

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**

**ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos  
para optar por el grado de Licenciada en Ingeniería de Alimentos

**Efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre distintos  
parámetros de proceso y sobre la calidad e inocuidad durante  
la elaboración de queso seco y queso Ricotta**

SOFÍA LARA AGUILAR

Carné: A93324

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio


Octubre, 2015

## Tribunal examinador

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:  
Sofía Lara Aguilar

Aprobado por:



---

M.Sc. Jacqueline Aiello Ramírez  
Presidente del Tribunal



---

Ph.D. Eric Wong González  
Director del Proyecto



---

Ph.D. Marianela Cortés Muñoz  
Asesora del Proyecto



---

Licda. Diana Viquez Barrantes  
Asesora del Proyecto



---

MADE. Marcia Cordero García  
Profesora Designada

## **Dedicatoria**

*A Dios y a mis papás por darme todo y hasta más de lo  
necesario para alcanzar esta meta*

## Agradecimientos

Agradezco a mi comité asesor por haberme ayudado cada vez que lo necesité, por tener siempre la mayor disponibilidad y la mejor actitud, por haberme guiado a lo largo de esta investigación y por darme el ejemplo de cómo debe ser un profesional. Un especial agradecimiento a mi director, Eric Wong, por haberme confiado esta investigación, por motivarme a dar siempre lo mejor, por su ayuda y por su amistad. A Mane y Diana, mis asesoras, por ayudarme a encontrar soluciones, por su apoyo en todo momento y por su aporte a este trabajo.

Le agradezco también a mis papás por darme las herramientas necesarias para cumplir esta meta, por haber sido mi soporte en los momentos difíciles, por enseñarme a no rendirme y a darlo todo por lo que uno quiere. A mis hermanos y abuelitos, por haber estado siempre presentes y dispuestos a ayudar.

De manera muy especial le agradezco a Dani, por ser mi apoyo y estar conmigo incondicionalmente, por ayudarme a crecer y a ser mejor, por tener siempre las palabras correctas. Le doy gracias por los viajes a Guadalupe, sin duda facilitaron la realización de esta investigación.

A don Francisco Cubero, por haberme suministrado la materia prima para el proyecto y a la profesora Elba Cubero, por sus consejos e infinita disponibilidad para ayudar.

Agradezco a mis amigos de TA por regalarme tantos buenos recuerdos y por ser parte de mi formación. A Moni, por su sincera amistad y por ser mi compañera de batalla. A Andre, Luci, Eu, Valerie, Sebas: gracias por todo, esta etapa fue mejor gracias a ustedes. Y a mis amigas, Andre y Ari, porque a pesar de la distancia siempre han estado a mi lado y nunca he dejado de sentir su apoyo y cariño.

Al personal del Laboratorio de Microbiología y Química del CITA, de manera especial a Vanny, Eduardo y Randall por su disposición para ayudar. Al personal del Laboratorio de Química de la ETA, especialmente a Giova, por su amistad, consejos y por compartir su forma de ver la vida.

# Índice general

TRIBUNAL EXAMINADOR .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN.....	x
<b>1. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo general.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
3.1 La leche y la industria láctea .....	6
3.2 Inocuidad de la leche .....	7
3.2.1 Patógenos .....	8
3.2.2 Enfermedades y brotes asociados con el consumo de leche cruda .....	8
3.2.3 <i>Escherichia coli</i> como indicador de inocuidad.....	9
3.2.4 Aseguramiento de la inocuidad de la leche.....	10
3.3 Aplicación de la sonicación en la industria láctea .....	13
3.3.1 Principio de la sonicación.....	13
3.3.2 Inactivación microbiana .....	15
3.3.3 Efectos de la sonicación sobre la calidad de los lácteos .....	19
3.4 Elaboración de queso.....	23

3.4.1 Coagulación enzimática.....	23
3.4.2 Coagulación ácida .....	24
3.4.3 Elaboración de queso seco .....	25
3.4.4 Elaboración de queso Ricotta.....	29
3.4.5 Rendimiento quesero.....	30
3.4.6 Aseguramiento de la inocuidad de los quesos .....	32
3.4.7 Parámetros de calidad .....	34
3.5 Necesidades de investigación sobre el uso de sonicación en el procesamiento de lácteos.....	36
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 Localización.....	38
4.2 Materias primas .....	38
4.3 Manejo del cultivo y preparación del inóculo .....	38
4.4 Inoculación de la muestra .....	39
4.5 Sonicación de la muestra .....	39
4.6 Elaboración de queso seco.....	40
4.7 Elaboración de queso Ricotta.....	43
4.8 Determinación del recuento de <i>Escherichia coli</i> .....	44
4.9 Determinación del rendimiento de la elaboración de queso .....	44
4.10 Determinación de la fuerza de corte del queso seco .....	44
4.11 Determinación del perfil de textura del queso Ricotta .....	45
4.12 Determinación de la humedad del queso Ricotta .....	45
4.13 Determinación de la grasa del queso seco .....	45
4.14 Análisis estadísticos .....	45
4.15 Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de <i>Escherichia coli</i> .....	45

4.16	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de la leche cruda en combinación con las etapas de proceso de elaboración de queso seco y Ricotta sobre el recuento de <i>Escherichia coli</i> .....	46
4.17	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y la fuerza de corte del queso seco .....	48
4.18	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y el perfil de textura del queso Ricotta.....	48
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
5.1.	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de <i>Escherichia coli</i> .....	50
5.2	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de la leche cruda en combinación con las etapas de proceso de elaboración de queso seco y Ricotta sobre el recuento de <i>Escherichia coli</i> .....	52
5.3	Determinación el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y la fuerza de corte del queso seco. ....	55
5.3.1	Efecto del tiempo de sonicación sobre el rendimiento .....	55
5.3.2	Efecto del tiempo de sonicación sobre la fuerza de corte.....	59
5.3.3	Otros efectos de la sonicación sobre la elaboración del queso seco.....	61
5.4	Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y el perfil de textura del queso Ricotta. ....	62
5.4.1	Efecto del tiempo de sonicación sobre el rendimiento .....	62
5.4.2	Efecto del tiempo de sonicación sobre el perfil de textura del queso Ricotta.....	64
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Microscopía electrónica de barrida de los glóbulos grasos de la leche. Las imágenes muestran (a) la integridad de un glóbulo graso de leche cruda sin procesar; (b) la estructura de un glóbulo tratado térmicamente y (c) glóbulo graso de menor tamaño, roto y rugoso debido a la sonicación .....	20
<b>Figura 2.</b> Diagrama del sistema continuo de sonicación.....	40
<b>Figura 3.</b> Flujo de proceso de la elaboración de queso seco.....	42
<b>Figura 4.</b> Flujo de proceso de la elaboración de queso Ricotta.....	43
<b>Figura 5.</b> Flujo de proceso del queso seco y queso Ricotta.....	47
<b>Figura 6.</b> Reducción de <i>E. coli</i> en leche cruda en función del tiempo de sonicación.....	50
<b>Figura 7.</b> Rendimiento de la elaboración de queso seco en función del tiempo de sonicación de la leche utilizada como materia prima. ....	55
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de grasa del queso seco según el tiempo de sonicación de la leche utilizada como materia prima. ....	56
<b>Figura 9.</b> Suero obtenido de la elaboración del queso seco según el tiempo de sonicación de la leche cruda: a) 0 minutos, b) 20 minutos, c) 40 minutos y d) 60 minutos.....	58
<b>Figura 10.</b> Fuerza de corte del queso seco en función del tiempo de sonicación de la leche utilizada como materia prima. ....	59
<b>Figura 11.</b> Granos de cuajada obtenidos durante la elaboración de queso seco según el tiempo de sonicación de la leche cruda: a) 0 minutos, b) 20 minutos, c) 40 minutos y d) 60 minutos. ....	61
<b>Figura 12.</b> Queso seco obtenido según el tiempo de sonicación de la leche cruda: a) 0 minutos, b) 20 minutos, c) 40 minutos y d) 60 minutos.....	62
<b>Figura 13.</b> Rendimiento de la elaboración de queso Ricotta en función del tiempo de sonicación de la leche a partir de la cual se obtuvo el suero. ....	63
<b>Figura 14.</b> Contenido de humedad del queso Ricotta en función del tiempo de sonicación de la leche a partir de la cual se obtuvo el suero.....	64



## Índice de cuadros

<b>Cuadro I.</b> Composición de la leche de vaca.....	6
<b>Cuadro II.</b> Parámetros determinados mediante el análisis de perfil de textura (TPA). .....	36
<b>Cuadro III.</b> Reducción logarítmica de <i>E. coli</i> en diferentes productos intermedios y en el producto final del procesamiento de queso seco y queso Ricotta según el tiempo de sonicación aplicado a la leche utilizada como materia prima. ....	53
<b>Cuadro IV.</b> Reducción promedio de <i>E. coli</i> en el procesamiento de queso seco según el tiempo de sonicación de la leche cruda. ....	53
<b>Cuadro V.</b> Promedio de los parámetros del perfil de textura del queso Ricotta elaborado con el suero obtenido a partir de la elaboración de queso seco y su respectiva probabilidad asociada.....	65

## Lista de abreviaturas

<	Menor que
>	Mayor que
<b>ANDEVA</b>	Análisis de varianza
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>Aw</b>	Actividad de agua
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control
<b>CITA</b>	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>NACMCF</b>	National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods
<b>NMP</b>	Número más probable
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>TPA</b>	Texture Profile Analysis
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UHT</b>	Ultra High Temperature
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture
<b>USPHS</b>	United States Public Health Service

## Resumen

Se evaluó el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de *Escherichia coli*. Se aplicaron 5 tratamientos diferentes (0, 15, 30, 45 y 60 min) manteniendo la temperatura de la muestra en un rango entre  $(20-23) \pm 2$  °C durante el proceso. Para ello se inocularon 240 mL de leche cruda con *E. coli* y se sonicaron con una frecuencia constante de 20 kHz, una amplitud de 40 % y una entrada de energía de 50 W correspondiente a 0,83 W/mL. Posteriormente se realizó un recuento por vaciado de la bacteria y se calculó la reducción obtenida para cada tiempo respecto al recuento inicial.

Se determinó que un aumento en el tiempo de sonicación incrementó la reducción de *E. coli* ( $p=0,0008$ ). Sin embargo, bajo las condiciones utilizadas no se alcanzó la reducción de  $5 \log_{10}$ UFC/mL necesaria para considerar este tratamiento como una alternativa a la pasteurización de la leche.

Se evaluó también el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda en combinación con las etapas de proceso de elaboración de queso seco y Ricotta sobre el recuento de *Escherichia coli*. Se evaluaron el tiempo de sonicación (0, 20, 40 y 60 min) y las etapas de proceso, para lo cual se muestrearon distintos productos a lo largo del proceso de elaboración de los quesos (leche sonicada, queso pre-prensado, suero 1, queso seco, flóculos, suero 2 y queso Ricotta). El procesamiento se realizó a escala de laboratorio, se inocularon 240 g de leche cruda con *E. coli*, se sonicaron y se utilizaron para la elaboración del queso seco, en el caso del queso Ricotta se utilizó el suero obtenido. Se realizó un recuento por vaciado de la bacteria a cada producto y se calculó la reducción obtenida para cada tiempo respecto al recuento inicial de la leche.

Se concluyó que las etapas de proceso no tuvieron un efecto significativo sobre la reducción de *E. coli* en el queso seco ( $p=0,0819$ ,  $1-\beta=1$ ). Por el contrario, el incremento en el tiempo de sonicación provocó un aumento en la reducción de *E. coli* en el queso ( $p<0,0001$ ) y su efecto resultó independiente de las etapas del proceso ( $p=0,7130$ ,  $1-\beta=1$ ). Respecto al queso Ricotta no fue posible determinar si se dio un efecto combinado, pues el procesamiento por sí solo implicaba una etapa de calentamiento que provocaba la inactivación total de la bacteria.

Por otra parte, al evaluar diferentes tiempos de sonicación de leche cruda (0, 20, 40 y 60 min) se determinó que incrementaba el rendimiento del queso seco ( $p<0,0001$ ), aumentaba su contenido de grasa ( $p=0,0011$ ) y disminuía su fuerza de corte ( $p<0,0001$ ). Además, cualitativamente se determinó que al aumentar el tiempo de tratamiento los granos de cuajada resultaron menos consistentes, que el suero obtenido fue menos turbio y que el producto final mostró una menor exudación de grasa y una apariencia más homogénea en cuanto color.

Adicionalmente, se utilizó el suero obtenido del proceso del queso seco para elaborar queso Ricotta y se determinó que el tiempo de sonicación de la leche no tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento ( $p=0,08$ ) ni tampoco sobre los parámetros asociados al perfil de textura (TPA) ( $1-\beta=1$ ). Se determinó además que al aumentar el tiempo de tratamiento incrementó el porcentaje de humedad en el producto final ( $p<0,0001$ ).

# 1. Justificación

La leche es conocida como uno de los alimentos más completos disponibles en la naturaleza, cualidad que se atribuye a su alto aporte nutricional en relación con su aporte calórico (Chandan & Kilara, 2008). Entre los principales componentes de la leche se encuentran proteínas de alta calidad, grasa, calcio, fósforo, riboflavina, vitamina A, vitamina B12, entre otros (Walstra *et al.*, 2006). Los beneficios del consumo de leche pueden obtenerse al consumir productos derivados como el queso, la natilla, y el yogurt (Miller *et al.*, 2007). Durante la elaboración de dichos productos, la leche sufre transformaciones químicas y físicas que le confieren distintas características sensoriales manteniendo su calidad nutricional, lo cual da como resultado un producto con valor agregado atractivo para el consumidor (Walstra *et al.*, 2006).

Los productos lácteos en Costa Rica representan un 5,7 % del aporte calórico de la canasta básica nacional (Muñoz & Zamora, 2013). Por otra parte, la producción de derivados lácteos aumentó en promedio un 2,8 % anual en el periodo 2007-2011. A nivel nacional los productos lácteos principales son la leche fluida (62 %), quesos (18 %), leche en polvo (8 %), helados (4 %), cremas ácidas (3 %) y otros (5 %) (González, 2012).

La leche, debido a su calidad nutricional y a su alta disponibilidad de agua, es un medio idóneo para el crecimiento de microorganismos de deterioro y/o patógenos. Es por ello que la industria alimentaria ha prestado especial atención a su calidad microbiológica, no solamente en relación con la inocuidad y la salud pública, sino porque esto afecta directamente la idoneidad para ser utilizada como materia prima y su vida útil, así como la calidad de productos derivados (Walstra *et al.*, 2006).

El consumo de leche cruda ha sido asociado con brotes causados por microorganismos patógenos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros (Walstra *et al.*, 2006). Esto provocó que se desarrollaran distintos métodos para asegurar la inocuidad de la leche y de sus derivados tales como la pasteurización, ultrapasteurización, microfiltración y ultra alta presión (Boor & Murphy, 2002; Pereda *et al.*, 2007), siendo los tratamientos térmicos los más utilizados a nivel mundial (Walstra *et al.*, 2006).

La pasteurización de la leche es el tratamiento térmico más común y tiene como principales objetivos garantizar la inocuidad y aumentar la vida útil del producto mediante la eliminación de microorganismos patógenos y la inactivación enzimática (Kelly *et al.*, 2012). La reducción microbiana

lograda mediante el tratamiento térmico depende de la combinación de tiempo y temperatura. Mediante la pasteurización se logra la reducción del 90 al 99 % de los microorganismos, se eliminan los patógenos, se inactivan la mayoría de enzimas, pero no se destruyen esporas (Revilla, 1996; Walstra *et al.*, 2006).

A pesar de la efectividad de los tratamientos térmicos en cuanto a inocuidad, se ha demostrado que estos provocan efectos negativos en la calidad sensorial y nutricional de la leche. Entre ellos están la desnaturalización y modificación de proteínas, desbalance en los minerales, pérdida de vitaminas, y pérdida de lisina, cambios indeseables en el color y sabor producto de la reacción de Maillard (Walstra *et al.*, 2006; Shanmugam *et al.*, 2012). Esto repercute directamente en la calidad de los productos derivados. Específicamente, la pasteurización disminuye la capacidad de las proteínas de la leche para cuajar, reduce el desuerado durante la elaboración de quesos (Walstra *et al.*, 2006), en quesos madurados el proceso de maduración es más largo y el desarrollo del sabor deseado es menor (Gunasekaran & Ak, 2003).

Debido a estas desventajas es que se han buscado nuevas tecnologías, por ejemplo: ultrasonido, microondas, altas presiones, impulsos de campo eléctrico y luz ultravioleta (Shanmugam *et al.*, 2012; Chemat *et al.*, 2011., Bermúdez *et al.*, 2009). Según Shanmugam *et al.* (2012), de los tratamientos alternativos mencionados, el procesamiento con ultrasonido ha sido objeto de estudio en años recientes debido a que presenta ventajas como ser amigable con el ambiente y no ser tóxico. Lo contrario sucede con otras opciones como las microondas, el calentamiento óhmico, los rayos gamma y las pulsaciones eléctricas que en general son vistas por la población con cierta precaución.

El ultrasonido es una forma de energía vibracional y las frecuencias utilizadas en el procesamiento de alimentos van de 20 a 100 kHz. Cuando las ondas de ultrasonido se propagan en un medio líquido ocurre el fenómeno conocido como cavitación debido a la generación de micro-burbujas que colapsan violentamente (Chandrapala *et al.*, 2012). Esto genera una alta presión de hasta 50 000 kPa y un aumento de temperatura de hasta 5000 K de manera localizada provocando así efectos de cizalla y un efecto de esterilización localizada (O'Donnell *et al.*, 2010).

El tratamiento con ultrasonido se conoce como sonicación y se ha investigado su aplicación en diferentes campos de la industria alimentaria. Entre las posibles implementaciones de esta tecnología se encuentran la formación de emulsiones y homogenización, modificación de viscosidad, tenderización, uso como herramienta analítica para caracterizar alimentos, limpieza de equipos, extracción de

compuestos, antiespumante e inactivación enzimática y microbiana (Patist & Bates, 2008; Chandrapala *et al.*, 2012).

En cuanto a la inactivación microbiana mediante sonicación, esta se atribuye principalmente a los efectos generados por la cavitación. Sumado al aumento de presión y temperatura antes mencionado, el colapso de las burbujas también produce micro-corrientes de líquido a alta velocidad las cuales provocan rupturas y erosión en superficies sólidas, dentro de las que se incluyen las membranas celulares microbianas. También, se atribuye el efecto bactericida a efectos de cavitación intracelular que provocan lisis en la membrana del microorganismo (Chandrapala *et al.*, 2012).

La sonicación ha debido combinarse con otros factores como presión y calor para lograr las reducciones microbianas deseadas. Esto debido a que al utilizarse por sí sola se requieren tiempos muy largos de tratamiento (Lee *et al.*, 2009). Por ejemplo, Chandrapala *et al.* (2012) reportan que el valor D de *Staphylococcus aureus* al ser tratado con ultrasonido (150 W, 20 kHz) es de 187 minutos a 14 °C, mientras que al ser combinado con presión (manosonicación), calor (termosonicación) o los dos factores a la vez (manotermosonicación), se observa un efecto sinérgico que disminuye el tiempo de tratamiento (Lee *et al.*, 2009; Arroyo *et al.*, 2011). Adicionalmente, se logró la reducción de *Salmonella* spp. en jugo de naranja por medio de la osmosonicación, la cual consiste en combinar el ultrasonido con un medio de alta presión osmótica (Wong *et al.*, 2008).

Uno de los principales retos al aplicar la sonicación en el procesamiento de alimentos es la modificación de la funcionalidad de los componentes, ya que pueden darse cambios en su estructura, su funcionalidad e inclusive la inactivación de biomoléculas (Sener *et al.*, 2006). Estos efectos se atribuyen a que la cavitación genera efectos mecánicos, físicos y químicos como la formación de ondas y el movimiento turbulento, efectos suficientemente potentes como para romper enlaces inter e intramoleculares. La fuerza de cizalla generada tiene la capacidad de romper cadenas de polímeros y desordenar o separar proteínas que estén débilmente asociadas (Zisu *et al.*, 2013).

Respecto a los efectos de la sonicación en productos lácteos, Bermúdez *et al.* (2009) reporta que la leche termoultrasonificada muestra un incremento en su contenido de grasa posiblemente por el efecto de homogenización provocado por la cavitación, el cual aumenta la disponibilidad de la grasa y la cantidad de ácidos grasos libres. Otros efectos estudiados han sido la reducción en la viscosidad de la leche como consecuencia del rompimiento de cadenas poliméricas y de agregados proteicos (Zisu *et al.*, 2013), el aumento en la estabilidad al calor de las proteínas del suero también debido al rompimiento

de agregados proteicos (Ashokkumar *et al.*, 2009) y el mejoramiento de la textura y de la capacidad de retención de agua en yogurt (Sfakianakis & Tzia, 2014).

El efecto de la sonicación en las proteínas de la leche resulta de especial importancia para la industria quesera, ya que parámetros como el rendimiento, el tiempo de floculación, el tiempo de endurecimiento y la textura final del queso dependen de la conformación de las proteínas, dado que este producto está formado por una red proteica que encierra el suero y la grasa (Walstra *et al.*, 2006). Otro factor importante es la grasa porque sufre un proceso de homogenización durante la sonicación (Shanmugam *et al.*, 2012). Gunasekaran y Ak (2003) reportan que la homogenización de la leche puede aumentar el rendimiento de la elaboración de queso y que, al crear nuevas interfaces agua-lípido, se incrementa la estabilidad de los glóbulos de grasa, evitando así que ésta salga de la matriz. También se reporta que la homogenización de la leche provoca un aumento en la firmeza y la elasticidad del queso (Gunasekaran & Ak, 2003).

A pesar de las potenciales aplicaciones de la sonicación a nivel industrial, hay poca información disponible acerca del efecto de la sonicación en los productos derivados de la leche y sobre los parámetros de proceso de su elaboración. Por esta razón, y al considerar las desventajas de la pasteurización y el interés en el desarrollo de nuevas tecnologías, este proyecto plantea como objetivo general determinar el efecto del tiempo de sonicación sobre distintos parámetros de la elaboración de queso seco y queso Ricotta. Esto se plantea con el fin de estudiar la viabilidad de sustituir el tratamiento térmico y obtener productos de mejor calidad sensorial y nutricional según los beneficios descritos anteriormente para tratamientos con ultrasonido.

Adicionalmente, se pretende evaluar el efecto antimicrobiano de la combinación de la sonicación de la leche cruda con otras etapas del proceso de elaboración de productos lácteos que impliquen cambios de pH, calentamiento, disminución del  $A_w$ , entre otras. En el procesamiento del queso seco se realiza una etapa final de salado, mientras que el queso Ricotta se obtiene por medio de una acidificación directa. Ambas condiciones crean un ambiente antagónico para el crecimiento de microorganismos (Guinee & Fox, 2004) y podrían evitar que los microorganismos previamente dañados por el efecto de cavitación logren recuperarse y sobrevivir en el producto. En caso de que se obtuviera un producto final inocuo el ultrasonido podría entonces utilizarse como alternativa al tratamiento térmico. De esta forma se partiría de una materia prima de mayor calidad nutricional y libre de las alteraciones provocadas por la pasteurización, obteniendo así productos de mejor calidad y con valor agregado para el consumidor.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre distintos parámetros de proceso y sobre la calidad e inocuidad durante la elaboración de queso seco y Ricotta.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de *Escherichia coli*.
- Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda en combinación con las etapas de proceso de elaboración de queso seco y Ricotta sobre el recuento de *Escherichia coli*.
- Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y la fuerza de corte del queso seco.
- Determinar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y el perfil de textura del queso Ricotta.



### 3. Marco Teórico

#### 3.1 La leche y la industria láctea

La leche es la secreción de las glándulas mamarias de un mamífero y tiene como objetivo principal alimentar a su cría. Sin embargo, también es utilizada para consumo humano, ya sea en su forma líquida o transformada en algún producto derivado como por ejemplo queso, yogurt, helado, natilla, entre otros (Walstra *et al.*, 2006).

