado las muestras por contaminación fúngica

3.2.8. Determinación de la actividad de agua

El valor promedio de actividad de agua (a_w) se mantuvo prácticamente constante durante la maduración (Tabla 21). Todas las condiciones presentaron poca variación en el tiempo de maduración, obteniéndose un valor promedio de $0,94 \pm 0,01$. Estos resultados coinciden con los reportados por Leclercq-Perlat et al. (2013), quienes no encontraron diferencias significativas de a_w del queso Camembert madurados durante 14 días a 13°C y con una humedad relativa entre 90 y 97 %.

Tabla 21: Valores de a_w obtenidos durante la maduración de los quesos inoculados (Q) y controles (C).

Día de maduración	a_w					
	Quesos inoculados (Q)			Quesos controles (C)		
	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)	Pre envasado (12 °C)	Post envasado (12 °C)	Post envasado (5 °C)
1	$0,95 \pm 0$			$0,94 \pm 0$		
3	$0,95 \pm 0$			$0,94 \pm 0$		
6	$0,94 \pm 0$			$0,95 \pm 0$		
14	$0,94 \pm 0$			$0,94 \pm 0,01$		
21		$0,93 \pm 0$	$0,94 \pm 0$		$0,94 \pm 0$	$0,93 \pm 0,01$
35		$0,94 \pm 0$	$0,94 \pm 0$		ND	$0,94 \pm 0$

(ND) No Determinado por haber descartado las muestras por contaminación fúngica

3.3. Evolución de las variables microbiológicas durante la maduración

3.3.1. Investigación de patógenos y recuento de microorganismos indicadores

Dependiendo de su contenido de humedad, los recuentos obtenidos fueron contrastados, en cada muestreo, con los valores establecidos en el CAA para quesos de baja y mediana humedad (Introducción, Tabla 2). En todos los muestreos donde se analizó patógenos, tanto para los quesos inoculados como para los controles, se obtuvo ausencia de *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes* en 25 g. Los recuentos obtenidos a lo largo del tiempo de maduración para *Estafilococos coagulasa positiva*, coliformes a 30°C y 45°C se encontraron por debajo del límite

establecido en el CAA Además, los recuentos obtenidos de anaerobios sulfitos reductores a lo largo del tiempo de maduración se encontraron por debajo de 10 UFC/g (Tablas 22 y 23).

Tabla 22: Resultados de recuento de indicadores e investigación de patógenos obtenidos en los quesos inoculados, en los diferentes tiempos de muestreo.

Día	Coliformes 30 °C (UFC/g)	Coliformes 45 °C (UFC/g)	Estaf. coag+ (UFC/g)	Anaerobio sulfito red (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp en 25 g	<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g
1	$<10 \pm 0$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	Ausencia	Ausencia
14	$1,2 \times 10^2 \pm 2,8 \times 10^1$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	ND	ND
21 (5°C)	$2,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^1$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	ND	ND
21 (12°C)	$2,4 \times 10^2 \pm 0$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	ND	ND
35 (5°C)	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	ND	ND
35 (12°C)	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	Ausencia	Ausencia

(ND) No Determinado

Tabla 23: Resultados de recuento de indicadores e investigación de patógenos obtenidos en los quesos controles, en los diferentes tiempos de muestreo.

Día	Coliformes a 30 °C (UFC/g)	Coliformes a 45 °C (UFC/g)	Estaf. coag+ (UFC/g)	Anaerobio sulfito red (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp en 25 g	<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g
1	$<10 \pm 0$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	Ausencia	Ausencia
14	$4,0 \times 10^1 \pm 0$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	ND	ND
21 (5°C)	$2,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^1$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	ND	ND
21 (12°C)	$3,7 \times 10^2 \pm 3,5 \times 10^1$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	ND	ND
35 (5°C)	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	ND	ND
35 (12°C)	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	$<100 \pm 0$	$<10 \pm 0$	Ausencia	Ausencia

(ND) No Determinado

3.3.2. Recuento de hongos en tripa

La Tabla 24 expone el recuento de hongos obtenido para los distintos días de maduración en la tripa de los quesos inoculados. Los mismos fueron identificados morfológicamente como *Penicillium nalgiovense*. Como puede observarse, el recuento de conidios de *P. nalgiovense* comenzó a aumentar a partir del día 6, día en el que empezó a evidenciarse el desarrollo fúngico en la superficie de la tripa de los quesos. El día 14 se obtuvo un emplume homogéneo que cubría la totalidad de la tripa obteniéndose recuentos en el orden de 10^7 UFC/cm². Luego del envasado no se observó una disminución en los recuentos lo que indica que el hongo se mantiene viable

dentro del envase. Aunque las bajas temperaturas pueden provocar una disminución en el crecimiento del hongo por reducir la actividad enzimática e incrementar la microviscosidad citoplasmática del hongo (Deacon, 2006) en este caso, a 5 °C, los recuentos se mantuvieron en el orden de 10^7 UFC/cm², de igual forma que a 12 °C, hasta el final del tiempo estudiado (día 35).

Tabla 24: Recuento de *P. nalgiovense* durante la maduración de los quesos inoculados

Etapas	Día	Temperatura de maduración	<i>P. nalgiovense</i> (UFC/cm²)
Pre envasado	1		$<50 \pm 0$
	3		$<50 \pm 0$
	6	12 °C	$1,1 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^5$
	10		$5,8 \times 10^6 \pm 9,8 \times 10^5$
	14		$2,3 \times 10^7 \pm 2,7 \times 10^7$
Post envasado	21	5 °C	$5,5 \times 10^6 \pm 0$
		12 °C	$6,0 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^5$
	35	5 °C	$4,0 \times 10^7 \pm 3,2 \times 10^6$
		12 °C	$3,3 \times 10^7 \pm 3,2 \times 10^6$

3.3.3. Biomasa fúngica en tripa

La Tabla 25 muestra la cuantificación de la biomasa fúngica en peso seco (gramos de micelio /cm² de tripa) durante la maduración. Se observó que los valores obtenidos en el día 35 para las unidades maduras a 12 °C, resultaron mayores en un orden de magnitud con respecto a los obtenidos para las maduras a 5 °C y respecto a los obtenidos el día de envasado (día 14), demostrando que el hongo se mantiene viable tras el envasado y continúa desarrollándose.

Al comparar los datos obtenidos en el método de recuento en tripa con el de biomasa en peso seco se puede observar una tendencia similar entre ambas técnicas. Esto sugiere que ambas metodologías resultarían adecuadas para realizar el seguimiento del desarrollo fúngico superficial de los quesos. Lessard et al. (2012) obtuvieron resultados similares, con tendencias comparables entre el recuento en placa y la cuantificación de biomasa durante la maduración de un queso

blando inoculado con *P. camemberti* y madurado a 14 °C por 9 días y luego a 4 °C por 22 días, ambas etapas a 90 % h.r.

Tabla 25: Biomasa fúngica de la tripa, en peso seco (g de micelio/cm² de tripa) obtenida durante la maduración de los quesos inoculados

Etap	Día	g micelio/cm ²	
Pre envasado (12 °C)	1	5,7 x 10 ⁻⁵ ± 3,8 x 10 ⁻⁵	
	3	2,1 x 10 ⁻⁵ ± 1,8 x 10 ⁻⁵	
	6	6,3 x 10 ⁻⁵ ± 1,5 x 10 ⁻⁵	
	10	1,1 x 10 ⁻⁴ ± 1,3 x 10 ⁻⁴	
	14	4,6 x 10 ⁻⁴ ± 8,4 x 10 ⁻⁵	
Post envasado (5 °C)	21	5 °C	1,2 x 10 ⁻⁴ ± 2,4 x 10 ⁻⁵
		12 °C	4,4 x 10 ⁻⁴ ± 2,5 x 10 ⁻⁴
	35	5 °C	8,1 x 10 ⁻⁴ ± 2,2 x 10 ⁻⁴
		12 °C	1,1 x 10 ⁻³ ± 3,4 x 10 ⁻⁴

3.4. Análisis de caracterización sensorial

3.4.1. Ensayo de Categorización

La Tabla 26 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de categorización.

El atributo descripto corresponde al queso de la derecha. A modo de ejemplo, en la comparación C14 12 °C vs Q14 12 °C: Más olor a hongo a corteza, se refiere a que el queso Q14 a 12 °C presentó más olor a hongo y a corteza que el queso C14 a 12 °C.

Cuando se comparan quesos inoculados, madurados a distintas temperaturas (filas 5 y 8) no se obtuvo diferencias significativas a los 21 ni a los 35 días de maduración. A nivel sensorial el panel detectó diferencias significativas entre los quesos inoculados y controles a partir del día 14 respecto al atributo olor (filas 1, 2, 3 y 6), mientras que respecto al flavor esto no ocurre hasta el día 35 (filas 6 y 7). Tampoco se obtuvo diferencias significativas en cuanto a la textura entre los controles y los quesos inoculados.

Los quesos controles madurados a 12 °C y 35 días, no fueron analizados por encontrarse contaminados externamente.

Tabla 26: Resultados del ensayo de categorización

Fila	Comparaciones	Olor	Textura	Flavor
1	C14 12°C vs Q14 12°C	2 Más olor a hongo A corteza	4 Menos firme Más húmeda	4 Aceitosa
2	C21 5°C vs Q21 5°C	2 Más olor a hongo A corteza	4 Menos elástico	3,5 Mayor intensidad de aroma Salado
3	C21 12°C vs Q21 12°C	3,5 A hongo	4 Menos firme	4 A corteza A hongo
4	C21 5°C vs C21 12°C	4 A manteca	4 Más firme Más seco	4 Mas salado
5	Q21 5°C vs Q21 12°C	3 Más olor a hongo	3 Más blando Más húmedo	4 Menos salado Menos aroma
6	C35 5°C vs Q35 5°C	2 Mas olor a hongo Leve amoniacal lavandina	4 Más húmedo Menos firme	3 Más salado Mas aroma a hongo
7	C35 5°C vs Q35 12°C	2,5 Más olor a hongo Leve amoniacal	2 Menos firme Más húmeda y más elástica	3 Más aroma a hongo Más ácido Menos salado
8	Q35 5°C vs Q35 12°C	4 Más fuerte	4 Más húmeda Menos firme	4 Mayor intensidad a hongo

(C): quesos controles; (Q) quesos inoculados

3.4.2. Ensayo descriptivo cuantitativo (QDA)

3.4.2.1. Apariencia

Respecto a la apariencia, la Tabla 27 reúne las descripciones obtenidas. En cuanto a la apariencia externa, se observó que en los quesos inoculados, a partir del día 14 de maduración el hongo cubría totalmente la superficie. Además, la corteza presentó un aumento en función del tiempo, conforme aumentaba el proceso de deshidratación para todas las condiciones,

exceptuando los quesos inoculados. El análisis de la apariencia interna señaló que el queso era homogéneo internamente sin ojos biológicos y con muy pocos ojos mecánicos.

Tabla 27: Descriptores obtenidos para la apariencia externa e interna

Muestra	Apariencia externa	Apariencia interna	
		Color	Ojos
C14 12°C	hongos en extremos	Halo oscuro periférico de 3 mm	No
Q14 12°C	Hongos blancos en toda la superficie menos en los extremos.	Halo oscuro	Pequeños mecánicos
C21 5°C	Hongos negros y verdes.	Halo oscuro periférico de 4 mm	No
Q21 5°C	Hongos blancos en toda la superficie	Halo oscuro periférico de 4 mm	No
C21 12°C	Hongos negros y verdes	Halo oscuro periférico de 4 mm	No
Q21 12°C	Hongos blancos en toda la superficie. (mayor cantidad que a 5°C)	Halo oscuro periférico de 4 mm	No
C35 5°C	Superficie seca y agrietada	Halo oscuro periférico de 8 mm	Pequeños mecánicos
Q35 5°C	Emplume parejo.	Halo oscuro periférico de 4 mm	No
Q35 12°C	Emplume parejo.	Halo oscuro periférico de 4 mm	No

(C) controles; (Q) Quesos inoculados

3.4.2.2. Olor y aroma

La Tabla 28 muestra los descriptores de olor y aroma obtenidos. En cuanto a la intensidad del olor, se encontraron diferencias significativas entre los controles y las muestras con hongo a partir del día 14 de maduración. Además de la intensidad, los panelistas manifestaron diferencias respecto al olor. Las muestras con hongo fueron descriptas como “olor a hongo, humedad”. Al día 35 de maduración se percibieron las primeras notas amoniacales siendo más acentuadas a 12 °C que 5 °C, a 12 °C también apareció el descriptor a tierra y a aceite viejo.

A diferencia del olor, no se obtuvieron diferencias significativas para el aroma entre las diferentes condiciones.

Tabla 28: Descriptores obtenidos para el olor y aroma (C: controles; Q: quesos inoculados)

Muestra	Olor	Aroma
C14 12°C	Lácteo fresco	Lácteo fresco- Anti fúngico
Q14 12°C	Hongo-humedad- lavandina	Hongo-corteza- lácteo acidificado
C21 5°C	Manteca- Lácteo acidificado - levadura	Lácteo acidificado- corteza
Q21 5°C	Humedad- hongo- corteza	Humedad- hongo- corteza
C21 12°C	Manteca - Lácteo fresco - levadura	Corteza
Q21 12°C	Humedad-lavandina-corteza	Corteza
C35 5°C	Corteza- a viejo- manteca	Manteca vieja- corteza
Q35 5°C	Hongo – corteza- nota amoniacal	Hongo- Manteca
Q35 12°C	Hongo- amoniacal- tierra	Aceite viejo-amoniacal

3.4.2.3. Perfil sensorial de los quesos obtenidos

En los quesos inoculados, el descriptor *elasticidad*, muy importante en quesos semiduros, resultó ser el que presentó mayor puntuación y, por lo tanto, el que mejor describió a este producto. Al final del estudio se observó que el control perdió elasticidad debido a la pérdida de humedad. Sin embargo, durante todo el estudio la elasticidad del queso se mantuvo con poca variación, siendo un descriptor destacado (Anexo VII A).

Coincidentemente con los resultados fisicoquímicos, no se detectó mucha variación en la humedad, salvo al día 35 de maduración donde el control se percibió más seco y los quesos inoculados más húmedos presentando una diferencia de humedad significativa respecto al control, sin importar la temperatura de maduración. Esto también explicaría por qué no se evidenciaron grandes cambios en la firmeza, salvo al día 35 donde el control se endureció y las muestras con hongo se percibieron más “blandas”.

Se sintió un salado leve y una persistencia en boca del hongo.

El sabor amargo, generalmente asociado a la liberación de péptidos y aminoácidos amargos durante la proteólisis (Gómez de la Cruz, 1996), no fue un descriptor del producto, ya

que recién al día 35 se percibió en forma muy débil y no se encontraron diferencias entre las muestras controles e inoculadas. Esto sugiere que, en el tiempo y condiciones estudiadas, no ocurre una proteólisis significativa en el producto para incrementar el amargor (Figura 51), a pesar de haberse evidenciado un incremento en el índice de maduración como también en los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC y Urea-Page.

En los días 21 y 35 de maduración, los descriptores evaluados permitieron explicar el 93,6 % de la variabilidad total. Las muestras se agruparon en 3 comportamientos bien diferenciados: i) grupo 1: controles del día 35 a 5 °C, ii) grupo 2: controles y quesos inoculados al día 21, a 12 y 5 °C, y iii) grupo 3: controles y quesos inoculados al día 35, a 12 y 5 °C (Figura 52). El grupo 1 presenta un comportamiento muy distante al grupo 2 y 3, definiendo su variabilidad principalmente por tener mayor salado, mayor friabilidad y mayor firmeza. Si bien el grupo 2 y 3 marcan un comportamiento similar, difieren, principalmente en los descriptores de impresión de humedad e intensidad de olor, con valores mayores el día 35.

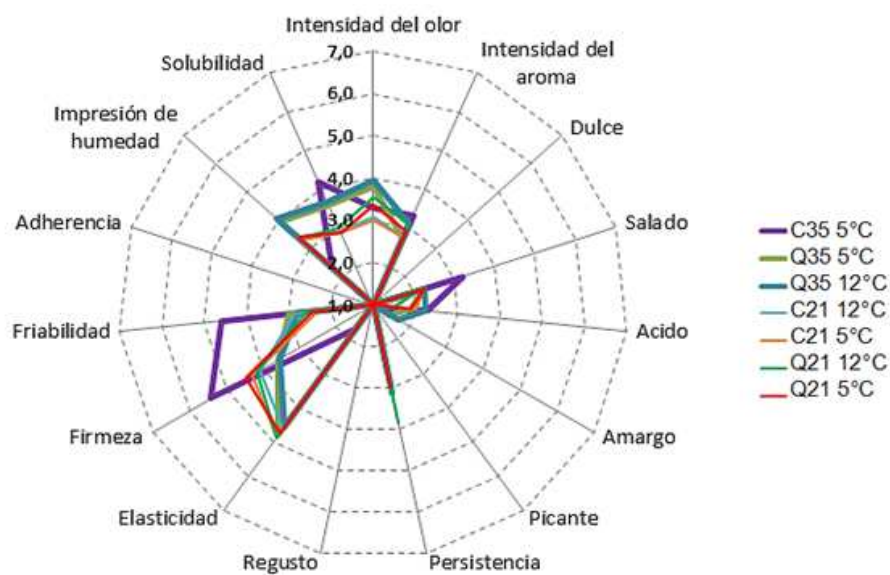


Figura 51: Perfil sensorial de los quesos obtenidos al día 21 y 35 de maduración, a 12 y 5 °C (C: controles; Q: quesos inoculados).

