

EVALUACIÓN DE DIFERENTES ESTRATEGIAS PARA ACELERAR LA MADURACIÓN DE QUESO REGGIANITO



INTRODUCCIÓN

La maduración de los quesos es la etapa más larga del proceso productivo general. Mientras que los trabajos de transformación de la leche en cuajada en tina se miden en minutos, la maduración se mide en días, meses o años. En particular en el caso de quesos duros, este período puede durar entre seis meses y dos años. El incremento de la proteólisis y peptidólisis mediante diversas estrategias tecnológicas, ya sea a través de operaciones simples o la aplicación de tecnologías innovadoras, aparecen como muy favorables desde el punto de vista de la aceleración de la maduración y, por consiguiente, de la disminución de los costos de producción de un alimento de elevado valor agregado (Fox *et al.*, 2000; Zalazar *et al.*, 2006). Lo que se busca es reducir un tiempo de espera significativo en el costo del producto, sin alterar la bioquímica de la maduración. Se han ensayado diversas estrategias para acelerar la maduración de quesos duros, como el queso Reggiano. Dentro de éstas, se puede mencionar el aumento de la temperatura de maduración (Ceruti *et al.*, 2012; Sihufe *et al.*, 2010). Si bien los resultados obtenidos han sido muy prometedores, esta estrategia no ha sido aún utilizada en la industria quesera. Otra estrategia involucra la adición de enzimas exógenas, como

Costabel, L.^{1*}; Bergamini, C.²; Vaudagna, S.^{3,4}; Cuatrin, A.¹; Audero, G.¹; Hynes, E.²

¹INTA EEA Rafaela. Rafaela, Santa Fe, Argentina.

²Instituto de Lactología Industrial - UNL/CONICET. Santa Fe, Argentina.

³Instituto Tecnología de Alimentos (ITA) - INTA Castelar. Castelar, Buenos Aires, Argentina.

⁴CONICET. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*costabel.luciana@inta.gov.ar

proteasas, carboxypeptidasas y lipasas (Azarnia *et al.*, 2011; El Soda y Awad, 2003; Fox *et al.*, 2000; Kailasapathy y Lam, 2005; Sihufe *et al.*, 2011; Wilkinson y Kilcawely, 2005). En el caso de quesos duros, el uso de lipasas resultó muy satisfactorio. Muchas lipasas han sido utilizadas para acelerar la maduración de los quesos duros. En general, el uso de proteasas no ha sido muy aconsejable, debido a que causan modificaciones en el desarrollo de la proteólisis y producen defectos en la textura y el sabor de los quesos (Wilkinson y Kilcawley, 2005). Además, las enzimas son un ingrediente de alto costo y las pérdidas de las mismas en el suero de quesería son elevadas (Upadhyay y McSweeney, 2003; Wilkinson y Kilcawley, 2005). Por esta razón, una de las estrategias planteadas en este trabajo consistió en incrementar la actividad de enzimas que están naturalmente presentes en los quesos, como son la enzima coagulante y la plasmina. El coagulante agregado a la leche para producir la transformación casearia es capaz de intervenir en mayor o menor medida en la degradación de las caseínas, según el tipo de queso (Hynes *et al.*, 2004a; Bansal *et al.*, 2007;). Asimismo, la plasmina —una proteasa nativa de la leche— degrada algunos de los componentes individuales de las caseínas durante la maduración de los productos (Farkye y Fox, 1992; Fox *et al.*, 2000; Ismail y Nielsen, 2010). El incremento de tales actividades por modificaciones tecnológicas, puede conducir a una proteólisis más rápida o de mayor avance en los productos finales (Farkye y Fox, 1992; Hynes *et al.*, 2004b).

También en este trabajo, se planeó el tratamiento de altas presiones hidrostáticas (APH) como una estrategia innovadora que puede ser utilizada con el objetivo principal de disminuir el período de maduración de los quesos (O'Reilly *et al.*, 2001; Trujillo *et al.*, 2002; San Martín González *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue acelerar la maduración de queso Reggianito mediante modificaciones de la tecnología tradicional, destinadas a incrementar la proteólisis y peptidólisis. Las estrategias evaluadas fueron las siguientes: i) incremento de la actividad de enzimas proteolíticas no microbianas, la enzima coagulante residual y la plasmina, a través de una modificación de la temperatura de cocción en presencia de dos coagulantes diferentes, y ii) aplicación de la tecnología de altas presiones hidrostáticas (APH).

MATERIALES Y MÉTODOS

ELABORACIÓN DE LOS QUESOS

En la primera experiencia, se estudió la influencia del tipo de coagulante y de la temperatura de cocción sobre la proteólisis y la actividad de la enzima coagulante residual y de la plasmina. Se utilizaron dos temperaturas de cocción diferentes: 50 y 56°C, y dos tipos de coagulantes: quimosina bovina (CH) y quimosina de camello (CA), ambas obtenidas por fermentación de microorganismos modificados genéticamente. Se elaboraron quesos Reggianito miniatura, utilizando un conjunto de tinas individuales, y las muestras se almacenaron por 90 días a 12°C. En la segunda experiencia, se estudió el efecto del tratamiento con APH -aplicando diferentes combinaciones presión-tiempo de mantenimiento- sobre la composición química, el pH, los recuentos microbiológicos, la proteólisis, la peptidólisis, la actividad de enzimas proteolíticas no microbianas, la textura, los parámetros cromáticos y los atributos sensoriales del queso Reggianito. Para ello, se elaboraron quesos Reggianito miniatura en la miniplanta quesera del INTA EEA Rafaela, a los cuales se les aplicó presiones de 100 MPa durante 5 (T1) y 10 (T2) min y 400 MPa durante 5 (T3) y 10 (T4) min a 20°C el día posterior a la elaboración. Algunos quesos no fueron tratados con APH, los que se consideraron como controles (C). Todos los quesos se maduraron durante 90 días a 12°C.