La composición promedio de la leche se muestra en el Cuadro I, su componente mayoritario es el agua, en la que se encuentran disueltas sustancias como lactosa y minerales y dispersas sustancias como grasa y proteínas (Walstra *et al.*, 2006). A pesar del alto contenido de agua, su importancia a nivel nutricional ha sido ampliamente estudiada y reconocida principalmente por su aporte de calcio, proteína, potasio, vitamina A, vitamina B<sub>12</sub>, riboflavina, niacina y fósforo (Jensen & Kroger, 2006).

**Cuadro I.** Composición promedio de la leche de vaca.

Componente	Contenido (%)
Agua	85,3 – 88,7
Grasa	2,5 – 5,5
Proteína	2,3 – 4,4
Lactosa	3,8 – 5,3
Minerales	0,57 – 0,83

Fuente: Walstra *et al.*, 2006

La proteína de la leche es de alta calidad debido a que contiene los nueve aminoácidos esenciales. Esta fracción se considera una mezcla heterogénea conformada por dos tipos de proteína: las caseínas (80%) y las proteínas del suero (20%). Las primeras son las de mayor relevancia para la industria quesera y se pueden dividir en cuatro componentes principales: alfa, beta, gamma y kappa. Las segundas son una fracción más heterogénea pero predominan la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Jensen & Kroger, 2006).

En cuanto a los carbohidratos, el azúcar predominante es la lactosa que se encuentra acompañada por otros compuestos minoritarios como glucosa, galactosa y oligosacáridos. La grasa por su parte es el componente que le confiere las características de sabor, textura y apariencia. Además, es fuente de ácidos grasos esenciales y de vitaminas liposolubles (Jensen & Kroger, 2006).

La industria de la leche fluida y productos lácteos es una de las más importantes a nivel mundial. En el año 2012 presentó una producción aproximada de 754 millones de toneladas de leche (FAO, 2015), con India y Estados Unidos dentro de los principales productores. Su importancia radica en que transforma la leche cruda, alimento altamente perecedero, en productos con mayor vida útil, de alta calidad nutricional y de gran variedad. A nivel mundial existen tres grupos principales a los que se destina la producción de leche: leche fluida y fermentados, quesos y leche en polvo (FAO, 2009).

Según la OECD/FAO (2014) se espera que la producción mundial de leche presente un crecimiento de un 1,9 % anual durante la próxima década. El consumo mundial per cápita de productos lácteos para el año 2012 fue de 109,1 kg de leche, valor que superó en un 7,6 % al consumo reportado para el año 2005 (Fresco, 2014). Se estima un aumento anual de 1,2 % a 1,9 % en el consumo per cápita en países en vías de desarrollo como consecuencia de un aumento en el ingreso económico y de las nuevas tendencias en cuanto a dieta y salud (OECD/FAO, 2014).

En Costa Rica, la producción de leche presentó un crecimiento del 4 % en el periodo 2012-2013, alcanzando un valor de 1055 millones de kilogramos (Madriz, 2014). El 70 % de la producción se comercializa como leche fluida y en polvo, seguido por un 18 % que se utiliza como materia prima para la elaboración de quesos y el restante 12 % se reparte entre productos como helados, mantequilla y yogurt. Según la Cámara Nacional de Productores de Leche, en el año 2013, el consumo de productos lácteos per cápita fue de 202 kg (Madriz, 2014), superando casi en un 46 % el consumo per cápita mundial de ese mismo año.

### **3.2 Inocuidad de la leche**

La leche presenta condiciones óptimas para el crecimiento de diversidad de microorganismos ya que tiene un  $A_w$  elevado (0,99), una alta calidad nutricional y pH neutro (6,6 – 6,7) (Angelidis, 2015). Su flora normal se puede clasificar en dos grupos: bacterias de deterioro y bacterias patógenas. Las de deterioro liberan enzimas que provocan la hidrólisis de la lactosa, la grasa y las proteínas, generando así sabores y olores desagradables que alteran la calidad de la leche y su idoneidad para ser procesada (Walstra *et al.*, 2006). Por otra parte, las bacterias patógenas afectan directamente la salud del consumidor en diversas formas que serán descritas más adelante. En consecuencia, la leche debe tener una buena calidad microbiológica para asegurar su inocuidad, calidad y aumentar la vida útil de los productos derivados (Walstra *et al.*, 2006).

Las principales fuentes de contaminación de la leche son el animal, la superficie de la ubre, el encargado y el equipo de ordeño, la alimentación del animal y el agua. La leche obtenida asépticamente presenta recuentos del orden de <100 UFC/mL, pero por lo general el rango es de <1000 UFC/mL a 20 000 UFC/mL (Moatsou & Moschopoulou, 2015).

### **3.2.1 Patógenos**

La leche ha sido el alimento responsable de un número importante de brotes de enfermedad, especialmente la leche cruda y leche que se contamina posterior a la pasteurización. La flora patógena puede ser endógena del animal, del ambiente o del agua y la contaminación se puede dar desde el ordeño hasta el procesamiento (Angelidis, 2015; Papademas & Aspri, 2015).

### **3.2.2 Enfermedades y brotes asociados con el consumo de leche cruda**

La leche y sus productos derivados se han visto implicados en casos de enfermedad por su consumo, lo cual se atribuye principalmente a las características de la leche mencionadas anteriormente y a su alto nivel de consumo a nivel mundial. Por este motivo se han ideado diferentes métodos de procesamiento para asegurar la inocuidad, por ejemplo la pasteurización, el secado, la acidificación, entre otros que serán discutidos más adelante.

En algunos lugares aún se acostumbra consumir leche cruda y sus productos derivados, es decir, sin ninguno de los tratamientos mencionados (Papademas & Aspri, 2015). Sin embargo, esta práctica representa un potencial peligro para la salud si no se aplican medidas estrictas de higiene que aseguren su inocuidad. Por ello, autoridades e instituciones gubernamentales como la FDA y el CDC (2014a) aconsejan no consumir productos lácteos que no hayan sido pasteurizados o tratados mediante algún método que asegure la eliminación de patógenos.

En el año 2012 se realizó una revisión de los casos reportados al CDC sobre brotes asociados con productos lácteos no pasteurizados en Estados Unidos. El documento reporta que en el periodo 1993-2006 se presentaron 73 brotes y 1571 casos de los cuales 202 terminaron en hospitalizaciones y dos en muertes. El 63 % de los brotes fueron provocados por leche cruda y el restante 37 % por queso sin pasteurizar. Además, la totalidad de los brotes fueron causados por bacterias, principalmente *Campylobacter* spp. (54 %), *Salmonella* spp. (22 %), *E. coli* productor de toxina Shiga (13 %), *Brucella* spp. (4 %), *Listeria* spp. (4 %) y *Shigella* spp. (3 %) (Langer *et al.*, 2012).

Según un informe del CDC (2014b), en Estados Unidos se reportaron 81 brotes asociados con leche cruda durante el periodo 2007-2012 dando como resultado 979 personas afectadas y 73 hospitalizadas. El 81 % de los brotes se presentaron en estados en los que es permitido el consumo de leche cruda. Los principales microorganismos relacionados fueron *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157 y *Salmonella*. Otros patógenos comunes en leche son *Listeria*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Brucella*, *Salmonella* y *Shigella* (Walstra *et al.*, 2006; Schmidt, 2008).

### **3.2.3 *Escherichia coli* como indicador de inocuidad**

La bacteria *Escherichia coli* es un bacilo Gram-negativo que forma parte de la familia Enterobacteriaceae. La mayoría de cepas de *E. coli* son mesófilas, pueden crecer en un rango de temperatura 7-50 °C con 37 °C como valor óptimo y de preferencia se desarrollan en medio con un pH neutro. *E. coli* tiene la capacidad de fermentar carbohidratos con una consecuente producción de ácido y gas, principalmente H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Además, esta bacteria puede fermentar la lactosa a 44 °C, diferenciándose así de otros microorganismos como *Shigella* y *Salmonella* (Papademas & Aspri, 2015).

*Escherichia coli* ha sido ampliamente utilizada como un microorganismo indicador, lo cual significa que su presencia indica que existe la posibilidad de que también estén presentes otros patógenos similares y evidencia prácticas higiénicas deficientes e inclusive contaminación fecal (Busta *et al.*, 2013). Para el caso específico de la leche, la FDA (2009) menciona que una concentración de este bacilo mayor que 100 NMP/g indica condiciones poco sanitarias durante su procesamiento y contaminación con materia fecal.

El fundamento de la relación entre este bacilo y la materia fecal resulta del hecho de que su hábitat normal es el intestino de animales de sangre caliente y le resulta difícil sobrevivir fuera de él, de ahí que su presencia se relacione con la de otros patógenos de origen entérico y a malas prácticas de higiene. Sin embargo, es importante tener claro que la presencia de *E. coli* no asegura que haya presencia de patógenos en la muestra (Odonkor & Ampofo, 2013).

La determinación de *E. coli* como referencia también se ha aplicado para fines diferentes a indicar contaminación fecal. Por ejemplo, San Martín *et al.* (2005) utilizaron la cepa de *E. coli* ATCC 25922 como indicador para realizar una evaluación de resistencia antimicrobiana. Ellos justifican la escogencia de esta bacteria por ser utilizada frecuentemente en laboratorios como indicador de higiene y porque se considera que es el mejor indicador entre los microorganismos Gram negativos. Además, se

ha utilizado como microorganismo de referencia para modelar las cinéticas de inactivación microbiana al aplicar diferentes tipos de sonicación (Lee *et al.*, 2009), como indicador en el estudio del efecto de la fotosonicación de la leche cruda (Sengül *et al.*, 2011) y para evaluar el efecto del tratamiento con luz pulsada en leche (Miller *et al.*, 2012).

Al seleccionar como microorganismo indicador a *E. coli* se deben tener en cuenta sus limitaciones. Según se menciona anteriormente, la presencia de *E. coli* no asegura que exista presencia de otros patógenos en la muestra o que estos exhiban exactamente el mismo comportamiento. Además, *E. coli* no representa una única especie y por lo tanto podría haber presencia de bacterias coliformes como *Proteus* y *Aerobacter* que no tienen relación con el tracto gastrointestinal (Odonkor & Ampofo, 2013).

### **3.2.4 Aseguramiento de la inocuidad de la leche**

Por los peligros que podría implicar el consumo de leche cruda para la salud del consumidor se han desarrollado diferentes tratamientos que aseguren su inocuidad. Los más populares a nivel mundial son los tratamientos térmicos, los cuales se basan en la aplicación de combinaciones de temperatura y tiempo de calentamiento que permiten alcanzar diferentes niveles de eliminación de microorganismos según la intensidad del tratamiento (Walstra *et al.*, 2006). Además, desde hace algunos años se han realizado investigaciones acerca de tecnologías alternativas que permitan el aseguramiento de la inocuidad de alimentos, incluida la leche, sin necesidad de aplicar calor.

#### **3.2.4.1 Tratamientos térmicos**

La elección del tratamiento térmico a aplicar depende de dos factores principalmente: el nivel de inactivación microbiana requerido para obtener un producto inocuo con una vida útil determinada y los cambios en la calidad del producto (color, sabor, aroma, entre otros) (Kelly *et al.*, 2012). Cuanto más intenso sea el tratamiento térmico, mayores son los cambios que experimenta la leche en cuanto a su calidad. A continuación se describen los tratamientos térmicos más utilizados a nivel industrial.

El tratamiento térmico más leve es conocido como termización y consiste en un calentamiento de la leche durante 15 segundos a una temperatura entre 57 y 68 °C (Kelly *et al.*, 2012). El objetivo de esta operación es disminuir la población de las bacterias psicrótrofas y así evitar la producción de enzimas lipasas y proteasas resistentes al calor que provocarían el deterioro de la leche (Walstra *et al.*, 2006). Normalmente, este tratamiento se aplica a leche cruda que vaya a ser almacenada en

refrigeración por un periodo de tiempo largo antes de ser utilizada, ya que durante este periodo se favorece el crecimiento de las psicrótrofas (Kelly *et al.*, 2012).

Por otra parte, la pasteurización implica un calentamiento más intenso y tiene como propósito la eliminación de patógenos asociados con la leche, entre ellos *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* spp., *E. coli* enteropatógena, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*. Adicionalmente se elimina la flora de deterioro conformada por coliformes, bacterias ácido lácticas mesófilas y bacterias psicrótrofas (Walstra *et al.*, 2006).

Las condiciones utilizadas durante la pasteurización pueden variar siempre y cuando se obtenga un efecto equivalente. Por ejemplo, la pasteurización a bajas temperaturas consiste en aplicar un calentamiento durante 30 minutos a 63 °C o por 15 segundos a 72 °C, mientras que en la pasteurización a altas temperaturas se puede realizar el tratamiento a 89 °C durante 1 segundo o inclusive utilizar temperaturas mayores a 100 °C (Walstra *et al.*, 2006; USPHS & FDA, 2011). Estos tratamientos fueron diseñados para lograr la reducción a niveles seguros del patógeno más resistente asociado con el alimento, que en este caso corresponde a *Coxiella burnetii* (NACMCF, 2004; Keener, 2013).

Walstra *et al.* (2006) reportan que la pasteurización provoca pocos cambios en la composición de la leche. Tras una pasteurización a baja temperatura, el principal cambio que ocurre es la inactivación de la enzima fosfatasa alcalina. No obstante, el sabor se mantiene comparable al de la leche cruda, no se da desnaturalización de las proteínas del suero, no hay cambios en su textura y se mantienen sus propiedades bacteriostáticas (Walstra *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2012). Sin embargo, al aplicar una pasteurización a alta temperatura la mayoría de propiedades bacteriostáticas se destruyen, se desnaturaliza una fracción de las proteínas del suero y se desarrolla un leve sabor a cocido. Por último, indistintamente del tipo de pasteurización, a nivel nutricional no ocurren mayores cambios, excepto por la pérdida de vitamina C (Walstra *et al.*, 2006).

El tratamiento térmico más intenso es conocido como esterilización, popularmente llamado UHT por las siglas en inglés de "Ultra High Temperature". Mediante la esterilización no solo se eliminan las células vegetativas, sino también esporas que puedan estar presentes en la leche (Manzi & Pizzoferrato, 2006). Comúnmente a nivel industrial se aplica un calentamiento a 135 °C durante 3 segundos o inclusive a 145 °C por un segundo y posteriormente se empaca asépticamente. Como resultado se obtiene un producto con una vida útil de hasta un año almacenado a temperatura ambiente (Walstra *et al.*, 2006).

Las pérdidas provocadas a nivel nutricional por la esterilización aumentan respecto a la pasteurización, e inclusive continúan durante el almacenamiento. Las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub> y C son las que se ven mayormente afectadas por el tratamiento, mientras que las vitaminas A y E no presentan una disminución al esterilizar la leche. Además, en la leche tratada mediante UHT ocurre la reacción de Maillard durante el almacenamiento y esto conlleva a una pérdida de lisina. Sin embargo, no se considera importante puesto que la proteína de la leche tiene lisina en exceso (Walstra *et al.*, 2006).

En relación con la calidad sensorial, la leche adquiere un sabor a cocido o esterilizado, cuya intensidad depende directamente de las condiciones aplicadas durante el tratamiento. Sin embargo, se reporta que estos sabores disminuyen durante el almacenamiento puesto que son compuestos sulfurados que se oxidan (Walstra *et al.*, 2006). Además, la leche se oscurece levemente debido a la reacción de Maillard en la cual se da la formación de compuestos pardos llamados melanoidinas (Kelly *et al.*, 2012).

#### **3.2.4.2 Nuevas tecnologías**

Indiscutiblemente, los tratamientos térmicos representan la opción más eficiente para la inactivación tanto de microorganismos patógenos como de deterioro en productos lácteos, sin embargo provocan efectos secundarios como modificaciones de color, sabor y a nivel nutricional tal como se explicó anteriormente (Akdemir, 2015). Dichos efectos contradicen las tendencias actuales de consumo, ya que el consumidor se informa cada vez más sobre la calidad de los alimentos y exige a la industria alimentaria que sus productos mantengan las características y la calidad nutricional del alimento antes de ser procesado. Adicionalmente, existe una creciente demanda por mayor variedad de productos convenientes que posean una larga vida útil. Como resultado, durante los últimos años se han realizado esfuerzos para desarrollar tecnologías alternativas a los tratamientos térmicos que permitan obtener productos inocuos y de alta calidad que satisfagan las necesidades mencionadas (Pereira & Vicente, 2010; Singh *et al.*, 2014; Akdemir, 2015).

Dentro de las tecnologías de procesamiento no térmico se encuentra la aplicación de campos eléctricos pulsantes, el procesamiento a altas presiones, la ultrasonificación, la irradiación con luz ultravioleta y la irradiación gamma (Pereira & Vicente, 2010; Singh *et al.*, 2014; Akdemir, 2015). Todas las anteriores tecnologías se han aplicado al procesamiento de lácteos. También se han realizado investigaciones sobre el uso de atmósferas modificadas usando CO<sub>2</sub> como agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento de bacterias psicrótrofas en leche, queso, yogurt, helado y natilla. La

microfiltración también ha mostrado ser exitosa en la reducción de la población microbiana en leche cruda. Ésta implica un leve calentamiento y por ello mantiene la calidad de la leche (Álvarez & Ji, 2003).

A pesar de las múltiples investigaciones y del potencial que tiene la aplicación de estas tecnologías, en general no han logrado igualar la eficiencia y efectividad de los tratamientos térmicos. Algunas requieren la aplicación de altas intensidades del tratamiento, repercutiendo negativamente en la calidad sensorial del alimento (Pereira & Vicente, 2010). Otras se encuentran en las primeras etapas de desarrollo y aún no cumplen con las regulaciones de la FDA. Como consecuencia, la aplicación de estas tecnologías depende de la obtención de mayor cantidad de resultados, de la inversión económica y de la aprobación legal (Álvarez & Ji, 2003).

Con el fin de potenciar la aplicación de las nuevas tecnologías se ha propuesto combinarlas entre ellas o inclusive con las tecnologías convencionales para lograr lo que Pereira y Vicente (2010) llaman “Efecto de Barrera”. Este término se refiere a la obtención de efectos antimicrobianos sinérgicos que minimicen el impacto en las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos y que permitan satisfacer las demandas del consumidor.

### **3.3 Aplicación de la sonicación en la industria láctea**

El desarrollo de aplicaciones del ultrasonido para la industria láctea ha incrementado como resultado de su aporte positivo a la efectividad de los procesos. Los efectos provocados por la sonicación se utilizan en aplicaciones como la ultrafiltración de suero, la reducción de la viscosidad, la homogenización de la leche, la producción de yogurt (Chandrapala *et al.*, 2012; Tiwari & Mason, 2012), entre otras aplicaciones que serán descritas más adelante.

#### **3.3.1 Principio de la sonicación**

El término ultrasonido se refiere a las ondas sonoras que superan la frecuencia audible, es decir, que tienen una frecuencia de 20 kHz o más (Chandrapala *et al.*, 2012). Según la frecuencia, el ultrasonido se puede clasificar en: ultrasonido de poder (16 – 100 kHz), ultrasonido de alta frecuencia (100 kHz – 1 MHz) y ultrasonido de diagnóstico (1 – 10 MHz) (Patist & Bates, 2008). Adicionalmente, para clasificar la aplicación del ultrasonido es necesario conocer la cantidad de energía del campo acústico generado. Ésta se puede reportar en términos de energía acústica (W), densidad de energía acústica ( $Ws/m^3$ ) o intensidad acústica ( $W/m^2$ ), siendo esta última la más común (Knorr *et al.*, 2004).



Las ondas ultrasónicas son generadas por medio de un transductor que convierte la energía eléctrica en energía sonora (Tiwari & Mason, 2012). Esto es posible mediante el principio de transformación electrostrictiva, que se basa en la deformación elástica de materiales ferroeléctricos dentro de un campo de alta frecuencia eléctrica y que es causada por la atracción de moléculas polarizadas en el campo. Para polarizar las moléculas se transmite una corriente alterna al material ferroeléctrico mediante dos electrodos. Posteriormente, una vez que la energía se ha convertido en oscilación mecánica, las ondas sonoras se transfieren del transductor a un amplificador que las transmitirá a la sonda que se encuentra en contacto con el medio, en este caso el alimento (Knorr *et al.*, 2004; Patist & Bates, 2008).

Una vez que las ondas ultrasónicas pasan a través del medio líquido, se produce un fenómeno conocido como cavitación acústica (Chandrapala *et al.*, 2012). En este proceso la onda viaja por el medio en forma de una serie de ciclos de compresión (alta presión) y rarefacción (baja presión). Durante la rarefacción se forman vacíos o cavidades en el medio, las cuales absorben pequeñas cantidades de vapor disuelto, formando así las llamadas burbujas de cavitación. Estas burbujas continúan creciendo durante los ciclos sucesivos, ya que la cantidad de vapor que ingresa a la burbuja durante el ciclo de baja presión (rarefacción) es mayor a la cantidad de vapor que sale durante la compresión. Finalmente, cuando las burbujas alcanzan un volumen en el que ya no pueden absorber más energía, colapsan violentamente provocando así la cavitación (Patist & Bates, 2008; Chandrapala *et al.*, 2012; Tiwari & Mason, 2012).

El colapso de dichas burbujas genera un calentamiento localizado de aproximadamente 5 500 °C y presiones en el orden de 50 MPa (Chandrapala *et al.*, 2012; Tiwari & Mason, 2012). Además, se producen fuerzas físicas violentas, micro-chorros, fuerzas de cizalla y turbulencia (Chandrapala *et al.*, 2012). Cabe resaltar que en el medio se forman miles de estas burbujas y que, por lo tanto, los efectos del ultrasonido se atribuyen esencialmente al fenómeno de la cavitación (Tiwari & Mason, 2012).

De acuerdo con lo reportado por Patist & Bates (2008), la frecuencia de las ondas es inversamente proporcional al tamaño de las burbujas. Por lo tanto, al utilizar bajas frecuencias (ultrasonido de poder), se generan burbujas de gran tamaño que resultan en mayores temperaturas y presiones durante la cavitación.

La aplicación del ultrasonido en el campo de los alimentos se conoce como sonicación y se divide en dos aplicaciones principales: el análisis de alimentos y el procesamiento de alimentos. Para el

análisis se utilizan altas frecuencias (5 – 10 MHz), baja intensidad ( $<1 \text{ W cm}^{-2}$ ) y es un tratamiento no destructivo. Por el contrario, para el procesamiento se utilizan bajas frecuencias (20 – 100 KHz), alta intensidad ( $10 – 1000 \text{ W cm}^{-2}$ ) que pueden provocar cambios físicos significativos en el alimento a causa de la cavitación (Bermúdez & Barbosa, 2011; Tiwari & Mason, 2012).

Los cambios físicos provocados por el ultrasonido de poder se aprovechan en procesos en los que se requiera el rompimiento del medio sonificado, como por ejemplo: para la inactivación de microorganismos, la extracción de compuestos de células o tejidos y la regulación de la actividad enzimática en alimentos (Bermúdez & Barbosa, 2011).

### **3.3.2 Inactivación microbiana**

La capacidad del ultrasonido para inactivar microorganismos se ha atribuido principalmente a los efectos de la cavitación acústica (Chandrapala *et al.*, 2012). Tiwari & Mason (2012) reportan que éste fenómeno provoca el debilitamiento y el rompimiento de las células bacterianas a través de tres factores. El primero es el daño a la pared celular debido a efectos mecánicos provocados por los gradientes de presión generados en el colapso de las burbujas. El segundo son las fuerzas de cizalla generadas por micro-corrientes. Finalmente, el tercero es un ataque químico a la pared celular por parte de radicales libres y de peróxido de hidrógeno que se forman durante la cavitación como producto de la sonólisis del agua. Otro mecanismo importante es la cavitación intracelular, que se refiere a choques micromecánicos que afectan a los componentes estructurales y funcionales de la célula hasta causar la lisis celular (Tiwari & Mason, 2012).