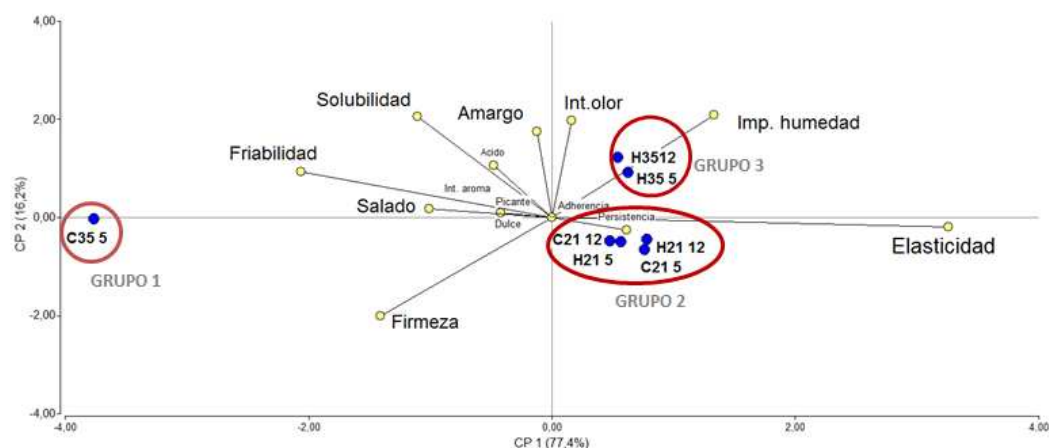


Figura 52: Análisis de componentes principales del perfil sensorial de los quesos obtenidos al día 21 y 35 de maduración a 5°C y 12°C (C: controles; H: quesos inoculados).

4. CONCLUSIONES PARCIALES

A partir del presente Capítulo se pudo concluir que el uso de un envase de polietileno microperforado para cubrir el queso contenido en una bandeja plástica también microperforada, resultó ser exitoso para el enlentecimiento del proceso de deshidratación, sin afectar la viabilidad del hongo ni el aspecto del producto, permitiendo extender la maduración hasta el día 35 y de esta manera prolongar el tiempo de participación del hongo.

Si bien se pudo observar que en la etapa de pre envasado, tanto los controles como los quesos inoculados mostraron perfiles peptídicos muy similares, al día 14 de maduración el panel sensorial detectó diferencias significativas entre ellos respecto al atributo olor y, desde ese día, tanto a 12 °C como a 5 °C, se detectaron valores de nitrógeno soluble a pH 4,6 superiores a los controles, siendo más marcados en el caso de 12 °C. Esto resulta sumamente interesante por evidenciar que el crecimiento superficial de *P. nalgiovense* confiere características distintivas al producto respecto al queso sin emplume.

Se observó que el grado de proteólisis al día 21 de maduración a 12 °C fue comparable con el obtenido al día 35 a 5 °C, lo cual sugiere que se puede alcanzar maduraciones similares trabajando la combinación tiempo – temperatura.

A nivel sensorial, el producto se caracteriza principalmente por ser elástico y con olor a hongo. Por otro lado, al comparar los quesos inoculados a las distintas temperaturas de maduración, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a olor, textura y flavor entre ambas temperaturas de maduración. Al día 35 se percibió un sabor amargo débil, notas amoniacales y a manteca vieja, con mayor acentuación a 12 °C que 5 °C.

Considerando los resultados obtenidos y diversos factores (producción, logística, comercialización) se elige como temperatura de maduración post envasado 5 °C, por representar una temperatura más segura en cuanto a inocuidad alimentaria

CAPÍTULO V

Vida útil sensorial y evaluación de la aceptación por consumidores de los quesos desarrollados



1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En el Capítulo IV se comprobó la eficacia del envasado para disminuir la velocidad de deshidratación del producto y se definió 5 °C como la temperatura de maduración post envasado. Contemplando estas etapas, en el presente capítulo se proponen los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Complementar la caracterización del proceso de maduración mediante la incorporación de otras técnicas analíticas.
- ✓ Estimar la vida útil sensorial del producto.
- ✓ Evaluar la aceptación del producto por parte de los consumidores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Complementación de la caracterización del proceso de maduración por incorporación de metodología analítica.

2.1.1. Elaboración de la masa y obtención de los quesos contenidos en tripa

Se elaboró masa de queso según la receta para queso Tybo en la Planta Piloto del Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea (INTI-Lácteos) procediendo de igual manera que en el Capítulo IV, sección 2.1. La totalidad de los quesos obtenidos se inoculó con una suspensión de conidios de *P. nalgiovense* según lo detallado en el Capítulo III, sección 2.1.4.

2.1.2. Maduración de los quesos contenidos en tripa

Todos los quesos inoculados obtenidos, se maduraron en el Laboratorio de Micología de Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). Para ello se utilizaron dos cámaras acondicionadas y verificadas según lo descripto en el Capítulo IV, sección 2.2.

La maduración tuvo lugar en dos etapas: una pre envasado (hasta el día 14 de maduración), a 12 °C, y una post envasado, a 5 °C (hasta el día 43), ambas a 90 % de h.r. Los quesos se envasaron, según el procedimiento descrito en el Capítulo IV, sección 2.2, al día 14, por presentar un emplume homogéneo que cubría la totalidad de la superficie. Los quesos se maduraron por un total de 43 días.

Se reservaron 4 quesos inoculados envasados y 4 sin envasar para realizar el seguimiento de peso durante todo el proceso de maduración.

2.1.3. Caracterización de los quesos durante su maduración

Para realizar la caracterización de los quesos obtenidos se hizo un seguimiento durante su maduración realizando muestreos a los días 1, 14, 21, 30, 35 y 43.

Con la intención de profundizar en el estudio de los cambios ocasionados debido al proceso de maduración, se implementaron nuevas técnicas analíticas. En todos los muestreos se realizó el seguimiento de algunos de los parámetros fisicoquímicos antes evaluados por ser considerarlos los de mayor significancia para caracterizar el proceso madurativo (pérdida de peso, humedad, perfil peptídico de la fracción insoluble a pH 4,6 por Urea-Page, pH e índice de maduración), microbiológicos (investigación de patógenos e indicadores, recuento de hongos en tripa y cuantificación de biomasa fúngica en tripa) según lo detallado en el Capítulo IV, secciones 2.3.3.2 y 2.3.3.3. Adicionalmente, se realizó la determinación de color, índice de lipólisis y microscopías electrónicas de barrido de la tripa con desarrollo de *P. nalgiovense*.

2.1.3.1. Color

Se evaluó el cambio de color en el tiempo de maduración. Como referencia se consideró el día 1 de maduración. El queso picado fue dispuesto en el dispositivo para muestras en polvo y se realizaron mediciones mediante un colorímetro marca Minolta CR-400 ®, utilizando el Espacio CIE L*a*b*, con Iluminante D65 (luz de día), y una geometría 45°/0°. El análisis de cada muestra se realizó por triplicado.

2.1.3.2. Índice de lipólisis

El grado de lipólisis se determinó en conjunto con el laboratorio de fisicoquímica del INTI-Lácteos, mediante la técnica BDI (Bureau of Dairy Industry) - ISO 1740:2004).

Se colocó 10 g de queso picado en un butirómetro y se mezcló con 20 mL de reactivo BDI (solución acuosa con 3 % de Tritón X-100 y 7 % de tetrafosfato de sodio). La mezcla se incubó a 100 °C por 20 min y se centrifugó para separar la grasa. La grasa se transfirió a un erlenmeyer y se tituló con una solución estándar de hidróxido tetra-n-butylamonio (0,1 mol/L, en isopropanol / metanol (3:1)), usando como indicador azul de timol (0,1 g/L en propanol), bajo flujo de nitrógeno hasta obtener un color amarillo a débilmente verdoso persistente durante 5 s. Como referencia se utilizó ácido palmítico disuelto en grasa láctea (lavada con hidróxido de potasio 0,1 M, enjuagada con agua y centrifugada).

Se calculó la acidez grasa (w_a) en milimoles cada 100 g de grasa, usando la siguiente expresión:

$$w_a = \frac{(V_1 - V_2)C}{m} \times 100$$

Donde,

V_1 : volumen (mL) de la solución estándar hidróxido tetra-n-butylamonio usado en la titulación de la porción de ensayo disuelta.

V_2 : volumen (mL) de la solución estándar hidróxido tetra-n-butylamonio usado en la titulación de del blanco.

C : concentración exacta (mol/L) de la solución estándar de hidróxido tetra-n-butylamonio.

M : masa (g) de la muestra analizada.

Luego, se calculó el índice de lipólisis (ácidos grasos libres), expresado como gramos de ácido oleico cada 100 g de grasa, aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Índice de lipólisis (\%)} = \frac{M_2 \times w_a}{1000}$$

Donde,

w_a : acidez grasa (milimoles cada 100 g de grasa) de la muestra analizada.

M_2 : masa molecular relativa de ácido oleico ($M_2= 282$).

2.1.3.3. Microscopia electrónica de barrido

Con el fin de observar los cambios micromorfológicos de *Penicillium nalgiovense* durante la maduración de los quesos se realizaron microscopias electrónicas de barrido (SEM) del micelio desarrollado sobre las tripas de los mismos. Para ello, se cortaron cuadrados de 1 cm de lado de tripa con desarrollo miceliar obtenidas de quesos muestreados a los 7, 14, 21 y 35 días. Las muestras se colocaron en un tubo eppendorf y se las fijó sumergiéndolas en 1 mL de una solución compuesta por 5 % de ácido acético glacial, 10 % de formaldehído, 35 % de agua destilada y 50 % de etanol 96 % v/v. Luego, fueron sometidas a concentraciones crecientes, por 15 min cada una, de etanol 96 % v/v (50 %, 75 % y 100 %), 15 min por concentración, y finalmente se deshidrató con agregado de acetona (50:50) durante 15 min, hasta llegar a 100 %, por 30 min. Las muestras deshidratadas fueron secadas por punto crítico (E3000, Polaron) empleando CO₂. Las muestras fueron montadas en stubs y se les evaporó oro (300 Å) empleando una evaporadora de metales en plasma de Argón (91000 Model 3, Pelco). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM 35 CF (Tokio, 1983) a un potencial de 10 kV.

2.2. Vida útil sensorial

A partir de los quesos obtenidos en la sección 2.1.1, en los mismos tiempos muestreados para la caracterización (días 14, 21, 30, 35 y 43 de maduración) también se tomaron muestras para realizar un análisis descriptivo cuantitativo (QDA) con el fin de determinar la vida útil sensorial del producto. El mismo estuvo a cargo del equipo sensorial del INTI-Lácteos, según lo detallado en el Capítulo IV, sección 2.3.4.2. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y las medias se compararon utilizando el test de Tukey para determinar diferencias

significativas ($p < 0,05$) usando el software InfoStat, version 2017 (InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

2.3. Evaluación por consumidores

2.3.1. *Obtención de los quesos contenidos en tripa con desarrollo superficial de P. nalgiovense*

Se realizó una nueva producción de quesos según lo descrito en la sección 2.1.1.

La etapa de post envasado de los quesos se extendió por 7 días, por lo que la maduración completa desde el día de elaboración fue de 21 días.

Para establecer el día final de maduración al cual realizar el ensayo de aceptación por consumidores se tuvo en cuenta el resultado obtenido en la estimación de vida útil sensorial (sección 2.2). Con el fin de evaluar al producto en un tiempo intermedio de vida útil, y de forma de poder correlacionar con los resultados anteriores de caracterización, se tomó como día de ensayo el que coincidiera con un punto de muestreo de los ensayos anteriores más próximo a la mitad de la vida útil obtenida en la sección 2.2. Por lo tanto, la maduración de los quesos, que se llevó a cabo según lo indicado en la sección 2.1.2, se extendió hasta el día determinado para realizar el ensayo de aceptación por consumidores.

2.3.2. *Análisis microbiológico y composición proximal del producto*

El día 19 de maduración se tomaron dos unidades representativas de los quesos obtenidos para realizar las determinaciones microbiológicas, según lo indicado en el Capítulo IV, sección 2.3.3.1, de forma de garantizar la inocuidad de las muestras para el ensayo de aceptación por consumidores.

El día 21 de maduración se apartaron dos unidades representativas de los quesos obtenidos, para realizar la composición proximal de los mismos. Para ello, se determinaron los parámetros de materia seca, grasa y proteína (calculada a partir del valor de nitrógeno total utilizando el factor 6,38), según lo detallado en el Capítulo III, sección 2.3.2.4. Adicionalmente

se determinó cenizas, según se describe a continuación. El contenido de carbohidratos se obtuvo por diferencia.

2.3.2.1 Cenizas

El contenido de cenizas se determinó mediante el método AOAC 935.42. Para ello, se secó un crisol en mufla a 550 °C durante 1 h. Se retiró y se enfrió en desecador, luego se pesó. Se pesó dentro del crisol 3 g de queso picado. Se llevó a mufla y se elevó progresivamente la temperatura hasta llegar a los 550 °C. Se calcinó a 550 °C hasta obtener cenizas de un color gris claro o llevar hasta peso constante, luego de enfriar en desecador se pesó.

El contenido de cenizas de las muestras, expresado como porcentaje, se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Cenizas (p/p)} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

Donde,

M_0 : masa (g) de la cápsula.

M_1 : masa (g) de la cápsula y la muestra.

M_2 : masa (g) de la cápsula y la muestra calcinada.

2.3.3. Evaluadores y lugar de ensayo

El ensayo de aceptación por consumidores se realizó teniendo como referencia la Norma ISO 11136:2014. Los ensayos se llevaron a cabo, en paralelo, en el laboratorio de Evaluación Sensorial de INTI-Lácteos y en la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). El laboratorio de INTI-Lácteos hizo la convocatoria por la Intranet del Instituto y realizaron una inscripción por la web con el fin de asignar horarios y organizar la prueba. El análisis sensorial se realizó en cabinas sensoriales que cumplen con los requisitos especificados en la Norma IRAM 20003 y se encuentran informatizadas con el software FIZZ, versión 2.50 a 278 (Biosystemes, Francia)

(Figura 53). Los evaluadores asistieron al laboratorio de análisis sensorial el día y el horario en el cual se inscribieron, y se ubicaron en una de las cabinas asignadas.



Figura 53: Laboratorio de Evaluación Sensorial de INTI-Lácteos. (A): Cabinas sensoriales informatizadas; (B): Grupo de trabajo del Laboratorio de Evaluación Sensorial que coordinaron las tareas de evaluación con consumidores.

En el caso de la UNQ, la invitación se realizó vía mail a todo el Departamento de Ciencia y Tecnología. El análisis sensorial se realizó en una sala acondicionada. En todos los casos, el criterio de selección se basó en que fueran consumidores habituales de quesos y adultos mayores de 18 años.

2.3.3.1. Planilla de evaluación

La encuesta utilizada en este estudio se encuentra en el Anexo VI.

La primera parte del estudio incluyó preguntas para evaluar la aceptabilidad, tanto a nivel global, como de la apariencia externa (pelado y sin pelar), interna, del sabor y de la textura. Para ello se utilizó una escala hedónica verbal de 9 puntos, variando desde el máximo nivel de gusto (“*Me gusta muchísimo*”) al máximo nivel de disgusto (“*Me disgusta muchísimo*”) y cuenta con un valor medio neutro (“*No me gusta ni me disgusta*”), a fin de facilitar al evaluador la localización de un punto de indiferencia. Para analizar los datos obtenidos, se realizó una

conversión de la escala verbal en numérica, asignándole valores consecutivos a cada descripción para cada pregunta. Luego, se determinó el promedio del puntaje para cada uno de dichos valores, se analizaron mediante análisis de varianza y las medias se compararon utilizando el test de Tukey para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) usando el software FIZZ, versión 2.50 a 278 (Biosystemes, Francia).

Luego, se realizó una pregunta *CATA*, en la cual se le permitía al evaluador marcar todo lo que correspondiera para describir al queso mediante una lista de términos preestablecidos (seco, húmedo, blando, duro, atractivo, amargo, salado, ácido, convencional, sabor a hongo, sabor a viejo/rancio, ideal para comer en picadas, sabor fresco, innovador, práctico, elástico y desagradable). Finalmente se preguntó por la intención de compra, utilizando una escala de 5 puntos, variando desde la máxima intención de compra (“Definitivamente la compraría”) al mínimo nivel de intención de compra (“Definitivamente no lo compraría”) con un valor medio neutro (Quizás si, quizás no la compraría”).

Una vez finalizada la evaluación de las muestras, se les pidió completar un formulario con sus datos personales, hábitos de consumo y de compra. Se les preguntó edad, sexo, frecuencia de consumo de queso, variedades de queso que consume y qué tiene en cuenta al momento de elegir un queso.

2.3.3.2. Ejecución del ensayo

Los quesos a ser evaluados fueron atemperados a 15 °C durante 1 h.

Luego de haberse acomodado el consumidor en su puesto, se le mostró un queso entero con la tripa y otro pelado para realizar las primeras preguntas sobre aceptabilidad. Asimismo, se le entregó una rodaja de queso pelado, de 15 mm de espesor, para degustar y continuar respondiendo la encuesta. En el caso del INTI, las respuestas fueron ingresadas directamente por los evaluadores en el software FIZZ, mientras que en la UNQ la encuesta fue completada manualmente y luego se cargaron los datos a dicho software.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Complementación de la caracterización del proceso de maduración por incorporación de metodología analítica.

3.1.1. Quesos obtenidos

Se obtuvo un total de 49 quesos (5,8 kg) con un peso promedio por unidad de 118,4 g. Todos los quesos se maduraron durante 43 días en condiciones controladas. Se verificó que la limpieza de las cámaras resultó eficaz, obteniendo en todos los casos un recuento de hongos menor a 1 UFC/cm²/15 min.

Durante la primera etapa de maduración, pre envasado (hasta el día 14), las condiciones de maduración se mantuvieron dentro de las propuestas, ya que se registró un promedio de $12,7 \pm 3,2$ °C y $91,5 \pm 9,1$ % h.r. En la segunda etapa de maduración, post envasado (desde el día 14), al igual que lo sucedido en el ensayo del Capítulo IV, si bien la temperatura de las cámaras se mantuvo dentro de lo propuesto, la humedad relativa se mantuvo por debajo de lo deseado, obteniendo un promedio de $5,2 \pm 0,6$ °C y $84,9 \pm 2,9$ % h.r.

Coincidentemente con el ensayo del capítulo IV, el crecimiento de *P. nalgiovense* sobre la superficie de la tripa comenzó a observarse a partir del día 6 de maduración, obteniéndose un emplume homogéneo, sin contaminaciones, en toda la superficie de los quesos, a partir del día 14.

La Figura 54 muestra imágenes del aspecto externo e interno de los quesos obtenidos en los diferentes muestreos realizados. Al igual que en el Capítulo IV puede observarse que se obtuvo una masa uniforme y sin ojos mecánicos ni biológicos.