ANÁLISIS DE LOS QUESOS

Los quesos de ambas experiencias fueron analizados al inicio, a los 45 y a los 90 días de maduración. Se realizaron análisis de composición de proteínas totales, grasa, materia seca y pH de acuerdo a métodos de referencia (FIL-IDF N° 20 B 1993; FIL-IDF N° 152 A 1997; FIL-IDF N° 4 A, 2004; Bradley *et al.*, 1993, respectiva-

mente), recuentos microbiológicos (recuento total de flora láctica termofílica en APC-leche (Candiotti *et al.*, 2002) y recuentos de microorganismos en MRS incubados a 30 y 45°C en los quesos de la segunda experiencia (Corsetti *et al.*, 1998), actividad de plasmina (Richardson y Pearce, 1981) y enzima coagulante residual (Hurley *et al.*, 1999), y seguimiento de la proteólisis por medio de análisis de las fracciones nitrógeno soluble (Gripon *et al.*, 1975; Hynes *et al.*, 2003), electroforesis en gel de poliacrilamida aplicando un sistema de gel discontinuo en el cual la concentración de acrilamida de 4% para el gel de apilamiento, y de 7,5% para el gel de separación (Hynes *et al.*, 1999) y péptidos solubles en agua por HPLC (Hynes *et al.*, 2003). En los quesos de la segunda experiencia, se determinaron además los aminoácidos libres totales y aminoácidos libres, utilizando un analizador de aminoácidos (Cattaneo *et al.*, 2014), y se realizaron análisis de textura y color por métodos instrumentales (Costabel, 2015) y sensoriales con panel entrenado (Meilgaard *et al.*, 2007).



CALCIO

- Carbonato de Calcio Pesado
- Carbonato de Calcio Liviano
- Carbonato de Calcio con densidades específicas

Calcio para compresión directa:

- Carbonato de Calcio CD
- Citrato de Calcio CD

Molinos y Panificados – Alfajores y Galletitas
 Leches y Yogures - Dulces y Postres - Productos Dietéticos
 Fármacos y Cosméticos - Uso veterinario – Alimento balanceado

- Certificación GMP: Good Manufacturing Practice
- Certificación ANMAT: Ingredientes Farmacéuticos Activos

CAFUNE S.A.: (54 11) 4918-2677 / 2680
 carbofarma@carbofarma.com.ar

www.carbofarma.com.ar

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la primera experiencia, la concentración de grasa, proteínas, humedad, plasmina y plasminógeno fueron procesadas por análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Para las demás variables, el tiempo de maduración, el tipo de coagulante utilizado y las diferentes temperaturas de cocción de los diferentes tratamientos aplicados fueron seleccionados como factores principales para el análisis. Se utilizó un diseño factorial para medias repetidas en el tiempo (PROC MIXED, SAS Ver. 9.2, SAS Institute, Inc., Cary, Estados Unidos). En el caso en que la interacción resultó significativa ($P \leq 0,05$), se procedió a la "apertura" de la misma. Esto consiste en probar las hipótesis correspondientes a los efectos simples de uno de los factores para cada uno de los niveles del otro factor, considerando como término de error el correspondiente al modelo completo. Posteriormente, para cada efecto simple que resultó significativo se aplicó una prueba de comparaciones múltiples (Prueba de LSD) para detectar grupos de niveles homogéneos ($\alpha = 0,05$).

En la segunda experiencia, los resultados de composición química, pH, recuentos microbiológicos, actividad coagulante residual y de plasmina, fracciones nitrogenadas, aminoácidos libres y textura fueron analizados utilizando un diseño factorial para medidas repeti-

das en el tiempo descripto anteriormente (PROC MIXED, SAS Ver. 9.2, SAS Institute, Inc., Cary, Estados Unidos). El tiempo de maduración y los diferentes tratamientos aplicados, incluyendo el control, fueron seleccionados como factores principales para el análisis. Los perfiles peptídicos se analizaron por métodos multivariados, incluyendo una metodología denominada lógica difusa ("fuzzy approach") para la pre-reducción de los datos obtenidos por HPLC (Piraino *et al.*, 2004). El nuevo set de datos fue entonces analizado por análisis de componentes principales (PCA), usando la aplicación SPSS® (SPSS Inc., Chicago, IL) (Pripp *et al.*, 2000 a,b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA EXPERIENCIA

La temperatura de cocción influyó sobre la actividad coagulante residual, verificándose que los quesos en los cuales la misma fue de 50°C retuvieron una actividad significativamente mayor ($p < 0,05$) que los tratados a 56°C (Tabla 1). Por el contrario, la temperatura de cocción no modificó la actividad de la plasmina.