En un estudio se comparó el efecto de un tratamiento térmico y de la sonicación sobre *E. coli* utilizando microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). Al sonicar las células a 40 °C durante 3 minutos se observó que se produjeron agujeros en la superficie de la célula, los cuales se atribuyeron a la perforación de la pared celular y de la membrana citoplasmática provocada por las corrientes generadas durante la cavitación. También se observaron deformaciones en las paredes celulares y encogimiento de las células. Además, al aumentar la temperatura de sonicación a 60 °C los daños celulares y los cambios morfológicos fueron más extensivos. Se determinó también que los daños no son uniformes, pues después de los tratamientos se observó que habían células intactas (Tiwari & Mason, 2012).

Se debe considerar que la inactivación microbiana depende directa o indirectamente de variables como la fuente del ultrasonido, la geometría del reactor, la frecuencia y la intensidad. Además, la eficiencia de la inactivación se afecta por las propiedades del medio, tales como el volumen, temperatura, viscosidad y la concentración de gas disuelto. El tipo de bacteria también influye en la reducción, pues la sonicación ha mostrado ser menos efectiva en bacterias Gram-positivas posiblemente por tener una pared celular más robusta que las Gram-negativas (Tiwari & Mason, 2012).

Desde hace algunas décadas se han llevado a cabo estudios utilizando la sonicación para la inactivación microbiana de especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *Shigella* en diferentes alimentos. En cuanto a las pruebas realizadas específicamente con leche se ha utilizado sobre *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* y recuento total de coliformes (Bermúdez & Barbosa, 2011).

Por tratarse de una tecnología de preservación alternativa y por los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, la sonicación ha recibido mucha atención y se están llevando a cabo esfuerzos por aplicarla en la industria láctea. No obstante, los resultados de los estudios realizados en muchas matrices hasta la fecha indican que la eficacia de la sonicación por sí sola para la inactivación microbiana es baja e insuficiente. Como resultado, se han diseñado procesos que combinan la sonicación con otras tecnologías como altas presiones (manosonicación), tratamientos térmicos (termosonicación), alta presión y temperatura (manotermosonicación), presión osmótica (osmosonicación) y luz ultravioleta (fotosonicación) con el fin de aumentar su eficacia (Wong *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Arroyo *et al.*, 2011; Sengül *et al.*, 2011).

Por ejemplo, estudios realizados con *L. monocytogenes* en leche descremada mostraron que el valor de reducción decimal  $D_{60\text{ }^{\circ}\text{C}}$  disminuyó de 2,1 minutos, al aplicar únicamente el tratamiento térmico, a 0,3 minutos al combinar el calentamiento con la sonicación. De igual forma, al estudiar la inactivación de *E. coli* en leche UHT el valor D disminuyó de 77 a 23 segundos como resultado de la aplicación de la termosonicación (Bermúdez & Barbosa, 2011). En cuanto a la manotermosonicación, se han obtenido reducciones importantes de *L. monocytogenes* en leche descremada (Bermúdez & Barbosa, 2011). En otro estudio, Lee *et al.* (2009) observaron que al aplicar un tratamiento térmico a 40, 47 y 54 °C durante 4 minutos la reducción de *E. coli* era despreciable, al combinarlo con sonicación obtuvieron una reducción de aproximadamente 4 log y al utilizar la manotermosonicación obtuvieron una reducción de 5 log en 0,5 minutos.

Bermúdez *et al.* (2009) realizaron una investigación para modelar la inactivación de *Listeria innocua* en leche cruda variando la amplitud de onda del ultrasonido y utilizando una temperatura constante de 63 °C durante 30 minutos. Obtuvieron una reducción de 5,3 log luego de 30 minutos de pasteurización y una reducción de 5 log luego de 10 minutos de termosonicación, demostrando así un efecto sinérgico. En otra investigación realizada por Sengül *et al.* (2011) con leche cruda se determinó que la fotosonicación tiene un mayor efecto en la reducción de bacterias totales y coliformes que al utilizar las tecnologías por separado. Se realizó también un estudio con leche en polvo rehidratada utilizando *Cronobacter sakazakii* como indicador y los autores reportaron que se requerían 12 minutos de tratamiento térmico a 60 °C, 4 minutos de manosonicación (35 °C; 200 kPa) o 1,8 minutos de manotermonosonicación (60 °C; 200 kPa) para garantizar la muerte del 99,99% de *C. sakazakii* en la leche (Arroyo *et al.*, 2011).

Otros autores reportan que mediante la termosonicación se redujo en un 43 % el valor de reducción decimal de *Staphylococcus aureus* en leche cruda en comparación con utilizar el tratamiento térmico convencional. También se reporta que la reducción del recuento total de leche cruda resultó mayor conforme se aumentó la temperatura del tratamiento de termosonicación (Tiwari & Mason, 2012).

Por último, para retomar el efecto de la matriz sobre la inactivación microbiana, se investigó el efecto del contenido de grasa de la leche sobre la reducción de *Listeria innocua* y se obtuvo que la reducción disminuyó de 4,5 log a 2,5 log al aumentar el contenido de grasa de 1 % a 3,47 % luego de 30 minutos de sonicación a 63 °C. Asimismo, se observó que la reducción de *Salmonella* en una solución de peptonas fue de 2,5 log, mientras que al aplicar las mismas condiciones a una muestra de leche con chocolate la reducción fue de 0,1 log. El comportamiento de estos resultados se atribuye al efecto protector que tiene la grasa sobre los microorganismos (Tiwari & Mason, 2012).

### **3.3.2.1 Sonicación como alternativa a la pasteurización**

En el año 2002 se le solicitó a la FDA que revisara las tecnologías alternativas de procesamiento de alimentos y su equivalencia respecto a la pasteurización (Keener, 2013). Como resultado, en el año 2004, el Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos de Estados Unidos (NACMCF) emitió un documento llamado *Requisite Scientific Parameters For Establishing The Equivalence Of Alternative Methods Of Pasteurization* (Parámetros Científicos Requeridos para Establecer la Equivalencia de Métodos Alternativos de Pasteurización). En este documento, el NACMCF

define la pasteurización como cualquier proceso, tratamiento, o combinación de ambos, que es aplicado a los alimentos para reducir el microorganismo más resistente de importancia para la salud pública a un nivel al que no es probable que represente un riesgo para la salud pública bajo condiciones normales de distribución y almacenamiento. Aclara además, que la pasteurización se puede lograr utilizando múltiples tratamientos que en combinación logran el resultado esperado, pero que individualmente no lo hacen (NACMCF, 2004).

El NACMCF (2004) menciona que para equiparar cualquier proceso a la pasteurización debe seguirse un procedimiento de validación tomando en cuenta el diseño experimental, la sensibilidad y la especificidad del método utilizado para recuperar el patógeno, el uso de diferentes cepas de microorganismos, la reducción requerida, la evaluación de desviaciones de proceso y la uniformidad del tratamiento, las características de la matriz, entre otros factores, así como un posterior proceso de verificación. Incluso, en el caso de algunas tecnologías alternativas, el documento detalla aspectos que deben tomarse en cuenta para determinar si el tratamiento equivale a una pasteurización, investigaciones necesarias, los microorganismos más resistentes a cada tecnología, la información necesaria para la validación y la verificación y los posibles riesgos provocados al aplicar el tratamiento. Sin embargo, para el caso del ultrasonido no se encuentra disponible dicha información, pero sí señala que se requiere mayor investigación para escalar la tecnología a nivel industrial y evidenciar el efecto de la sonicación en las propiedades de los alimentos.

Otro aspecto importante, es que el microorganismo más resistente de importancia para la salud pública depende del alimento y de la tecnología utilizada para procesarlo. Por lo tanto, el patógeno con la mayor resistencia a un tratamiento podría no serlo al aplicarle otro tratamiento, es decir, que la bacteria más resistente al tratamiento térmico podría no ser la más resistente a la sonicación. Por ello, se requiere de mayor investigación para definir el patógeno de referencia específico para cada tecnología (NACMCF, 2004). En cuanto a la sonicación, dicho microorganismo aún no ha sido definido.

En el caso de esta investigación, se pretende iniciar el estudio del efecto de la sonicación sobre la inocuidad de productos lácteos, por ello se utiliza *Escherichia coli* como un indicador del posible comportamiento que podrían tener microorganismos patógenos de interés en leche durante el procesamiento de productos lácteos elaborados a partir de leche sonicada. Adicionalmente, se toma como referencia la reducción de 5 logaritmos, valor que pide la FDA para aprobar la pasteurización en otros alimentos líquidos como los jugos de frutas (FDA, 2001).

### **3.3.3 Efectos de la sonicación sobre la calidad de los lácteos**

La sonicación puede provocar cambios a nivel estructural en los productos lácteos, pues además de afectar las membranas celulares también propicia la alteración de otros componentes de los alimentos como la grasa y las proteínas. Esto resulta de interés ya que tiene un impacto directo sobre la calidad, tanto de la leche como de sus productos derivados y por tal razón ha sido objeto de estudio.

#### ***3.3.3.1 Propiedades nutricionales***

Hasta ahora la mayoría de estudios relacionados con la inactivación microbiana o enzimática han mostrado que la sonicación provoca pérdidas de nutrientes mínimas. Sin embargo, por tratarse de una tecnología emergente aún se requiere de mayor investigación para asegurar que el producto obtenido no solamente sea inocuo sino que conserve su calidad nutricional (Bermúdez & Barbosa, 2011; Chandrapala *et al.*, 2012).

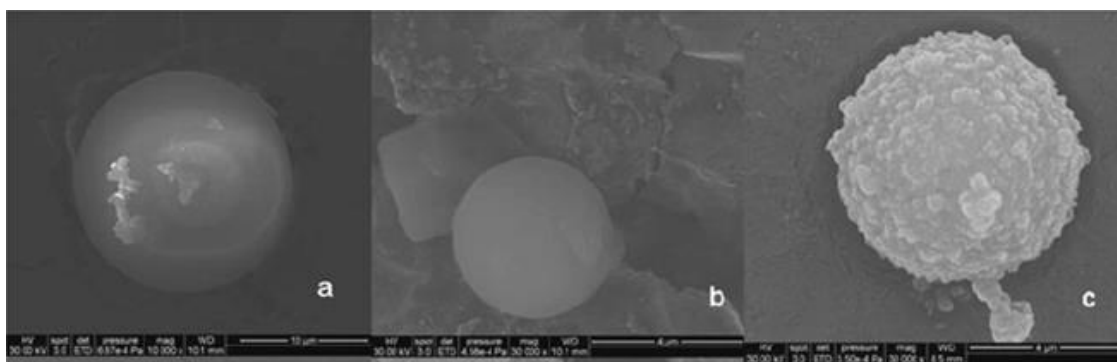
Uno de los efectos relacionados con la sonicación es la desnaturalización de proteínas. Por ejemplo, se determinó una disminución de 0,26 % en el contenido de proteína entre leche cruda y leche termosonicada (Bermúdez & Barbosa, 2011; Tiwari & Mason, 2012). Una posible explicación es que ocurra una desnaturalización debido al efecto combinado de la cavitación y el tratamiento térmico. Sin embargo, se cree que la desnaturalización al sonicar la leche únicamente ocurre al combinarla con calor (>60 °C), pues en pruebas realizadas con temperaturas menores a 50 °C, el contenido de proteína soluble no fue diferente a la del control (Bermúdez & Barbosa, 2011).

Adicionalmente, en otro estudio se determinó un aumento en la capacidad antioxidante de la leche descremada al someterla a la sonicación. Se cree que esto es provocado por la ruptura de estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas. Además, el rompimiento de las micelas de caseína en la leche a causa de la sonicación conlleva a un aumento de la caseína presente y esto también tiene un efecto antioxidante importante (Bermúdez & Barbosa, 2011).

En cuanto al impacto sobre las vitaminas y los minerales, la información disponible es escasa. Se ha determinado que al sonicar la leche los cambios en el contenido de calcio no son significativos (Bermúdez & Barbosa, 2011; Shanmugam *et al.*, 2012).

### 3.3.3.2 Propiedades físico-químicas

Se ha demostrado que la sonicación provoca cambios en algunas propiedades físico-químicas de la leche. Uno de los efectos mayormente reportados es el de homogenización. Se ha reportado que los glóbulos grasos de la leche sufren una disminución de tamaño del 81,5 % tras varios segundos de sonicación y que el efecto fue aún mayor al combinar el tratamiento con calor. Adicionalmente, la superficie de los glóbulos grasos pasa de ser suave y lisa a rugosa, tal como se observa en la Figura 1 (Bermúdez & Barbosa, 2011).



**Figura 1.** Microscopía electrónica de barrido de los glóbulos grasos de la leche. Las imágenes muestran (a) la integridad de un glóbulo graso de leche cruda sin procesar; (b) la estructura de un glóbulo tratado térmicamente y (c) glóbulo graso de menor tamaño, roto y rugoso debido a la sonicación (Bermúdez & Barbosa, 2011).

Como consecuencia de la homogenización también se ha encontrado que conforme incrementa la intensidad de la sonicación ocurre un aumento en la luminosidad de la leche y se vuelve más blanca. Este fenómeno ocurre porque el color blanco de la leche se debe a que los glóbulos de grasa dispersan la luz, por lo tanto, al reducir su tamaño éstos se vuelven más homogéneos y se modifica la reflexión de la luz provocando que el color se vea más blanco (Bermúdez & Barbosa, 2011; Tiwari & Mason, 2012). Se ha mostrado que incluso luego de 16 días en refrigeración el color blanco se mantiene y no ocurre sinéresis. Esto sugiere que la sonicación puede mejorar la apariencia de la leche durante su vida útil y se puede acoplar la sonicación al proceso de pasteurización de manera que se homogenice y se asegure la inocuidad en una sola operación (Bermúdez & Barbosa, 2011).

Otra consecuencia de la homogenización de la grasa es el aumento en el contenido de lípidos. Este cambio ocurre debido a que al reducir el tamaño de los glóbulos se produce una salida de triglicéridos al medio, facilitando así su extracción y cuantificación (Tiwari & Mason, 2012).

En una investigación realizada en el año 2008, se utilizó el ultrasonido para procesar proteínas del suero y se demostró que estas sufrieron un cambio en su conformación y estructura, alterando así su solubilidad en el agua. La modificación en la estructura provocó que los aminoácidos hidrofílicos quedaran en contacto con las moléculas de agua y que por lo tanto aumentara su solubilidad (Bermúdez & Barbosa, 2011). Chandrapala *et al.* (2012) también reportan estudios en los que se ha demostrado que la sonicación mejora la solubilidad y la capacidad de formar espuma de las proteínas séricas.

Se ha estudiado también el efecto de la sonicación sobre las enzimas presentes en la leche y se ha determinado que puede disminuir o inclusive detener la actividad enzimática. Se reporta que hubo un efecto sinérgico al inactivar enzimas de la leche mediante termosonicación a 61, 70 y 75 °C. Entre las enzimas estudiadas se encuentran la fosfatasa alcalina, la lactoperoxidasa, la  $\alpha$ -lactalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina. Además, en otro estudio se determinó que conforme aumenta el tiempo de sonicación de la quimosina, disminuye su actividad durante la formación de la cuajada (Bermúdez & Barbosa, 2011).

Según Bermúdez y Barbosa (2011), la inactivación enzimática ocurre debido a la generación de radicales libres, ya que estos afectan directamente los enlaces disulfuro presentes en las proteínas. Como evidencia se reportó que luego de los tratamientos de termosonicación había presencia de peróxido de hidrógeno como consecuencia de la formación de radicales libres (Bermúdez & Barbosa, 2011). Sin embargo, otros autores concluyeron que la inactivación enzimática no ocurre si únicamente se aplica la sonicación. Además, encontraron que la inactivación depende del medio y de la enzima (Tiwari & Mason, 2012).

Por otra parte, la vida útil de la leche cruda entera y termosonicada a 63 °C por 30 minutos ha mostrado ser más extensa que la de la leche pasteurizada bajo los métodos convencionales. El recuento de bacterias mesófilas resultó  $<2 \log_{10}$  UFC/mL luego de 16 días de almacenamiento a 4 °C, siempre tomando en cuenta que el contenido de grasa representa un parámetro decisivo en el crecimiento bacteriano (Bermúdez & Barbosa, 2011).

En cuanto a la viscosidad, Bermúdez y Barbosa (2011) reportan que en leche fresca la viscosidad disminuyó de 1,9 mPa s a 1,76 y 1,77 mPa s luego de ser sonicada, independientemente de su contenido de grasa. Este comportamiento se ha justificado basándose en el efecto de reducción de tamaño de los glóbulos grasos, el cual provoca que la leche fluya con mayor facilidad.



Otro parámetro de calidad en la industria láctea es el pH, que en la leche fresca debe ser alrededor de 6,7. En el caso de la leche sonicada se obtuvieron valores menores (6,5 y 6,6) para la leche descremada y leche entera respectivamente. Estos valores no representan cambios significativos en el pH de la leche, aunque igualmente se han propuesto algunas explicaciones a dicha disminución. Se dice que como la leche está conformada en gran parte por agua, los radicales libres que se forman a partir de las moléculas de agua al sonicarla son los responsables de la acidificación. También, se presume que el ultrasonido podría promover la actividad de algunas enzimas y acelerar reacciones químicas que provoquen la disminución del pH. No obstante, ninguna de estas teorías ha sido comprobada (Bermúdez & Barbosa, 2011).

Específicamente en productos derivados se ha demostrado que la homogenización con ultrasonido mejora la estabilidad ante el cremado durante el almacenamiento en yogurt y leche. Además, la sonicación de la leche mejora la viscosidad y aumenta la capacidad de retención de agua del yogurt, disminuyendo así la sinéresis. Estas mejoras están directamente relacionadas con la estructura del yogurt, que está formada por cadenas y agregados de caseína que interactúan con las proteínas del suero para retener el suero y los glóbulos de grasa. Adicionalmente, los cambios provocados por el ultrasonido en la membrana de los glóbulos grasos podría modificar la forma en que éstos interactúan con ellos mismos y con las proteínas, mejorando así las propiedades del gel (Chandrapala *et al.*, 2012).

También se ha reportado que los cultivos de leche termosonicada forman el gel a mayores valores de pH, tienen mayor viscosidad y mayor capacidad de retención de agua. Se menciona además que la estructura es diferente, similar a la de un panal de abeja y de naturaleza más porosa (Chandrapala *et al.*, 2012). Además, el tiempo de fermentación del yogurt disminuye, ya que la cavitación estimula la producción de ácido mediante la liberación de enzimas intracelulares de los microorganismos y favorece la hidrólisis de la lactosa (Bermúdez & Barbosa, 2011).

Otros investigadores han detectado que durante la sonicación de leche pasteurizada se producen aromas similares al hule o a gomas así como la formación de alquenos como producto de la oxidación lipídica. También se ha señalado que al combinar la sonicación con los tratamientos térmicos aumenta la oxidación lipídica conforme incrementa la sonicación y el tiempo de almacenamiento (Tiwari & Mason, 2012).

En relación con la elaboración de queso, se busca reducir el tiempo de endurecimiento y aumentar el rendimiento, pues este ronda el 10 %. Al sonicar la leche para estudiar el efecto sobre la

actividad proteolítica de las enzimas relacionadas con el cuajo de la leche, se determinó que el ultrasonido acelera el endurecimiento de la cuajada y que el producto final presenta mayor firmeza debido a la actividad de las enzimas. Se reporta que el queso fresco producido con leche sonicada muestra mejores características como mayor blancura, mayor dureza, mayor capacidad de retención de agua, mayor rendimiento y en general mejor aceptación por parte de los consumidores (Bermúdez & Barbosa, 2011).

### **3.4 Elaboración de queso**

El paso esencial durante la elaboración de queso es la coagulación de las proteínas de la leche, ya sean las caseínas, las proteínas del suero o la combinación de ambas. Existen tres principales formas de lograrlo: mediante enzimas proteolíticas, acidificando hasta el punto isoeléctrico de las proteínas ( $pI \sim 4,6$ ) o calentando hasta  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  a un pH de 5,2. La primera es la más popular y la última es la utilizada para la elaboración de quesos como el Ricotta (Gunasekaran & Ak, 2003).

#### **3.4.1 Coagulación enzimática**

La coagulación enzimática permite precipitar la fracción proteica compuesta por las micelas de caseína. Se le llama enzimática puesto que se logra mediante la adición de enzimas proteolíticas a la leche, conocidas como cuajo. La enzima principal es conocida como quimosina y puede ser de origen animal, vegetal o microbiano (Gunasekaran & Ak, 2003).

Para una mejor comprensión de la coagulación enzimática es necesario conocer la estructura de las micelas de caseína, las cuales se asemejan a una esfera y se componen de varios tipos de caseínas. Las  $\alpha$  y  $\beta$  caseínas son hidrofóbicas y se encuentran en el interior de la estructura rodeadas por la  $\kappa$ -caseína, que cumple una función estabilizadora evitando así que las micelas se aglomeren. Esta capacidad de estabilizar se debe a que la caseína  $\kappa$  está formada por una parte hidrofóbica (para- $\kappa$ -caseína) y una parte hidrofílica (glicomacropéptido). El glicomacropéptido sobresale de la micela a manera de vellosidades, interactúa con la fase acuosa y de esta manera estabiliza la micela (Fox & Guinee, 2013).

Al agregar el cuajo, la quimosina hidroliza el enlace entre la para- $\kappa$ -caseína y el glicomacropéptido. Esto ocasiona que el péptido se solubilice en la fase acuosa y pierda su capacidad estabilizadora, provocando entonces que las micelas coagulen conforme avanza la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína (Fox & Guinee, 2013).

El proceso de la coagulación ocurre en dos etapas. Durante la primera, los vellos hidrofílicos de la  $\kappa$ -caseína de la micela son hidrolizados. La segunda, inicia una vez que un 85 a 95 % de la  $\kappa$ -caseína ha sido hidrolizada y ocurre la agregación de las micelas alteradas (para-caseínas) (Gunasekaran & Ak, 2003; Waagner, 2006; Fox & Guinee, 2013). Dicha agregación ocurre en parte debido a las fuerzas de van der Waals, sin embargo son insuficientes y por ello resulta necesaria la presencia de iones calcio en el medio. Estos iones tienen un doble efecto en la coagulación, disminuyen la repulsión electrostática neutralizando las cargas negativas de las micelas y además crean enlaces entre sitios negativos de las paracaseínas. Es por esto que, es una práctica común adicionar cloruro de calcio a la leche al momento de agregar el cuajo, pues acelera la coagulación, reduce la cantidad de cuajo necesaria y permite obtener un gel más firme (Walstra *et al.*, 2006).

Conforme aumenta el grado de agregación de las micelas, se va formando una red tridimensional en la que quedan atrapados glóbulos de grasa, agua y otros compuestos hidrosolubles (Gunasekaran & Ak, 2003). Este fenómeno continúa hasta que se logran visualizar los agregados, también conocidos como flóculos. Al tiempo que transcurre desde la adición del cuajo, hasta que los agregados puedan ser detectados visualmente se le conoce como tiempo de floculación o tiempo de coagulación (Walstra *et al.*, 2006).

El tiempo de floculación se ve afectado por otros factores además de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ . Uno de ellos es la temperatura, que debe ser mayor a 18 °C para que ocurra la aglomeración de las micelas aun cuando la  $\kappa$ -caseína haya sido hidrolizada. Adicionalmente, cuanto mayor sea el contenido de caseína de la leche, menor será el tiempo de floculación. En cuanto al pH, éste afecta la actividad enzimática pero no tiene mayor efecto sobre la velocidad de agregación de las paracaseínas (Walstra *et al.*, 2006). Otros autores mencionan el efecto de la concentración y de la actividad enzimática, en ambos casos, un incremento de éstas se reflejará en un menor tiempo de coagulación y mayor firmeza (Gunasekaran & Ak, 2003).

### **3.4.2 Coagulación ácida**

La coagulación ácida es utilizada en la fabricación de menor variedad de quesos, que además son producidos a partir del suero proveniente de la elaboración de queso por coagulación enzimática, de leche o de una combinación de suero con leche (Fox & Guinee, 2013). En este caso, el procedimiento de interés es la coagulación ácida del suero lácteo. El objetivo de este tipo de coagulación es recuperar el valor nutricional de las proteínas del suero obtenido como subproducto de la elaboración de queso

por coagulación enzimática, ya que hasta hace unos años se descartaba y causaba gran contaminación ambiental (Fox *et al.*, 2000).