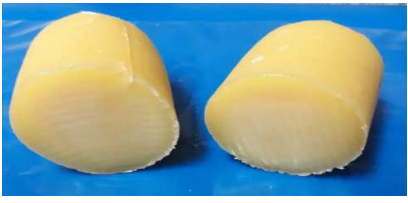
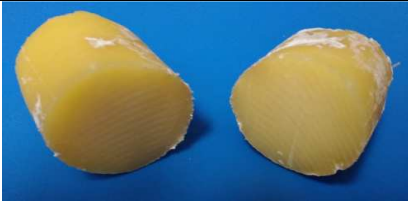
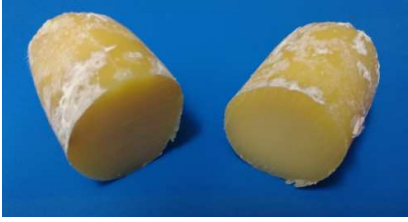
Muestreo		Apariencia Externa	Apariencia Interna
ETAPA PRE ENVASADO	Día 1		
	Día 14		
ETAPA POST ENVASADO	Día 22		
	Día 30		
	Día 36		
	Día 43		

Figura 54: Aspecto externo e interno de los quesos obtenidos en los distintos muestreos durante los 43 días de maduración

3.1.2. Evolución de las variables fisicoquímicas durante la maduración

3.1.2.1. Pérdida de peso

La Figura 55 muestra la evolución del porcentaje promedio de la pérdida de peso referida al peso inicial. Luego del día 14, día de envasado, se observó un descenso de la velocidad de deshidratación tanto para los controles de pérdida de peso sin envasar como para los envasados. Como puede observarse los controles sin envasar presentaron una mayor velocidad de deshidratación que los envasados, siendo ésta de $0,29 \pm 0,01$ g/día y $0,12 \pm 0,01$ g/día, respectivamente. Estos resultados ratifican lo obtenido en el Capítulo IV, señalando que el envasado resulta efectivo para enlentecer la deshidratación.

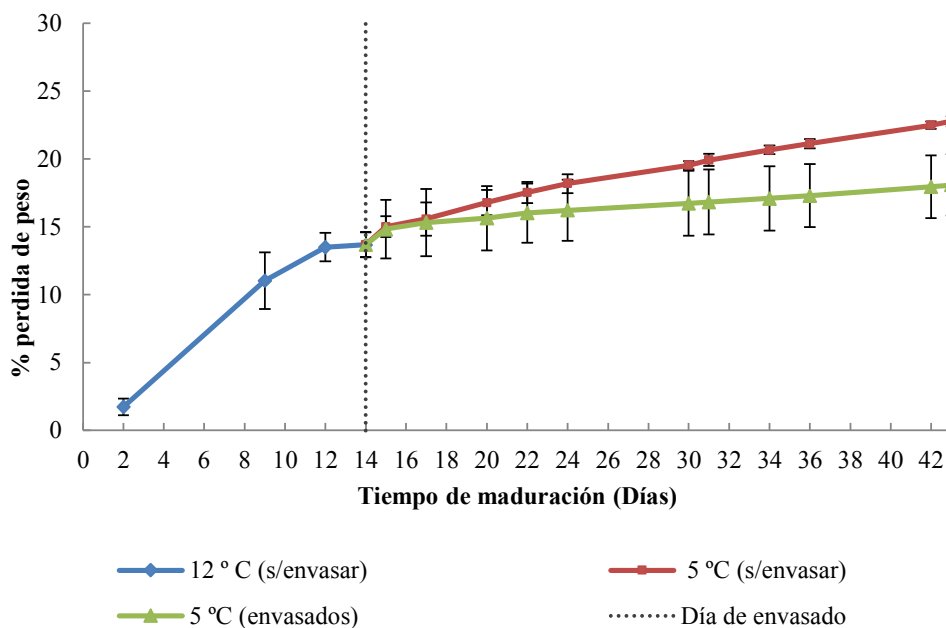


Figura 55: Evolución del porcentaje de pérdida de peso durante la maduración de los quesos, comparando su comportamiento a las temperaturas de maduración post envasado de 12 °C y 5 °C, en su condición envasados y sin envasar.

3.1.2.2. Perfil peptídico por electroforesis (Urea-PAGE)

Coincidentemente con lo observado en el Capítulo IV, recién a partir del día 35 (Figuras 56 (6) y 57 (7)) comenzó a evidenciarse la aparición de nuevas bandas por encima y debajo de las bandas principales de α y β caseínas. Esto sugiere una degradación de las α y β caseínas asociada a un aumento de la concentración de γ -caseína y posiblemente de fragmentos de la α_1 . Este comportamiento se vio acentuado el día 43 con una mayor intensidad de las nuevas bandas.

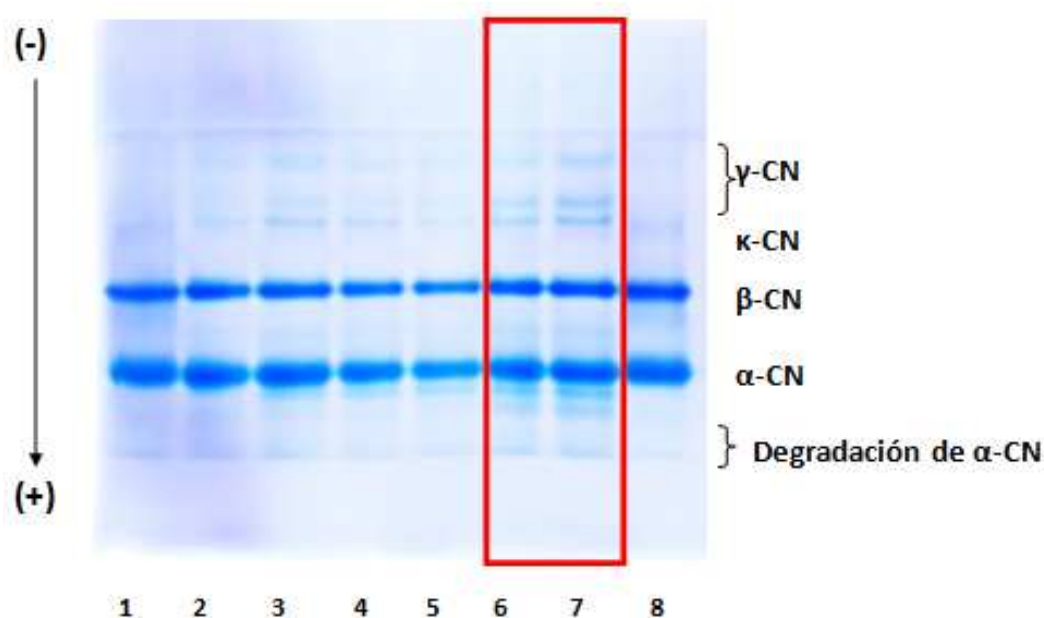


Figura 56: Electrofotograma obtenido por análisis con Urea-PAGE de las fracciones proteicas insolubles a pH 4,6 (1) LPC, Leche en Polvo Control; (2) día 1; (3) día 14; (4) día 21; (5) día 30; (6) día 35; (7) día 43; (8) LPC, Leche en Polvo Control.

Los espectros obtenidos del análisis de los geles con el procesador de imágenes ImageJ muestran que los picos iniciales de α y β caseína se van deformando conforme aparecen nuevos picos de menor tamaño (señalados con flecha) asociados a las nuevas bandas observadas en el gel. A medida que avanza el tiempo de maduración, dichos picos se definen y se diferencian mejor mientras que con los picos principales ocurre lo contrario (Figura 57).

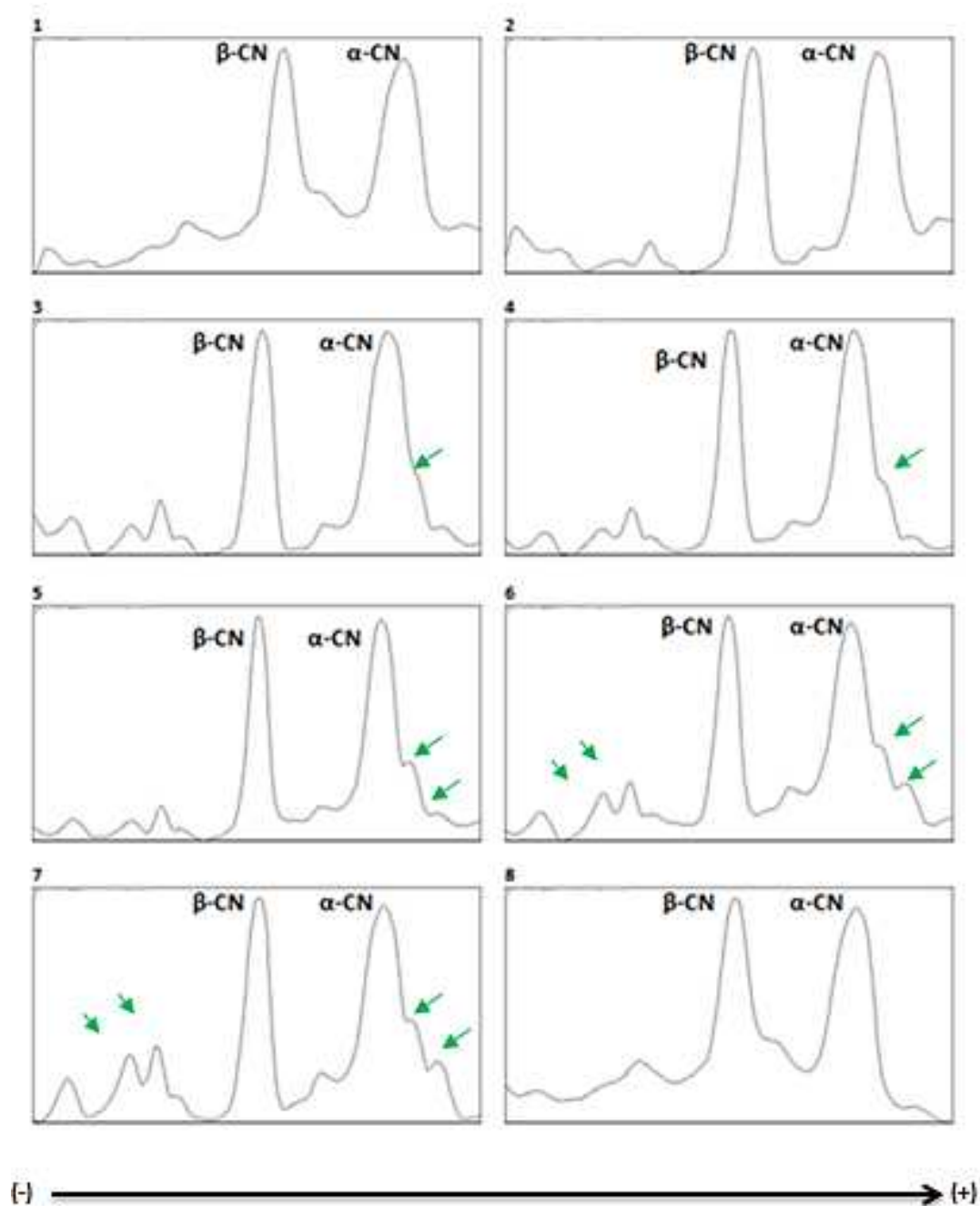


Figura 57: Perfil obtenido por Urea-PAGE de las fracciones proteicas insolubles a pH 4,6 analizadas por el procesador de imágenes ImageJ: (1) LPC, Leche en Polvo Control; (2) día 1; (3) día 14; (4) día 21; (5) día 30; (6) día 35; (7) día 43; (8) LPC, Leche en Polvo Control.

3.1.2.3. Color

La Tabla 29 muestra los cambios de color ocurridos en los quesos durante su maduración relacionados con los parámetros de medida de luminosidad (L^*), intensidad de color rojo (a^*) y

color amarillo (b^*). Se puede observar que al aumentar el tiempo de maduración disminuye L^* mientras que a^* y b^* aumentan, lo cual concuerda con resultados obtenidos por El-Nimr et al. (2010) quienes evaluaron los cambios de color durante la maduración de queso Gouda. La luminosidad se correlacionó de forma negativa con la deshidratación del producto ya se obtuvo menor claridad a menor contenido de humedad, resultado comparable con lo obtenido por Alvarez et al. (2007) al evaluar quesos de cabra. También es de destacar que la etapa de post maduración coincide con el uso de temperaturas de refrigeración, lo cual contribuye con la pérdida de luminosidad (Johnson, 1999). La mayor tonalidad roja y amarilla que se da con el paso de la maduración podría corresponderse a la difusión a través de la tripa de pigmentos producidos por el hongo superficial, siendo en este caso *P. nalgiovense* distinguido por la síntesis de nalgiovensina y nalgiofaxina de coloración naranja y amarilla, respectivamente.

Tabla 29: Seguimiento del color (CIELab) durante la maduración de los quesos

Etapa	Día	L^*	a^*	b^*	ΔE
Pre envasado (12 °C)	1	73,3	-4,90	23,24	0
	14	66,60 $\pm$ 0,07	-4,62 $\pm$ 0,04	21,15 $\pm$ 0,20	7,02 $\pm$ 0,13
Post envasado (5 °C)	21	66,19 $\pm$ 0,47	-4,57 $\pm$ 0,04	22,30 $\pm$ 0,16	7,13 $\pm$ 0,06
	30	62,08 $\pm$ 0,06	-4,48 $\pm$ 0,11	22,67 $\pm$ 0,15	11,27 $\pm$ 0,02
	35	60,86 $\pm$ 0,11	-4,36 $\pm$ 0,02	22,89 $\pm$ 0,05	12,46 $\pm$ 0,11
	43	60,08 $\pm$ 0,06	-4,28 $\pm$ 0,01	22,90 $\pm$ 0,02	13,24 $\pm$ 0,06

Los resultados demostraron que la diferencia de color (ΔE) aumentó con el avance del tiempo de maduración. A partir del día 14 los quesos presentaron un valor de diferencia de color superior a 6 lo que significa que el cambio fue considerable respecto a las muestras al día 1 considerando la escala de Ramirez Navas et al. (2010) (Introducción, Tabla 4). Si bien se observó que la diferencia de color ocurrió aún en la etapa de post envasado, dicho fenómeno fue menos marcado obteniendo en la etapa pre envasado de 14 días un cambio de 7,02 puntos comparado con 6,22 en 29 días post envasado. La menor diferencia de color que se produce posterior al envasado, se correspondería con la menor pérdida de peso que se da al implementar el uso de un

envase microperforado, sin embargo los cambios ligeros ocurridos demuestran que ocurren cambios de color ocasionados más allá de los debidos por la deshidratación. Entre estos cambios, cabe mencionar el producido por la proteólisis que disminuye la luminosidad por transformar las proteínas en un estado más soluble, y el dominio del color del queso por compuestos hidrosolubles como la riboflavina que intensifica hacia el color verde y amarillo (Johnson, 1999).

3.1.2.4. Índice de lipólisis

La Tabla 30 contiene los resultados correspondientes a la determinación del índice de lipólisis para los muestreos de los días 1, 14, 21, 35 y 43.

Tabla 30: Índice de lipólisis, expresado como g ácido oleico/100 g grasa, obtenido en los quesos a los días 1, 14, 21, 35 y 43 de maduración.

Etapas	Día	Índice de lipólisis
Pre envasado (12 °C)	1	0,26 ± 0,0033
	14	0,33 ± 0,0066
	21	0,60 ± 0,0022
Post envasado (5 °C)	35	0,65 ± 0,0047
	43	0,86 ± 0,0074

A partir de dichos resultados se pudo comprobar la capacidad lipolítica de la cepa C5 de *P. nalgiovense* en quesos, en concordancia con lo evaluado anteriormente (Capítulo I, sección 3.3) en medio sintético.

Se observó un aumento de la lipólisis a medida que avanza la maduración, por lo que pudo verificarse que la técnica analítica utilizada resultó ser efectiva para evaluar la evolución de dicha actividad enzimática, en concordancia con otros autores (Salji y Kroger, 1981; Noura et al., 2011) que también han analizado el grado de lipólisis durante la maduración de quesos aplicando dicha metodología.

A pesar de que durante los primeros 14 días no se observó una actividad lipolítica significativa, a partir del día 14 esto se revirtió llegando el día 21 a triplicar el índice del primer día.

Si bien los agentes lipolíticos pueden provenir de las bacterias lácticas no fermento como también de las bacterias iniciadoras, esta lipólisis suele ser baja respecto a la aportada por los hongos en quesos con maduración fúngica, especialmente con *Penicillium* sp. que es el género fúngico considerado con mayor poder lipolítico en quesos (Cerning et al., 1987; McSweeney, 2004; Fernández-Bodega et al., 2009; Lessard, 2012). La cepa C5 utilizada para el desarrollo fúngico superficial de los quesos elaborados ha demostrado su perfil lipolítico en su caracterización (Tabla 7, Capítulo I), por lo que es de suponer que la lipólisis detectada es, en gran parte, debido a la participación del hongo.

Al comparar estos resultados con los del índice de maduración (Tabla 31) se puede apreciar que la actividad lipolítica tiene lugar con mayor velocidad, ya que el índice de maduración se mantiene casi constante hasta el día 21 y luego se incrementa muy poco hasta el final del tiempo de maduración (día 43).

3.1.2.5. Humedad, pH e índice de maduración

La Tabla 31 reúne la evolución de los valores promedio de los demás parámetros fisicoquímicos evaluados. Como puede observarse, la humedad final alcanzada fue de $34,88 \pm 0,44$ % lo que corresponde, según la clasificación establecida en el CAA (Introducción, Tabla 1), a un queso de baja humedad (pasta dura). Al igual que en el Capítulo IV, el pH se mantuvo casi constante y el índice de maduración, aunque no fue considerable, sufrió un aumento gradual potenciándose al final del tiempo de maduración (día 43).

Si bien el índice de maduración evidencia que hay actividad proteolítica, que a su vez se verificó por el perfil peptídico obtenido (sección 3.1.2.2), la misma no fue suficiente para producir un cambio en el pH ni ser percibido sensorialmente (sección 3.2.3).

Tabla 31: Valores promedio y desviaciones estándar de los parámetros fisicoquímicos Humedad (%), pH e índice de maduración.