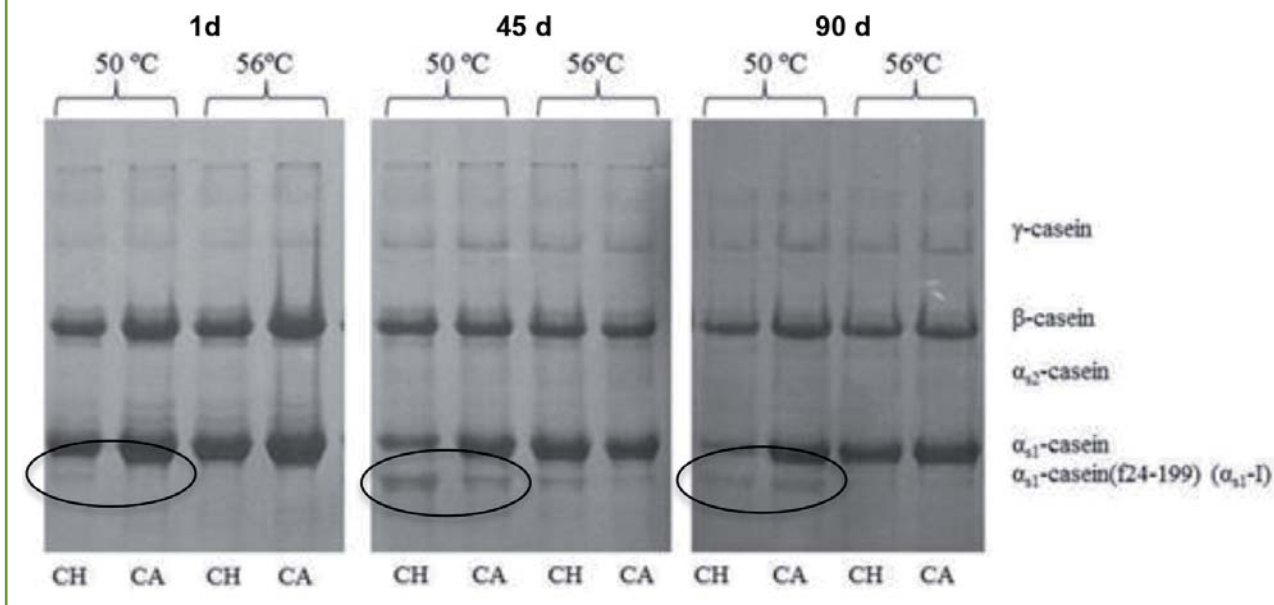
Durante la maduración se verificó una reactivación de esta enzima. La reactivación fue más importante cuando los quesos fueron tratados a mayor temperatura. Estudios previos realizados en queso Reggiano hallaron una tendencia similar, aunque incluían tempe-

TABLA 1 - Actividad coagulante residual (nmol producto h⁻¹ g⁻¹), pH y fracciones NS en los quesos expresadas como porcentaje del N total durante la maduración (promedio ± DS de las cuatro réplicas de elaboración de quesos) a diferentes temperaturas de cocción y para los dos coagulantes evaluados.

Item	Tiempo	Quesos			
		Quimosina de Camello		Quimosina bovina	
		50 °C	56 °C	50 °C	56 °C
Actividad coagulante	6	183,8 ± 46,8	63,2 ± 28,3	124,2 ± 15,8	56,8 ± 39,3
	50	269,8 ± 64,1	132,1 ± 34,4	194,0 ± 74,6	169,9 ± 30,6
	90	321,6 ± 48,2	276,1 ± 30,4	326,4 ± 66,8	249,2 ± 35,6
NS-pH 4,6	6	5,0 ± 0,6	3,1 ± 1,5	5,0 ± 0,2	4,7 ± 0,1
	50	7,7 ± 0,4	6,1 ± 0,9	9,2 ± 0,8	6,6 ± 0,2
	90	8,9 ± 0,2	7,8 ± 1,9	10,5 ± 0,7	10,2 ± 1,7
NS-TCA	6	2,8 ± 0,3	1,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1
	50	6,7 ± 0,3	2,7 ± 0,8	7,0 ± 0,5	5,2 ± 0,6
	90	7,7 ± 0,1	4,9 ± 1,1	8,7 ± 0,3	6,4 ± 0,1
NS-PTA	6	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,4	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	50	3,2 ± 1,0	1,7 ± 0,3	3,3 ± 0,4	2,2 ± 0,1
	90	4,5 ± 0,7	2,5 ± 0,7	5,6 ± 0,1	3,4 ± 0,1

Nota: Para la actividad de quimosina, los valores resaltados muestran que la actividad coagulante al final de la maduración fue mayor que en los quesos recién elaborados.

FIGURA 1 - Perfil electroforético de la fracción insoluble en agua a pH 4,6 durante la maduración. Los óvalos muestran la mayor hidrólisis de la caseína α_{s1} en los quesos cuya T de cocción fue 50°C



raturas de cocción muy elevadas, de hasta 60°C (Hynes *et al.*, 2004b). La proteólisis primaria también resultó afectada por la temperatura de cocción. Se observó que la hidrólisis de la caseína α_{s1} , la cual es mediada principalmente por la quimosina, fue menor en los quesos cuya temperatura de cocción fue de 56°C (Figura 1).