El procedimiento implica un calentamiento hasta los 90 °C por un tiempo entre 5 y 30 minutos y una posterior acidificación directa con ácido cítrico, acético o láctico, hasta que el pH alcance el punto isoeléctrico de las proteínas, el cual ronda un valor alrededor de 5. Durante la etapa de calentamiento las proteínas séricas se unen a las caseínas y además se desnaturalizan, lo cual las hace insolubles en el medio y ambas precipitan al acidificar en forma de partículas de diferentes formas y tamaños (Ramesh, 2011).

Las partículas de este tipo de queso son frágiles, permeables y tienen una contractibilidad reducida. La cuajada que se obtiene es desmenuzable y poco cohesiva, contrario a las características de la cuajada obtenida a partir de la coagulación enzimática. Además, es una cuajada con mayor porcentaje de humedad debido a la alta capacidad de ligar agua de las proteínas séricas y no tiene la propiedad de derretirse (Fox *et al.*, 2000).

### **3.4.3 Elaboración de queso seco**

Un queso seco o duro se caracteriza principalmente por presentar un contenido de humedad bajo dentro de un rango de 26-36 %. Algunos tipos de queso que cumplen con esta característica son el Parmesano y el Romano (Gunasekaran & Ak, 2003). Estos quesos se caracterizan por tener una pasta dura y sin presencia de ojos, su textura típica se atribuye a la unión de pequeños gránulos de cuajada y al fracturarlo se puede observar cómo se quiebra irregularmente (De Roest, 2000). Estas propiedades características del queso seco son resultado principalmente de las operaciones de corte y cocción (Izzi *et al.*, 2012). A continuación se detalla el procesamiento y el efecto de cada etapa sobre el producto final.

#### **3.4.3.1 Pre-tratamiento de la leche**

El paso inicial en la elaboración de queso es la estandarización de la leche, es decir, el ajuste de la proporción entre la grasa y la proteína. Esta etapa es de especial importancia en caso de que el producto deba cumplir con estándares legales en cuanto a su composición (Gunasekaran & Ak, 2003). Posteriormente, se aplica un tratamiento que asegure la inocuidad del producto final mediante la eliminación de patógenos que pudieran estar presentes en la leche, por ejemplo la pasteurización

(Walstra *et al.*, 2006). Sin embargo, a nivel artesanal y en algunos lugares se omite el tratamiento térmico y se utiliza leche cruda como materia prima para evitar alteraciones de sabor.

### **3.4.3.2 Adición de cultivos lácticos o pre-maduración**

La adición de cultivos lácticos iniciadores a la leche, tiene como objetivo principal la producción de ácido láctico a partir de la lactosa (Ustunol, 2015). Las bacterias inoculadas provocan además diversas reacciones tanto en la leche como en la cuajada, afectando así la composición y las características del queso. Por ejemplo, ocurren reacciones proteolíticas, lipolíticas y fermentación de azúcares. Otro aporte importante del cultivo es el desarrollo del aroma y el sabor característico del producto, por lo que resulta indispensable seleccionar el cultivo correcto según el tipo de queso (Van Hoorde & Van Landschoot, 2015).

De manera más específica, la acidificación de la leche controla el crecimiento de microorganismos indeseables como los patógenos y productores de gas. Además, modifica el tiempo de coagulación enzimática debido a que el cuajo presenta mayor actividad a un menor pH. También influye en el pH, en el contenido de fosfato de calcio y en la humedad de la cuajada, pues favorece la sinéresis (Walstra *et al.*, 2006). Fox & Guinee (2013) reportan que la acidificación afecta la fuerza del gel de la cuajada, lo cual tiene un impacto sobre el rendimiento.

Por otra parte, la actividad proteolítica del cultivo afecta las propiedades reológicas y de textura del queso, pues se van degradando las caseínas durante el tiempo de almacenamiento. Adicionalmente, las enzimas peptidasas liberadas a causa de la autólisis celular son responsables de la formación de aminoácidos libres que contribuyen al sabor del queso (Waagner, 2006).

Cabe destacar que el efecto sobre el producto depende del tipo de cultivo utilizado. En el procesamiento del queso seco se utilizan cultivos termófilos, pues la cuajada experimenta una etapa de cocción a altas temperaturas (45-55 °C), tal como será detallado más adelante. En este caso el cultivo se compone de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus* (Waagner, 2006; Fox & Guinee, 2013; Ustunol, 2015).

### **3.4.3.3 Coagulación**

La coagulación es enzimática (ver sección 3.4.1 Coagulación enzimática), por lo que una vez que se ha activado el cultivo iniciador en la leche se agregan el  $\text{CaCl}_2$  y el cuajo a la temperatura óptima de la

enzima (32-35 °C). Se agita para favorecer una distribución homogénea y se deja reposar la mezcla hasta que se forme la cuajada y sea lo suficientemente firme para cortarla (Waagner, 2006).

Para determinar si la cuajada está lista para ser cortada se realiza una prueba de corte en cruz. La prueba consiste en realizar una incisión en forma de cruz y si se observa que las superficies formadas son lisas y hay salida de suero entonces puede continuarse con la etapa de corte (Torres, 2001).

#### **3.4.3.4 Corte**

La operación de corte tiene como objetivo acelerar la sinéresis mediante el aumento del área superficial de la cuajada al ser cortada en cubos pequeños. De esta forma, se reduce la distancia que debe difundir el suero y se facilita su salida (Gunasekaran & Ak, 2003). Es de esperar entonces que cuanto más pequeño sea el tamaño de los cubos, menor será la humedad final de la cuajada y por lo tanto del queso. Para obtener un queso seco el tamaño de los cubos debe ser entre 2 y 5 mm (Waagner, 2006).

El tiempo de corte debe hacerse en el momento preciso. Si se hace antes de tiempo se pierden sólidos, también llamados finos, que migran al suero afectando negativamente el rendimiento. Por otro lado, si se corta muy tarde mayor cantidad de agua queda atrapada en la cuajada y se modifica la humedad final del queso (Gunasekaran & Ak, 2003; Walstra *et al.*, 2006). Normalmente esta operación se realiza mediante cuchillos o con un instrumento conocido como lira que se compone de alambres delgados y tiene una forma que se ajusta a la tina quesera (Fox & Guinee, 2013).

#### **3.4.3.5 Cocción**

Luego del corte incrementa la salida de suero dando inicio a la sinéresis, fenómeno que se favorece mediante la agitación de la mezcla de la cuajada y el suero. Durante este proceso los gránulos se tornan más firmes como consecuencia de la pérdida de humedad. Al mismo tiempo, por tratarse de un queso seco, la agitación incluye un calentamiento, razón por la que a esta etapa se le llama cocción (Gunasekaran & Ak, 2003; Waagner, 2006).

El proceso de cocción va a favorecer aún más la sinéresis, facilitando así la contracción de los gránulos. Durante esta etapa resulta fundamental controlar la velocidad de calentamiento, pues si es muy rápida puede formarse una corteza en la superficie del gránulo que va a dificultar la salida del suero y si es muy lenta la salida de suero podría ser mayor a la deseada porque toma mayor cantidad de

tiempo alcanzar la temperatura deseada. Los parámetros característicos durante la cocción del queso seco son calentar la mezcla del suero con la cuajada hasta alcanzar una temperatura entre los 50 y 56 °C (Waagner, 2006) y a una velocidad promedio de 4 a 6 °C/min (Iezzi *et al.*, 2012; Mucchetti *et al.*, 2014).

Las altas temperaturas (~50 °C) también favorecen la actividad metabólica de las bacterias lácticas en la cuajada, situación que se traduce un aumento de la sinéresis, pues el descenso del pH provocado por la producción de ácido láctico favorece la salida del suero (Gunasekaran & Ak, 2003).

#### **3.4.3.6 Pre-prensado y prensado**

Una vez que se obtiene la cuajada con el nivel de humedad deseada, se retira una parte del suero hasta que éste apenas cubra la cuajada y se aplica una ligera presión por un tiempo corto. Este método de prensado en el suero caliente resulta en un queso de textura cerrada y compacta (Waagner, 2006).

Posteriormente, se retira la cuajada del suero y se coloca en los moldes para continuar con las operaciones de moldeado y volteo. Durante estas etapas el peso de la cuajada ejerce una fuerza sobre sí misma y continúa el proceso de formación del queso mediante la salida de suero y la compactación de los gránulos de cuajada. El volteo ocurre posterior al moldeado y consiste básicamente en voltear el molde para que la presión sea ejercida sobre la otra cara del queso.

Al finalizar el volteado, la cuajada se somete a una presión mayor durante la etapa de prensado. El prensado ayuda a eliminar suero y a compactar la cuajada de manera que adopte la forma deseada y se dé la formación de corteza. El tiempo y la intensidad del prensado tienen un efecto sobre la humedad final del queso, a menor tiempo y menor presión, mayor será el contenido de agua (Menz, 2002; Gunasekaran & Ak, 2003).

#### **3.4.3.7 Oreo**

Al haberse formado el queso y antes del salado, es conveniente que el queso pase por una etapa de oreo en la cual se seca su superficie, se homogeniza el color y se forma una corteza más dura y a la vez protectora. Para que esto suceda se coloca el queso en un lugar con una ventilación moderada y una temperatura controlada (Pardo & Almanza, 2003; Romero del Castillo & Mestres, 2004).

### **3.4.3.8 Salado**

El salado es una etapa fundamental pues sin ella el queso carece de sabor. Adicionalmente, la sal tiene un papel importante en cuanto a la textura, la calidad microbiológica, la regulación de la actividad enzimática y el contenido de humedad (Gunasekaran & Ak, 2003; Waagner, 2006). El queso seco tomado como referencia para esta investigación presenta un porcentaje promedio de sal de 5,1 % (Lorenzini, 1994), el cual es notoriamente alto tomando en cuenta que el contenido de sal en los quesos se encuentra en un rango de 0,7 a 6 % (Guinee & Fox, 2004).

La operación de salado se puede realizar de tres formas: salando en seco mediante la adición de cristales de sal a la cuajada, frotando los cristales o salmuera en la superficie del queso o sumergiendo el queso en salmuera (Gunasekaran & Ak, 2003). Sin embargo, originalmente el queso seco solía salarse introduciéndolo en camas de sal de manera que quedara totalmente cubierto. Así, se obtenía un producto final con un valor bajo de  $A_w$  y esto permitía conservarlo por largos periodos de tiempo cuando no se contaba con un sistema de refrigeración (Lorenzini, 1994). Lo que ocurre durante el salado es una transferencia de masa entre el queso y la sal, pues los iones de sodio difunden de la región de alta concentración a la de baja concentración, al mismo tiempo que el agua del queso migra en dirección opuesta y abandona el producto. Cuanto mayor sea la concentración de sal mayor será la salida de agua y por lo tanto, el resultado de este método de salado es un producto de baja humedad y muy estable (Walstra *et al.*, 2006).

### **3.4.4 Elaboración de queso Ricotta**

El queso Ricotta es un queso blando, sin maduración y originario de Italia, en otros países latinoamericanos también se conoce como Requesón. Este queso es obtenido a partir de una coagulación ácida (ver sección 3.4.2 Coagulación ácida) y su principal componente son las proteínas séricas. La USDA especifica que existen tres tipos de queso Ricotta según la materia prima de partida: leche entera, leche semi-descremada y leche descremada o suero (Fox *et al.*, 2000).

Tradicionalmente, el queso Ricotta se producía a partir del suero obtenido de la elaboración de queso Mozzarella, sin embargo en la actualidad se produce a partir casi cualquier tipo de suero dulce. En la literatura se reportan variedad de métodos de elaboración, pero en general coinciden en que se realiza una etapa inicial de calentamiento ya sea de la leche, del suero o de una mezcla de ambos a una temperatura entre los 80 y 90 °C y una posterior acidificación directa con un ácido orgánico hasta



alcanzar un pH alrededor de 5. Los ácidos más utilizados son el acético, cítrico o láctico. Posteriormente, el precipitado obtenido se deja reposar por un tiempo de 10 a 20 minutos y luego se procede a drenar el suero resultante utilizando una manta. El proceso de drenado se realiza bajo condiciones de refrigeración y se mantiene de esta forma hasta ser empacado (Fox *et al.*, 2000; Johnson, 2001).

El queso Ricotta presenta un contenido de humedad de hasta 80 %, un sabor suave y levemente ácido y es un producto listo para consumo inmediato pues no tiene un periodo de maduración (Shaw, 1996). Es un producto aceptado no solamente para consumo directo, sino que se utiliza en diferentes aplicaciones como ingrediente, por ejemplo en la elaboración de otros quesos para aumentar el rendimiento y en la producción de rellenos para repostería (Fox *et al.*, 2000).

La sobrevivencia de microorganismos en el producto es baja debido al tratamiento térmico que experimenta bajo condiciones ácidas, por lo que básicamente sólo podrían sobrevivir esporas. Como resultado, las condiciones higiénicas durante el empaque son de suma importancia. En su mayoría, el deterioro provocado por crecimiento microbiano en este tipo de queso es causado por *Pseudomonas* sp., mohos y levaduras (Johnson, 2001). Su vida útil es aproximadamente de una a tres semanas si ha sido correctamente empacado y se almacena en refrigeración (Fox *et al.*, 2000).

### **3.4.5 Rendimiento quesero**

El rendimiento quesero es la suma de materia grasa, proteínas, agua y otros componentes de la leche transferidos al queso durante el proceso de elaboración, es decir, la cantidad de queso obtenida a partir de una determinada cantidad de leche. Existen diversas formas de expresar el rendimiento, sin embargo lo más común es reportarlo como los kilogramos de queso obtenidos por cada 100 kilogramos de leche. Otras opciones son: litros de leche por tonelada de queso, kilos de materia seca por 100 kilos de leche o fracción de un determinado constituyente (Menz, 2002). El rendimiento es un valor de mucho interés para los productores, pues será lo que determine sus ganancias (Walstra *et al.*, 2006).

Algunos autores mencionan que reportar el rendimiento como kilos de queso por kilos de leche es lo más conveniente, pues permite notar con mejor precisión las variaciones del rendimiento y de los sólidos totales de la leche según la temporada. Por el contrario, otros autores resaltan que esta expresión dificulta la comparación entre lotes, pues no toma en cuenta el efecto del contenido de sólidos de la leche sobre el rendimiento (Menz, 2002).

El rendimiento quesero depende de diversos factores como el contenido de caseína y de grasa de la leche, la variedad de queso, la composición final del producto, las etapas del procesamiento y la manera en que estas se lleven a cabo (Menz, 2002). A continuación se detallará el efecto de estos y otros parámetros sobre el rendimiento quesero.

Naturalmente, la composición de la leche va a afectar el rendimiento quesero, pues los glóbulos grasos, las micelas de caseína y otros solutos son los componentes que forman el queso. Por lo general, se considera a las caseínas como la fracción de mayor importancia (Walstra *et al.*, 2006). La composición de la leche se ve influenciada por elementos genéticos como la raza, así como por causas medioambientales dentro de los que se encuentran la estación, el clima, la edad, el estado de gestación, la nutrición, entre otros (Menz, 2002).

La calidad microbiológica también influye en el rendimiento, debido a que muchas de las bacterias psicrótrofas que pueden crecer en la leche producen proteasas termo-resistentes (Walstra *et al.*, 2006; Chandan & Kapoor, 2011). En consecuencia, si ocurre un crecimiento excesivo de estas bacterias y un almacenamiento prolongado de la leche, la pérdida de rendimiento de proteína puede alcanzar hasta un 5 %. Para contrarrestar este efecto se deben tener buenas prácticas agrícolas en finca y se debe termizar la leche al momento de recibirla en caso de que se vaya a almacenar por un tiempo mayor a algunas horas antes de la elaboración de queso (Walstra *et al.*, 2006).

En el caso de las pérdidas durante el procesamiento, están dadas principalmente por la velocidad de agitación, el tamaño y la velocidad del corte de los granos, la temperatura de cocción, la separación del suero, el prensado y el salado (Menz, 2002, Walstra *et al.*, 2006, Chandan & Kapoor, 2011). Todos estos parámetros se encuentran estrechamente relacionados con la cantidad de suero que se remueve de la cuajada, que es la variable más importante en la determinación de la composición y el rendimiento del queso pues afecta su humedad final (Walstra *et al.*, 2006).

El corte de la cuajada no solo se relaciona con la salida del suero, sino también con la pérdida de pequeños fragmentos de la cuajada conocidos como finos, los cuales se desprenden durante el proceso de corte y posteriormente quedan en el suero pues no se logran recuperar debido a su tamaño. Además, el tiempo de corte debe ser el correcto, pues si la cuajada se corta cuando aún está muy suave se puede fragmentar provocando altas pérdidas. De igual forma, si el gel se corta cuando ya está muy firme los cubos pueden romperse en vez de cortarse y también ocurren pérdidas de finos (Walstra *et al.*, 2006).

Contrario a los casos anteriores, el rendimiento puede incrementar cuando ocurre una desnaturalización de las proteínas séricas, provocada típicamente por un tratamiento térmico excesivo. Lo que sucede es que la  $\beta$ -lactoglobulina desnaturalizada interactúa con las micelas de caseína y pasa a formar parte de la cuajada cuando las caseínas coagulan. Otro factor que favorece el rendimiento es la adición de cloruro de calcio pues ayuda a la formación de la cuajada como se mencionó anteriormente (Walstra *et al.*, 2006).

La homogenización también puede incrementar el rendimiento, pues provoca la formación de glóbulos grasos más pequeños que son recubiertos por micelas de caseína y que en su mayoría pasan a formar parte de la cuajada. De esta forma, durante el corte y la agitación la transferencia de grasa al suero es menor que en el caso de la leche sin homogenizar y aumenta el rendimiento. Sin embargo, es poco común utilizar leche homogenizada para la elaboración de queso pues en general provoca una textura y un sabor no deseados como producto del favorecimiento de la lipólisis (Walstra *et al.*, 2006).

### **3.4.6 Aseguramiento de la inocuidad de los quesos**

El aseguramiento de la inocuidad de un queso inicia desde la correcta obtención y manipulación de la leche en la finca, de manera que la materia prima sea de excelente calidad microbiológica, con un bajo recuento de células somáticas y esté libre de sustancias tóxicas y cuerpos extraños que puedan atender contra la salud del consumidor. Durante el procesamiento también deben aplicarse las Buenas Prácticas de Manufactura, se debe controlar la calidad del agua, asegurar una correcta desinfección de los equipos y condiciones asépticas de empaque y almacenamiento (Lillevang, 2006).

Sumado a lo anterior, como etapas del procesamiento se aplican diversas técnicas o tratamientos que permiten obtener un producto final inocuo, estable durante el almacenamiento y de mayor vida útil. La mayoría de esos tratamientos tienen además un papel importante en el desarrollo de los atributos sensoriales específicos del queso.

#### ***3.4.6.1 Tratamientos térmicos***

En la elaboración de queso se debe utilizar leche tipo A con un recuento total no mayor a 100 000 UFC/mL o tipo B con un recuento no mayor a 300 000 UFC/mL (Johnson, 2001) y debe mantenerse en refrigeración hasta el momento en que vaya a ser utilizada (Lillevang, 2006). Sin embargo, a pesar de las buenas prácticas en finca y de la calidad microbiológica de la leche, ésta normalmente es

pasteurizada a nivel industrial para asegurar la inocuidad del producto final mediante la eliminación de patógenos (ver Sección 3.2.4.1 Tratamientos térmicos).

En el caso de quesos duros la etapa de cocción también se relaciona con la inocuidad pues se utilizan temperaturas entre 53 y 55 °C por un periodo largo de tiempo de hasta 60 minutos en algunos quesos. Como resultado puede ocurrir una reducción de la carga microbiana indeseable al mismo tiempo que se favorece el crecimiento del cultivo iniciador (Maifreni *et al.*, 2013).

#### **3.4.6.2 Acidificación**

El crecimiento de patógenos también es inhibido por medio de acidificación del queso, ya sea mediante la adición directa de un ácido orgánico o por la producción de ácido láctico provocada por el cultivo láctico. La combinación de un bajo pH y la presencia del ácido logra inhibir el crecimiento de patógenos y de microorganismos de deterioro, especialmente gramnegativos (Lillevang, 2006; Maifreni *et al.*, 2013).

El efecto antimicrobiano de la acidificación se ha atribuido a diversos mecanismos, por ejemplo a acciones dentro de la célula o en su pared o membrana celular. Sin embargo, el mecanismo más evidente es el descenso del pH del medio provocado por el aumento de protones en el medio. Puesto que cada especie o cepa tiene un rango de pH óptimo de crecimiento, si el valor cae y resulta menor a dicho rango el crecimiento se inhibe y el microorganismo eventualmente muere (Stratford & Eklund, 2003).

#### **3.4.6.3 Uso de cultivos protectores**

Además de acidificar, el cultivo iniciador compite con las bacterias patógenas y produce bacteriocinas y peróxido de hidrógeno para inhibir su crecimiento (Maifreni *et al.*, 2013). Hill (s.f.) incluso menciona que en su opinión, el desarrollo adecuado del cultivo láctico tiene la misma importancia que la pasteurización en lo que respecta a la inocuidad del queso, dejando de lado a los quesos a los que no se les adiciona cultivo como es el caso del Ricotta.

#### **3.4.6.4 Salado**

Mediante la etapa de salado se persiguen dos objetivos que son mejorar el sabor del queso y aumentar su vida útil. El último es posible pues al aumentar la concentración de sal, incrementa la interacción de solutos con el agua y disminuye el  $A_w$ , que es el agua disponible en el alimento para el

crecimiento microbiano y la actividad enzimática. En consecuencia, cuanto menor sea dicho valor menor será la actividad microbiana pues no hay agua disponible para los procesos bioquímicos de la célula (Davidson & Critzer, 2012). Los únicos microorganismos patógenos de importancia en quesos que podrían resistir a estas condiciones son *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* (Lillevang, 2006).

#### **3.4.6.5 Refrigeración**

Las bajas temperaturas causan un descenso e incluso pueden detener el crecimiento microbiano, evitando así el desarrollo de microorganismos de deterioro o patógenos. Durante la etapa de almacenamiento y maduración es necesario controlar la relación entre el tiempo y la temperatura, pues podría favorecer el crecimiento microbiano. Por ello, la temperatura durante este proceso debe ser la más baja posible contemplando que no se altere la calidad sensorial del queso (Lillevang, 2006). En quesos suaves, como lo es el Ricotta, la refrigeración es indispensable pues su alto contenido de humedad es favorable para los microorganismos (Walstra *et al.*, 2006).

#### **3.4.7 Parámetros de calidad**

La calidad del queso es influenciada por su composición, principalmente por su porcentaje de humedad, también por la concentración de sal, el pH y el contenido graso (Gunasekaran & Ak, 2003; Fox & Guinee, 2013). Los principales parámetros de calidad de un queso son su apariencia, sabor, textura, funcionalidad, calidad microbiológica y valor nutricional. La apariencia incluye el color y la presencia o ausencia, según sea el tipo de queso, de mohos u ojos. La funcionalidad se refiere a atributos como por ejemplo la elasticidad o la capacidad de derretir o de ser rallado, características importantes al usar el queso como ingrediente (Fox & Guinee, 2013).

##### **3.4.7.1 Textura**

Algunos autores consideran que la textura es el atributo más importante pues la apariencia general y la sensación bucal del queso se aprecian antes que el sabor (Gunasekaran & Ak, 2003; Muthukumarappan & Karunanithy, 2010; Sánchez & Pérez, 2012). La Organización Internacional de Normalización (ISO) define la textura de un alimento como todos los atributos reológicos y estructurales del alimento que son perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles y, cuando sea apropiado, visuales y auditivos (Gunasekaran & Ak, 2003). Este atributo es percibido por el consumidor como la respuesta muscular a la tensión ejercida sobre el queso, por ejemplo al rebanarlo, doblarlo, morderlo o masticarlo y a lo que percibe visualmente. La respuesta sensorial es resultado de la interacción de la

parte microestructural y macroestructural, donde la primera se refiere al arreglo de los componentes de la cuajada y el segundo al acomodo de los trozos de cuajada para formar el queso (Fox & Guinee, 2013).