Etapas	Día	Humedad (g/100g)	pH	Índice de maduración
Pre envasado (12 °C)	1	43,13 ± 0,19	5,3 ± 0	6,95 ± 0,39
	4	35,28 ± 0,03	5,4 ± 0	6,92 ± 0,25
Post envasado (5 °C)	21	35,92 ± 0,33	5,5 ± 0,1	6,96 ± 0,23
	30	34,64 ± 0,33	5,5 ± 0,1	7,11 ± 0,27
	35	35,29 ± 0,10	5,5 ± 0,1	7,28 ± 0,26
	43	34,88 ± 0,44	5,5 ± 0,1	7,44 ± 0,34

ES: extracto seco

3.1.3. Evolución de las variables microbiológicas durante la maduración

3.1.3.1. Investigación de patógenos y recuento de microorganismos indicadores

En todos los tiempos muestreados, excepto el día 1 (pasta blanda), los recuentos obtenidos fueron contrastados con los valores establecidos en el CAA para quesos de baja humedad (Introducción, Tabla 2). En todos los muestreos donde se analizó patógenos, se obtuvo ausencia de *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes* en 25 g. Los recuentos obtenidos a lo largo del tiempo de maduración para *Estafilococos* coagulasa positiva, coliformes a 30 °C y 45 °C se encontraron por debajo del límite establecido en el CAA.

Además los recuentos obtenidos de anaerobios sulfitos reductores a lo largo del tiempo de maduración se encontraron por debajo de 10 UFC/g (Tabla 32).

Tabla 32: Resultados de recuento de indicadores e investigación de patógenos obtenidos en los quesos inoculados, en los diferentes tiempos de maduración.

Día	Coliformes 30 °C (UFC/g)	Coliformes 45 °C (UFC/g)	Estafilococos coag+ (UFC/g)	Anaerobios sulfito red (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp en 25 g	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> en 25 g
1	<10 ± 0	<10 ± 0	<100 ± 0	<10 ± 0	Ausencia	Ausencia
14	<10 ± 0	<10 ± 0	<100 ± 0	<10 ± 0	ND	ND
21	1,5x10 ² ± 7,7x10 ¹	<10 ± 0	<100 ± 0	<10 ± 0	ND	ND
30	<10 ± 0	<10 ± 0	<100 ± 0	<10 ± 0	ND	ND
35	<10 ± 0	<10 ± 0	<100 ± 0	<10 ± 0	ND	ND
43	<10 ± 0	<10 ± 0	<100 ± 0	<10 ± 0	ND	ND

NOTA: (ND) No Determinado

3.1.3.2. Recuento de hongos en tripa

La Tabla 33 expone el recuento de hongos obtenido sobre la tripa para los distintos días de maduración. Los mismos fueron identificados morfológicamente como *Penicillium nalgiovense*. Como puede observarse, luego del envasado los recuentos se mantuvieron en un mismo orden (10⁷ UFC/cm²) hasta el día 43 donde se observó un leve descenso de los mismos, demostrando que, en las condiciones estudiadas, el hongo se mantiene viable dentro del envase, ratificando lo observado en el Capítulo IV y en concordancia con las micrografías obtenidos de *P. nalgiovense* donde la micromorforfología del hongo se conserva aún en condiciones de envasado y de refrigeración.

Tabla 33: Recuento de *P. nalgiovense* durante la maduración de los quesos inoculados

Etapas	Día	<i>P. nalgiovense</i> (UFC/cm ²)
Pre envasado (12 °C)	1	<25 ± 0
	14	2,6 x 10 ⁶ ± 1,1 x 10 ⁶
Post envasado (5 °C)	21	1,7 x 10 ⁷ ± 6,4 x 10 ⁶
	30	3,5 x 10 ⁷ ± 1,7 x 10 ⁷
	35	2,2 x 10 ⁷ ± 6,0 x 10 ⁶
	43	2,0 x 10 ⁷ ± 3,1 x 10 ⁶

3.1.3.3. Biomasa fúngica

La Tabla 34 muestra la cuantificación de la biomasa fúngica en peso seco (gramos de micelio /cm² de tripa) durante la maduración. Como puede observarse, luego del envasado los valores se mantienen en el mismo orden (10⁻⁴ g de micelio /cm² de tripa) que en el día de envasado. Los resultados obtenidos son comparables con los obtenidos en el Capítulo IV. Asimismo, estos resultados resultan comparables con el comportamiento obtenido con el recuento de *P. nalgiovense* obtenido en la sección 3.1.3.2 y en relación a la conservación de la estructura del hongo observada por los micrografías electrónicas de barrido. confirmar dependiendo que fotos dejemos

Tabla 34: Biomasa fúngica (g micelio/cm²) obtenida durante la maduración de los quesos inoculados

Etapas	Día	g micelio/cm²
Pre envasado (12 °C)	1	$3,3 \times 10^{-5} \pm 2,5 \times 10^{-6}$
	14	$2,2 \times 10^{-4} \pm 8,6 \times 10^{-5}$
Post envasado (5 °C)	21	$3,2 \times 10^{-4} \pm 9,6 \times 10^{-5}$
	30	$2,6 \times 10^{-4} \pm 8,2 \times 10^{-5}$
	35	$3,6 \times 10^{-4} \pm 6,6 \times 10^{-5}$
	43	$2,2 \times 10^{-4} \pm 4,0 \times 10^{-5}$

3.1.3.4. Microscopías electrónicas de barrido

La Figura 58 muestra las micrografías electrónicas de barrido obtenidas de muestras de *P. nalgiovense* desarrollado sobre la tripa de los quesos a los días 7, 14, 21 y 35 de maduración. En las mismas se distingue la micromorfología típica de *Penicillium nalgiovense*, con hifas de paredes lisas y estructuras terminales ramificadas, terverticiladas, en forma de pincel y conidios esféricos o subesféricos, de aproximadamente 3 µm de diámetro. Puede apreciarse que al día 7, si bien los conidios y conidióforos se encuentran conservados, las hifas evidencian un aspecto que sugiere deshidratación, lo que se acentúa con el progreso de la maduración. El buen estado de conservación de los conidios, aún en condiciones de envasado (días 21 y 35), se fundamenta en su alta resistencia a condiciones ambientales desfavorables debido a su pared celular y a la

acumulación de solutos protectores compatibles en su citoplasma ante un estrés hídrico (azúcares, polioles y aminoácidos) que le confieren resistencia y reservas energéticas sin interferir con la función celular (Van Long et al., 2017).

La alta humedad de la cámara de maduración sería suficiente para lograr el desarrollo superficial del hongo, sin embargo la baja humedad inicial del producto podría estar limitando su crecimiento en el tiempo. Las hifas cumplen funciones de nutrición y crecimiento mediante la secreción de enzimas que digieren la materia orgánica antes de ingerirla y luego la almacenan en forma de glucógeno (Chiericatti, 2013), por lo que el estado deteriorado de las hifas podría impactar negativamente en la nutrición del hongo y este podría ser el motivo por el cual no se obtiene un resultado en aumento de la biomasa al progresar la maduración (sección 3.1.3.3). Sin embargo, el hecho de que los conidios mantuvieron su forma y aspecto del día 7, turgentes y conservados, en los cuatro días evaluados, podría ser la razón por lo cual esos valores no disminuyen sino que se mantienen estables (en el orden de 10^7 UFC/cm² de tripa) hasta el final del tiempo de maduración (día 43) (sección 3.1.3.2).

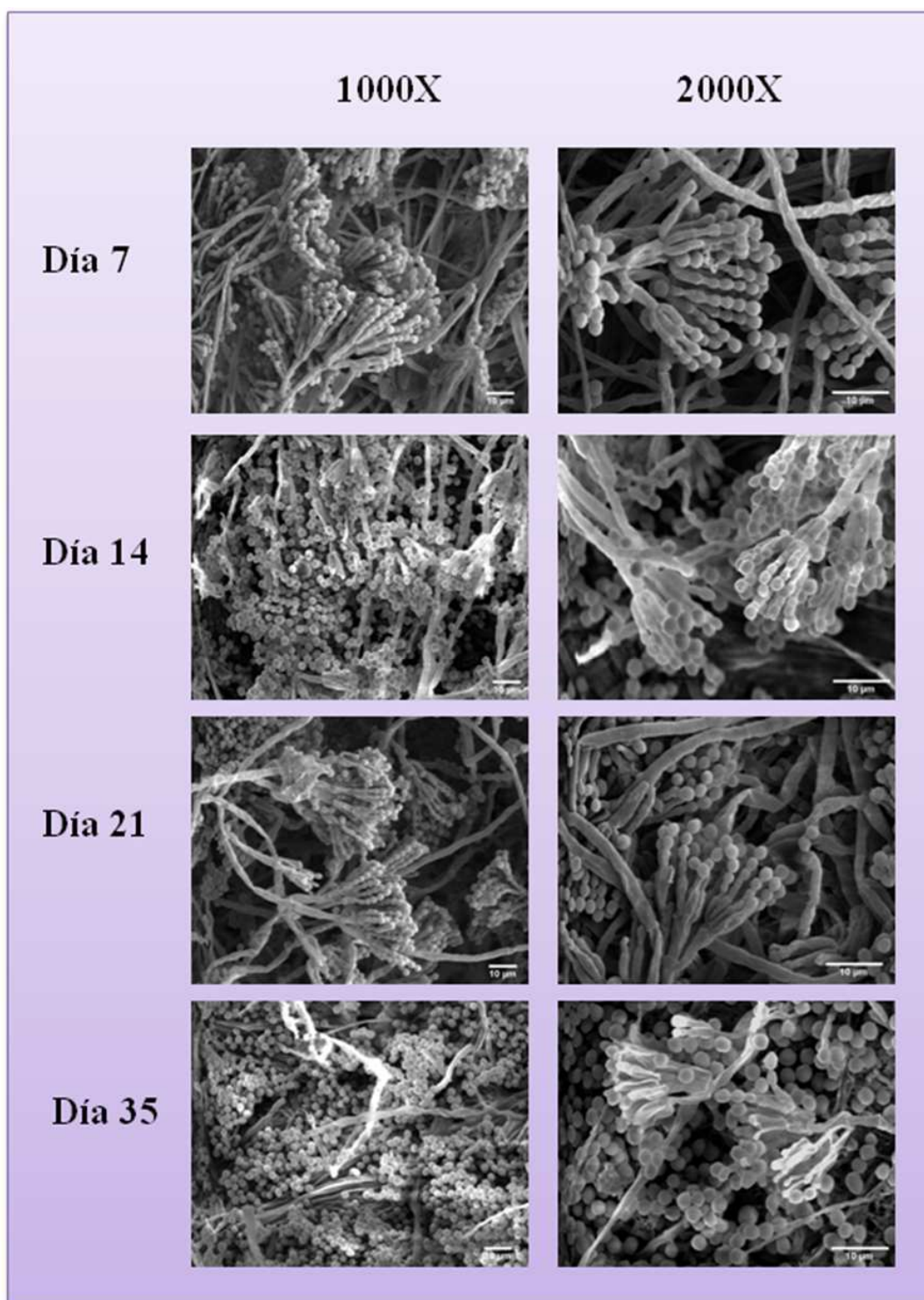


Figura 58: Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de *P. nalgiovense* desarrollado sobre las tripas de los quesos, a los 7, 14, 21 y 35 días de maduración, obtenidas con una magnificación de 1000X y 2000X.

3.2. Vida útil sensorial

En todos los muestreos realizados a partir del día 14 (días 14, 21, 30, 35 y 43 de maduración) se llevó a cabo un QDA con el fin de determinar la vida útil sensorial del producto. A continuación se detallan los atributos evaluados.

3.2.1. Apariencia

La Tabla 35 expone los descriptores obtenidos para la apariencia. En cuanto a la apariencia externa se observó un desarrollo homogéneo del hongo sobre la tripa a partir del día 14. La forma cilíndrica se mantuvo constante durante todo el tiempo de maduración evaluado. En los quesos enteros sin tripa, se observó un color amarillo homogéneo. La apariencia interna no presentó cambios significativos en el tiempo. En todos los muestreos se señaló que el queso era homogéneo internamente, sin ojos ni grietas, presentando un color amarillo no homogéneo con un halo oscuro periférico. Con el transcurso del tiempo de maduración se observó oscurecimiento e incremento del halo, alcanzando un espesor de 5-10 mm el día 30, manteniéndose hasta el final del tiempo de maduración estudiado (día 43). Estos fenómenos se relacionan con la pérdida de humedad durante la maduración.

Tabla 35: Descriptores obtenidos para la apariencia externa e interna.

Día	Apariencia externa		Apariencia interna	
	Con tripa	Sin tripa	Color	Homogeneidad de la pasta
14	Desarrollo del hongo homogéneo	Color amarillo homogéneo	Amarillo claro; halo oscuro periférico de 5 mm	Homogénea sin grietas ni ojos
21	Desarrollo del hongo homogéneo	Color amarillo homogéneo	Halo más oscuro y difuso (5 mm), amarillo no homogéneo	Homogénea sin grietas ni ojos
30	Desarrollo del hongo homogéneo	Color amarillo homogéneo	Halo más oscuro y difuso (5-10 mm), amarillo no homogéneo	Homogénea sin grietas ni ojos
35	Desarrollo del hongo homogéneo	Color amarillo homogéneo	Halo más oscuro y difuso (5-10 mm), amarillo no homogéneo	Homogénea sin grietas ni ojos
43	Desarrollo del hongo homogéneo	Color amarillo homogéneo; algunas grietas; masa seca	Halo más oscuro y difuso (5-10 mm), amarillo no homogéneo	Homogénea sin grietas ni ojos

3.2.2. Aroma

La tabla 36 muestra los descriptores de aroma obtenidos. El aroma a corteza y hongo apareció como un descriptor característico del queso en todos los tiempos evaluados. El aroma a manteca vieja comenzó a manifestarse al día 35, coincidentemente con el Capítulo IV, y se mantuvo hasta el día 43.

Tabla 36: Descriptores obtenidos para el aroma

Etap	Día	Aroma
Pre envasado (12 °C)	14	Corteza - Hongo - Lácteo fresco
	21	Corteza - Hongo - Lavandina
Post envasado (5 °C)	30	Corteza - Hongo - Lavandina
	35	Corteza - Hongo - Manteca vieja
	43	Corteza - Hongo - Manteca vieja

3.2.3. Perfil sensorial de los quesos obtenidos

Los productos presentaron diferencias significativas en intensidad de olor, elasticidad, firmeza, friabilidad y salado (Anexo VII B). La elasticidad disminuyó significativamente desde el día 35, mientras que la firmeza aumentó significativamente desde el día 21 y luego permaneció sin cambios hasta el final del tiempo estudiado (día 43). Las diferencias en intensidad de olor, elasticidad, y friabilidad no presentaron una tendencia marcada en el tiempo.

El panel sensorial concluyó que el queso comienza a perder calidad sensorial a partir del día 35 por apreciar notas de manteca vieja, lo cual indicaría que durante la maduración ocurren procesos de degradación de la materia grasa del producto que predominan frente a la proteólisis. Estos resultados son concordantes con los fisicoquímicos en los cuales se evidencia mayor variación entre los tiempos de maduración con el índice de lipólisis que con el índice de maduración y el perfil de fracciones proteicas insolubles a pH 4,6, siendo aún más acentuada la diferencia en los tiempos finales donde el panel sensorial pudo percibirlo.

Además, se señaló como punto óptimo el día 21 de maduración (Figura 59A), resaltando los descriptores elasticidad y firmeza, al igual que en la segunda producción para el mismo tiempo de madurado. Al igual que en Capítulo IV, el sabor amargo no fue un descriptor

del producto. Esto sugiere que, en el tiempo y condiciones estudiadas, no ocurre una proteólisis significativa en el producto.

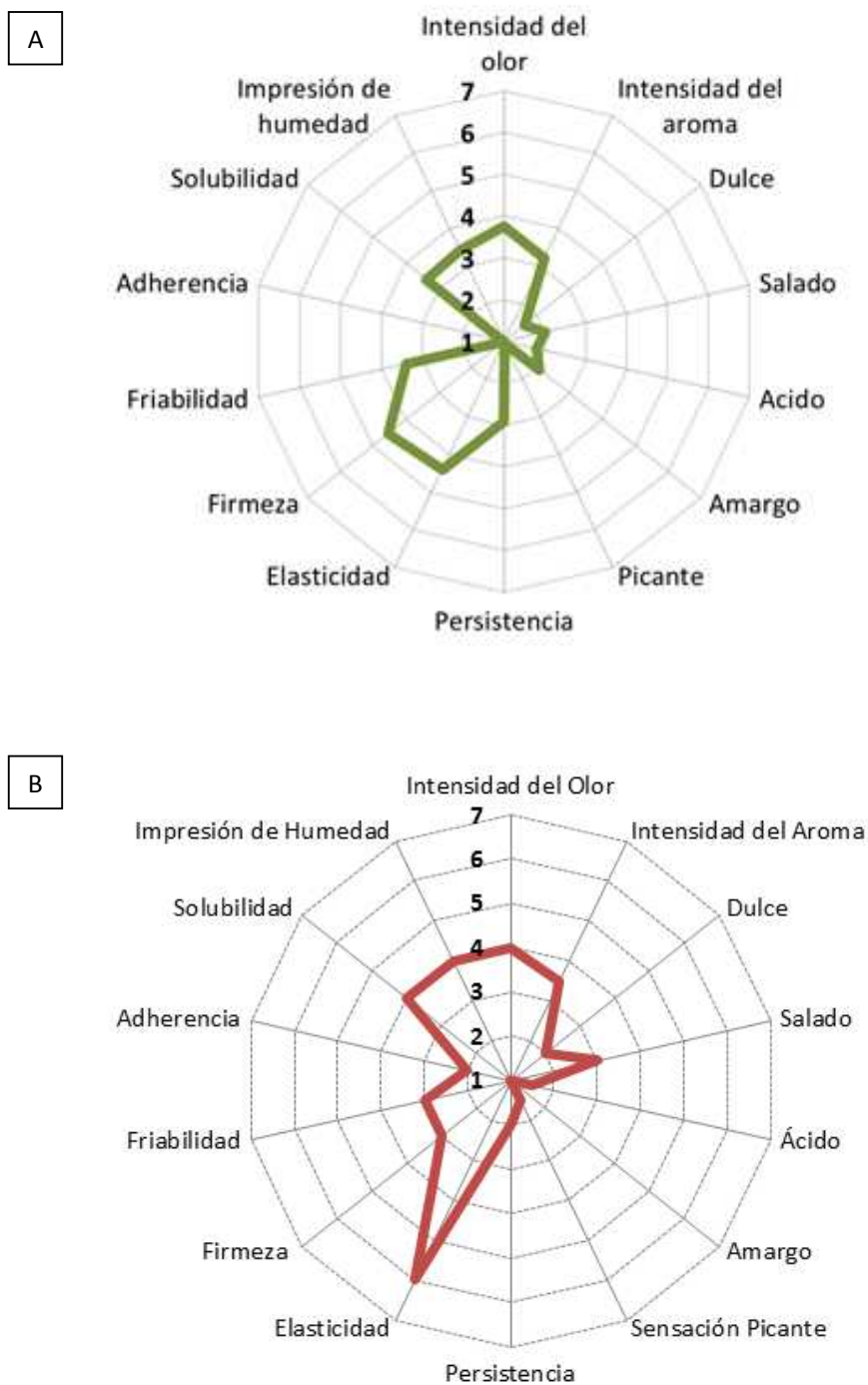


Figura 59: Perfil sensorial obtenido con (A) queso contenido en tripa con desarrollo superficial de *P. nalgiovense* madurado hasta el día 21 y (B) un queso Tybo

Al comparar el perfil sensorial del queso desarrollado (Figura 59 A) con el del queso Tybo (Fuente: INTI-Lácteos) (Figura 59 B) se puede apreciar que tienen un perfil similar para los descriptores: dulce, intensidad de aroma y de olor, impresión de humedad, solubilidad, acidez, friabilidad y adherencia. Si bien el queso desarrollado se distingue por su elasticidad, es menor a un queso Tybo. Por otro lado, el queso desarrollado se diferencia significativamente respecto a los descriptores más acentuados de firmeza, amargor, persistencia y sensación picante, los tres últimos atribuibles a la contribución proteolítica del hongo. Además de la elasticidad, en el queso Tybo se percibe más salado, esto podría deberse a que la tripa actúa como barrera no garantizando una absorción completa y homogénea.