Los resultados de los perfiles electroforéticos concuerdan con los obtenidos para la actividad coagulante residual. Los quesos de 50°C, que mostraron mayor actividad coagulante residual, también mostraron una mayor degradación de la caseína α_{s1} con una consiguiente mayor producción del péptido α_{s1} -I (f24-199). Además, el contenido de nitrógeno en las fracciones solubles resultó menor en los quesos tratados a 56°C que en los tratados a 50°C (Tabla 1). Se observó una influencia significativa ($p < 0,05$) del tipo de coagulante utilizado, especialmente en las fracciones nitroge-

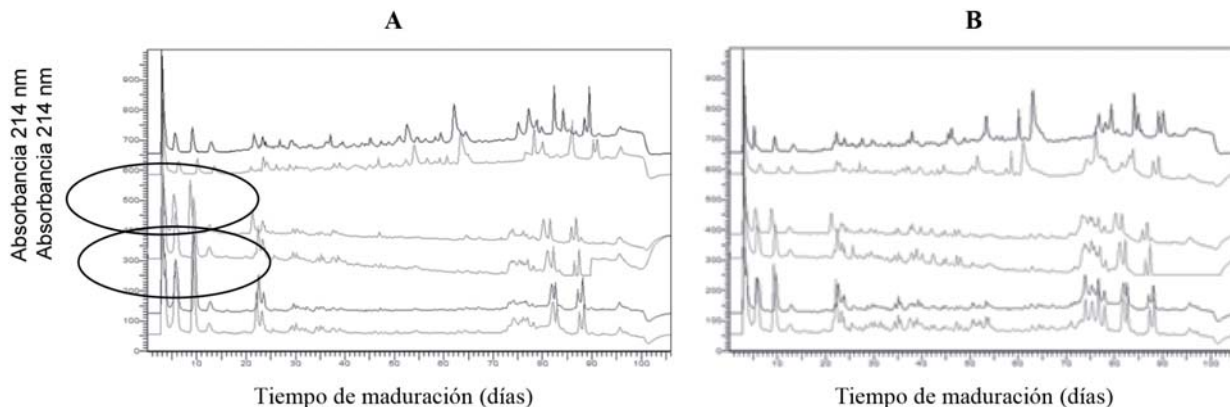
nadas y en los perfiles peptídicos (Figura 2); ambos indicadores mostraron que la quimosina de camello fue levemente menos proteolítica que la quimosina bovina, lo que se evidenció principalmente a los 56°C. Sin embargo, esas diferencias resultaron menores que las debidas a la temperatura de cocción.

Comparando el tipo de coagulante ensayado, se pudo observar que los quesos elaborados con quimosina de camello presentaron menor proteólisis durante la maduración, lo cual fue verificado por menores niveles de ciertos índices de proteólisis en los mismos. Una tendencia similar fue obtenida por Bansal *et al.* (2009) en quesos Cheddar elaborados con estas mismas enzimas coagulantes, al comprobar que la utilización del coagulante de camello condujo a menores niveles de proteólisis en comparación con la quimosina bovina.

Luis Viale 1867 - CABA - Argentina | (5411) 4584-8888 | www.piedmont.com.ar | piedmont@piedmont.com.ar

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification

FIGURA 2 - Perfiles peptídicos de los quesos durante la maduración. Quesos elaborados con quimosina de camello (CA) y quimosina bovina (CH) A) a 50°C y B) a 56°C. Los óvalos marcan la menor proteólisis evidenciada a los 56°C cuando se utilizó el coagulante CA comparado con CH.



SEGUNDA EXPERIENCIA

El tratamiento con APH no modificó la composición química de los quesos ni el pH, pero se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los recuentos microbiológicos. En efecto, se verificó que los quesos tratados a 400 MPa presentaron al inicio de la maduración, recuentos de los microorganismos del fermento inferiores a los de los quesos controles y tratados a 100 MPa (Tabla 2). La disminución en los recuentos debido al tratamiento con APH, puede indicar inhibición del crecimiento de los microorganismos, por daño en la pared