Diversos factores durante la elaboración del queso tienen un impacto sobre la textura del queso, especialmente los que definen la humedad, la acidez y el pH, pues incluso pequeñas variaciones pueden provocar algunos cambios. El efecto del contenido de grasa también ha sido estudiado y se concluyó que la textura de quesos con mayor porcentaje de grasa tiene mayor aceptación que los reducidos en grasa. Lo que sucede es que la grasa y el agua tienden a debilitar la estructura proteica disminuyendo su grado de compactación, por lo tanto, un queso con mayor contenido graso es más suave. Sin embargo, aún no está claro el efecto de la humedad y por lo tanto se dice que la textura del queso depende mayormente de la matriz proteica y no del contenido de humedad (Gunasekaran & Ak, 2003).

La textura se puede medir por medio de un panel sensorial entrenado, sin embargo, debido al costo, a la subjetividad y a la dificultad de conformar un panel de este tipo lo que se realiza regularmente son mediciones instrumentales (Gunasekaran & Ak, 2003; Fox & Guinee, 2013). A nivel sensorial la textura comprende muchos atributos y no es posible medirlos todos mediante un instrumento, no obstante, la medición de algunas características mecánicas se correlacionan de buena forma con atributos sensoriales (Gunasekaran & Ak, 2003).

Por ejemplo, los métodos imitativos permiten realizar mediciones mecánicas que pretenden imitar la evaluación sensorial de una persona. Dentro de este grupo, uno de los métodos más aceptados es conocido como TPA (Análisis del Perfil de Textura). Esta prueba comprende una doble compresión del alimento, de manera que se simulen los primeros dos mordiscos durante la masticación del alimento. Los dos mordiscos o compresiones pueden estar separados por un tiempo de espera y en general la muestra se comprime a un 70 % o más de su tamaño original para simular el mordisco (Gunasekaran & Ak, 2003; Muthukumarappan & Karunanithy, 2010). Como resultado del TPA se obtiene una curva que permite determinar los parámetros que se muestran en el Cuadro II, todos ellos han mostrado tener una buena correlación con la evaluación sensorial, sin embargo el instrumento tiene ciertas limitaciones pues no se replica la interacción entre el alimento y los tejidos de la boca y los dedos (Gunasekaran & Ak, 2003; Muthukumarappan & Karunanithy, 2010).

**Cuadro II.** Parámetros determinados mediante el análisis de perfil de textura (TPA).

<b>Parámetro</b>	<b>Definición</b>
Adhesividad	Trabajo necesario para superar las fuerzas de atracción entre la superficie de un alimento y la superficie de otro material
Cohesividad	Fuerza de los enlaces internos que componen al alimentos
Dureza	Fuerza necesaria para lograr una determinada deformación
Elasticidad	Velocidad a la cual un alimento deformado regresa a su forma original luego de remover la fuerza deformante
Gomosidad	Energía necesaria para desintegrar un alimentos semi-sólido
Masticabilidad	Energía necesaria para masticar un alimento sólido

Fuente: O'Callaghan *et al.*, 2004

La prueba de corte es otra medición común en quesos, consiste en determinar la fuerza y energía necesarias para que una cuchilla logre atravesar la muestra y comprende la fractura, deformación plástica y fricción del queso. Esta prueba es fácil de realizar, requiere de trozos pequeños de muestra y lo más importante es que se asemeja a la percepción que el consumidor tendría al dar la mordida con los dientes frontales (Gunasekaran & Ak, 2003).

### **3.5 Necesidades de investigación sobre el uso de sonicación en el procesamiento de lácteos**

La implementación de la sonicación en la industria de los lácteos tiene gran potencial debido a su impacto a nivel microbiológico, funcional y de proceso. Es una tecnología que puede escalarse a nivel industrial y con la capacidad de mejorar la calidad del producto, incrementar la eficiencia del proceso y reducir los costos de operación de manera que el retorno sobre la inversión sea atractivo a nivel industrial (Patist & Bates, 2008).

Bermúdez y Barbosa (2011) recomiendan ahondar en la investigación sobre el efecto de la sonicación en el procesamiento de queso pues se ha demostrado que tiene un efecto sobre las características de este producto. Resulta necesario además ampliar la investigación a distintos tipos de queso, pues el impacto de la sonicación podría ser dependiente de los parámetros de procesamiento. De igual forma, Tiwari y Mason (2012) concluyen que se requiere de mayor investigación sobre el efecto combinado del ultrasonido con otras tecnologías para el procesamiento de alimentos y que debe estar enfocado en el escalamiento a nivel industrial.

Es el interés de esta investigación aportar información acerca del efecto de la sonicación sobre parámetros de proceso, calidad e inocuidad durante la elaboración de dos tipos de queso. Además, pretende evaluar el efecto combinado de la sonicación con otras etapas de proceso como el salado, la acidificación y la cocción o desuerado para determinar si hay un efecto sinérgico sobre la reducción de la carga microbiana en el producto, esto con el objetivo de implementar esta tecnología a nivel industrial como alternativa a la aplicación de tratamientos térmicos.



## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Localización

Las pruebas experimentales de esta investigación se realizaron en los laboratorios de microbiología y química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y en el laboratorio de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos, ambos ubicados en la Sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica.

### 4.2 Materias primas

Para la realización de las pruebas experimentales se utilizó leche de vaca, cruda, entera y sin homogenizar. Su composición promedio fue de 3,62 % de grasa, 3,24 % de proteína y 8,43 % de sólidos no grasos. La leche fue adquirida en una finca ubicada en la zona de El Carmen de Guadalupe, Goicoechea, San José y se almacenó en refrigeración desde el ordeño. Se procuró que la leche no tuviera más de 24 horas de haber sido ordeñada al momento de ser utilizada.

Para la elaboración del queso seco se utilizó el cuajo Chymax Extra y el cultivo SA500 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus*), ambos de la casa Chr. Hansen y cloruro de calcio, materiales adquiridos por medio de ASEAL S.A. En el caso del queso Ricotta, se utilizó ácido cítrico grado alimentario del proveedor Insumos Químicos y Servicios de Costa Rica S.R.L. Para el salado de ambos quesos se utilizó sal comercial.

### 4.3 Manejo del cultivo y preparación del inóculo

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, la cual es aerobia, se utiliza regularmente para ensayos de sensibilidad a antibióticos y fue aislada originalmente de una muestra clínica humana en Seattle, Estados Unidos (Minogue *et al.*, 2014; ATCC, 2015). La cepa se tomó de la bacterioteca del Laboratorio de Microbiología del CITA. Para activarla se rayó en Agar Estándar y se incubó a 35 °C de 16 a 24 horas antes de la realización de los experimentos con el fin de obtener colonias puras.

Se preparó el inóculo utilizando como referencia el estándar de Mc Farland N° 2 para obtener una carga aproximada de  $8 \log_{10}$  UFC/mL. Se siguió el procedimiento descrito por Marsik (2011), el cual consistió en colocar una asada del cultivo activado en 10 mL de solución salina al 0,9 % y mezclar utilizando un vórtex hasta que la asada se dispersara completamente. Posteriormente, se colocó el

estándar al lado del inóculo contra una tarjeta blanca con líneas negras y se comparó la turbidez observando las líneas negras a través de la suspensión. En caso de que la turbidez no fuera igual en ambos tubos, se dispersaron más asadas del cultivo hasta alcanzar la turbidez del estándar de Mc Farland.

#### **4.4 Inoculación de la muestra**

Para inocular la muestra se tomó como referencia el procedimiento descrito por Marsik (2011), el cual consistió en tomar una alícuota del inóculo preparado (10,00 mL) y distribuirlo homogéneamente mediante agitación magnética en una masa o volumen conocido de leche (240,00 g o mL) según el objetivo correspondiente para obtener una carga aproximada entre 6 y 7  $\log_{10}$  UFC/g o mL.

#### **4.5 Sonicación de la muestra**

Para los tratamientos de sonicación se utilizó el sistema mostrado en la Figura 2. El sistema consistió en un baño de hielo (A) que permitió mantener la temperatura de la muestra entre  $(20-23) \pm 2$  °C durante el tratamiento. La leche inoculada se colocó en un beaker (B) y se recirculó de manera continua con un flujo constante de 2,25 mL/s hasta la celda del sonicador (E) mediante una bomba peristáltica Masterflex (D) (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL). La celda era de acero inoxidable y contenía una sonda ultrasónica de 13 mm de diámetro ubicada en el centro (H). El tiempo de sonicación y la amplitud se programaron en el controlador ultrasónico CP-750 (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL) (G). Durante todo el proceso se mantuvo la muestra con agitación magnética a una velocidad de 260 rpm.

La muestra se sonicó el tiempo correspondiente a cada tratamiento con una frecuencia constante de 20 kHz, una amplitud de 40 % y una entrada de energía de 50 W que corresponde a 0,83 W/mL. Para cada tratamiento se utilizaron mangueras previamente autoclavadas y la celda y la sonda se desinfectaron con una solución de cloro con una concentración de 150 ppm. Luego de la desinfección se realizaron enjuagues con agua para eliminar el cloro remanente en el equipo.

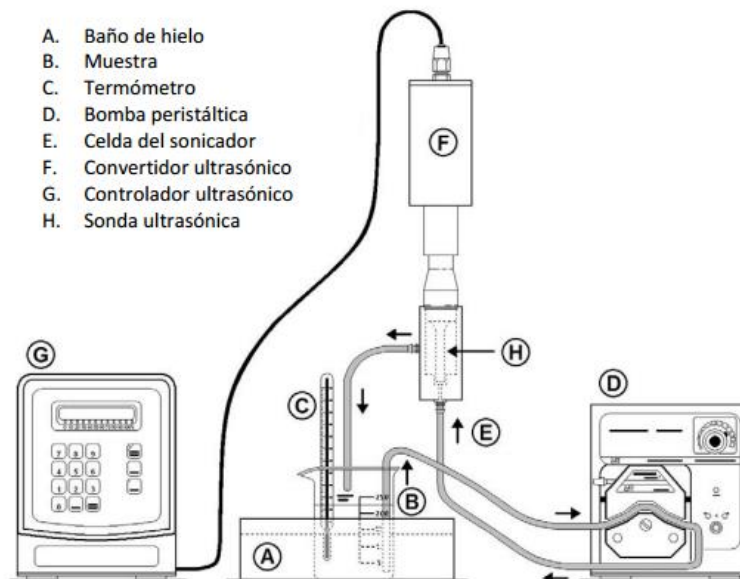


Figura 2. Diagrama del sistema continuo de sonicación (Wong, 2008).

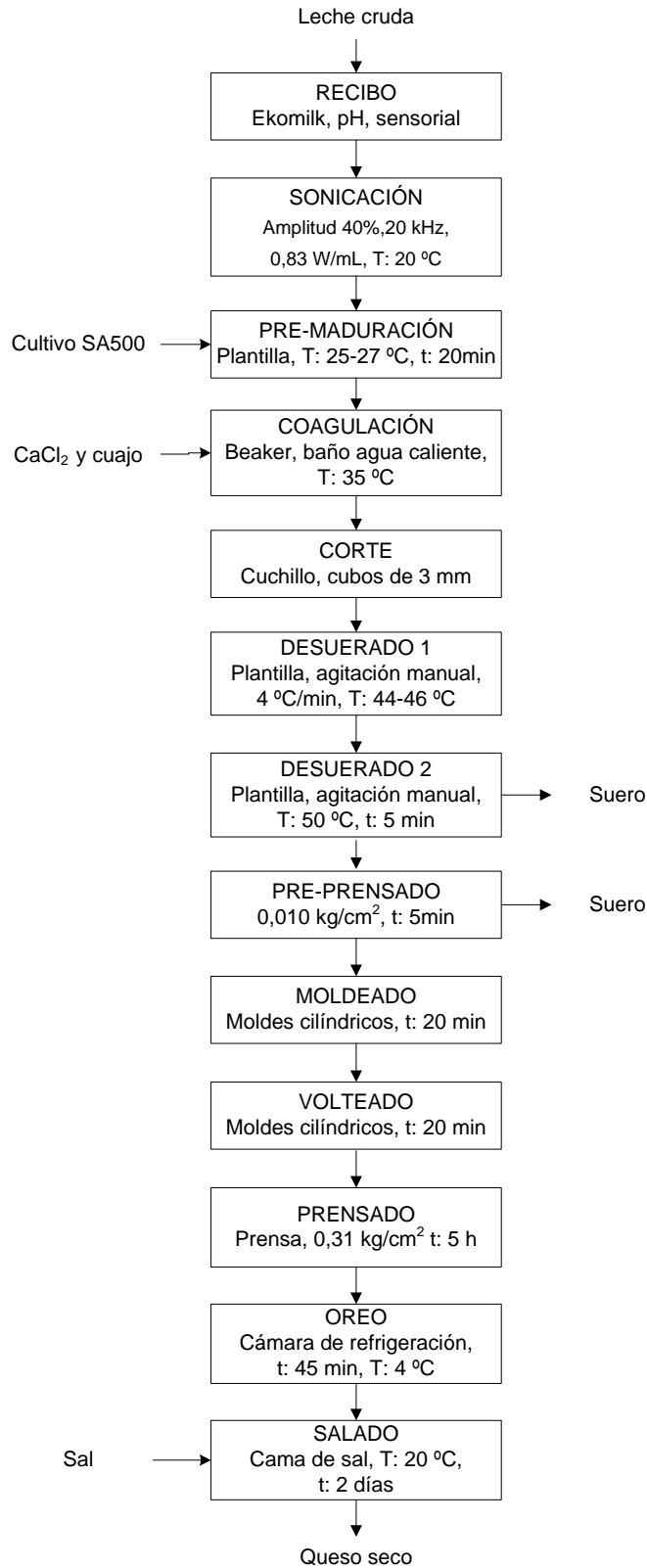
#### 4.6 Elaboración de queso seco

Para elaborar el queso seco se siguió un procedimiento adaptado de Lorenzini (1994). Las modificaciones realizadas al procedimiento original se llevaron a cabo con el objetivo de obtener un producto a escala de laboratorio que presentara las mismas características que un queso realizado a nivel industrial, tomando como principal parámetro el porcentaje de humedad característico del queso seco. Los cambios realizados implicaron principalmente reducciones en los tiempos de algunas operaciones como el desuerado, el prensado y el salado. Se utilizaron 250 g de leche cruda como materia prima y se siguió el proceso mostrado en el Figura 3 y descrito a continuación:

##### *Descripción del proceso*

1. **Recepción de la leche:** se mide el pH utilizando un pHmetro, se observa el color, se evalúa el olor sensorialmente y se realiza un análisis con el equipo Ekomilk para determinar la composición de la materia prima.
2. **Sonicación:** se opera el equipo a 40 % de amplitud, con una frecuencia de 20 kHz y una potencia de 0,83 W/mL. Se mantiene la leche a una temperatura máxima de 25 °C y se sonica el tiempo que corresponda según el tratamiento. El flujo volumétrico de leche se mantiene constante durante esta etapa.

3. **Pre-maduración:** se agrega el cultivo láctico y se mantiene la temperatura de la leche entre 25 y 27 °C durante 20 minutos para que se adapte al medio e inicie la producción de ácido láctico.
4. **Coagulación:** se calienta la leche hasta que alcance una temperatura de 35 °C, posteriormente se agrega el cloruro de calcio y el cuajo a la leche según la dosis recomendada por el fabricante y se agita para distribuirlos homogéneamente en la leche. Se mantiene la leche en reposo hasta que finalice el tiempo de coagulación, el cual se define mediante una prueba de corte en cruz con cuchillo.
5. **Corte:** se procede a cortar la cuajada con ayuda de un cuchillo y un alambre en forma de L en cubos pequeños de aproximadamente 3 mm de lado.
6. **Desuerado 1:** se agita constantemente y se calienta la mezcla hasta alcanzar una temperatura entre 44 y 46 °C. El calentamiento debe ser gradual (4 °C /min) para evitar la formación de una corteza y asegurar la máxima salida de suero de la cuajada.
7. **Desuerado 2:** se retira una cantidad de suero tal que los granos queden apenas cubiertos. Se eleva la temperatura a 50 °C y se mantiene una agitación constante durante 5 minutos.
8. **Pre-prensado:** se retira la cantidad de suero necesaria para que la cuajada vuelva a quedar apenas cubierta y se ejerce una ligera presión de 0,10 kg/cm<sup>2</sup> durante 5 minutos.
9. **Moldeado:** se corta la cuajada pre-prensada en cuatro partes iguales y se coloca en el molde procurando que se mantenga lo más íntegra posible, es decir, evitando que se fragmente. Posteriormente, se deja la cuajada en reposo durante 20 minutos.
10. **Volteado:** se voltea el molde que contiene la cuajada de manera que la parte inferior de la cuajada quede ahora arriba y se deja reposar por 20 minutos.
11. **Prensado:** se coloca el molde en la prensa y se ejerce una presión de 0,31 kg/cm<sup>2</sup> por un tiempo de 5 horas de manera que se compacte la cuajada y se forme el queso.
12. **Oreo:** se coloca el queso en refrigeración por un tiempo de 45 minutos con el objetivo de secar la superficie del queso.
13. **Salado:** se coloca el queso en un beaker de manera que quede totalmente recubierto de sal y se mantiene a una temperatura entre 20-25 °C durante 2 días.



**Figura 3.** Flujo de proceso de la elaboración de queso seco.

## 4.7 Elaboración de queso Ricotta

Para elaborar el queso Ricotta se utilizó como materia prima el suero obtenido como subproducto del procesamiento del queso seco descrito en la Figura 3. El proceso se realizó a nivel de laboratorio tomando como referencia el procedimiento descrito por Fox *et al.* (2000) tal como se muestra en la Figura 4 y se detalla a continuación:

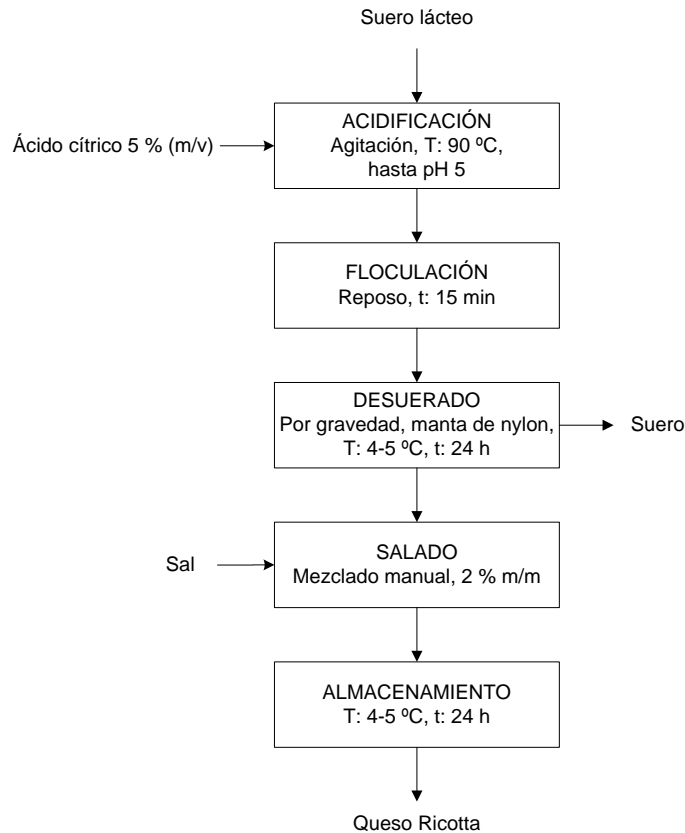


Figura 4. Flujo de proceso de la elaboración de queso Ricotta.

### Descripción de proceso

- 1. Acidificación:** se calienta el suero y una vez que alcanza los 90 °C se acidifica agregando ácido cítrico 5 % (m/v) con agitación constante hasta un pH de 5,0.
- 2. Floculación:** una vez terminado el tratamiento térmico se deja en reposo la mezcla durante 15 minutos para favorecer la precipitación de las proteínas.
- 3. Desuerado:** se procede a separar el precipitado manualmente mediante un colador y una manta de nylon con el fin de remover el suero y evitar pérdidas. Luego, se deja desuerar el queso en el colador durante 24 horas en refrigeración.

4. **Salado:** se pesa el producto final, se adiciona sal común al 2 % (m/m), se mezcla con una cuchara y se coloca en un recipiente.
5. **Almacenamiento:** se almacena el producto en refrigeración por un periodo de 24 horas.

#### **4.8 Determinación del recuento de *Escherichia coli***

Se tomó como referencia el procedimiento descrito en el *Bacteriological Analytical Manual* (Maturin & Peeler, 2001) para realizar un recuento total aerobio por plating y se adaptó utilizando agar Mac Conkey como medio selectivo para *E. coli*. El procedimiento realizado se detalla a continuación:

- a) Se colocó el volumen o la masa de producto según correspondiera en una bolsa de Stomacher y se agregó agua peptonada estéril al 0,1% hasta obtener una dilución decimal de la cantidad de producto determinada.
- b) Se homogenizó la mezcla durante 1 minuto en el Stomacher.
- c) Se realizaron diluciones decimales de la muestra utilizando agua peptonada estéril al 0,1 %, se plataron por vaciado en agar Mac Conkey y se incubaron a 35 °C por 48 horas.
- d) Se contaron las colonias típicas de *E. Coli*, las cuales se observaron como colonias rosadas o rojas. El recuento se expresó como  $\log_{10}$  UFC/mL.

En el caso del recuento del inóculo de *E. coli* se realizaron únicamente los pasos C y D.

#### **4.9 Determinación del rendimiento de la elaboración de queso**

Tanto en el caso del queso seco como en el del queso Ricotta, se determinó la masa inicial de leche o suero según correspondiera y la masa del producto final obtenido según los procedimientos descritos en las secciones 4.6 y 4.7 respectivamente. Las mediciones de dichas masas se realizaron mediante una balanza granataria (Ohaus, modelo Pioneer PA 3102). Posteriormente se calculó el rendimiento como gramos de queso/100 gramos de leche o suero.

#### **4.10 Determinación de la fuerza de corte del queso seco**

Se determinó la fuerza de corte del queso seco utilizando el texturómetro TA.XT Plus. Los parámetros de medición se definieron tomando como referencia el procedimiento descrito por Jaster *et al.* (2014). Se utilizó el extremo filoso de la cuchilla, una velocidad de 0,8 mm/s y una distancia de corte de 15,0 mm. La medición se realizó sin alterar la forma o tamaño de las muestras, las cuales eran quesos

cilíndricos de 32 mm de diámetro y aproximadamente 25 mm de altura. Los quesos se encontraban almacenados en refrigeración (5 °C) y se colocaron en un ambiente a 20 °C por un periodo de una hora antes de la medición.

#### **4.11 Determinación del perfil de textura del queso Ricotta**

Se determinó el perfil de textura del queso Ricotta utilizando el texturómetro TA.XT Plus. Se tomó como referencia el experimento diseñado por Prudencio *et al.* (2014) para la determinación de la fuerza de compresión uniaxial en el mismo tipo de queso. Para la prueba se utilizó una celda cilíndrica de 25 mm de diámetro, una velocidad de 1 mm/s y una compresión de 12,5 mm. Durante la medición las muestras se encontraban contenidas en un recipiente plástico de 30 mm de diámetro y se mantuvieron almacenadas a 5 °C hasta el momento de realizar la prueba.

#### **4.12 Determinación de la humedad del queso Ricotta**

Se determinó según el método AOAC 926.08 (AOAC, 2012).

#### **4.13 Determinación de la grasa del queso seco**

Se determinó según el método AOAC 974.09 (AOAC, 2012).