A partir de los resultados obtenidos se propone una vida útil de 21 días que se extiende desde que se logra la cobertura total de la superficie de los quesos por parte de *P.nalgiovense* y por lo tanto se envasa (día 14) hasta el día 35 de maduración donde se comienzan a percibir caracteres indeseables en los quesos como el aroma a manteca vieja.

3.3. Aceptación por consumidores

3.3.1. Obtención de los quesos contenidos en tripa con desarrollo superficial de P. nalgiovense

Se obtuvo un total de 30 quesos (3,5 kg) con un peso promedio por unidad de 116 g. La maduración se realizó en condiciones de humedad y temperatura controladas y se extendió hasta el día 21, por ser el día de muestreo antes utilizada más cercano al día 24 que es el punto medio de la vida útil determinada en la sección 3.2. La limpieza de las cámaras resultó eficaz, obteniendo en todos los casos un recuento de hongos menor a 1 UFC/cm²/15 min. Coincidentemente con los ensayos anteriores, a partir del día 14 se obtuvo un emplume homogéneo y sin contaminaciones en toda la superficie de los quesos.

3.3.2. Análisis microbiológico y Composición proximal del producto

El análisis microbiológico de los quesos, al día 19, garantizó su aptitud para el consumo por cumplir con los requisitos del CAA. Se obtuvo ausencia de *Salmonella sp.* y de *Listeria monocytogenes* en 25 g, < 100 UFC/g para *Estafilococos* coagulasa positiva, y < 10 UFC/g para coliformes a 30 °C y 45 °C y para anaerobios sulfitos reductores.

En la Tabla 37 se describe la composición proximal obtenida para los quesos contenidos en tripa con desarrollo superficial de *P. nalgiovense*, al día 21 de maduración. Por cálculo teórico de diferencia porcentual, no se determinó presencia de carbohidratos en su composición.

Tabla 37: Composición proximal (g /100 g), en base seca del queso contenido en tripa con desarrollo superficial de *P. nalgiovense*, al día 21 de maduración

Grasa (g /100)	52,51 ± 0,63
Proteína (g /100)	41,85 ± 0,54
Cenizas (g /100)	5,89 ± 0,33
Carbohidratos (g /100)	< 1

Al realizar una comparación del queso desarrollado respecto a diversas marcas existentes en el mercado de queso Tybo, la proporción de proteínas y carbohidratos se mantiene dentro de la media, mientras que el de grasa y materia seca es mayor (Tabla 38).

Tabla 38: Comparación de la composición proximal (g / 100 g queso), referidos en base húmeda de diversos quesos Tybo ofertados en el mercado.

	Queso en desarrollo	Marca 1	Marca 2	Marca 3	Marca 4	Marca 5	Promedio
Grasa (g/100 g)	34,56	23,33	27,00	30,0	27,0	24,0	27,65 ± 4,15
Proteínas (g/100 g)	27,68	25,33	26,00	33,33	27,0	29,0	28,06 ± 2,89
Carbohidratos (g/100 g)	<1	3,33	0	3,33	0	0	1,11 ± 1,72

En base a su contenido de humedad (33,84 ± 0,04 %) y de grasa (52,51 ± 0,63 % (ES)) el queso obtenido al día 21 de maduración se corresponde, según la clasificación establecida en

el CAA (Introducción, Tabla 1), a un queso de baja humedad (pasta dura) y graso. El queso Tybo, por definición del CAA es un queso semiduro y semigraso.

3.3.3. Ensayo con consumidores

Para comprobar la aceptación del queso desarrollado se realizó la prueba de consumidor en donde se evaluó el nivel de agrado del producto.

Se reclutó un total de 168 evaluadores, superando dicho número al propuesto por Espinoza Manfugás (2007) quien recomienda entre 100 y 150. La totalidad eran personas no entrenadas, perteneciente a la comunidad que integra el INTI y la UNQ, con un nivel de estudio mayoritariamente universitario (58,93 %) seguido por el nivel secundario (17,86 %) y, en un mismo nivel, terciario y postgrado (11,90 y 11,31 %, respectivamente) (Anexo VIII, A). En INTI se reclutó a 100 consumidores y en UNQ a 68. El 57,74 % eran mujeres y el 42,26 % hombres, distribuyéndose según rangos etarios entre 18 y 29 años (26,79 %), entre 30 a 39 años (33,93 %), entre 40 a 49 años (24,40 %), entre 50 a 59 años (9,52 %) y mayores a 60 años (5,36 %). La mayoría de los evaluadores (89 %) consumían queso al menos una vez por semana (Anexo VIII, B). Al consultar qué queso consumían, considerando que los evaluadores podían elegir más de una opción por respuesta, los quesos cremoso y por salud resultaron ser las variedades más elegidas (77,98 %) junto con la mozzarella (75,0 %) frente a la minoría protagonizada por los quesos con hongo, como el brie (22,02 %) y el azul (48,81 %) (Anexo VIII, C).

La evaluación indica un resultado favorable como respuesta al nuevo queso. Basado en una escala hedónica de 9 puntos, donde 9 significa “*Me gusta muchísimo*”, 1 es “*Me disgusta muchísimo*” y cuenta con un valor medio neutro “*No me gusta ni me disgusta*”, el queso tuvo una puntuación muy satisfactoria con una aceptación general de 6,9 puntos (Tabla 39). Los aspectos textura y sabor obtuvieron los mayores puntajes de aceptación ($7,3 \pm 1,5$ y $7,1 \pm 1,5$, respectivamente). Si bien el consumidor argentino promedio no está acostumbrado al consumo de quesos con hongos, el aspecto del queso sin pelar obtuvo un puntaje de 6,4 (sobre 9 puntos) lo que es un dato muy alentador.

Tabla 39: Porcentaje de respuestas obtenidas para cada puntaje en cada pregunta de aceptabilidad y promedio de puntaje obtenido en cada pregunta.

Puntaje	Escala hedónica	Global (%)	Sin pelar (%)	Pelado (%)	Sabor (%)	Textura (%)
9	<i>Me gusta muchísimo</i>	8,93	9,52	7,14	14,29	20,24
8		23,21	19,64	29,17	29,17	35,12
7		38,10	24,40	28,57	33,93	24,40
6		16,07	18,45	17,26	8,33	8,33
5	<i>No me gusta ni me disgusta</i>	7,74	13,69	9,52	8,33	7,14
4		1,19	7,14	5,95	2,38	2,98
3		3,57	2,98	1,19	1,19	0
2		1,19	4,17	1,19	1,79	0,60
1	<i>Me gusta muchísimo</i>	0	0	0	0,60	1,19
Promedio de puntaje $\pm$ DS		6,9 $\pm$ 1,4 ^b	6,4 $\pm$ 1,8 ^c	6,8 $\pm$ 1,5 ^b	7,1 $\pm$ 1,5 ^{ab}	7,3 $\pm$ 1,5 ^a

Medias seguidas de diferentes letras minúsculas en el mismo renglón indica diferencia significativa (test de Tukey test $p < 0,05$).

La Figura 60 muestra el perfil obtenido al responder la pregunta CATA en la cual se les pidió a los evaluadores que marquen todos los términos que describían al producto. Entre los atributos que más se destacaron se encuentran los que lo caracterizaron como “ideal para comer en picadas”, “con sabor fresco”, “blando”, “atractivo” y “elástico”. Es de destacar la baja frecuencia que se obtuvo con los atributos sabor a viejo/rancio, amargo, duro y seco, aspectos indeseables a nivel sensorial.

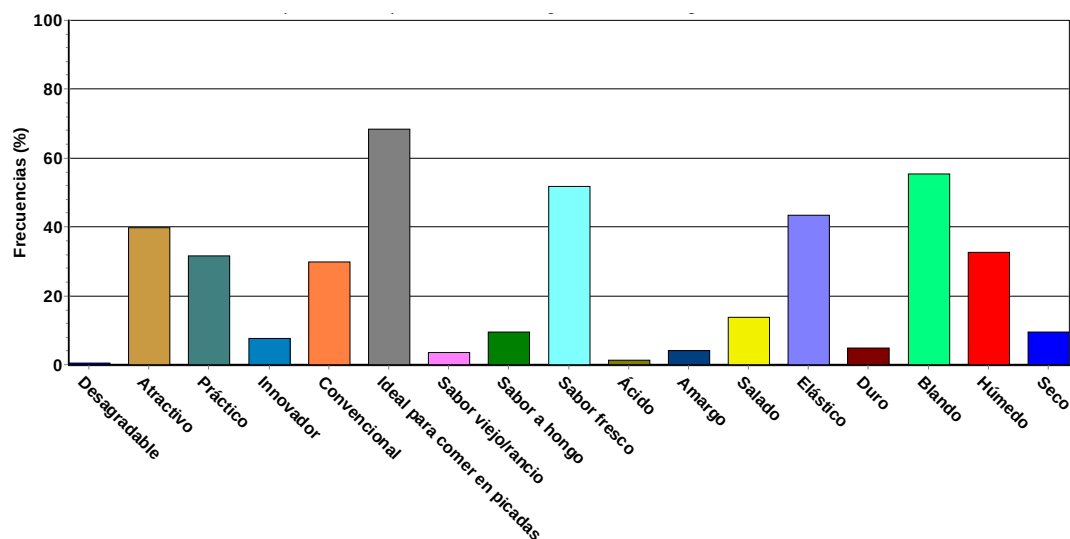


Figura 60: Perfil del queso de acuerdo a la opinión de los consumidores.

Uno de los aspectos más importantes a analizar en un nuevo producto, además de la aceptación a nivel sensorial, es si el consumidor lo compraría. La Tabla 40 expone los resultados obtenidos sobre la intención de compra del queso. Se obtuvo un puntaje promedio de intención de compra de $3,9 \pm 1,1$ %. El 75 % de los consumidores indicó que definitiva o probablemente lo compraría y apenas un poco más del 10 % manifestó que probable o definitivamente no lo compraría.

Tabla 40: Intención de compra (%) del queso.

Puntaje	Escala	Respuestas (%)
5	Definitivamente sí lo compraría	29,76
4	Probablemente sí lo compraría	45,24
3	Quizás sí, quizás no lo compraría	14,29
2	Probablemente no lo compraría	5,36
1	Definitivamente no lo compraría	5,36
Promedio puntaje $\pm$ SD		$3,9 \pm 1,1$

El estudio reveló que al elegir qué queso comprar priorizan la calidad y el precio, seguido por el aspecto y el uso que le darán (Anexo VIII, D).

4. CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos reprodujeron los antecedentes del Capítulo IV, contribuyendo el envasado a enlentecer la deshidratación. Tal como se vio en ensayos anteriores, el hongo desarrolla hasta el día 14 en el cual se obtiene un emplume completo y homogéneo de toda la superficie del queso. A partir de ese momento, entra en una fase de crecimiento que se mantiene estable, según los resultados obtenidos en el recuento de hongos y en la cuantificación de biomasa, debido a la conservación de la estructura de los conidios observada por las micrografías. Tanto el análisis de las fracciones nitrogenadas por electroforesis con Urea-Page como el índice de lipólisis resultaron ser técnicas adecuadas para monitorear la actividad

enzimática en los quesos desarrollados. Según los resultados obtenidos, la lipólisis ocurre antes que la proteólisis acumulándose en mayor medida sus subproductos de reacción conforme aumenta el tiempo. Esto se correlacionó con lo obtenido por el panel sensorial que definió descriptores asociados con la rancidez, hacia el final del tiempo estudiado, pero no con el amargor. Los demás parámetros fisicoquímicos analizados y la evaluación sensorial no evidenciaron una proteólisis significativa a lo largo del tiempo de maduración estudiado (43 días). Al medir color, se demostró que la diferencia de color aumentó con el avance del tiempo de maduración, con una correlación negativa de la luminosidad con la deshidratación del producto y con intensidad de los parámetros a^* y b^* en aumento, sugiriendo aportes por la presencia de compuestos hidrosolubles como la riboflavina y de pigmentos producidos por *P. nalgiovense*. Se calculó la composición proximal del queso al día 21, obteniéndose cantidades comparables con el queso Tybo del mercado, excepto el contenido graso que es superior. Según su contenido de humedad y grasa es catalogado como un queso de baja humedad (pasta dura) y graso.

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo descriptivo cuantitativo se propuso una vida útil del producto de 21 días, que se extiende desde el día 14 en el cual se envasa y se expende el producto a una temperatura de conservación de 5 °C, hasta el día 35 en el que se comienza a percibir flavors indeseables.

Finalmente, a partir del ensayo de aceptación con consumidores, se obtuvo resultados muy alentadores, con una aceptación buena del producto y con alta intención de compra manifestada. Se distinguió su textura y sabor como también su aplicación ideal para consumir en picadas.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró desarrollar y producir a escala piloto un queso innovador que se caracteriza por ser una masa recién elaborada contenida y madurada en tripa con desarrollo superficial de *Penicillium nalgiovense*, hongo que, hasta el momento, sólo se aplica como starter en matrices cárnicas.

La cepa de *P. nalgiovense* utilizada se eligió entre 21 cepas como resultado de caracterizarlas respecto a su variabilidad genética, crecimiento en presencia de cloruro de sodio, actividad enzimática y portación y expresión del gen involucrado en la producción de penicilina.

El proceso de maduración de este queso se estableció a 12 °C y 90 % de humedad relativa durante 14 días, momento en el que se logra la cobertura total de la superficie del producto por parte del hongo y se envasa apoyándolo sobre una bandeja plástica que se cubre con un film de polietileno microperforado. Este envase permite mantener la humedad del producto y conservar el emplume hasta el día final de su vida útil sensorial determinada en 21 que se extiende desde el día 14 en el cual se envasa y se expende el producto a una temperatura de conservación de 5 °C, hasta el día 35 en el que se comienza a percibir flavors indeseables.

Según el CAA el queso obtenido se define como graso y de baja humedad.

La aplicación de *P. nalgiovense* en este queso y en las condiciones establecidas garantizó que la producción de penicilina en el producto sea mínima y se mantenga con un gran margen por debajo del límite máximo teórico permitido, estimado en 180 µg de penicilina/kg.

Se caracterizaron fisicoquímica, microbiológica y sensorialmente los quesos obtenidos implementando un gran número de metodologías analíticas y procedimientos normalizados.

El producto tuvo una buena aceptación por parte de los consumidores, quienes además manifestaron un alto nivel de intención de compra.

PERSPECTIVAS FUTURAS

En el presente trabajo se demostró que es factible obtener un queso a partir de masa fresca contenida y madurada en tripa con desarrollo superficial de *Penicillium nalgiovense*. El producto desarrollado resulta novedoso y atractivo por su apariencia distintiva, sin embargo la proteólisis fúngica aún no es percibida a nivel sensorial.

Para aumentar la proteólisis lograda en este queso se propone utilizar estrategias que favorezcan el grado de proteólisis microbiana, incorporando microorganismos, como bacterias del ácido láctico en tina de fermentación y *Geotrichum candidum* a nivel superficial, con capacidad proteolítica reportada, a fin de que interactúen sinérgicamente con los cultivos iniciadores de fermentación como así también con *Penicillium nalgiovense* superficial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M. L.; Bragulat, M. R.; Castellá, G.; Accensi, F.; Cabañes, F. J. (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: 63-68.
- Aguilera, R., Oliveira, J. C.; Montanez, J.; Mahajan, P. (2011). Effect of modified atmosphere packaging on quality factors and shelf-life of surface mould ripened cheese: Part I. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 330-336.
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche. Principios de tecnología lechera*. Barcelona, Reverte S.A.
- Alapont Gutierrez, C. (2015). Caracterización enzimática, toxigénica y molecular de hongos filamentosos aislados en jamón D.O.P. de Teruel (Tesis Doctoral). Universidad Cardenal Herrera, España.
- Alshannaq, A.; Yu, J. (2017). Review Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14: 632-642.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3): 403-410.
- Alvarez, S.; Rodriguez, V.; Ruiz, M. E.; Fresno, M. (2007). Correlaciones de textura y color instrumental con la composición química de quesos de cabra canarios. *Arch. Zootec.* 56 (Sup. 1): 663-666.
- Al-Wadai, A.S.; Othman, M. R.; Mahmoud, M. A.; El-Aziz, A. R. M. (2013). Molecular characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of wheat grain. *Genet. Mol. Res.*, 12(3):3335-3352.
- Andersen, S. J. (1995). Compositional Changes in Surface Mycoflora During Ripening of Naturally Fermented Sausages. *Journal of Food Protection*. 58 (4): 426-429.
- Andersen, S. J.; Frisvad, J.C. (1994). Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. *Letters in Applied Microbiology*. 19: 486-400.
- AOAC 935.42. (2013). Ash of cheese. Gravimetric method. *Official Methods of Analysis*. 1st Action 1935.
- AOAC 991.20. (1991). Nitrogen (Total) in Milk. *Official Methods of Analysis*. 2nd supplement. 15th Edition.
- Ardö, Y. (1999). Evaluating proteolysis by analyzing the N content of cheese fraction. Pages 4–9 in *Bulletin IDF 337: Chemical Methods for Evaluating Proteolysis in Cheese Maturation (Part 2)*. Y. Ardö, ed. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Ardö y McSweeney. 2001. Cheese ripening. General mechanisms and specific Cheese varieties. IN: *cheeses in all their aspects*. *Bulletin of the IDF*. 369: 7-11.
- Arroyo Manzanares, N.; Huertas Pérez, J. F.; Gámiz Gracia, L.; García Campaña, A. M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín GRASEQA* N° 7: 16-31.
- Astete, A.M. (1989). Estudio de procesamiento, maduración y características del queso tipo Maribo, elaborado mediante la adición de sólidos lácteos. (Tesis Magister en Ciencias y Tecnología de la leche). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 164 p.
- Bain, I. (2013). *Etapas del Proceso de Elaboración de quesos*. INTA EEAA. Argentina.
- Banke, S., Frisvad, J. C.; Rosendahl, S. (1997). Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. *Mycological Research*, 101(5): 617-624.
- Baranyi, J.; Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23(3): 277-294.
- Barlett, A.; Dearden, J. C. (1995). Quantitative Structure-Activity Relationships in the Prediction of *Penicillin Immunotoxicity*. *Quantitative Structure-Activity Relationships*. 14: 258-263.
- Bayraktar, H.; Dólar, F. S.; Maden, S. (2007). Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* sp. *ciceris* strains on chickpea in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 156: 146-154.