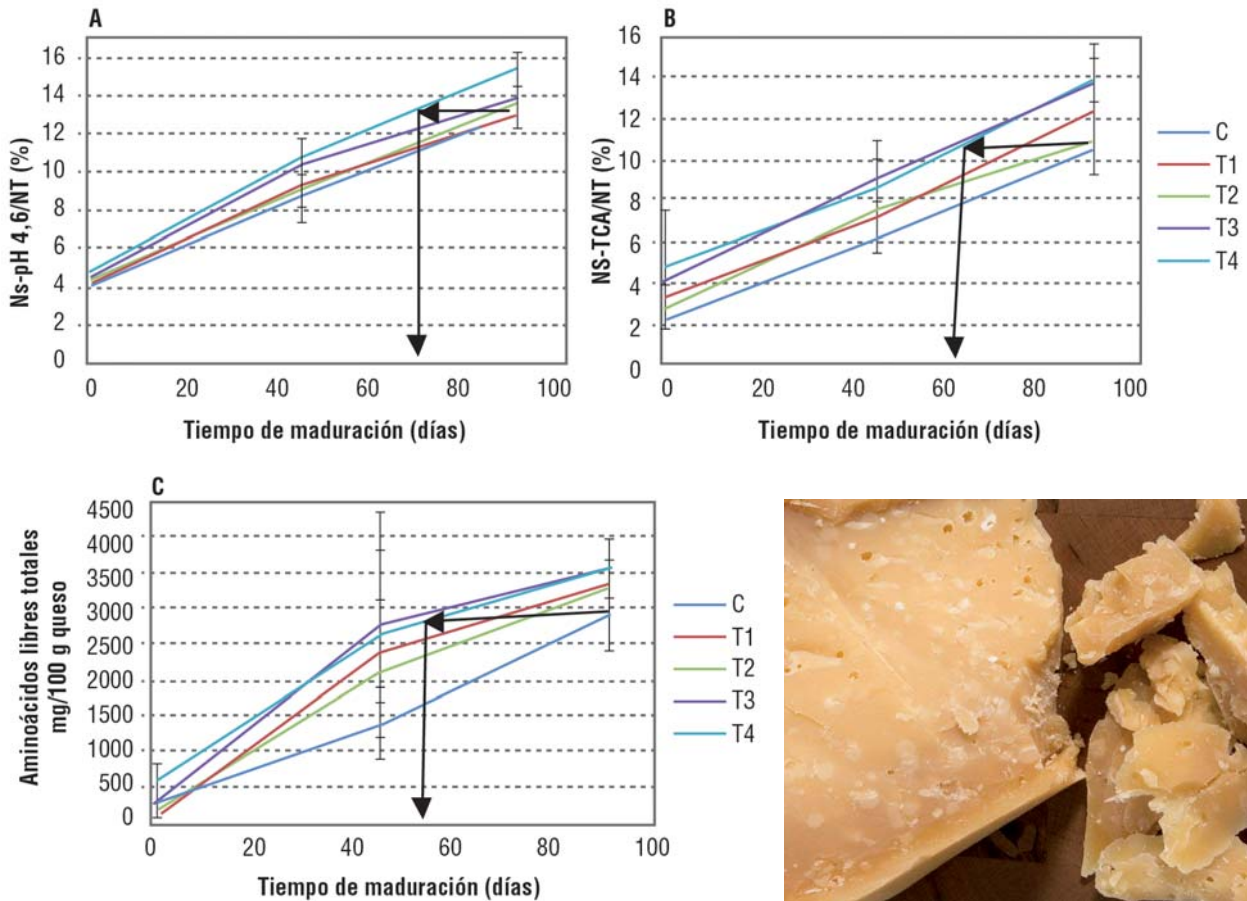
celular, o la autólisis del fermento (Malone *et al.*, 2002; O'Reilly *et al.*, 2002). El daño en la pared celular puede ser sub-lethal, y por lo tanto, los microorganismos pueden recuperarse y multiplicarse luego de la presurización (Wick *et al.*, 2004; Moschopoulou *et al.*, 2010).

Los quesos tratados a 400 MPa durante 10 min exhibieron una actividad de plasmina significativamente mayor ($p < 0,05$) que el resto, mientras que no se observaron diferencias debidas al tratamiento con APH en la actividad coagulante residual. El seguimiento de la proteólisis mostró que los quesos tratados a 400 MPa

TABLA 2 - Valores (promedio \pm error estándar de las cuatro réplicas de quesos) de lactobacilos termófilos y mesófilos (log10cfu/g), actividad de plasmina (nmoles of AMC liberados por g de materia seca), actividad coagulante (nmol de producto liberado por h y por g de materia seca), aminoácidos libres totales (mg de AA por 100 g de queso).

Item	Tratamiento APH						SE
	Tiempo de maduración	C	T1	T2	T3	T4	
Lactobacilos termófilos	1	8,72	8,58	8,89	7,69	6,89	0,32
	45	3,41	3,32	3,60	3,12	3,35	
	90	0,80	0,83	0,83	0,85	0,84	
Lactobacilos mesófilos	1	8,04	8,13	8,67	7,82	7,65	0,16
	45	6,79	6,78	6,66	7,20	7,30	
	90	6,29	6,69	6,72	7,01	6,91	
Actividad de plasmina	1	6,04	7,80	8,37	9,63	18,83	0,60
	45	3,96	5,75	5,64	8,24	10,11	
	90	3,73	5,28	5,88	10,32	12,91	
Actividad coagulante	1	158,85	164,59	157,87	165,90	182,28	24,04
	45	196,71	213,28	253,30	259,84	292,81	
	90	198,86	216,80	190,22	203,03	202,46	

FIGURA 3 - Evolución del NS-pH 4,6 y del NS-TCA (A y B) ambos expresados en relación al NT, y de los AAL totales (C) en función del tiempo de maduración. Las flechas señalan el tiempo al cual las muestras tratadas con APH alcanzaron los mismos valores de ambas fracciones solubles que los quesos controles.