#### **4.14 Análisis estadísticos**

Para realizar todos los análisis estadísticos que se detallarán a continuación se utilizó el paquete estadístico JMP 5.0.1.2. Se trabajó a un nivel de significancia del 5%. Cuando se encontraron efectos significativos se reportó la probabilidad asociada ( $p$ ), mientras que para efectos no significativos se reportó la potencia de prueba ( $1-\beta$ ).

#### **4.15 Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de *Escherichia coli***

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de sonicación como único factor (0, 15, 30, 45 y 60 minutos) para evaluar su efecto sobre la reducción logarítmica de *E. coli*. Para esto se inoculó la leche, se sonicó y se realizó un recuento de *E. coli* inmediatamente después del tratamiento. El experimento se realizó por triplicado con tres lotes de leche (cada bloque fue conformado por cada uno de los tres lotes de leche). La reducción logarítmica se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Reducción}_{\log}(UFC/g) = \log \text{recuento inicial} - \log \text{recuento final}$$



Para analizar los resultados obtenidos se realizó un análisis de regresión tomando el tiempo de sonicación como factor continuo para evaluar la significancia de la tendencia del recuento de *E. coli* en función del tiempo de sonicación.

#### **4.16 Determinación del efecto del tiempo de sonicación de la leche cruda en combinación con las etapas de proceso de elaboración de queso seco y Ricotta sobre el recuento de *Escherichia coli***

Se aplicó un diseño de bloques al azar con un arreglo factorial 4 x 4 para evaluar el efecto del tiempo de sonicación (0, 20, 40 y 60 minutos) como factor nominal y de las etapas de proceso (leche sonicada, queso pre-prensado, suero 1 y queso seco) sobre la reducción de *Escherichia coli* en el queso seco. El experimento se realizó por triplicado con tres lotes de leche (cada bloque fue conformado por cada uno de los lotes de materia prima). Para esto se inoculó la leche, se sonicó, se elaboró el queso seco y se realizó un recuento de *E. coli* a los productos mencionados anteriormente.

La reducción logarítmica se calculó de la siguiente forma:

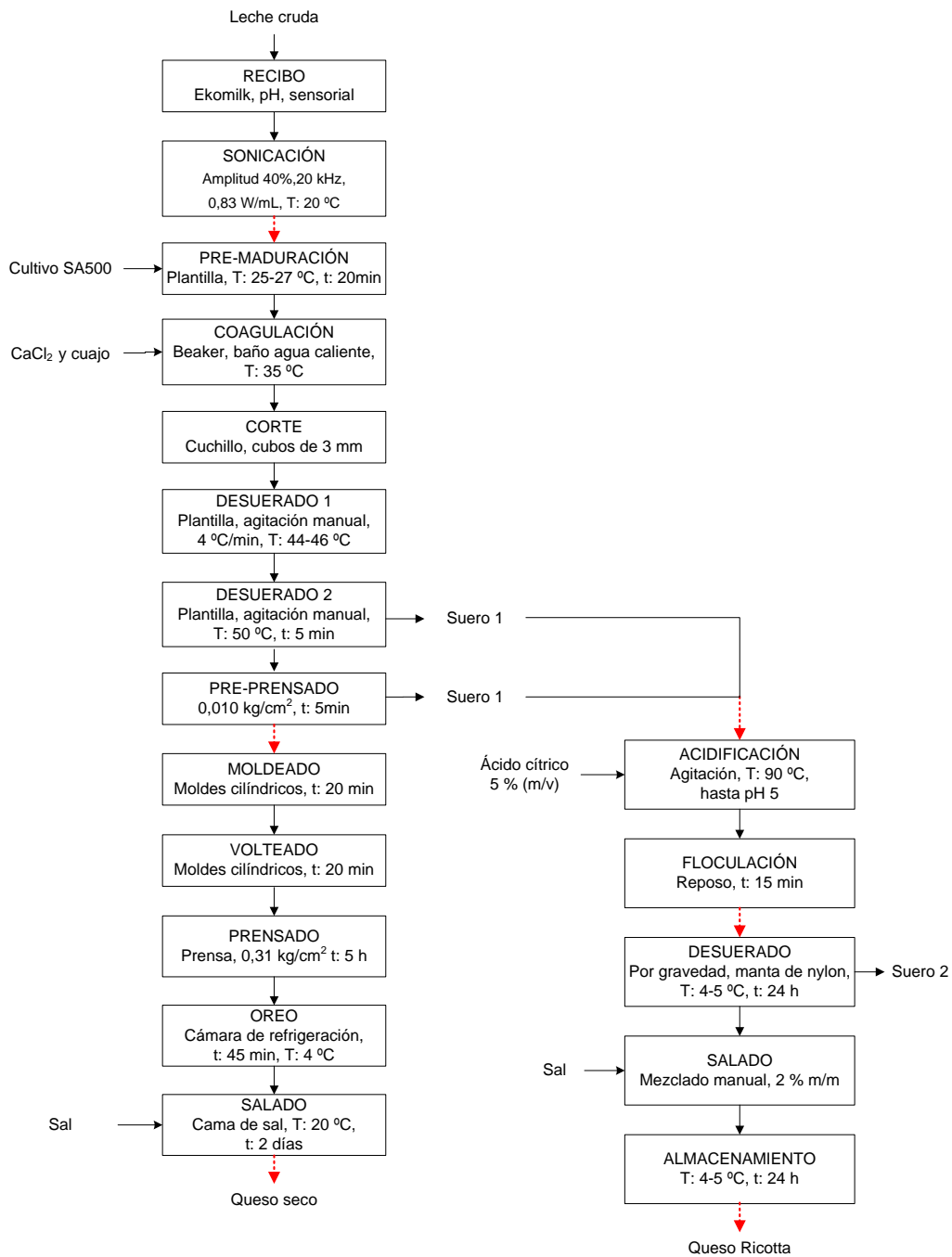
$$\text{Reducción}_{\log}(\text{UFC}/g) = \log \text{ recuento inicial de la leche} - \log \text{ recuento del producto}$$

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con el objetivo de determinar la significancia de los efectos simples (tiempo y etapa de proceso) y su interacción sobre el recuento de *E. coli*. En caso de encontrar diferencias significativas se realizó una comparación de medias por medio de la prueba de Tukey (95 % de confianza). A diferencia del análisis de datos de la Sección 4.15, en el que se tomó el tiempo de sonicación como factor continuo para evaluar su efecto sobre la tendencia en la reducción de *E. coli*, en este caso el tiempo se tomó como factor nominal con el objetivo de determinar si existía diferencia entre los tiempos de sonicación y así poder seleccionar el óptimo.

Respecto al queso Ricotta éste se elaboró partiendo del suero obtenido del proceso del queso seco y se realizaron los recuentos de *E. coli* a los productos correspondientes (flóculos, suero 2 y queso Ricotta). Cada tratamiento se realizó por triplicado con tres lotes de leche. En este caso, la reducción de *E. coli* obtenida fue total debido a que dicho proceso conlleva una etapa de calentamiento fuerte (90 °C) capaz de inactivar a la bacteria aún sin el efecto de la sonicación. Por esta razón, se excluyeron estos resultados del análisis estadístico, pues provocarían que se determinara que el efecto de la combinación de la sonicación con las etapas de proceso resultara significativo cuando en realidad pudo ser a causa

del tratamiento térmico por sí solo. Como único resultado se reportó el promedio de las reducciones obtenidas para cada producto asociado según el tiempo de sonicación.

En la Figura 5 se observa el flujo de proceso de los dos quesos mencionados a partir de la leche cruda y mediante las flechas punteadas se indican los momentos en los que se muestreó para realizar el recuento microbiológico.



**Figura 5.** Flujo de proceso del queso seco y queso Ricotta

#### **4.17 Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y la fuerza de corte del queso seco**

Para evaluar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento, y la fuerza de corte en el queso seco resultante se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo de tratamiento (0, 20, 40 y 60 minutos) como único factor. Para esto se sonicó la leche y a partir de ella se elaboró el queso. El rendimiento y la fuerza de corte se midieron al obtener el producto final. Para la determinación de ambos parámetros se realizaron cinco repeticiones independientes de cada medición utilizando 5 lotes de leche (cada bloque fue conformado por cada uno de los lotes de materia prima).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANDEVA con el fin de determinar la significancia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda como factor continuo sobre el rendimiento y la fuerza de corte del queso seco.

Adicionalmente, por su relación con el rendimiento y la textura del queso seco, se evaluó el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el contenido de grasa del producto final aplicando un diseño de bloques al azar con el tiempo de tratamiento (0, 20, 40 y 60 minutos) como único factor. Se determinó el porcentaje de grasa mediante el método de Babcock para tres de los cinco lotes (cada bloque fue conformado por cada uno de los lotes de materia prima).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANDEVA con el fin de determinar la significancia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda como factor continuo sobre el contenido de grasa del queso seco.

#### **4.18 Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y el perfil de textura del queso Ricotta**

Para evaluar el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y el perfil de textura del queso Ricotta se aplicó un diseño de bloques al azar unifactorial, tomando el tiempo de sonicación (0, 20, 40 y 60 minutos) como factor continuo. Para esto se elaboró el queso Ricotta partiendo del suero obtenido de la elaboración del queso seco y se determinó el rendimiento y el perfil de textura al obtener el producto final. Tanto para la determinación del rendimiento como para la medición del perfil de textura se realizaron cinco repeticiones con 5 lotes de materia prima (cada bloque fue conformado por el lote de leche).

El análisis estadístico consistió en un ANDEVA con el fin de determinar la significancia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda como factor continuo sobre el rendimiento y el perfil de textura del queso Ricotta.

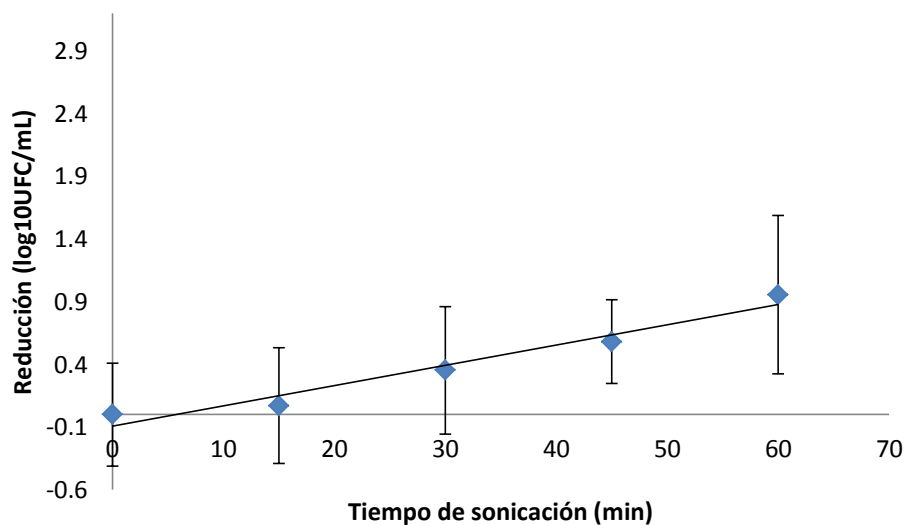
Además, por su posible influencia sobre el rendimiento y la textura del queso Ricotta, se determinó el porcentaje de humedad del producto final aplicando un diseño de bloques al azar con el tiempo de tratamiento (0, 20, 40 y 60 minutos) como único factor. Se realizaron cinco repeticiones con cinco lotes de leche (cada bloque fue conformado por cada uno de los lotes de materia prima).

El análisis estadístico se realizó mediante un ANDEVA con el fin de determinar la significancia del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda como factor continuo sobre el contenido de humedad del queso Ricotta.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre la reducción de *Escherichia coli*.

Se evaluó el efecto del tiempo de sonicación sobre la reducción de *Escherichia coli* en leche cruda. A continuación, en la Figura 6, se muestra el comportamiento obtenido según el tiempo de tratamiento aplicado.



**Figura 6.** Reducción de *E. coli* en leche cruda en función del tiempo de sonicación.

Se observa en la figura anterior, que conforme aumentó el tiempo de sonicación, la reducción logarítmica de *E. coli* incrementó ( $p=0,0008$ ). Este comportamiento coincide con lo esperado, pues ha sido ampliamente reportado que el tiempo de sonicación es uno de los parámetros con mayor influencia sobre el nivel de eficacia de la sonicación para inactivar microorganismos (Piyasena *et al.*, 2003; Chemat *et al.*, 2011; Tiwari & Mason, 2012). El efecto de reducción microbiana se atribuye al fenómeno de cavitación, cuyo mecanismo principal es el daño a la estructura celular de la bacteria mediante fuerzas de cizalla, cambios de presión y ataques químicos por medio de radicales libres y peróxido de hidrógeno (Tiwari & Mason, 2012). El resultado que se genera es que cuanto mayor es el tiempo de exposición del microorganismo a estas condiciones, más severos son los daños en su estructura y mayor es la inactivación microbiana.

La tendencia descrita no es el único aspecto importante, sino también la magnitud de la reducción obtenida, pues de ello depende inicialmente la factibilidad de aplicar la sonicación como tratamiento alternativo a la pasteurización de la leche. En este caso, la reducción logarítmica promedio obtenida fue de 0,95  $\log_{10}$ UFC/mL al aplicar un tratamiento de 60 minutos, mostrando así que bajo las condiciones aplicadas no fue posible alcanzar 5  $\log_{10}$ UFC/mL de reducción, tomando en cuenta que esta es la magnitud exigida por la FDA para que una pasteurización alternativa sea aprobada en otros alimentos líquidos (FDA, 2001; Keener, 2013). Este resultado podría deberse a que la mayoría de microorganismos muestran mayor sensibilidad a los efectos de la sonicación a temperaturas mayores a 50 °C, mientras que a temperaturas de sub-letalidad, como las aplicadas en este caso, la sonicación resulta poco eficaz (Knorr *et al.*, 2004, Arroyo *et al.*, 2011; Sengül *et al.*, 2011).

Estudios similares también reportan reducciones inferiores a 5  $\log_{10}$ UFC/mL al sonicar a temperaturas menores a 50 °C. Por ejemplo, Herceg *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la sonicación a 20 °C sobre *E. coli* en leche cruda con un 4 % de grasa y la mayor reducción alcanzada fue de 2,49  $\log_{10}$ UFC/mL al sonicar la muestra por un tiempo de 12 minutos, con una amplitud de 120  $\mu$ m, una potencia de 600 W y una frecuencia de 20 kHz. Por otra parte, Sengül *et al.* (2011) obtuvieron una reducción logarítmica de coliformes de 4,01  $\log_{10}$ UFC/mL al sonicar leche cruda durante 15 minutos a temperaturas menores a 30 °C. Sin embargo utilizaron una frecuencia de 24 kHz, una potencia de 240 W, una sonda de 22 mm y menor cantidad de muestra que en este caso, lo cual podría explicar que el efecto haya sido mayor al de esta investigación. Por último, Jelacic *et al.* (2012) reportaron una reducción de coliformes de aproximadamente 0,2  $\log_{10}$ UFC/mL luego de sonicar una muestra de suero lácteo por 8 minutos a 20 °C y a 35 °C, mientras que al precalentar la muestra a 55 °C, la reducción microbiana incrementó a aproximadamente 1,7  $\log_{10}$ UFC/mL y el resultado fue atribuido al efecto sinérgico de la cavitación y la temperatura.

Resulta importante resaltar el efecto de la composición de la matriz, especialmente de la fracción grasa, pues es una posible causa de la resistencia de las bacterias al ultrasonido. Arroyo *et al.* (2011) reportaron que al evaluar la inactivación de *Cronobacter sakazakii* mediante sonicación, la bacteria mostró mayor resistencia al tratamiento de sonicación en leche en polvo rehidratada que al encontrarse en un buffer de pH 7. De la misma forma, se determinó que en el caso de *Listeria innocua* y de *Salmonella* la reducción logarítmica obtenida es hasta dos unidades menor al sonicar la leche cuando se aumenta su contenido graso. Algunos autores atribuyen este comportamiento al efecto protector que tiene la grasa sobre los microorganismos (Bermúdez *et al.*, 2009; Tiwari & Mason, 2012).

Además del efecto protector, la grasa láctea aumenta la viscosidad de la matriz y esto repercute negativamente en la eficacia de la sonicación (Akdemir, 2015). Las ondas pierden energía al viajar por un medio viscoso, pues experimentan una mayor resistencia para fluir y como resultado disminuye la cavitación (Mulet *et al.*, 2002; Patist & Bates, 2008). Tomando en cuenta que la inactivación microbiana ocurre como consecuencia de la cavitación, es de esperar entonces que en fluidos viscosos la reducción microbiana sea menor. Dicho efecto fue corroborado en un estudio en el que la reducción de *Salmonella typhimurium* en caldo infusión cerebro corazón fue  $>3 \log_{10}$ UFC/mL, en leche descremada fue de 2,5  $\log_{10}$ UFC/mL y en huevo líquido fue  $<1 \log_{10}$ UFC/mL al sonicar las muestras por 30 minutos a una temperatura entre 40-50 °C (Piyasena *et al.*, 2003). Por lo tanto, el contenido promedio de grasa (3,62%) de la muestra pudo provocar que su viscosidad afectara negativamente la eficacia de la sonicación bajo las condiciones aplicadas en esta investigación.

De acuerdo con la tendencia observada en la Figura 6 podría considerarse aumentar el tiempo de sonicación para determinar si se alcanzan los 5  $\log_{10}$ UFC/mL de reducción deseados. Sin embargo, incluso un tratamiento de 60 minutos no resulta atractivo a nivel industrial debido a las implicaciones negativas sobre la eficiencia de los procesos (Lee *et al.*, 2009), tomando en cuenta que existen tratamientos térmicos (pasteurización y UHT) y alternativos (microfiltración) que alcanzan las reducciones requeridas en periodos menores, incluso en pocos segundos. Por lo tanto, se consideró que la sonicación de leche cruda llevada a cabo bajo las condiciones de esta investigación (20 kHz, 0,83 W/mL y 2,25 mL/s) y de acuerdo con la sobrevivencia de *E. coli*, no resulta aplicable industrialmente como alternativa a la pasteurización.

## **5.2 Determinación del efecto del tiempo de sonicación de la leche cruda en combinación con las etapas de proceso de elaboración de queso seco y Ricotta sobre el recuento de *Escherichia coli***

Para evaluar el efecto combinado de la sonicación con las etapas de proceso se realizaron recuentos de *E. coli* durante diferentes etapas del procesamiento de ambos quesos, con el fin de determinar en qué momento ocurría una mayor reducción y asociarlo con las operaciones involucradas. En el Cuadro III se muestran las reducciones obtenidas para cada producto según el tiempo de sonicación de la leche utilizada como materia prima.

**Cuadro III.** Reducción logarítmica de *E. coli* en diferentes productos intermedios y en el producto final del procesamiento de queso seco y queso Ricotta según el tiempo de sonicación aplicado a la leche utilizada como materia prima.

Tiempo sonicación (min)	Reducción (log <sub>10</sub> UFC/g)						
	Leche sonicada	Queso pre-prensado	Suero 1	Queso seco	Flóculos	Suero 2	Queso Ricotta
0	-0,12 ± 0,06	0,0 ± 0,7	0,5 ± 0,6	0,2 ± 0,9	> 4,82	> 4,82	> 4,82
20	0,0 ± 0,3	0,7 ± 0,8	0,5 ± 0,5	1,0 ± 1,0	> 4,81	> 4,81	> 4,81
40	0,5 ± 0,3	1,3 ± 0,8	0,9 ± 0,6	1,0 ± 1,0	> 4,82	> 4,82	> 4,82
60	1,0 ± 0,6	2,0 ± 1,0	1,5 ± 0,5	2,6 ± 0,1	> 4,81	> 4,81	> 4,81

Los valores mostrados en el Cuadro III para el caso del suero 2, los flóculos y el queso Ricotta corresponden a la reducción total de la bacteria en los tres productos. Dicho resultado se atribuyó principalmente a la etapa de calentamiento a 90 °C que se realiza en la elaboración del queso Ricotta y a la cual se encuentran asociados estos tres productos. Es decir, que dicho calentamiento junto con las demás etapas de procesamiento provocan una reducción total y por ello no se diferenció el aporte de los diferentes tiempos de sonicación en la reducción de *E. coli*. Por esta razón, estas reducciones no se incluyeron en el análisis estadístico realizado para determinar el efecto combinado del tiempo de sonicación con las etapas de proceso sobre la reducción de la bacteria, sino que solo se analizaron los datos de los productos intermedios y el producto final del proceso del queso seco.

Al analizar los datos el Cuadro III correspondientes a la elaboración del queso seco se determinó que las etapas de proceso no tuvieron un efecto significativo sobre la reducción de *E. coli* ( $p=0,0819$ ,  $1-\beta=1$ ). Únicamente el incremento en el tiempo de sonicación provocó un aumento en la reducción de *E. coli* durante el proceso de elaboración del queso ( $p<0,0001$ ) y su efecto resultó independiente de las etapas del proceso ( $p=0,7130$ ,  $1-\beta=1$ ). Por lo tanto, en el Cuadro IV se muestra la reducción promedio de *E. coli* obtenida en el procesamiento del queso seco según el tiempo de sonicación de la leche cruda.

**Cuadro IV.** Reducción promedio de *E. coli* en el procesamiento de queso seco según el tiempo de sonicación de la leche cruda.

Tiempo de sonicación (min)	Reducción (log <sub>10</sub> UFC/g)
0	0,0 ± 0,3 <sup>c</sup>
20	0,5 ± 0,3 <sup>bc</sup>
40	0,9 ± 0,4 <sup>b</sup>
60	1,8 ± 0,5 <sup>a</sup>

\*Promedios con letras diferentes indican que existe diferencia significativa ( $p<0,05$ )

\*\*El promedio y los límites de confianza fueron calculados con los datos correspondientes a las 3 repeticiones de los 4 productos asociados al queso seco.



De acuerdo con los resultados del Cuadro IV, se observa que la reducción de *E. coli* al utilizar la leche sin sonicar fue significativamente menor que las demás y que el tratamiento de 60 minutos presentó la mayor reducción y fue significativamente diferente de los demás tratamientos. Nuevamente, el efecto del tiempo de sonicación sobre la inactivación microbiana se atribuye a que cuanto mayor es la exposición de los microorganismos a la cavitación, mayores son los daños que experimentan (Piyasena *et al.*, 2003; Chemat *et al.*, 2011; Tiwari & Mason, 2012).

Se determinó también que bajo las condiciones de proceso utilizadas no se obtuvo la reducción de 5 logaritmos de *E. coli*. Según se observa en el Cuadro IV, la mayor reducción promedio alcanzada fue de alrededor de dos logaritmos mediante el tratamiento de 60 minutos, mostrando así que el efecto combinado de la sonicación con otras etapas de proceso no fue suficiente como para asegurar la inocuidad del queso seco. Sin embargo, puede rescatarse que la reducción fue mayor en comparación al resultado obtenido en la leche cruda, donde el valor máximo fue de alrededor de un logaritmo (ver Figura 6).

A pesar de no haber encontrado diferencia significativa en la reducción de *E. coli* respecto a las etapas del proceso seleccionadas, el aumento en la reducción en comparación con la obtenida en la leche se puede relacionar con las operaciones involucradas. Las células microbianas previamente afectadas por los efectos de la cavitación, podrían no haberse recuperado y morir debido a las condiciones adversas a las que se expusieron durante las etapas de procesamiento posteriores. Entre estas etapas podrían destacarse los procesos de desuerado que implican un proceso de calentamiento y que a pesar de alcanzar una temperatura máxima de solo 50 °C, podrían afectar a células que ya presentarían algún daño.