- Bernaldez, V.; Córdoba, J. J.; Rodríguez, M.; Cordero, M.; Polo, L.; Rodríguez, A. (2013). Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón”. Food Control. 32: 69-76.
- Bertola, N. C.; Bevilacqua, A. E.; Zaritzky, N. E. (1992). Proteolytic and rheological evaluation of maturation of tybo cheese. Journal of Dairy Science, 75: 3273-3281.
- Berruga, M. I.; Molina, A.; Althaus, R. L.; Molina, M. P. (2016). Control and prevention of antibiotic residues and contaminants in sheep and goat's milk. Small Ruminant Research. 142: 38-43.
- Berwal, J.S.; Dincho, D. (1995). Molds as protective cultures for raw dry sausages. Journal of Food Protection. 58: 817-819.
- Blanca, M. (1994). The contribution of the side chain of penicillins in the induction of allergic reactions. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 94: 562-563.
- Bourdichon, F.; Casaregola, S.; Farrokh, C.; Frisvad, J. C.; Gerds, M. L.; Hammes, W. P.; Harnett, J.; Huys, G.; Laulund, S.; Ouwehand, A.; Powell, I. B.; Prajapati, J.B.; Seto, Y.; Ter Schure, E.; Van Boven, A.; Vankerckhoven, V.; Zgoda, A.; Tuijelaars, S.; Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. International Journal of Food Microbiology, 154: 87-97.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem, 72: 248-254.
- Brito, C. (1993). Aspectos bioquímicos de la maduración de quesos. Alimentos 4 (18): 40-55.
- Brito, C., Morales, O., Molina, L. H., Pessot, R.; Pinto, M. (1995). Evolución de la maduración de queso Chanco tipo campo almacenado a altas temperaturas. Parte I. Parámetros Fisicoquímicos y pérdida de peso. Agro Sur, 23 (2): 95-106.
- Broome, M., Limsowtin, G. (1998). Starter peptidase activity in maturing cheese. The Australian Journal of Dairy Technology, 53: 79-82.
- Bruna, J.M.; Hierro, E.M.; De la Hoz, L.; Mottram, D.S.; Fernández, M.; Ordóñez, J.A. (2003). Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 85: 111-125.
- Bylund G. E. (1996). Manual de industrias Lácteas. Madrid, España: Tetrapack.
- Canel, R. S.; Gerrissi, S., Sanchez, M.; Mónaco, G.; Renaud, V.; Laich, F.; Wagner, J.; Ludemann, V. (2019, en prensa). Microbiological and Sensory Characteristics of Mould-Ripened Salami under Different Packaging Conditions. Food Technology and Biotechnology. doi 10.17113/ftb.57.01.19.5803.
- Calvo, C.; Durán, L. (1997). Propiedades físicas II: Ópticas y color. Temas en Tecnología de Alimentos. Ed. J. M. Aguilera. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Calzada Gomez, J. (2014). Prevención de la sobremaduración y de la formación de aminas biogénicas en quesos mediante tratamientos de altas presiones. (Tesis doctoral) Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. España.
- Canada, J. (2001). Caracterización sensorial y fisicoquímica del Queso Serpa. (Tesis doctoral) Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria. España.
- Chacón-Villalobos, A.; Pineda-Castro, M.L. (2009). Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo “Crottin de Chavignol”. Agronomía Mesoamericana 20(2):297-309.
- Champagne, C. P.; Soullignac, L.; Marcotte, M.; Innocent, J.P. (2003). Texture et evolution du pH de fromages de type Brie entreposes en atmosphere controlee. Lait, 83:145-151.
- Chaparro Pedraza, A. P. (2010). Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana (Tesis de posgrado) Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

- Chávez, R.; Fierro, F.; García Rico, R. O.; Laich, F. (2011). Mold-fermented foods: *Penicillium* spp. as ripening agents in the elaboration of cheese and meat products. In book: Mycofactories, Chapter: 5. Publisher: Bentham Science Publishers Ltd., Editors: A.L. Leitão, pp.73-98.
- Chiericati, C. (2013). "Control del desarrollo de hongos contaminantes de alimentos mediante iones dosificados por materiales microporosos". (Tesis de grado) Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
- Casassa, F.; Sari, S. (2006). Aplicación del Sistema Cie-Lab a los vinos tintos. Correlación con algunos parámetros tradicionales. Revista Enología, 5:56-62.
- Cerning, J.; Gripon, J.C.; Lamberet, G. ; Lenoir, J. (1987). Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. Le Lait, 67 (1): 3-39.
- Código Alimentario Argentino. (2014). Capítulo VIII: Alimentos Lácteos. Artículos: 556, 605, 623 y 633.
- Comisión del Codex Alimentarius. (2017). Límites Máximos de Residuos (LMR) y Recomendaciones sobre la Gestión de (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. 40ª Sesión del Codex Alimentarius.
- Comisión Europea. (2009). Reglamento (UE) n° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea. L15: 1-72.
- Cordero, M.; Córdoba, J.J.; Bernáldez, V.; Rodríguez, M.; Rodríguez, A. (2015). Quantification of *Penicillium nalgiovense* on dry-cured sausage 'salchichón' using a SYBR Green-based real-time PCR. Food Analytical Methods, 8: 1582-1590.
- Cortés Sánchez, A. J.; Mosqueda Olivares, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. Química Viva. 12: 64-90.
- Cottet, C.; Gallego, M.D.; Canel, R.; Moavro, A.; Wagner, J.; Ludemann, V. (2014). Estudio del desarrollo de *Penicillium nalgiovense* en matrices lácteas. XIII Congreso de micología 24 de agosto 2014.
- Dalgleish D. G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. En: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1. Eds. Fox, P. F., London: Chapman & Hall. pp. 69-100.
- Deacon, J.W. (2006). Fungal Biology. 4th ed. Blackwell Publishing Ltd, Malden.
- Deeth, H. C; Fitzgerald, C. H. (1976). Lipolysis in dairy products: A review. Aust. J. Dairy Technol, 31: 53-62.
- De la Fuente Fernández, S. (2011). Análisis de conglomerados. Facultad de ciencias económicas y empresariales. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Dinolfo, M. I.; Stenglein, S. A.; Moreno, M. V.; Nicholson, P.; Jennings, P.; Salerno, G. L. (2010). ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* strains from Argentina and England. European Journal of Plant Pathology, 127: 483-491.
- Dupont, J.; Magnin, S.; Marti, A. (1999). Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in the food industry. International Journal of Food Microbiology, 49: 109-18.
- El-Nimr, A.; Eissa, H.; El-Abd, M.; Mehriz, A.; Abbas, H.; Bayoumi, H. (2010). Water Activity, Color Characteristics and Sensory Properties of Egyptian Gouda Cheese during Ripening. Journal of American Science, 6 (10): 447-453.
- Espinoza Manfugás, J. (2007). Evaluación sensorial de los Alimentos. Editorial Universitaria. Cuba.
- Farber, P.; Geisen, R. (1994). Antagonistic Activity of the Food-Related Filamentous Fungus *Penicillium nalgiovense* by the Production of Penicillin. Applied and Environmental Microbiology, 60(9):3401-3404.
- Farkye, N. (2004). Cheese technology. International Journal of Dairy Technology, 57: 91-98 .
- Farkye, N.; Fox, P. (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. Journal of Dairy Research, 59: 209-216.

- Farrel, H. M.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G. T.; Brown, E. M.; Butler, J. E.; Creamer, L. K.; Hlcks, C. I.; Hollar, C. M.; Ng-Kwal-Hang, K. F.; Swalsgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 87: 1641-1674.
- Fernandez-Bodega, M. A.; Mauriz, E.; Gómez, A.; Martín, J. F. (2009). Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, valdeón and Bajes-Tresviso local variedades of blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 18-25.
- Fernández, M.; Linares, D. M.; Del Río, B.; Ladero, V.; Alvarez, M. A. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*, 74: 276-282.
- Fernández-Salguero, J.; Marcos, A.; Alcalá, M.; Esteban, M.A. (1989). Proteolysis of cabrales cheese and other European blue vein cheese varieties. *Journal of Dairy Research*, 56:141-145.
- Ferrandini Banchemo, E. (2006). Elaboración de queso de Murcia al vino con cuajo natural en pasta. (Tesis de Doctorado). Murcia: Universidad de Murcia.
- FIL-IDF 99-3:2009. Evaluación de productos lácteos por ensayo de categorización
- Filtenborg, O.; Frisvad, J.C.; Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 85-102.
- Fink-Gremmels, J.; Leistner, L. (1990). Toxicological evaluation of moulds. *Food Biotechnology*, 4: 579–584.
- Floros, J. D.; Nielsen, P. V.; Farkas, J. K. (2000). Advances in modified atmosphere and active packaging with applications in the dairy industry. *Bulleting of the IDF*, 346:22-28.
- Fox, P.F. (2003). *Advanced Dairy Chemistry-I. Proteins*, 3rd. Edition, P.L.H. McSweeneyeds. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Fox, P.F.; Mulvihill, D.M. (1990). Casein. In: Harris P. (eds) *Food Gels*. Elsevier Applied Food Science Series. Springer, Dordrecht.
- Frisvad, J.; Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49: 1-174.
- Galvalisi, U.; Lupo, S.; Piccini, J.; Bettucci, L. (2012). *Penicillium* species present in Uruguayan salami. *Revista Argentina de Microbiología*, 44: 36-42.
- Gamboa, P. M. (2009). The epidemiology of drug allergy-related consultations in Spanish allergology services: Alergológica-2005. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol*, 19 (2): 45-50.
- García Garibay, G.; Quintero Ramírez, A.; López, M. (2004). *Biotechnology Alimentaria*. Limusa S.A. D.F, México.
- Gareis, M.; Rotheneder, R.; Rödel, W. (1999). Mould-ripened meat products: new selection scheme for non-toxicogenic *Penicillium* spp. *Mycotoxin Research*, 15: 61-66.
- Geisen, R. (1995). Characterization of the species *Penicillium nalgioense* by RAPD and protein patterns and its comparison with *Penicillium chrysogenum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 595-601.
- Gilabert, E. (1992). Medida del color. Servicio de publicaciones Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Glass, N. L.; Donaldson, G. C. (1995). Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61:1323-1330.
- Gómez de la Cruz, M. J. (1996). Degradación de péptidos hidrófobos por bacterias lácticas. Aplicación en la eliminación del sabor amargo en queso. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. España.
- Gómez Ramos, P. F. (2014). Situación actual de residuos de fármacos veterinarios en alimentos de origen animal en el Perú. (Tesina) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.

- González, A.; Aguirre, X. Inter simple sequence repeat (ISSRs). (2007). Capitulo 19. En Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT. México
- González Villarreal, M. (2002). Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt”. Veraguas, República de Paraná. En <http://www.argenbio.org>.
- Gravesen, S.; Frisvad, J.C.; Samson. R.A. (1994). Microfungi. Munksgaard International Publishers Ltd, 1st Ed. Copenhagen, Dinamarca.
- Gripon, J.C. ; Desmazeaud, M. ; Le Bars, D. ; Bergère, J.L. (1975). Étude du rôle des micro-organismes et de leurs enzymes dans la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. Lait, 55: 502-516.
- Guinee, T.P.; Fox, P.F. (2004). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: P.F. Fox, et al., editors, Cheese: chemistry, physics and microbiology. Elsevier Academic Press, London, GBR. pp. 207-259.
- Hansen, B. V.; Nielsen, P. V. (1997). Development of a semisynthetic cheese medium for fungi using chemometric methods. Journal of dairy science, 80 (7):1237-1245.
- Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Seifert, K. A.; Overy, D. P.; Tuthill, D. M.; Valdez, J. G.; Samson, R. A. (2012). New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section Chrysogena. Persoonia, 29: 78-100.
- INDEC. (2004). Actualización de la Metodología oficial de cálculo de las líneas de pobreza. Argentina.
- IRAM 20003:2012. Análisis sensorial: guía para la instalación de locales de ensayo. Instituto Argentino de Normalización y Certificación. 2da. Ed., Buenos Aires, Argentina.
- ISO 1740:2004. Milkfat products and butter -Determination of fat acidity (Reference method).3rd Ed. The International Organization for Standardization. Geneva. Switzerland.
- ISO 3432/IDF 221:2008 Cheese - Determination of fat content - Butyrometer for Van Gulik method. The International Organization for Standardization. Geneva. Switzerland.
- ISO 3433/IDF 222:2008 Cheese - Determination of fat content - Van Gulik method. The International Organization for Standardization. Geneva. Switzerland.
- ISO 5534/IDF 4:2004 Cheese and processed cheese - Determination of the total solids content (Reference method). The International Organization for Standardization. Geneva. Switzerland.
- ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp”. The International Organization for Standardization. Geneva. Switzerland.
- ISO 8586-1:1993. Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part I. Selected assessor. The International Organization for Standardization. Geneva. Switzerland.
- ISO 11136:2014. Sensory analysis -- Methodology -- General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area. The International Organization for Standardization. Geneva. Switzerland
- ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method. The International Organization for Standardization. Geneva. Switzerland.
- JECFA. (1990). Evaluaciones del Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios: Bencilpenicilina. 36ª Reunión.
- Johnson, M. (1999). Casein-how it colors cheese. UW Dairy pipeline. Wisconsin Center for Dairy Research. Spring, 11 (2). Estados Unidos.
- Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche. (2005). Fundamentos para la elaboración de quesos. Universidad de Zulia. Venezuela.
- Laich, F.; Fierro, F.; Martín, J.F. (2002). Production of *Penicillin* by Fungi Growing on Food Products: Identification of a Complete Penicillin Gene Cluster in *Penicillium griseofulvum* and a Truncated Cluster in *Penicillium verrucosum*.

- Laich, F.; Fierro, F.; Martín, J.F. (2003). Isolation of *Penicillium nalgiovense* strains impaired in penicillin production by disruption of the *pcbAB* gene and application as starter on cured meat products. *Mycol. Research*, 107(6): 717-726.
- Laich, F.; Fierro, F.; Cardoza, R.E.; Martín, J.F. (1999). Organization of the gene cluster for biosynthesis of penicillin in *Penicillium nalgiovense* and antibiotic production in cured dry sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1236-1240.
- Larsen, M.D.; Jensen, K. (1999). The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, 46: 159-166.
- Lawless, H.T.; Heymann, H. (1999). *Sensory evaluation of food. Principles and practices*. 2nd Ed. Springer. USA.
- Lawlor, J. B.; Delahunty, C. M. (2000). The sensory profile and consumer preference for ten specialty cheeses. *International Journal of Dairy technology*, 53: 28-36.
- Lawrence, R. C.; Creamer, L. K.; Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *New Zealand Dairy Research Institute*, 70: 1748 -1760.
- Lavanchy, P.; Bérodiér, F.; Zannoni, M.; Noël, Y.; Adamo, C.; Squella, J.; Herrero, L. (1994). Guía para la evaluación sensorial de la textura de quesos de pasta dura o semidura. *Institut National de la Recherche Agronomique*. Paris.
- Leaver, J.; Law, A.; Banks, J.; Horne, D.; Calvo, M. (1993). Analysis of proteolysis in cheese using ion-exchange and reverse phase chromatography. IN: *Cheese yield & Factors Affecting it control*. IDF seminar. *International Dairy Federation*. 494-506.
- Le Bars, D.; Gripon, J. C. (1981). Role of *Penicillium roqueforti* proteinases during blue cheese ripening. *Journal of Dairy Research*, 48: 479-487.
- Leclercq-Perlat, M. N.; Hélias, A.; Corrieu, G. (2013). Short communication: Little change takes place in Camembert-type cheese water activities throughout ripening in term of relative humidity and salt. *J. Dairy Sci.*, 96: 7521-7525.
- Lessard, M. H.; Bélanger, G.; St-Gelais, D.; Labrie, S. (2012). The composition of camembert cheese-ripening cultura both mycelial growth and appearance. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (6): 1813-1819.
- Lomholt, S. B. (1996). The kinetics of the aggregation of casein micelles by rennet. (Ph.D. Thesis) The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.
- Lucey, A. J.; Johnson, M. E.; Horne, D. S. (2003). Invited Review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.*, 86: 2725-2743.
- Ludemann, V.; Pose, G.; Pollio, M.L.; Segura, J. (2004). Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 13-18.
- Lund, F.; Filtenberg, O.; Frisvad, J. C. (1995). Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, 12:173 -180.
- Mahmoud, M.; Abeer R. M; Aziz, A. E.; Al-Othman, M. R. (2016). Molecular and biochemical taxonomic tools for the identification and classification of plant-pathogenic *Penicillium* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol. 30.
- Marcos, A.; Esteban, M.; León, F.; Fernandez-Salguero, J. (1979). Electrophoretic Patterns of European Cheeses: Comparison and Quantitation. *Journal of Dairy Science*, 62: 892-900.
- Marinelli, F.; Genilloud, O. (2012). *Antimicrobials: New and Old Molecules in the Fight Against Multi-resistant Bacteria*. : Springer. New York, USA.
- McMahon, D. J.; Oberg, C. (1998). Influence of fat, moisture and salt on functional properties of Mozzarella cheese. *Aust. J. Dairy Technol*, 53:98.
- McSweeney, P.L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening, *International Journal of Dairy Technology*, 57(2).
- McSweeney P.L.H.; Fox, P.F. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic Professional, London.