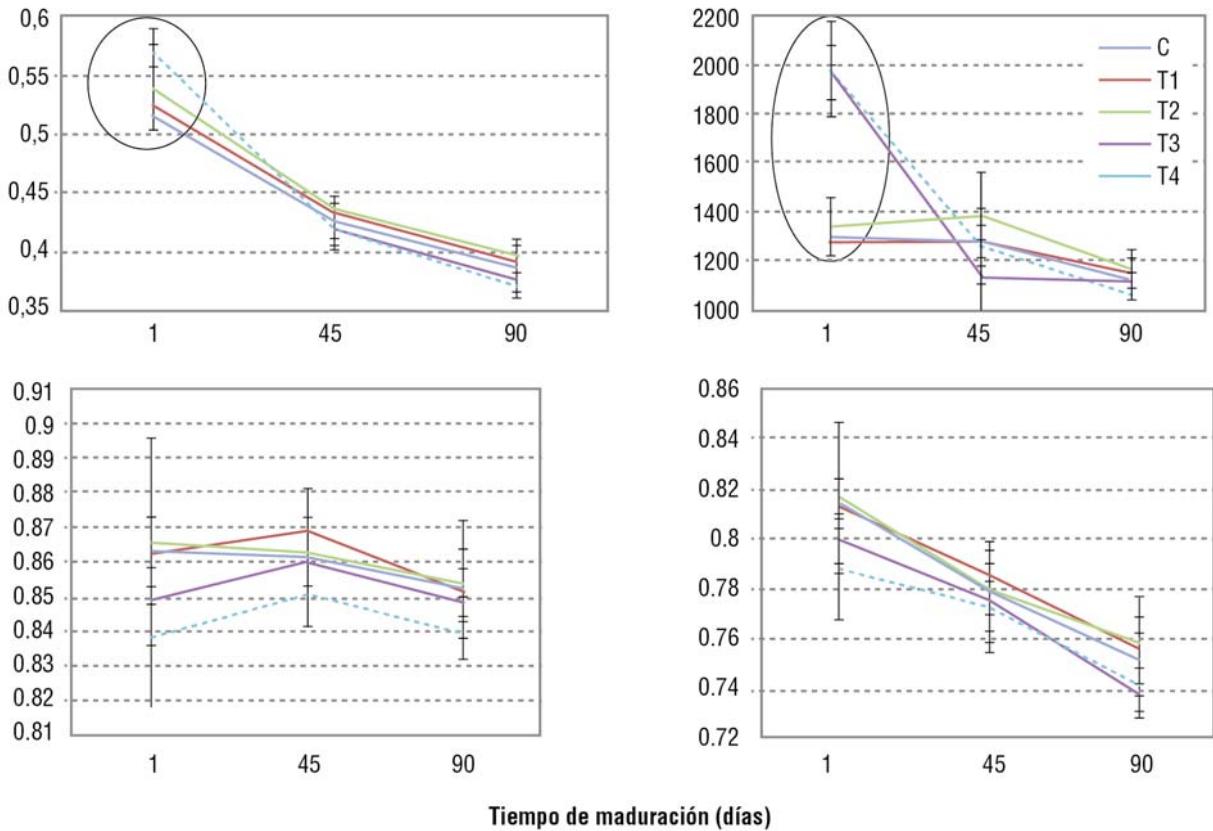


presentaron una mayor hidrólisis de las caseínas α s1 y β y niveles significativamente mayores ($P < 0,05$) de nitrógeno en las fracciones solubles (Figura 3). Los resultados del análisis de los perfiles peptídicos también mostraron una aceleración de la maduración atribuible a la aplicación de los tratamientos a 400 MPa (datos no presentados). Se observó que las muestras tratadas a 400 MPa durante 10 min alcanzaron aproximadamente a los 60 días de maduración los mismos niveles de nitrógeno en las fracciones solubles y aminoácidos libres totales que las muestras control al final de la maduración (90 días) (Figura 3). Los tratamientos a 100 MPa, independientemente del tiempo de mantenimiento de la presión, no provocaron cambios relevantes en ninguno de los parámetros evaluados con respecto al control, a excepción de un incremento en el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (NS-TCA).

En este trabajo, en general, los indicadores de proteólisis evaluados demostraron que esta transformación bioquímica principal de la maduración fue afectada por el tratamiento con APH. El efecto resultó más

notorio cuando el nivel de presión aplicada fue 400 MPa, ya que se verificó en indicadores no específicos como la fracción soluble a pH 4,6, y se correspondió con los resultados de la electroforesis, con una mayor intensidad en la fracción α s1-I y en las fracciones de γ -caseínas, especialmente a los 45 días de maduración. La mayor intensidad de γ -caseínas se correspondió con la mayor actividad de la plasmina en los quesos en los que se aplicó esa presión. También los perfiles peptídicos de las muestras tratadas a mayor presión se diferenciaron del resto, lo que evidenció una mayor proteólisis secundaria en los quesos T3 y T4. El esfuerzo y la deformación a la fractura de los quesos tratados a 400 MPa fueron mayores que en el resto de las muestras al inicio de la maduración, mientras que esos quesos presentaron valores inferiores de elasticidad y la cohesividad durante todo el periodo de almacenamiento (Figura 4). El mantenimiento de los valores de estas propiedades durante el almacenamiento puede atribuirse a la mayor proteólisis evidenciada en los quesos tratados a 400 MPa.

FIGURA 4 - Evolución de la deformación a la fractura (ϵ_f) (A), esfuerzo a la fractura (σ_f) (B), elasticidad (C) y cohesividad (D) durante el tiempo de maduración de los quesos control y tratados. Cada punto representa un valor promedio de las cuatro réplicas de elaboración. Los óvalos muestran las diferencias significativas ($p < 0,05$) en ϵ_f y σ_f entre las muestras tratadas a 400 y el resto, al inicio de la maduración.