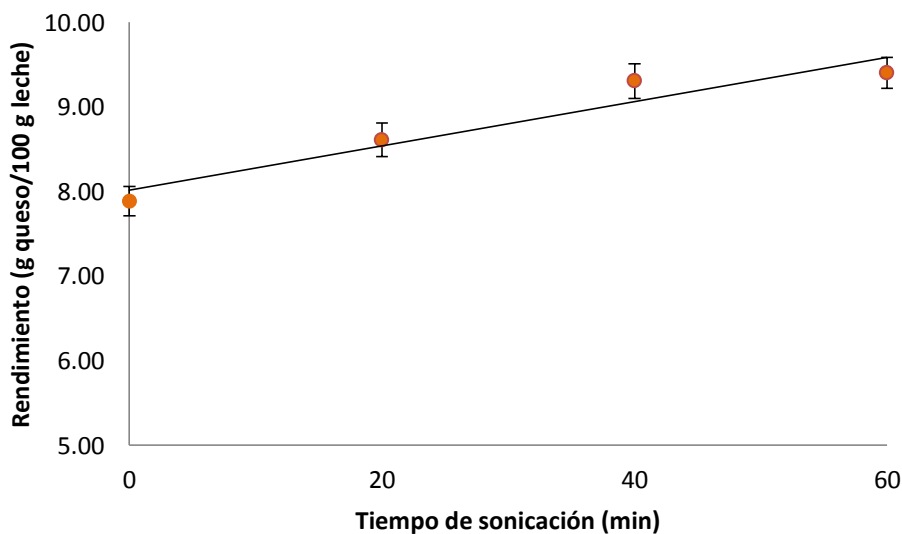
El proceso de salado también pudo haber contribuido en la reducción de *E. coli*, pues al disminuir el  $A_w$  del queso las bacterias mueren (Davidson & Critzer, 2012) y cuanto mayor sea el tiempo de exposición de los microorganismos a dicha condición, mayor es la muerte celular. Por lo tanto, podría suceder que durante el almacenamiento del queso seco se obtengan mayores reducciones microbianas que las observadas en este estudio. Este efecto fue estudiado por Wong *et al.* (2008), quienes demostraron que el tiempo de almacenamiento aumenta la reducción de *Salmonella* spp. en jugo de naranja sonicado y posteriormente concentrado mediante la adición de una solución de sacarosa con el fin de disminuir el  $A_w$  del medio, tratamiento al que los autores llamaron “osmosonificación”.

A pesar de que los resultados obtenidos bajo las condiciones utilizadas no aseguraron la inocuidad del queso seco, aspecto prioritario en el procesamiento de alimentos, se evaluó el efecto del tiempo de sonicación en otros parámetros asociados a su elaboración. Esto pues la sonicación también ha mostrado tener implicaciones positivas en otras operaciones asociadas al procesamiento de alimentos como por ejemplo emulsificación, cristalización y filtración (Chandrapala *et al.*, 2012).

### 5.3 Determinación el efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y la fuerza de corte del queso seco.

#### 5.3.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el rendimiento

Se evaluó el efecto de la sonicación sobre el rendimiento de la elaboración del queso seco y los resultados se muestran en la Figura 7. Se puede apreciar que la relación de queso obtenido por cada 100 gramos de leche utilizada aumentó conforme aumentó el tiempo de sonicación ( $p < 0,0001$ ).

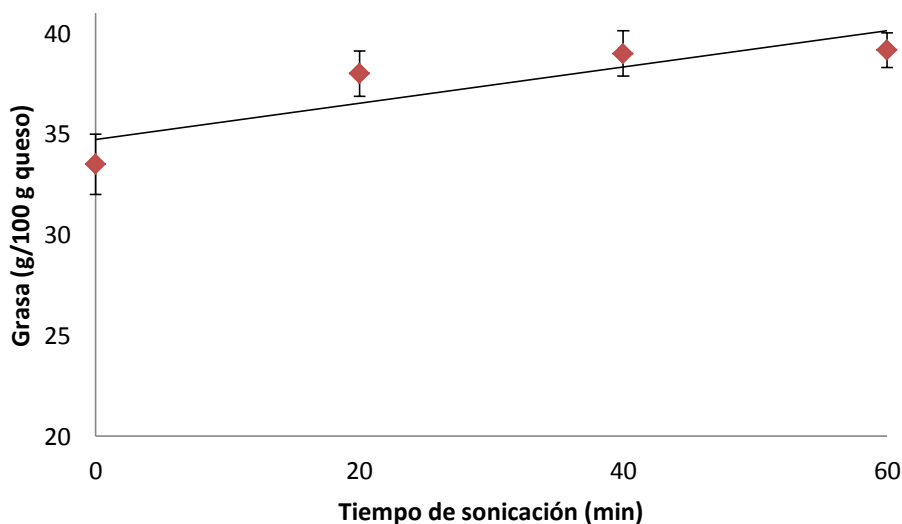


**Figura 7.** Rendimiento de la elaboración de queso seco en función del tiempo de sonicación de la leche utilizada como materia prima.

Este efecto de la sonicación sobre el rendimiento quesero ha sido reportado anteriormente para el caso del queso fresco, en el que el rendimiento fue casi el doble respecto al control (Bermúdez & Barbosa, 2011). Las posibles causas del aumento en dicho indicador son diversas y varían según el autor, sin embargo, en su mayoría se encuentran asociadas con cambios estructurales provocados por la cavitación a los glóbulos grasos y a las diferentes fracciones proteicas de la leche.

El primer factor es la homogenización de la grasa, pues al disminuir el tamaño de los glóbulos grasos se da la formación de nueva área superficial que posteriormente será recubierta por micelas de caseína. Este aumento de los puntos de interacción grasa-caseína favorece el agrupamiento tanto de caseínas como de proteínas séricas, fortaleciendo así la red proteica formada durante la elaboración de queso e incrementando el rendimiento (Cameron *et al.*, 2009; Bermúdez & Barbosa, 2011; Marchesini *et al.*, 2012; Sfakianakis & Tzia, 2014). Además, Bermúdez y Barbosa (2011) mencionan que la fracción hidrofílica de las caseínas que queda expuesta al medio liga moléculas de agua que también contribuyen a la formación de una red de proteínas, grasa y suero más compacta.

Adicionalmente, la homogenización y el consecuente fortalecimiento de la red proteica también inhiben la salida de grasa de la cuajada durante el procesamiento del queso, pues ésta se encuentra homogéneamente distribuida y fuertemente ligada a los demás componentes (Gunasekaran & Ak, 2003; Walstra *et al.*, 2006). Este efecto fue comprobado mediante la determinación del porcentaje de grasa del queso seco obtenido. Según se observa en la Figura 8, conforme aumentó el tiempo de sonicación el porcentaje de grasa fue significativamente mayor ( $p=0,0011$ ) y por lo tanto, se considera como otra posible causa del aumento del rendimiento. Cabe destacar también, que cuanto mayor fue el tiempo de sonicación, menor fue la exudación de grasa del queso seco tras el proceso de salado.



**Figura 8.** Porcentaje de grasa del queso seco según el tiempo de sonicación de la leche utilizada como materia prima.

Respecto al efecto en las proteínas séricas, se ha reportado que el ultrasonido ocasiona alteraciones en su conformación que aumentan su capacidad de unirse a las caseínas, de manera que

durante la coagulación de la leche una mayor cantidad de proteínas del suero quedan ocluidas en la cuajada y aumenta el rendimiento (Sfakianakis & Tzia, 2014). Shanmugam *et al.* (2012) evidenciaron lo anterior analizando el cambio en la concentración de caseínas y proteínas del suero en la fase acuosa de la leche descremada según el tiempo de sonicación. Estos autores determinaron que la cantidad de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina, proteínas séricas mayoritarias en la leche, disminuía significativamente en el suero hasta los 30 minutos de tratamiento. El resultado lo atribuyeron a la desnaturalización de las proteínas del suero y a la formación de agregados con otras proteínas séricas y con las caseínas.

De manera contraria, otros investigadores reportan que la sonicación por sí sola no desnaturalizó la  $\beta$ -lactoglobulina ni la  $\alpha$ -lactoalbúmina en leche descremada a temperaturas entre los 20 °C y 40 °C, pero sí observaron un efecto mejorador sobre los geles formados al producir yogurt con dicha leche (Nguyen & Anema, 2010). Por otra parte, Gülseren *et al.* (2007) estudiaron el efecto de la sonicación sobre la albúmina sérica bovina y determinaron que la proteína no se desnaturalizó por completo, pero sí sufrió cambios estructurales que aumentaban su susceptibilidad al tratamiento térmico y que el efecto fue mayor conforme incrementó el tiempo de sonicación. Dichas observaciones sugieren que durante las etapas de calentamiento en la elaboración del queso seco, las proteínas séricas previamente afectadas por la sonicación, pudieron haber precipitado junto con las caseínas aumentando así el rendimiento.

Se ha demostrado también que las proteínas séricas tienen mayor capacidad de retención de agua luego de tratamientos de sonicación, comportamiento al que también podría atribuirse el aumento en el rendimiento (Barbosa & Bermúdez, 2011). Según Gülseren *et al.* (2007) el ultrasonido aumentaba la hidrofobicidad y la carga superficial de la albúmina sérica bovina. Por otra parte, Kresic *et al.* (2008) determinaron que la sonicación provoca cambios conformacionales en las proteínas de concentrados y aislados de suero lácteo, causando que las partes hidrofílicas de los aminoácidos del interior queden expuestas al medio acuoso.

En relación con los efectos descritos anteriormente, cabe destacar que durante la elaboración del queso seco, conforme aumentó el tiempo de sonicación de la leche, disminuyó la cantidad de suero obtenida. De manera específica, el suero proveniente de la leche control representó aproximadamente el 84 % de la masa inicial de leche, mientras que tras una sonicación por 60 minutos, dicho porcentaje disminuyó a un 75 %. Este comportamiento podría entonces relacionarse con la mayor capacidad de

retención de agua por parte de la estructura proteica, a un menor contenido de proteínas séricas en el suero y a una menor cantidad de grasa liberada por la cuajada.

Adicionalmente, durante la elaboración del queso se observó que la turbidez del suero obtenido disminuyó conforme aumentó el tiempo de sonicación, tal como se puede apreciar en la Figura 9. De manera cualitativa, cuanto mayor fue el tiempo de sonicación menor fue la cantidad de partículas suspendidas en el suero y se observó menos blancuzco y más amarillento.



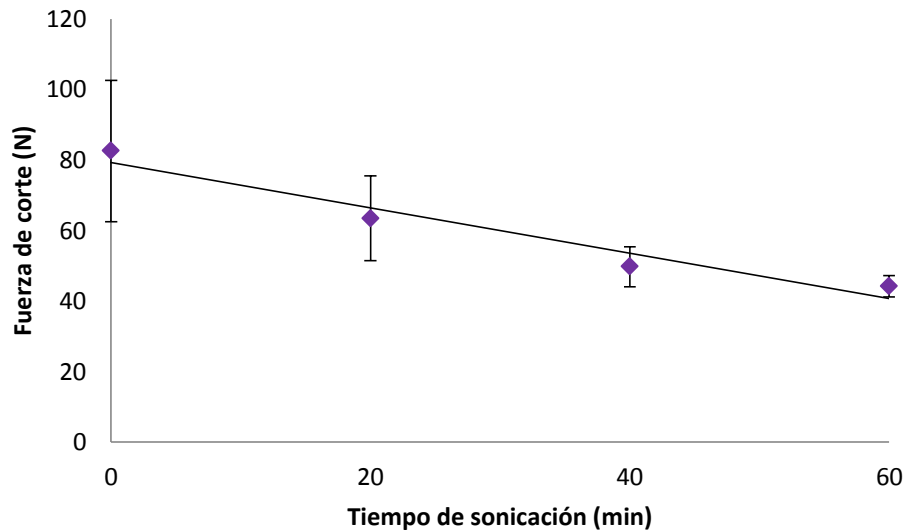
**Figura 9.** Suero obtenido de la elaboración del queso seco según el tiempo de sonicación de la leche cruda: a) 0 minutos, b) 20 minutos, c) 40 minutos y d) 60 minutos.

Este mismo comportamiento fue descrito por Shanmugam *et al.* (2012), quienes observaron una disminución en la turbidez del fluido supernatante obtenido al centrifugar muestras de leche previamente expuestas a diferentes tiempos de sonicación. Los investigadores determinaron que las caseínas y los agregados de caseína-proteína sérica presentes en el supernatante disminuyeron conforme aumentó el tiempo de sonicación. Dicho efecto fue atribuido a una reagregación de caseínas libres a las micelas de caseínas por efecto de las fuerzas mecánicas de la cavitación, así también como a la interacción de las proteínas del suero y sus agregados con las micelas de caseína, coincidiendo con los efectos descritos en los párrafos anteriores.

El incremento en el rendimiento del queso seco podría tener un impacto positivo a nivel industrial pues conllevaría a un aumento en las ganancias de la industria quesera. Por lo cual sería importante determinar un tiempo de sonicación en el que se obtenga un mayor rendimiento tomando en cuenta el consumo energético necesario. Sin embargo, antes de implementar ésta tecnología a nivel industrial resulta importante realizar una evaluación sensorial y de vida útil al queso, pues la homogenización de la grasa favorece el proceso de lipólisis y podrían generarse olores y sabores desagradables asociados con la hidrólisis lipídica (Waagner, 2006; Walstra *et al.*, 2006). Además, la sonicación podría causar cambios en otras características del producto que provoquen una alteración en la aceptación por parte del consumidor, ya sea positiva o negativamente.

### 5.3.2 Efecto del tiempo de sonicación sobre la fuerza de corte

En la Figura 10 se observa el comportamiento de la fuerza necesaria para cortar el queso seco según el tiempo de sonicación de la leche. Se determinó que conforme aumentó el tiempo de sonicación disminuyó la dureza del queso ( $p < 0,0001$ ), pues la fuerza de corte resultó menor.



**Figura 10.** Fuerza de corte del queso seco en función del tiempo de sonicación de la leche utilizada como materia prima.

La disminución de la fuerza de corte pudo ser producto de la homogenización de la leche. Esto pudo darse específicamente por el aumento en la cantidad de glóbulos grasos, el mayor porcentaje de grasa en el queso y la mayor retención de agua por parte de la estructura proteica (Gunasekaran & Ak, 2003).

En cuanto al efecto de la distribución y el tamaño de los glóbulos de grasa, se han obtenido resultados contradictorios en otras investigaciones. Algunos autores han determinado que la distribución homogénea de pequeños glóbulos de grasa genera más puntos débiles dentro de la matriz del queso, pues éstos interfieren en la formación de enlaces entre las cadenas proteicas, provocando un debilitamiento de la estructura. De manera contraria, se ha reportado que al disminuir el tamaño de los glóbulos grasos disminuye el rompimiento de la matriz de caseína y aumenta la firmeza del queso, pues al haber mayor área superficial recubierta de caseínas hay mayor estabilización e interacción entre las proteínas y se obtiene una estructura más firme (O'Riordan *et al.*, 2011). Sin embargo, de acuerdo con

los resultados de este estudio, pareciera que lo que ocurrió fue un debilitamiento de la estructura y por ello disminuyó la fuerza de corte.

Además del posible efecto de la distribución y el tamaño de los glóbulos grasos, debe considerarse que el porcentaje de grasa del queso también tiene influencia sobre la textura. Al aumentar el contenido de grasa se obtiene un queso más suave debido a una disminución en la proporción de proteínas, al debilitamiento de la estructura y a su efecto lubricante (Gunasekaran & Ak, 2003; Lawrence *et al.*, 2004). Según se mencionó anteriormente (Sección 5.3.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el rendimiento), en este caso se determinó que la sonicación aumentó el contenido de grasa retenida en el queso y esto podría explicar la disminución en la fuerza de corte observada en la Figura 10.

Por último, el posible aumento en la capacidad de retener agua por parte de la estructura proteica también podría ser una causa de la disminución de la fuerza de corte, pues el agua también debilita la red de proteínas (Gunasekaran & Ak, 2003; Lawrence *et al.*, 2004).

El cambio en la dureza del queso seco es un factor que debe tomarse en consideración, pues la alteración en la textura de un alimento podría tener un impacto a nivel de consumidor. En este caso podría alterar el nivel de agrado, pues cada tipo de queso está asociado con una textura característica e inclusive se considera que este atributo es uno de los principales indicadores de calidad (Gunasekaran & Ak, 2003; Muthukumarappan & Karunanithy, 2010; Sánchez & Pérez, 2012).

De acuerdo con Foegeding y Drake (2007), la medición instrumental de la dureza del queso está altamente correlacionada con la medición sensorial, ya que la boca del ser humano y los instrumentos utilizados son muy buenos midiendo la fuerza. Además, la prueba de fuerza de corte simula la ruptura realizada por los dientes frontales, proceso en el que el alimento no experimenta cambios de temperatura como sí ocurre durante la masticación y también por esto la correlación es alta. Tomando esto en cuenta, resulta aún más evidente la necesidad de comprobar si el cambio en la dureza es detectable sensorialmente y también evaluar otros parámetros de textura como la adhesividad, cohesividad, elasticidad y masticabilidad.

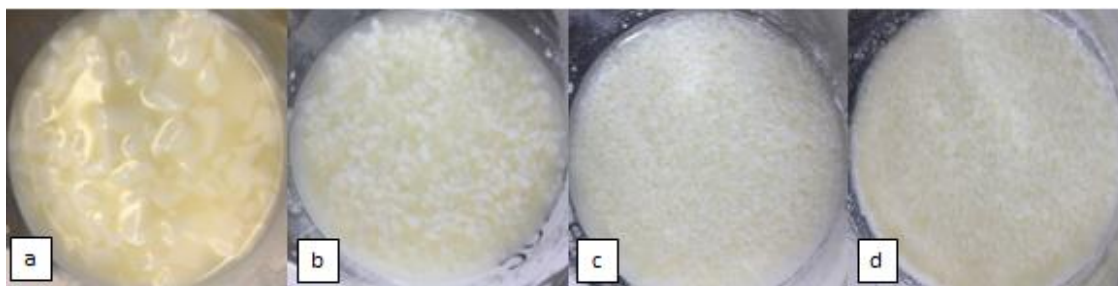
Por último, la disminución en la dureza podría tener implicaciones a nivel de proceso, pues en caso de que el queso sea utilizado como materia prima o sea sometido a operaciones posteriores como

corte o rallado, el cambio en la textura podría provocar cambios en el comportamiento del producto y en la eficiencia de esas operaciones.

### 5.3.3 Otros efectos de la sonicación sobre la elaboración del queso seco

Durante el procesamiento del queso seco se observaron cualitativamente diferencias entre las muestras. A pesar de que estas observaciones no están directamente relacionadas a los objetivos de la investigación, se consideró que podrían ser importantes en caso de considerar la aplicación de sonicación durante la elaboración de queso.

Primeramente, ocurrieron cambios en el comportamiento de la cuajada. Como se observa en la Figura 11 conforme aumentó el tiempo de sonicación, la consistencia de los granos de cuajada disminuyó a pesar de haber sido cortados de la misma forma. Es decir, en todos los casos la cuajada se cortó en cubos de aproximadamente 3 mm de lado, sin embargo al agitar los granos de las muestras sonicadas éstos se desmoronaban.



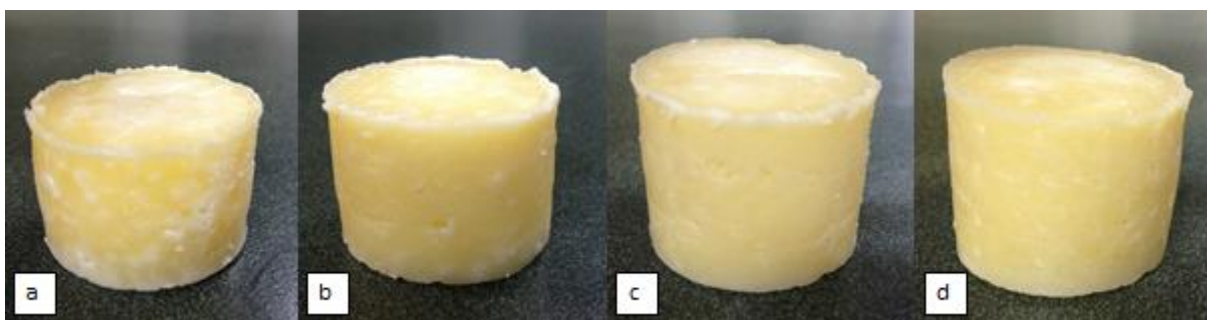
**Figura 11.** Granos de cuajada obtenidos durante la elaboración de queso seco según el tiempo de sonicación de la leche cruda: a) 0 minutos, b) 20 minutos, c) 40 minutos y d) 60 minutos.

Este fenómeno podría representar una dificultad a nivel de proceso, ya que cuanto menor fue el tamaño de los granos más difícil resultó su manipulación para llevar a cabo las operaciones posteriores, pues quedaban remanentes de cuajada en las superficies de los utensilios y equipos utilizados. Además, el comportamiento podría asociarse con las alteraciones que provoca la sonicación en las proteínas de la leche y a la grasa como se ha mencionado anteriormente, explicando así que cuanto mayor tiempo de sonicación mayor fue el efecto.

En la Figura 12 se pueden observar los quesos obtenidos para cada tiempo de sonicación y se aprecia que conforme incrementó el tiempo de tratamiento la corteza del queso resultó más



homogénea en cuanto al color. Este resultado se puede atribuir al efecto de la homogenización provocado por la cavitación, el cual provoca que la cuajada presente una composición más uniforme.



**Figura 12.** Queso seco obtenido según el tiempo de sonicación de la leche cruda: a) 0 minutos, b) 20 minutos, c) 40 minutos y d) 60 minutos.

Se observó también que el queso obtenido luego del oreo era más blancuzco conforme aumentaba el tiempo de sonicación, lo cual se debe a que al homogenizar la leche, la reducción de los glóbulos de grasa mejora la apariencia del queso y hace que sea vea más blanco (Gunasekaran & Ak, 2003). Dichas observaciones son respaldadas por Bermúdez y Barbosa (2011), quienes reportaron que al procesar queso fresco con leche sonicada el producto resultó más blanco y tuvo mejor aceptación por parte del consumidor. Sin embargo, no fue posible ver el efecto en el producto final, pues luego del salado todos los quesos se observaban igualmente amarillos debido a la concentración de la grasa en la corteza producto de la deshidratación.

Por último, el tratamiento de sonicación le confirió al queso un sabor extraño que fue más intenso conforme aumentó el tiempo de tratamiento. Otros autores han utilizado el descriptor “sabor a hule o a goma” para referirse al sabor que imparte el tratamiento de sonicación a la leche (Zisu & Chandrapala, 2015). Este efecto también debe ser tomado en cuenta al considerar aplicar la sonicación en la elaboración de queso, pues podría afectar el agrado por parte del consumidor.