- McSweeney, P. L. H.; Sousa, M. J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80: 293-324.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP). (2009). Protocolo de calidad para queso Tybo y Holanda. Versión: 14 Código: SAA016.
- Mishra, P. K.; Tewari, J. P.; Clear, R. M.; Turkington, T. K. (2004). Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology*, 145: 299-307.
- Molnár, I.; Gibson, D. M.; Krasnoff, S. B. (2010). Secondary metabolites from entomopathogenic *Hypocrealean* fungi. *Natural Product Reports*, 27:1241-1275.
- Moss, M. O. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation. En: Smith, J. F.; Henderson, RS; eds. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Ratón. pp. 37-56.
- Mrázek, J.; Pachlová, V.; Bunka, F.; Cerníková, M.; Dráb, V.; Bejblová, M.; Stanek, K.; Bunková, L. (2015). Effects of different strains *Penicillium nalgiovense* in the Nažový cheese during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96: 2547-2554.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70: 461-477.
- Nielsen, M. S.; Frisvad, J. C.; Nielsen, P. V. (1998). Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 91-99.
- Nouira, W.; Park, Y.; Guler, Z.; Terrill, T. (2011). Comparison of free fatty acid composition between low-fat and full-fat goat milk cheeses stored for 3 months under refrigeration. *Open Journal of Animal Sciences*, 1 (2): 17-23.
- Olson, N. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal food Science*. 47: 631.
- Owen, P. (1991). *Biotechnology de la fermentación*. Acribia.Madrid, España.
- Panelli, S.; Buffoni, J. N.; Bonacina, C.; Feligini, M. (2012). Identification of moulds from the Taleggio cheese environment by the use of DNA barcodes. *Food Control*, 28: 385-391.
- Papagianni, M. (2014). An evaluation of the proteolytic and lipolytic potencial of *Penicillium* spp. Isolated from traditional Greek sausages in submerged fermentation. *Appl. Biochem Biotechnol*, 172: 767-775.
- Park, Y. (2001). Proteolysis and Lipolysis of Goat Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*, 84: 84-92.
- Perrone, G.; Samson, R. A.; Frisvad, J. C.; Susca, A.; Gunde-Cimerman, N.; Epifany, F.; Houbraken, J. (2015). *Penicillium salami*, a new species occurring during seasoning of dry-cured meat. *International Journal of Food Microbiology*, 193; 91-98.
- Phillips, I.; Casewell, M.; Cox, T.; De Groot, B.; Friis, C.; Jones, R.; Nightingale, C.; Preston, R.; Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1): 28-52.
- Picque, D.; Leclercq-Perlat, M. N.; Guillemin, H.; Perret, B.; Cattenoz, T.; Provost, J. J.; Corrieu, G. (2010). Camembert-type cheese ripening dynamics are changed by the properties of wrapping films. *J. Dairy Sci.*, 93: 5601-5612.
- Pitt, J.; Samson, R.A.; Frisvad, J. C. (2000). List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Samson RA, Pitt JI, editors. *Integration of modern methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. Chapter 1, pp. 9-50.
- Pitt, J. I.; Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. North Ryde, Australia: Springer Dordrecht Heidelberg.
- Polo, C.; Ramos, M.; Sanchez, R. (1985). Free amino acids by high performance liquid chromatography and peptides by gel electrophoresis in Mahon cheese during ripening. *Food Chem.*, 16: 85-96.
- Ramirez Navas, J. S.; Aguirre Londoño, J.; Aristizabal Ferreira, V. A.; Castro Narváez, S. (2010). La sal en el queso: diversas interacciones. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1): 303-316.
- Restrepo, J. G. (1997). Penicilina y Bencilpenicilina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 10(1): 38-46.

- Riel, R. (1991). Composición y estructura físico-química de la leche. En: Ciencia y Tecnología de la Leche, Amiot, J. Eds. Acribia S.A., Zaragoza. pp. 1-53.
- Rohlf, F.I. (1998). Ntsys-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system Version 2.0. Applied Biostatistics. Exeter Software.
- Rodriguez, A.; Bernáldez, V.; Rodriguez, M.; Andrade, M.J.; Núñez, F.; Córdoba, J. J. (2015). Effect of selected protective cultures on ochratoxin A accumulation in dry-cured Iberian ham during its ripening process. LWT-Food Science and Technology, 60: 923-928.
- Roos, Y. H. (1995). Phase transitions in foods. Academic Press. San Diego, California, USA.
- Roussos, S.; Perraud Gaimé, I. (1996). Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. En: Galindo E. Fronteras in biotecnología y bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. México. pp. 341-348.
- Ruettimann, K. W.; Ladisch, M. R. (1987). Casein micelles: Structure, properties and enzymatic coagulation. Enzyme Microbiology Technology, 9: 578-598.
- Saliji, J. P.; Kroger, M. (1981). Proteolysis and Lipolysis in Ripening Cheddar Cheese Made with Conventional Bulk Starter and with Frozen Concentrated Direct-to-the-Vat Starter Culture. Journal of Food Science, 46(5): 1345-1348.
- Salimath, S. S.; De Oliveira, A. C.; Godwin, I. D.; Bennet-Zen, J. L. (1995). Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. Genome, 38: 757-763.
- Samson, R. A.; Seifert, K. A.; Kuijpers, A. F. A.; Houbraken, J. A. M. P.; Frisvad, J. C. (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. Studies in mycology, 49: 175-200.
- Samson, R.; Houbraken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J.; Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Sanjurjo, M. (1997). La penicilina, pionera de la era de los antibióticos. Educación Química, 8 (2): 68-74.
- Schoch, C. L.; Saifert, K. A.; Huhndorf, S. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. National Academy of Sciences of the United States of America, 109: 6241-6246.
- Scolari, G.; Sarra, P. G.; Baldini, P.; (2003). Mikrobiologija suhega mesa. In: Bem Z, Adamic J, Zlender B, Smole S, Gasperlin L (eds) Mikrobiologija zivil zivalskega izvora, Biotehniška fakulteta. Oddelek za zivilstvo, Ljubljana, pp 351-362.
- Seija, V.; Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. Temas de Bacteriología y Virología Médica, 34: 631-647.
- Sihufe, G. A.; Zorrilla, S. E.; Rubiolo, A.C. (2010). The influence of ripening temperatura and sampling site on the proteolysis in Reggianito Argentino cheese. LWT-Food Science and Technology, 43: 247-253.
- Smith, G. (1949). The effect of adding trace elements to Czapek-Dox medium. Transactions of the British Mycological Society, 32: 280-283.
- Sneath, P.; Sokal, R. (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Gen, microbiology, 17: 201-206.
- Soriano del Castillo, J. M. (2015). Micotoxinas en Alimentos. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Sousa, M. J.; Malcata, X. (1997). Ripening of ovine milk cheeses: effects of plant rennet, pasteurization, and addition of starter on lipolysis, Food Chemistry, 59(3): 427-432.
- Sousa, M. J.; Ardö, Y.; McSweeney, P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening, International Dairy Journal, 11(4-7): 327-345.
- Stenglein, S. A.; Balatti, P. A. (2006). Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. Physiological and Molecular Plant Pathology, 68: 158-167.
- Subramanian, A.; Luis Rodriguez-Saona, L. (2010). Chemical and Instrumental Approaches to Cheese Analysis. En Advances in Food and Nutrition Research, Vol. 59. Elsevier. USA.

- Sunesen, L. O.; Stahnke, L. H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages: selection, application and effects. *Meat Science*, 65: 935-948.
- Swanson, B.G. (1987). Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae*, 207: 49-61.
- Tipples, K. H. (1995). Quality and nutritional changes in stored grain. In: Jnyas, D.S., White, N.D.G., Muir W.E. eds). *Stored Grain Ecosystems*. Marcel Dekker. New York.USA. pp. 325 351.
- Trieu-Cuot, P.; Gripon, J. (1982). A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 49: 501-510.
- Upadhyay, V. K.; McSweeney, P.L.H.; Magboul, A. A.; Fox, P. F. (2004). Proteolysis in Cheese during Ripening”, en *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 3rd Ed. Vol. 1- General Aspects. Elsevier.
- Van Long, N.; Vasseur, V.; Coroller, L.; Dantigny, P.; Le Panse, S.; Weill, A.; Mounier, J.; Rigalme, K. (2017). Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination yime of *Penicillium species*. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 151-160.
- Van Hekken, D. L.; Thompson, M. P. (1992). Application of PhastSystem to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Dairy Sci.*, 75(5): 1204-10.
- Visagie, C. M.; Houbroken, J.; Frisvad, J. C.; Hong, S. B.; Klaassen, C. H. W.; Perrone, G.; Seifert, K. A.; Varga, J.; Yaguchi, T.; Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78: 343-371.
- Waites, M. J.; Morgan, N. L.; Rockey, J. S.; Higton, G. (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. London, UK: Blackwell Science.
- Walstra, P. (1999). Casein Sub-Micelles: Do They Exist? *International Dairy Journal*, 9: 189-192.
- Walstra, P.; Jenness, R. (1987). *Química y física lactológica*. Zaragoza: Ed. Acribia.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A. et al. (Ed.), *PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 315-322.
- Zuluaga Arroyave, N. (2017). El análisis sensorial de alimentos como herramienta para la caracterización y control de calidad de derivados lácteos. (Tesis) Universidad Nacional de Colombia.Colombia.

ANEXOS

ANEXO I: Medios de cultivo y reactivos**Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA)**

K ₂ HPO ₄	4,1 g
Czapek Concentrado	10 mL
Solución de Metales Traza	1 mL
Extracto der Levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Agar Dicloran Glicerol 18 % (DG18)

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ H ₂ O	0,5 g
Glicerol	220 g
Diclorán	1 mL
Cloranfenicol	100 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Agar Extracto de Malta (MEA) (pH final: 5,6)

Extracto de Malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Medio tipo queso modificado (MQM)Frasco 1

Manteca	250 g
Caseína	100 g
Agar	20 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	7,3 g
Agua	222,7 g

Frasco 2

NaCl	15 g
Lactato	8,3 g
Lactosa	7,9 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,6 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,025 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,004 g
Agua	355,17 g

Para el frasco 1, deben pesarse todos los componentes en un vaso de precipitado excepto la manteca que previamente a añadirse debe fundirse. Una vez agregados todos los componentes, es necesario homogeneizar la mezcla con una minipimmer. Luego de obtener una masa uniforme, la misma se traspasa a un frasco schott. En el frasco 2, se pesan todos los ingredientes en ese recipiente.

Ambas partes, se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Finalizada esta etapa, deben atemperarse los frascos a 50 °C, para luego poder agregar el contenido del frasco 2 al 1. Luego de combinarlos, debe realizarse una agitación ultraturax (IKA T25) hasta obtener un líquido totalmente uniforme, para luego proceder a plaquearlos.

Agar triptosa de soja (TSB) (pH final: 7,0)

Peptona de caseína	16 g
Peptona de soja	3 g
Glucosa	2,5 g
NaCl	6 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Agua destilada	1000 mL

Agar triptosa de soja 1 % (TSA 1 %) (pH final: 7,0)

Peptona de caseína	16 g
Peptona de soja	3 g
Glucosa	2,5 g
NaCl	6 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Agar	10 g
Agua destilada	1000 mL

TE 1X (buffer)

10mM Tris-HCl pH 8	10 mL
1mM EDTA pH 8	2 mL
Agua destilada	988 mL

GELES Y REACTIVOS PARA UREA PAGE**Buffer stracking (pH 7,6)**

Tris	0,75 g
HCl.	0,4 mL

Llevar a volumen final de 100 mL con agua destilada.

Buffer running (pH 8,9)

Tris	4,6 g
HCl	0,4 mL

Llevar a volumen final de 100 mL con agua destilada.

Gel de separación o running (6 % de acrilamida)

Por cada gel a preparar se coloca en un colector de vidrio de 10 mL los siguientes reactivos en el orden que se indica:

- 1- 2,7 g de urea
- 2- 0,6 g de acrilamida*
- 3- 0,034 de bisacrilamida*
- 4- Llevar a 10 mL con buffer running
- 5- 5 µl de TEMED
- 6- 25 µl de solución de persulfato 10 %. Una vez agregado esta solución comienza a gelificar la mezcla.

Gel de concentración o stacking (4,2 % de acrilamida)

Por cada gel a preparar se coloca en un colector de vidrio de 10 mL los siguientes reactivos en el orden que se indica:

- 1- 1,35 g de urea
- 2- 0,2 g de acrilamida*
- 3- 0,015 de bisacrilamida*
- 4- Llevar a 5 mL con buffer stracking
- 5- 4 µl de TEMED
- 6- 10 µl de solución de persulfato 10 %. Una vez agregado esta solución comienza a gelificar la mezcla).

Buffer de migración o corrida (pH 8,4)

Tris	3 g
------	-----

Glicina	14,5 g
---------	--------

Llevar a un volumen final de 1000 mL con agua destilada.

Solución Urea 9 M – β -Mercaptoetanol 1 %

Urea	54 g
------	------

β -Mercaptoetanol	1 mL
-------------------------	------

Llevar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

Solución desnaturalizante (pH 7,6)

Tris	0,37 g
------	--------

Urea (8 M)	24 g
------------	------

HCl	0,2 mL
-----	--------

β -Mercaptoetanol	0,35 mL
-------------------------	---------

Azul de Bromofenol	0,04 g
--------------------	--------

Llevar a un volumen final de 50 mL con agua destilada.

Solución stock de colorante:

Diluir 2,5 g de azul brillante de Coomassie R en 1000 mL de solución 50 % metanol : 10 % de ácido acético.

Solución diluyente:

Metanol	40 mL
---------	-------

Ácido acético:	5 mL
----------------	------

Glicerol	2,5 mL
----------	--------

Llevar a volumen a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

Solución diluida de colorante:

Diluir 1:20 la solución stock de colorante con solución diluyente.

Solución decolorante:

Metanol	20 mL
---------	-------

Ácido acético:	5 mL
----------------	------

Glicerol	2,5 mL
----------	--------

Llevar a volumen a un volumen final de 100 mL con agua destilad

ANEXO II: Instrucciones para técnica de ELISA

RIDASCREEN® Penicillin (r-biopharm) Art. Nr. R2921

1. Retirar el kit de la heladera y atemperar a temperatura ambiente, mínimo durante una hora.
2. Tomar tanta cantidad de pocillos como sea necesario para las muestras y standars.
3. Agregar 50 µl de cada solución standar y de las muestras preparadas a cada pocillo, por separado.
4. Agregar 25 µl de la enzima conjugada diluida a cada pocillo.
5. Agregar 25 µl del anticuerpo diluido a cada pocillo.
6. Mezclar suavemente, realizando movimientos circulares con la placa sobre la mesada.
7. Tapar para proteger de la luz e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
8. Realizar tres lavados, para ello sacar el líquido de los pocillos volcando los mismos, golpear el soporte hacia arriba y abajo contra papel absorbente. Con ayuda de micropipeta multicanal llenar los pocillos con 300 µl de buffer de lavado y derramar el líquido nuevamente. Golpear el soporte contra papel absorbente. Repetir el procedimiento 2 veces más.
9. Agregar 100 µl de la mezcla sustrato/cromógeno a cada pocillo.
10. Mezclar suavemente la placa e incubar a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad.
11. Agregar 100 µl de solución stop a cada pocillo.
12. Mezclar suavemente la placa e inmediatamente medir la absorbancia a 450 nm.

Colocar los valores de lectura del espectrofotómetro en el software especial provisto: RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. No. Z9996). Para obtener la concentración expresada en µg/kg (ppb) de ampicilina, el valor obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución correspondiente según la matriz (20 para quesos).



Kit comercial RIDASCREEN® Penicillin (r-biopharm) Art. Nr. R2921

ANEXO III: Encuesta a consumidores y potenciales consumidores estimar el límite máximo teórico de penicilina admitido en queso con desarrollo fúngico superficial.

Desarrollo de nuevo producto lácteo

Se pretende conocer la opinión de los posibles consumidores, para el desarrollo de un nuevo queso. Su participación nos brindará resultados importantes para nuestra investigación.

Esta encuesta es anónima. Responda las siguientes preguntas seleccionando una respuesta.

1. Edad (en años) entre: *(Marque solo una opción)*
 - ☐ Menos de 18
 - ☐ 18 – 30
 - ☐ 31 - 45
 - ☐ 46 - 60
 - ☐ Más de 60
2. Sexo: *(Marque solo una opción)*
 - ☐ Femenino
 - ☐ Masculino
3. Estudios: *(Marque solo una opción)*
 - ☐ Ninguno
 - ☐ Primario
 - ☐ Secundario
 - ☐ Terciario
 - ☐ Universitario
 - ☐ Posgrado
4. ¿Come queso? *(Marque solo una opción)*
 - ☐ Si
 - ☐ No
5. ¿Cuánto te gusta el queso Camembert o Brie? *(Marque solo una opción)*
 - ☐ Me gusta mucho
 - ☐ Me gusta
 - ☐ Ni me gusta ni me disgusta
 - ☐ No me gusta
6. A este tipo de queso ¿Con qué frecuencia lo consume? *(Marque solo una opción)*
 - ☐ Una vez al día
 - ☐ Más de una vez por semana
 - ☐ Una vez por semana
 - ☐ Más de una vez por mes
 - ☐ Una vez por mes
 - ☐ Esporádicamente
 - ☐ Nunca
7. En caso de haber contestado esporádicamente o nunca en la pregunta anterior, ¿a qué lo atribuye? *(Marque solo una opción)*
 - ☐ A su precio
 - ☐ A la falta de disponibilidad
 - ☐ A que tu círculo social no comparte el mismo gusto
 - ☐ A la falta de hábito de su consumo
 - ☐ A que prefiere otro tipo de queso
8. En caso de consumirlo ¿En qué situaciones lo hace? *(Marque solo una opción)*
 - ☐ Rutina familiar
 - ☐ Encuentros con amigos o familiares
 - ☐ Eventos especiales
 - ☐ Otros
9. ¿Por vez de consumo, cuánto sería lo máximo que comería normalmente? *(Marque solo una opción)*
 - ☐ 30 gramos (1 rebanada)
 - ☐ De 30 a 100 gramos
 - ☐ De 100 a 250 gramos
 - ☐ De 250 a 500 gramos
 - ☐ Más de 500 gramos

ANEXO IV: Cuantificación de Penicilina G

A partir de las absorbancias medidas, y considerando la curva de estándares efectuada en el ensayo, el software cuantifica el antibiótico como “Ampicilina” en $\mu\text{g/kg}$ (ppb). Para expresar ese resultado como “Penicilina G en queso” en $\mu\text{g/kg}$ (ppb), hay que descontarle un 15 % al valor original, debido a que existen interferencias de la matriz, las cuales son informadas por el fabricante del kit comercial que indica que en quesos se recupera un 115 % del total de la penicilina presente.