Los parámetros cromáticos no resultaron afectados por el tratamiento con APH. El panel entrenado, en las sesiones de análisis sensorial, señaló que a los 45 días de maduración, los quesos tratados a 400 MPa presentaron valores más intensos que las demás muestras en los atributos gusto salado y flavour típico. En un estudio previo, en el cual se evaluaron los atributos sensoriales que caracterizan a un queso Reggiano maduro, se encontró que el flavour genuino y gusto salado fueron los más importantes (Ceruti *et al.*, 2014). Los quesos tratados a la mayor presión (400 MPa), alcanzan a los 45 días de maduración una intensidad superior a los quesos controles y tratados a 100 MPa. En síntesis: los atributos que caracterizan a un queso maduro fueron más intensos en los quesos tratados a 400 MPa a los 45 días de maduración que en los controles y los tratados a 100 MPa. El efecto del tiempo de mantenimiento de la presión no fue significativo en los parámetros de textura y en los atributos sensoriales evaluados, a excepción de la elasticidad, en la cual las muestras tratadas a 400 MPa durante 10 min tuvieron un valor menor que las tratadas durante 5 min.

CONCLUSIONES

Los resultados de la primera experiencia permiten concluir que una modificación sencilla en la tecnología de elaboración de queso Reggiano, como la disminución de la temperatura de cocción, fue eficaz para incrementar la actividad residual de la enzima coagulante, con la consiguiente aceleración de la proteólisis y peptidólisis en los quesos. El reemplazo de la quimosina bovina por quimosina de camello no presentó ventajas en este sentido.

En cuanto a la utilización de la tecnología APH, se evidenció que un tratamiento de 400 MPa durante 10 min fue efectivo para acelerar la maduración del queso Reggiano a través del incremento de la proteólisis y la peptidólisis. Los quesos tratados a la mayor presión mostraron una aceleración en el desarrollo de los atributos sensoriales de un queso maduro.

En las dos estrategias evaluadas se produjo un incremento en la velocidad de maduración relacionado con el incremento de la proteólisis y el incremento de la actividad de enzimas habitualmente presentes en la matriz alimentaria, como el coagulante y la plasmina. Asimismo, se obtuvieron productos de buena calidad global y no se encontraron defectos.

BIBLIOGRAFÍA

- Azarnia, S. M.; Lee, B.; St-Gelais, D.; Kilcawley K.; y Noroozi, E. (2011) Effect of free and encapsulated recombinant aminopeptidase on proteolytic indices and sensory characteristics of Cheddar cheese. *LWT-Food Sci. Technol.* 44: 570-575.
- Bansal, N.; Fox, P., y McSweeney P.H.L. (2007). Factors affecting the retention of rennet in cheeses curd. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9219-9225.
- Bansal, N.; Drake, M. A.; Piraino, P.; Broe, M. L.; Harboe, M.; Fox, P. F. y McSweeney, P. H. L. (2009). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 19:510-517.
- Bradley, R. L.; Arnold, E.; Barbano, D. M.; Semerad, R. G.; Smith, D.E. y Vines, B. K. (1993). Chemical and physical methods. En: *Standard methods for the examination of dairy product.* (Ed.: Marshall, R.). American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos, pág. 433-531.
- Candioti, M. C.; Hynes, E. R.; Quiberoni, A.; Palma, S. B.; Sabbag, N. y Zalazar, C. A. (2002). Reggiano cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *Int. Dairy J.* 12: 923-931.
- Cattaneo, F., J. E. Sayago, M. R. Alberto, I. C. Zampini, R. M. Ordoñez, V. Chamarro, A. Pazos, and M. I. Isla. 2014. Anti-inflammatory and antioxidant activities, functional properties and mutagenicity studies of protein and protein hydrolysate obtained from *Prosopis alba* seed flour. *Food Chem.* 161: 391-399
- Ceruti, R. J.; Zorrilla, S. E.; Sabbag, N. G.; Costa, S. C. y Sihufe, G. A. (2014) Effect of increased initial ripening temperature on the sensory characteristics of Reggiano cheese. *Int. J. Dairy Technol* 67: 1-8.
- Ceruti, R. J.; Zorrilla, S. E. y Sihufe, G. A. (2012). The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggiano cheese. *Food Res. Int.* 48: 34-40.
- Corsetti, A.; Gobetti, M.; Smacchi, E.; DeAngelis, M. y Rossi, J. (1998) Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese. *J. Dairy Res.* 65: 631-642.
- Costabel, L.M. (2015) Estrategias tecnológicas para aumentar la proteólisis y peptidólisis en quesos duros. Tesis doctoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- El Soda, M. y Awad, S. (2003) Accelerated cheese ripening. En *Encyclopedia of Dairy Science*. Volume One. (Eds: Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; McSweeney, P.L.H.) Academic Press, Kidlington, Reino Unido. pág. 799-805
- Farkye, N. y Fox, P. (1992) Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *J. Dairy Res.* 59: 209-216.
- Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M. y McSweeney, P. L. (2000). *Fundamentals of Cheese Science.* (Ed. Fox, P. F.) Aspen Publishers, Maryland, USA.
- Gripon, J. C.; Desmazeaud, M. J.; Le Bars, D. y Bergère, J. L. (1975). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la pression commerciale. *Lait* 55: 502-516.
- Hurley, M. J.; O'Driscoll, B. M.; Kelly, A. L. y McSweeney, P. H. L. (1999) Novel assay for the determination of residual coagulant activity in cheese. *Int. Dairy J.* 9: 553-558.
- Hynes, E. R.; Aparo, L. y Candioti, M. C. (2004a). Influence of residual milk-clotting enzyme on α -s1 casein hydrolysis during ripening of Reggiano Argentine cheese. *J. Dairy Sci.* 87: 565-573.
- Hynes, E.; Candioti, M.; Zalazar, C.; McSweeney P. L. H. (2004b) Rennet activity and Proteolysis in Reggiano Argentine cooked cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 59, 3, 209-213.
- Hynes, E. R.; Bergamini, C. V.; Suárez, V. B. y Zalazar, C. A. (2003). Proteolysis on Reggiano Argentine cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* 86:3831-3840.
- Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (1999). Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 54: 24-27.
- International Dairy Federation (IDF). (2004). Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content (reference methods). N° 4: A. Bruselas, Bélgica.
- International Dairy Federation (IDF). (1993). Milk. Determinations of nitrogen content. N° 20: B. Bruselas, Bélgica.
- International Dairy Federation (IDF). (1997). Milk and milk products. Determination of fat content (general guidance on the use of butyrometric methods). N° 152: A. Bruselas, Bélgica.
- Ismail, B. y Nielsen, S.S. (2010). Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *J. Dairy Sci.* 93: 4999-5009
- Kailasapathy, K. y Lam S. H. (2005) Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *Int. Dairy J.* 15: 929-939.
- Malone, A. S.; Shellhammer, T. H. y Courtney, P. D. (2002). High pressure effects on the viability, morphology, lysis and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4357-4363.
- Meilgaard, M., Civille, G. V. y Carr, B. T. (2007) *Sensory Evaluation Techniques*, 4th edition. CRC Press, Florida, USA.
- Moschopoulou, E.; Anisa, T.; Katsaros, G.; Taoukis, P. y Moatsou, G. (2010) Application of high-pressure on ovine brined cheese: Effect on composition and microflora throughout ripening. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11: 543-550.
- O'Reilly, C. E.; Kelly, A. L.; Murphy, P. M. y Beresford, T. P. (2001) High-pressure treatment: applications to cheese manufacture and ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 51-59.
- O'Reilly, C. E.; O'Connor, P. M.; Murphy, P. M.; Kelly, A. L. y Beresford, T. P. (2002) Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 12:915-922.
- Piraino, P.; Parente, E y McSweeney, P. L. H. (2004) Processing of chromatographic data for chemometric analysis of peptides from cheese extracts: A novel approach. *J. Agric. Food Chem.* 52:6904-6911.
- Prupp, A. H.; Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L. H.; Sørhaug, T. y Fox, P. F. (2000a) Comparative study by multivariate statistical analysis of proteolysis in a sodium caseinate solution under cheese-like conditions caused by strains of *Lactococcus*. *Int. Dairy J.* 10:25-31.
- Prupp, A. H.; Stepaniak, L. y Sørhaug, T. (2000b) Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 10:249-253.
- Richardson, B. y Pearce, K. (1981). The Determination of Plasmin in Dairy Products. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 16:209-220.
- San Martín-González, M. F.; Rodríguez, J. J.; Gurram, S.; Clark, S.; Swanson, B. G. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2007) Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. *LWT Food Sci. Technol.* 40: 697-705.
- Sihufe, G. A.; Pirola, M. B.; Ramos, E.; Ceruti, R. J.; De Pianta Vicin, D. A. y Robert, L. (2011) Proteólisis en Queso Reggiano elaborado con enzimas exógenas para acelerar su maduración. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, 19 al 21 de octubre de 2011. Copia electrónica ISBN 978-987-22165-4-2.
- Sihufe, G. A.; Zorrilla, S. E.; Perotti, M. C.; Wolf, I. V.; Zalazar, C. A.; Sabbag, N. G.; Costa, S. C. y Rubiolo, A. C. (2010a) Acceleration of cheese ripening at elevated temperature. An estimation of the optimal ripening time of a traditional Argentinean hard cheese. *Food Chem.* 119: 101-107.
- Trujillo, A. J.; Capellas, M.; Saldo, J.; Gervilla, R. y Guamis, B. (2002) Application of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3: 295-307.
- Upadhyay V. K. y McSweeney, P. L. H. (2003). Acceleration of cheese ripening. En *Dairy Processing. Improving quality.* Ed. CRC Press, Cambridge, Reino Unido. pág. 419-447.
- Wick, C.; Nienaber, U.; Anggraeni, O.; Shellhammer, T. H. y Courtney, P. D. (2004). Texture proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial Cheddar cheeses treated with high pressure. *J. Dairy Res.* 71:107-115.
- Wilkinson M. G. y Kilcawley K. N. (2005) Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 15: 817-830.
- Zalazar, C.A.; Candioti, M.; Mercanti, D.J.; Bergamini, C.V.; Meinardi, C. (2006) Maduración acelerada. En: *Avances en Microbiología, Bioquímica y Tecnología de quesos.* (Eds. Jorge Reinheimer y Carlos Zalazar), Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina. pág. 267-284