A) Resultados de la cuantificación de penicilina del capítulo 2, sección 3.1 (Tabla 9).

ID	Absorbancia	Ampicilina $\mu\text{g/kg}$ (ppb)	Penicilina G en queso $\mu\text{g/kg}$ (ppb)	Promedio (ppb)	Promedio (C -) (ppb)	DS
BA4	0,255	>80	>80	>80	>80	-
BA4'	0,327	>80	>80			
C5	0,378	78,2	68	62,2	58,9	8,2
C5'	0,428	64,9	56,4			
SC1	0,283	>80	>80	>80	>80	-
SC1'	0,309	>80	>80			
BA3	0,339	>80	>80	>80	>80	-
BA3'	0,325	>80	>80			
C R	0,851	10,3	9,0	10,3	7,0	1,9
C R'	0,756	13,4	11,7			
C+H	0,511	45,7	39,7	49,2	45,9	13,3
C+H'	0,418	67,4	58,6			
C-	1,012	3,8	3,3	3,3	-	0
C- '	1,014	3,7	3,2			

T1, C5, SC1 y BA3: aislamientos de *P. nalgiowense*, C+ H: *P. chrysogenum*, C R: Control de recuperación de penicilina, C -: Control negativo.

B) Cálculos para determinar el porcentaje de recuperación en base a la solución de Penicilina G sódica inyectada en el queso, cuya cantidad teórica fue de 6 ppb:

➔ Penicilina G cuantificada, proveniente de la solución = 7,0 ppb

6 ppb de Penicilina G ➔ 100 %

7,0 ppb de Penicilina G ➔ 116,6 %

Control de recuperación

C) Resultados de la cuantificación de penicilina del capítulo 2, sección 3.2 (Tabla 10)

ID	Absorbancia	Ampicilina µg/kg (ppb)	Penicilina G en queso µg/kg (ppb)	Promedio (ppb)	DS
Día 9 (A)	2,615	< 2,5	< 2,5	< 2,5	-
Día 9 (B)	2,459	< 2,5	< 2,5		
Día 9 (C)	2,652	< 2,5	< 2,5		
Día 14 (A)	1,328	5,9	5,1	5,6	0,7
Día 14 (B)	1,305	6,1	5,3		
Día 14 (C)	1,208	7,3	6,4		
Día 17 (A)	1,114	8,7	7,6	7,0	0,8
Día 17 (B)	1,236	7,0	6,1		
Día 17 (C)	1,143	8,3	7,2		
Día 21 (A)	0,953	12,5	10,8	10,4	0,5
Día 21 (B)	0,964	12,1	10,5		
Día 21 (C)	0,99	11,4	9,9		
Día 28 (A)	0,882	15,1	13,1	14,5	2,5
Día 28 (B)	0,887	14,9	12,9		
Día 28 (C)	0,78	20,0	17,4		
Día 30 (A)	0,635	29,1	25,3	21,5	3,4
Día 30 (B)	0,749	21,7	18,9		
Día 30 (C)	0,719	23,4	20,4		
C - (A)	1,884	< 2,5	< 2,5	< 2,5	-
C - (B)	1,917	< 2,5	< 2,5		
C - (C)	1,788	< 2,5	< 2,5		

Nota: C -: Control negativo.

Cálculo del Porcentaje de disminución promedio respecto al ensayo del capítulo 2, sección 3.2:

$$\text{Promedio de Penicilina G en queso (ppb)} = \frac{5,0 + 19,1 + 10,8 + 3,0}{4} = 9,5$$

$$58,9 \text{ ppb} \rightarrow 100\%$$

$$(58,9 - 9,5) \rightarrow 83,9\%$$

Porcentaje de disminución

D) Resultados de la cuantificación de penicilina del capítulo 3, sección 2.2.6 (Tabla 15)

ID	Absorbancia	Ampicilina µg/kg (ppb)	Penicilina G en queso µg/kg (ppb)	Promedio (ppb)	DS
Día 14 (A1)	2,243	< 2,5	< 2,5	< 2,5	-
Día 14 (A2)	2,125	< 2,5	< 2,5		
Día 14 (B1)	1,947	< 2,5	< 2,5		
Día 14 (B2)	2,073	< 2,5	< 2,5		
Día 21 (A1)	1,403	5,04	4,4	3,6	0,9
Día 21 (A2)	1,418	4,87	4,2		
Día 21 (B1)	1,495	4,01	3,5		
Día 21 (B2)	1,598	2,85	2,5		
Día 30 (A1)	1,385	5,24	4,6	5,1	0,2
Día 30 (A2)	1,449	4,53	3,9		
Día 30 (B1)	1,175	7,8	6,8		
Día 30 (B2)	1,307	6,11	5,3		
C - (A1)	2,235	< 2,5	< 2,5	< 2,5	-
C - (A2)	2,44	< 2,5	< 2,5		
C - (B1)	2,692	< 2,5	< 2,5		
C - (B2)	2,748	< 2,5	< 2,5		

-Cálculo del porcentaje de disminución de penicilina del capítulo 3 respecto al capítulo 2:

$$21,5 \text{ ppb} \rightarrow 100\%$$

$$(21,5 - 5,1) \text{ ppb} \rightarrow 76,3 \%$$

Porcentaje de disminución

ANEXO V: Método de Bradford**Preparación del reactivo azul de Coomassie**

- a) Disolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G 250 en 50 mL de etanol al 96 % v/v.
- b) Agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85% (H_3PO_4 concentrado).
- c) Transferir a un matraz volumétrico de 1 L y llevar a 1 L con agua destilada.
- d) Filtrar la solución por filtración al vacío y almacenar en una botella de reactivo hasta su uso.

Solución stock de seroalbumina bovina (BSA)

- a) Preparar un patrón stock de BSA pesando la misma y se lleva a volumen con agua, hasta obtener una concentración final de 1,0 mg/mL.
- b) Pipetear cantidades variables de la sc. stock de BSA (1,0 mg/mL) para obtener el siguiente rango de concentraciones: 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,015 mg/mL. Llevar a volumen con agua destilada.

Procedimiento experimental

- a) Agregar 200 μL del reactivo Bradford diluido 1/5 a cada pocillo.
- b) Colocar 10 μL de cada patrón (o de muestra) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. (Realizar tripicados para cada muestra). Mezclar cuidadosamente con la micropipeta evitando la formación de burbujas.
- c) Incubar a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos (no más de una hora, la absorbancia aumentará con el tiempo).
- d) Medir la absorbancia a 595-465 nm en un lector de microplacas.

Utilizar el mismo procedimiento para la determinación de proteínas en la muestra problema.

Preparación de la curva de calibración

- a) Graficar la absorbancia vs. μg de proteína para cada cantidad de BSA.
- b) Determinar la cantidad de proteína en cada una de las muestras incógnitas.

ANEXO VI: Cuestionario utilizado para la prueba de aceptación por consumidores

Bienvenido/a a esta sesión de degustación!!

Por favor **LEA ATENTAMENTE** y conteste **TODAS** las preguntas que se encuentran más abajo.

A continuación deberá **OBSERVAR, OLER y DEGUSTAR** una porción de este queso.

ATENCIÓN: Le pedimos, por favor, **NO CONSUMIR MÁS DE LA MITAD DE LA MUESTRA INICIAL** con el fin de poder conservar una cantidad suficiente para responder todas las preguntas del cuestionario

1- Considerando este queso de **MANERA GLOBAL** (teniendo en cuenta la **APARIENCIA** del mismo, pelado y sin pelar, su **OLOR, SABOR y TEXTURA**), indique cuánto le gusta, marcando con una cruz donde corresponda:

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Me disgusta muchísimo				No me gusta Ni me disgusta				Me gusta muchísimo

2- Considerando **SOLO** la **APARIENCIA** del queso **SIN PELAR**, indique cuánto le gusta, marcando con una cruz donde corresponda.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Me disgusta muchísimo				No me gusta Ni me disgusta				Me gusta muchísimo

3- Considerando **SOLO** la **APARIENCIA** del queso **PELADO**, indique cuánto le gusta, marcando con una cruz donde corresponda.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Me disgusta muchísimo				No me gusta Ni me disgusta				Me gusta muchísimo

AHORA PUEDE DEGUSTAR!!!

4- Considerando **SOLO** el **OLOR** y el **SABOR, HUELA y PRUEBE** el queso e indique cuánto le gusta, marcando con una cruz donde corresponda.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Me disgusta muchísimo				No me gusta Ni me disgusta				Me gusta muchísimo

5- Considerando **SOLO** la **TEXTURA** en **BOCA, PRUEBE** el queso e indique cuánto le gusta, marcando con una cruz donde corresponda.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Me disgusta muchísimo				No me gusta Ni me disgusta				Me gusta muchísimo

6- ¿Cómo describiría usted a este queso?

Marque con una cruz todas las palabras que considera que se aplican a este producto.

Práctico	☐	Salado	☐	Duro	☐
Húmedo	☐	Seco	☐	Convencional	☐
Ácido	☐	Blando	☐	Sabor a hongo	☐
Amargo	☐	Sabor fresco	☐	Sabor a viejo/rancio	☐
Elástico	☐	Innovador	☐	Atractivo	☐
		Ideal para comer en picadas	☐	Desagradable	☐

7- ¿Compraría este queso? Marque con una cruz

☐	☐	☐	☐	☐
Definitivamente no lo compraría	Probablemente no lo compraría	Quizás sí, quizás no lo compraría	Probablemente lo compraría	Definitivamente lo compraría

¡Muchas gracias por participar de esta degustación!

Ahora le pedimos, por favor, contestar las siguientes preguntas personales:

Edad:**8-Estudios:**

Primario	☐
Secundario	☐
Terciario	☐
Universitario	☐

Sexo:**9 - ¿Quién realiza las compras en su hogar? Marque con una cruz**

Solamente yo	☐
Principalmente yo, a veces alguien mas	☐
Yo y alguien más por igual	☐
Principalmente otra persona, a veces yo	☐
Siempre otra persona	☐

10 - ¿Con que frecuencia consume queso?

Nunca	☐
Esporádicamente	☐
Una vez por mes	☐
Más de una vez por mes	☐
Una vez por semana	☐
Más de una vez por semana	☐

11 - ¿Dónde compra habitualmente el queso que consume?

Quesería	☐
Mercado de barrio	☐
Hipermercado	☐
Otros	☐

12 - Marque con una cruz las variedades de queso que consume:

(Más de una opción es posible)

☐	☐	☐	☐	☐
Azul (Tipo Roquefort)	Brie/ Camembert	Cremoso/ Port Salut	Mozzarella	Pategrás (Mar del Plata)
☐	☐	☐	☐	
Reggianito (para rallar)	Barra (queso de máquina)	Queso Untable	Otros	

13- ¿Qué tiene en cuenta a la hora de elegir el queso que compra? (Más de una opción es posible)

☐	☐	☐	☐
Precio	Calidad	Aspecto	Beneficio para la salud
	☐	☐	☐
	El uso	Origen del producto	Otros

ANEXO VII: Ensayo Descriptivo Cuantitativo

A) Perfil sensorial obtenido para los quesos contenidos en tripa con desarrollo superficial de *P. nalgiovense*, evaluados a los 14, 21 y 35 días de maduración. Capítulo IV, sección 3.4.2.3.

	Condición	Int. Olor	Int. Aroma	Elasticidad	Firmeza	Imp. Humedad	Amargo
Día 14	C 12 °C	3,04 ^a	2,86 ^{ab}	5,04 ^c	3,75 ^{abc}	3,11 ^b	0
	Q 12 °C	4,79 ^d	3,57 ^c	4,82 ^{bc}	3,75 ^{abc}	3,36 ^b	0
Día 21	C 12 °C	3,08 ^a	2,75 ^a	4,6 ^{3b}	4,08 ^{bcd}	3,42 ^b	0
	Q 12 °C	3,54 ^{bc}	3,08 ^{ab}	4,88 ^{bc}	4,17 ^{cd}	3,33 ^b	0
	C 5 °C	3,0 ^a	2,75 ^a	4,88 ^{bc}	4,29 ^d	3,29 ^b	0
	Q 5 °C	3,38 ^b	2,92 ^{ab}	4,75 ^{bc}	4,46 ^d	3,38 ^b	0
Día 35	C 5 °C	3,30 ^{ab}	3,30 ^{bc}	1,70 ^a	4,20 ^{cd}	2,30 ^a	1,25 ^a
	Q 12 °C	3,95 ^c	3,10 ^{ab}	4,55 ^b	3,55 ^a	4,05 ^c	1,68 ^a
	Q 5 °C	3,80 ^{bc}	2,70 ^a	4,80 ^{bc}	3,60 ^{ab}	3,95 ^c	1,45 ^a

Medias seguidas de diferentes letras minúsculas en la misma columna indica diferencia significativa (test de Tukey test. $p < 0,05$).

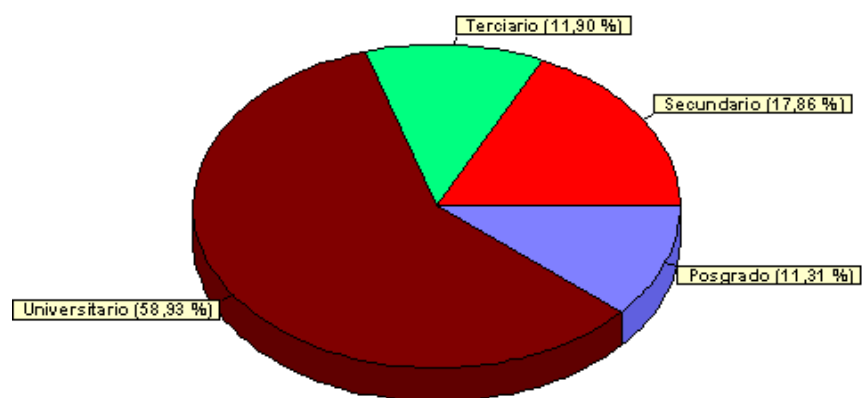
B) Perfil sensorial obtenido para los quesos contenidos en tripa con desarrollo superficial de *P. nalgiovense*, evaluados a los 14, 21, 30, 35 y 43 días de maduración. Capítulo V, sección 3.3.3.

Análisis	Día 14	Día 21	Día 30	Día 35	Día 43
Int. Olor	3,83 ^{bc}	3,75 ^c	3,94 ^{bc}	4,14 ^{ab}	4,47 ^a
Int. Aroma	3,46	3,17	3,47	3,5	3,63
Elasticidad	4,13 ^a	4,38 ^a	4,47 ^a	2,89 ^b	3,06 ^b
Firmeza	3,79 ^b	4,54 ^a	4,34 ^a	4,36 ^a	4,66 ^a
Friabilidad	3,58 ^{ab}	3,38 ^{abc}	3,19 ^{bc}	3,75 ^a	2,47 ^d
Adherencia	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Solubilidad	3,46	3,42	3,34	3,5	3,72
Imp. Humedad	3,75	3,38	3,53	3,29	3,19
Dulce	2,42	1,63	1,94	2,25	1,91
Salado	2,58 ^b	2,0 ^a	2,22 ^a	2,14 ^a	1,97 ^a
Ácido	2,25	1,79	1,88	1,89	2,03
Amargo	2,25	2,08	2,13	2,32	2,22
Picante	1,09	1,04	1,06	1,04	1,19
Persistencia	3,0	2,92	3,03	3,0	3,0

Medias seguidas de diferentes letras minúsculas en el mismo renglón indica diferencia significativa (test de Tukey test. $p < 0,05$).

ANEXO VIII: Resultados de la encuesta con consumidores

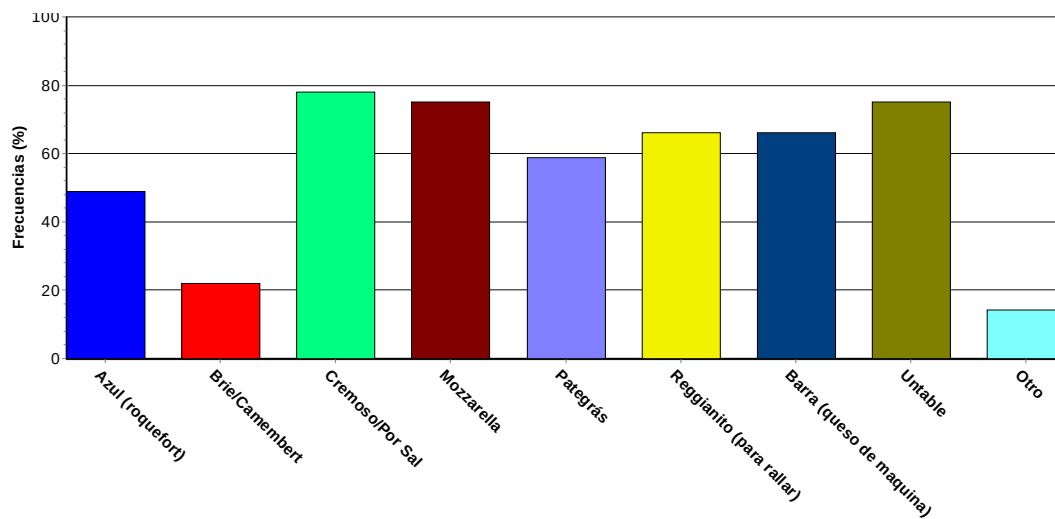
A) Nivel de estudios de los consumidores



B) Frecuencia de consumo de queso



C) Variedades de queso consumidos



D) Qué tiene en cuenta al elegir comprar un queso