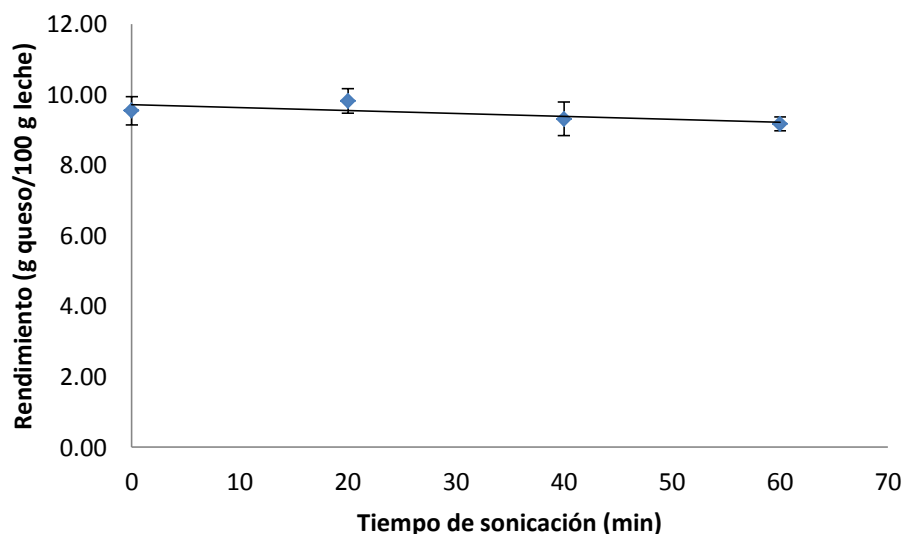
## **5.4 Determinación del efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre el rendimiento y el perfil de textura del queso Ricotta.**

### **5.4.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el rendimiento**

Se utilizó el suero obtenido del procesamiento del queso seco para evaluar el efecto del tiempo de sonicación de la leche cruda sobre el rendimiento de la elaboración de queso Ricotta. En la Figura 13

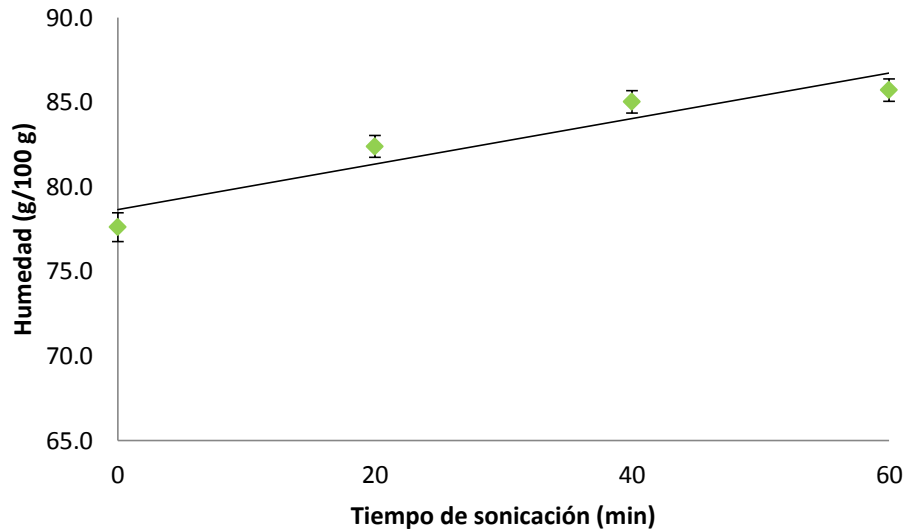
se muestran los resultados obtenidos. Se determinó que el tiempo de sonicación de la leche no tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento ( $p=0,08$ ).

Como se discutió en la sección 5.3.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el rendimiento, una de las posibles causas del aumento en el rendimiento del queso seco es la interacción de proteínas séricas con las caseínas, de manera que durante la coagulación las primeras pasaban a formar parte de la cuajada en vez de permanecer en el suero. Por lo tanto, se hubiera esperado que al utilizar el suero proveniente de la elaboración del queso seco, ocurriera una disminución del rendimiento del queso Ricotta conforme aumentaba el tiempo de sonicación, pues éste se compone principalmente de proteínas séricas.



**Figura 13.** Rendimiento de la elaboración de queso Ricotta en función del tiempo de sonicación de la leche a partir de la cual se obtuvo el suero.

Una hipótesis sobre el resultado obtenido es que la disminución en el contenido de proteínas séricas en el queso pudo haber sido contrarrestado por un aumento en su humedad, ya que como se ha explicado anteriormente, la sonicación aumenta la capacidad de estas proteínas para ligar agua (Barbosa & Bermúdez, 2011). Por lo tanto, se realizó una determinación de humedad al queso Ricotta y se obtuvo que conforme aumentó el tiempo de sonicación, mayor fue el contenido de humedad en el producto ( $p<0,0001$ ), tal como se observa en la Figura 14. Es decir, que el contenido de proteínas en el queso pudo haber disminuido, pero no fue posible determinar el efecto en el rendimiento pues la humedad incrementó. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis, se requeriría un análisis del contenido de proteína del queso Ricotta.



**Figura 14.** Contenido de humedad del queso Ricotta en función del tiempo de sonicación de la leche a partir de la cual se obtuvo el suero.

Debe considerarse también que el contenido de grasa en el producto final es un factor influyente en los rendimientos obtenidos. Según fue explicado anteriormente, el efecto homogenizador de la cavitación inhibe la salida de grasa de la cuajada al suero y por lo tanto los quesos Ricotta correspondientes a los tratamientos con mayor tiempo de sonicación podrían presentar menor contenido de grasa, afectando así su rendimiento.

Según los resultados obtenidos, la utilización de suero obtenido a partir de leche sonicada para la elaboración de queso Ricotta podría no tener efectos negativos en cuanto al rendimiento, lo cual resulta positivo a nivel industrial. Sin embargo, el aumento en el contenido de humedad del producto podría favorecer el crecimiento de microorganismos provocando así una disminución de su vida útil. Además, sería recomendable realizar una evaluación sensorial del queso, pues una variación en su composición podría repercutir en el agrado por parte del consumidor.

#### **5.4.2 Efecto del tiempo de sonicación sobre el perfil de textura del queso Ricotta**

En el Cuadro V se muestran los valores del perfil de textura del queso Ricotta. Según los resultados obtenidos se determinó que el tiempo de sonicación de la leche no tuvo efecto significativo sobre ninguno de los parámetros evaluados ( $1-\beta=1$ ).

**Cuadro V.** Promedio de los parámetros del perfil de textura del queso Ricotta elaborado con el suero obtenido a partir de la elaboración de queso seco y probabilidad asociada con el efecto del tiempo de sonicación para cada parámetro.

<b>Parámetro</b>	<b>Promedio*</b>	<b>Probabilidad</b>
Dureza (N)	2,3 ± 0,3	0,6594
Adhesividad	-7,6 ± 0,8	0,1179
Elasticidad (mm)	11,8 ± 0,1	0,8265
Cohesividad	0,61 ± 0,01	0,3165
Gomosidad (N)	1,4 ± 0,2	0,4566
Masticabilidad (Nm)	0,02 ± 0,02	0,4712

\*El promedio y los límites de confianza de cada parámetro fueron calculados con los 20 datos correspondientes a las 5 repeticiones de los 4 tratamientos aplicados.

El queso Ricotta se compone principalmente de proteínas séricas, las cuales tal como se ha mencionado anteriormente, experimentan cambios al ser expuestas a la sonicación. Entre dichos cambios se encuentran el aumento en su capacidad de retención de agua, alteraciones estructurales y mayor exposición de sus grupos hidrofílicos al medio en que se encuentren (Gülseren *et al.*, 2007; Kresic *et al.*, 2008; Bermúdez & Barbosa, 2011), lo cual podría repercutir en las interacciones entre las proteínas y por lo tanto en la estructura del queso. Sin embargo, mediante el análisis del perfil de textura no se determinó que estas modificaciones tuvieran un efecto en la textura del producto, aun cuando el porcentaje de humedad presentó un aumento de aproximadamente un 6 % entre el queso del tratamiento control y el de 60 minutos (ver Figura 14).

A pesar de que a nivel instrumental no fue posible detectar que el tiempo de sonicación tuviera un efecto sobre el perfil de textura, sería recomendable corroborar este resultado mediante una evaluación sensorial. Esto debido a que durante la masticación el alimento experimenta cambios de temperatura, interacciona con la saliva y el proceso involucra más que dos mordiscos (Brown, 2002). Adicionalmente, Brown (2002) y Foegeding y Drake (2007), reportan que la masticabilidad en queso determinada instrumentalmente no presenta una alta correlación con la medición sensorial y que la adhesividad y la elasticidad tienen una buena correlación pero no es tan alta como en el caso de la dureza. Por lo tanto, a nivel sensorial se podrían percibir cambios en la textura del producto que no resultan detectables mediante mediciones instrumentales.

Esta investigación demostró que la incorporación de la sonicación al procesamiento del queso seco y queso Ricotta podría tener efectos positivos a nivel económico y en la calidad del producto, sin

embargo, es importante recordar que bajo las condiciones aplicadas no se aseguró la inocuidad del queso seco. Por lo tanto, podrían considerarse opciones que incluyan sonicación como manosonicación, termosonicación o manotermosonicación, de manera que se obtenga un producto inocuo y evaluar si bajo esas nuevas condiciones los resultados determinados en este estudio se mantienen. Esto dado que la presión, altas temperaturas u otros factores que se apliquen podrían tener diferentes efectos sobre los componentes de la leche, provocando resultados que se desvíen de lo descrito en este estudio.

## 6. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos bajo las condiciones utilizadas para la realización de las pruebas y las características de la materia prima utilizada en el estudio, se puede concluir lo siguiente:

- Conforme aumenta el tiempo de sonicación de la leche cruda, incrementa significativamente la reducción de *E. coli*.
- La sonicación de leche cruda hasta por 60 minutos no permite alcanzar la reducción de 5 logaritmos de *E. coli* necesaria para considerarse como tratamiento alternativo a la pasteurización de la leche.
- Al aumentar el tiempo de sonicación de la leche cruda se obtiene una reducción de *E. coli* significativamente mayor en el queso seco independientemente de las etapas del proceso. La mayor reducción se obtuvo al aplicar un tratamiento de 60 minutos, pero su magnitud no fue suficiente como para asegurar la inocuidad del producto final.
- Las etapas del proceso de elaboración de queso seco no tienen un efecto significativo sobre la reducción de *E. coli* al utilizar leche cruda con diferentes tiempos de sonicación como materia prima.
- Durante la elaboración del queso Ricotta se obtuvo una reducción total de *E. coli* para todos los tiempos de tratamiento evaluados como resultado de la combinación de las etapas de su procesamiento.
- Conforme aumenta el tiempo de sonicación incrementa significativamente el rendimiento del proceso de elaboración del queso seco y el contenido de grasa en el producto final.
- La fuerza de corte del queso seco resulta significativamente menor conforme aumenta el tiempo de sonicación de la leche cruda utilizada como materia prima.
- Conforme aumenta el tiempo de sonicación la cuajada pierde consistencia y tiende a formar gránulos más pequeños que podrían dificultar el proceso de elaboración del queso seco. Además, el suero obtenido presenta una menor turbidez y menor cantidad visible de agregados de proteína.

- El tiempo de sonicación de la leche cruda no tiene un efecto significativo sobre el rendimiento del proceso de elaboración de queso Ricotta, pero provoca un aumento significativo en su porcentaje de humedad.
- El perfil de textura del queso Ricotta no experimenta cambios significativos en ninguno de sus parámetros al aumentar el tiempo de sonicación de la leche cruda.

## 7. Recomendaciones

A partir de las conclusiones de este estudio se generan las siguientes recomendaciones:

- Estudiar el efecto del contenido de grasa de la leche sobre la eficacia de la sonicación para la inactivación de microorganismos patógenos de interés en el procesamiento de lácteos.
- Determinar el efecto del tiempo de sonicación en combinación con temperaturas superiores a las utilizadas en este estudio sobre la inactivación de bacterias de interés en el procesamiento de lácteos.
- Estudiar el efecto combinado de la sonicación con otros factores asociados con el procesamiento de lácteos (maduración, acidificación, adición de cultivos) sobre la inactivación de microorganismos patógenos de interés en el procesamiento de lácteos.
- Evaluar los efectos de la sonicación en el procesamiento y la calidad de otros productos lácteos como por ejemplo yogurt, kéfir u otros tipos de queso.
- Realizar una evaluación del efecto de la sonicación sobre el nivel de agrado del consumidor tanto para el queso seco como para el queso Ricotta.
- Determinar el efecto del tiempo de sonicación sobre la vida útil del queso seco y del queso Ricotta.



## 8. Referencias bibliográficas

- AKDEMIR, G. 2015. Non-thermal processing of milk and milk products for microbial safety. *In* Özer, B.H. & Akdemir, G. eds. Dairy microbiology and biochemistry. CRC Press Taylor & Francis Group, Estados Unidos.
- ALVAREZ, V.B. & JI, T. 2003. Emerging processing and preservation technologies for milk and dairy products. *In* Gutiérrez, G.F. & Barbosa, G.V. eds. Foods science and food biotechnology. CRC Press Taylor & Francis Group, Estados Unidos.
- ANGELIDIS, A.S. 2015. The microbiology of raw milk. *In* Papademas, P. ed. Dairy microbiology: a practical approach. CRC Press Taylor & Francis Group, Estados Unidos.
- AOAC. 2012. Official methods of analysis. Métodos 926.08 y 974.09. 19na edición. Association of Official Analytical Chemists International, Estados Unidos.
- ARROYO, C., CEBRIÁN, G., PAGÁN, N. & CONDÓN, S. 2011. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by manothermosonication in buffer and milk. *International Journal of Food Microbiology*. 151: 21-28.
- ASHOKKUMAR, M., LEE, J., ZISU, B., BHASKARCHARYA, R., PALMER, M. & KENTISH, S. 2009. Hot topic: sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 92: 5353-5356.
- ATCC. 2015. Product sheet: *Escherichia coli* (ATCC 25922). ATCC, Estados Unidos.
- BERMÚDEZ, D., & BARBOSA, G.V. 2011. Power ultrasound to process dairy products. *In* Feng, H., Barbosa, G. & Weiss, J. eds. Ultrasound technologies for food and bioprocessing. Springer, Estados Unidos.
- BERMÚDEZ, D., CORRADINI, M.G., MAWSON, R. & BARBOSA, G.V. 2009. Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 172-178.
- BOOR, K.J. & MURPHY, S.C. 2002. Microbiology of market milks. *In* Robinson, R.K. ed. Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. John Wiley and Sons, Estados Unidos.

- BROWN, J.A. 2002. Cheese texture. Tesis MSc en Ciencia de Alimentos. Universidad de Carolina del Norte, Departamento de Ciencia de Alimentos. Carolina del Norte, Estados Unidos.
- BUSTA, F. F., SUSLOW T. V., PARISH M. E., BEUCHAT L. R., FARBER J. N., GARRETT E. H. & HARRIS L. J. 2013. The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In FDA. Ed. Preventive control measures for fresh & fresh-cut produce. INTERNET. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091372.htm> Visitado el 16/03/2015.
- CAMERON, M., MCMASTER, L.D. & BRITZ, T.J. 2009. Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science & Technology*. 89(1): 83-98.
- CDC. 2014a. Raw (unpasteurized) milk. INTERNET. <http://www.cdc.gov/features/rawmilk/> Visitado el 12/02/2015.
- CDC. 2014b. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 2012, annual report. Atlanta, CDC. INTERNET. <http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2012-508c.pdf#page=12> Visitado el 12/02/2015.
- CHANDAN R. C. & KAPOOR, R. 2011. Principles of cheese technology. *In* Chanda, R.C. & Kilara, A. eds. Dairy ingredients for food processing. Wiley-Blackwell, Estados Unidos.
- CHANDAN, R.C. & KILARA, A. 2008. Role of milk and dairy foods in nutrition and health. *In* Chandan, R.C., Kilara, A. & Shah, N.P. Dairy Processing and Quality Assurance. Wiley-Blackwell, Estados Unidos.
- CHANDRAPALA, J., OLIVER, C., KENTISH, S. & ASSHOKUMAR, M. 2012. Ultrasonics in food processing- Food quality assurance and food safety. *Trends in Food Science and Technology*. 26: 88-98.
- CHEMAT, F., HUMA, Z. & KAMRAN, M. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18: 813-835.
- DAVIDSON, P.M. & CRITZER, F.M. 2012. Interventions to inhibit or inactivate bacterial pathogens in foods. *In* Oyarzabal, O.A. & Backert, S. eds. Microbial food safety. Springer, Estados Unidos.
- DE ROEST, K. 2000. The production of parmigiano-reggiano cheese. Van Gorcum & Company, Holanda.

- FAO. 2009. Agribusiness handbook: milk/dairy products. FAO, Roma.
- FAO. 2015. Milk production. INTERNET. <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.VNjdbPnF-Sp> Visitado el 12/02/2015.
- FDA. 2001. Hazard analysis and critical control point (HAACP) procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice. Federal register. 66: 6138-6202.
- FDA. 2009. Policy guidance manual. Dairy products- microbial contaminants and alkaline phosphatase activity. INTERNET. <http://www.fda.gov/downloads/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/UCM192468.pdf> Visitado el 20/02/2015.
- FOEGEDING, E.A. & DRAKE, M.A. 2007. Invited review: sensory and mechanical properties of cheese texture. *Journal of Dairy Science*. 90: 1611-1624.
- FOX, P.F. & GUINEE, T.P. 2013. Cheese science and technology. *In* Park, Y.W. & Haenlein, F.W. eds. Milk and dairy products in human nutrition: production, composition and health. Wiley-Blackwell, Estados Unidos.
- FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M. & MCSWEENEY, P.L. 2000. Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers, Estados Unidos.
- FRESCO, E. 2014. Situación actual y perspectiva del sector lácteo internacional. *In* Congreso Nacional Lechero. San José, Costa Rica.
- GONZALEZ, J.M. 2012. Situación actual y perspectivas del sector lácteo costarricense. Visión de la Cámara Nacional de Productores de Leche. *In* Congreso Nacional Lechero. San Carlos, Costa Rica.
- GUINEE, T.P. & FOX, P.F. 2004. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. *In* Fox, P.F., McSweeney, P.L., Cogan, T.M. & Guinee, T.P. eds. Cheese: chemistry, physics and microbiology. 3ra ed. Elsevier, Italia.
- GULSEREN, I., GUZEY, D., BRUCE, B.D. & WEISS, J. 2007. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14: 173-183.
- GUNASEKARAN, S. & AK, M.M. 2003. Cheese rheology and texture. CRC Press, Estados Unidos.

- HERCEG, Z., REZEK, A., LELAS, V. & MEDEDOVIC, S. 2012. The effect of high intensity ultrasound treatment on the amount of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in milk. *Food Technology & Biotechnology*. 50 (1): 46-52.
- HILL, A.R. s.f. General functions of cheese cultures. INTERNET. <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/general-functions-cheese-cultures> Visitado el 31/05/2015.
- IEZZI, R., LOCCI, F., GHIGLIETTI, R., BELINGHERI, C., FRANCOLINO, S. & MUCCHETTI, G. 2012. Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheese curds grains size and distribution by image analysis. *Food Science and Technology*. 47: 380-385.
- JASTER, H., LEONELLI, A.C., BACH, L., GOMES, F., DINNIES, R., ESMERINO, L.A., NOGUEIRA, A. & MOTTIN, D. 2014. Quality evaluation of parmesan-type cheese: a chemometric approach. *Food Science and Technology*. 33 (1): 181-188.
- JELICIC, I., BOZANIC, R., BRNCIC, M. & TRIPALO, B. 2012. Influence and comparison of thermal, ultrasonic, and thermo-sonic treatments on microbiological quality and sensory properties of rennet cheese whey. *Mljekarstvo*. 62 (3): 165-178.
- JENSEN, R.G. & KROGER, M. 2006. Importance of milk and milk products in the diet. *In* Miller, G.D., Jarvis, J.K. & McBean, L.D. eds. *Handbook of dairy foods and nutrition*. 3ra edición. CRC Press, Estados Unidos.
- JOHNSON, M.E. 2001. Cheese products. 2da edición. *In* Marth, E.H. & Steele, J.L. eds. *Applied dairy microbiology*. Marcel Dekker, Estados Unidos.
- KEENER, K.M. 2013. Food regulations. *In* Kutz, M. ed. *Handbook of farm, dairy and food machinery engineering*. 2da edición. Academic Press, Estados Unidos.
- KELLY, A.L., DATTA, N. & DEETH, H.C. 2012. Thermal processing of dairy products. *In* Sun, D. ed. *Thermal Food Processing: new technologies and quality issues*. 2da edición. CRC Press Taylor & Francis Group, Estados Unidos.
- KNORR, D., ZENKER, M., HEINZ, V. & LEE, D. 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 261-266.

- KRESIC, G., LELAS, V., REZEK, A., HERCEG, Z. & RIMAC, S. 2008. Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*. 87: 64-73.
- LANGER, A.J., AYERS, T., GRASS, J., LYNCH, M., ANGULO, F.J. & MAHON, B.E. 2012. Nospasteurized dairy products, disease outbreaks and state laws-United States, 1993-2006. *Emerging Infectious Diseases*. 18(3): 385-391.
- LAWRENCE, R.C., GILLES, J., CREAMER, L.K., CROW, V.L., HEAP, H.A., HONORE, C.G., JOHNSTON, K.A. & SAMAL, P.K. 2004. Cheddar cheese and related dry salted varieties. *In* Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. & Guinee, T.P. eds. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 3ra edición. Elsevier, Italia.
- LEE, H., ZHOU, B., LIANG, W., FENG, H. & MARTIN, S.E. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*. 93: 354-364.
- LILLEVANG, S. 2006. Quality control and sanitation of cheese. *In* Hui, Y.H. ed. *Handbook of food science, technology and engineering*. CRC Taylor & Francis Group, Estados Unidos.
- LORENZINI, M. 1994. Diagnóstico y tipificación química, microbiológica y sensorial del queso seco producido en la región norte del país. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- MADRIZ, J.A. 2014. Situación actual y perspectivas del sector lácteo nacional. *Visión de la Cámara Nacional de Productores de Leche*. San José Costa Rica.
- MAIFRENI, M., BARTOLOMEOLI, I., FRIGO, F & MARINO, M. 2013. Safety issues in the production of cheeses from raw milk and natural starters. *In* Preedy, V.R., Ross, R & Patel, V.B. eds. *Handbook of cheese in health: production, nutrition and medical sciences*. Wageningen Academic Publishers, Holanda.
- MANZI, P. & PIZZOFERRATO, L. 2006. UHT thermal processing of milk. *In* Sun, D. ed. *Thermal food processing: new technologies and quality issues*. CRC Press Taylor & Francis Group, Estados Unidos.

- MARCHESINI, G., BALZAN, S., MONTEMURRO, F., FASOLATO, L., ANDRIGHETTO, I., SEGATO, S. & NOVELLI, E. 2012. Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO<sub>2</sub> on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 16: 391-397.
- MARSIK, F.J. 2011. Antimicrobial susceptibility testing. *In* Mahon, C.R., Lehman, D.C. & Manulesis, G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4ta edición. Elsevier, Estados Unidos.
- MATURIN, L. & PEELER, J.T. 2001. Aerobic plate count. *In* FDA. ed. *Bacteriological analytical manual*. USDA, Estados Unidos.
- MENZ, M.B. 2002. Estudio del rendimiento quesero teórico a través de ecuaciones predictivas y su correlación con el rendimiento práctico en queso chanco industrial. Tesis Lic. en Ingeniería de Alimentos. Universidad Austral de Chile, Escuela de Ingeniería de Alimentos. Valdivia.
- MILLER, B.M., SAUER, A & MORARU, C.I. 2012. Inactivation of *Escherichia coli* in milk and concentrated milk using pulsed-light treatment. *Journal of Dairy Science*. 95: 5597-5603.
- MILLER, G.D., JARVIS, J. K. & MCBEAN, L.D. 2007. *Handbook of dairy foods and nutrition*. 3ra edición. CRC Press Taylor and Francis Group, Estados Unidos.
- MINOGUE, T.D., DALIGAULT, H.A., DAVENPORT, K.W., BISHOP-LILLY, K.A., BROOMALL, S.M., BRUCE, D.C., CHAIN, P.S., CHERTKOV, O., COYNE, S.R., FREITAS, T., FREY, K.G., GIBBONS, H.S., JAISSE, J., REDDEN, C.L., ROSENZWEIG, C.N., XU, Y., & JOHNSON, S.L. 2014. Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. *Genome Announc*. 2(5): e00969-14.
- MOATSOU, G. & MOSCHOPOULOU, E. 2015. Microbiology of raw milk. *In* Özer, B.H. & Akdemir-Evrendilek, G. eds. *Dairy microbiology and biochemistry: recent developments*. CRC Press Taylor & Francis Group, Estados Unidos.
- MUCCHETTI, G., GATTI, M., NOCETTI, M., REVERBERI, P., BIANCHI, A., GALATI, F. & PETRONI, A. 2014. Segmentation of Parmigiano Reggiano dairies according to cheese-making technology and relationships with the aspect of the cheese curd surface at the moment of its extraction from the cheese vat. *Journal of Dairy Science*. 97: 1202-1209.

- MULET, A., CARCEL, J.A., BENEDITO, J. & SANJUAN, N. 2002. Applications of low-intensity ultrasonics in the dairy industry. *In* Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G.V. & Aguilera, J.M. eds. Engineering and food for the 21<sup>st</sup> century. CRC Press, Estados Unidos.
- MUÑOZ, J. & ZAMORA, K. 2013. Caracterización del sector lácteo en Costa Rica. MEIC, Costa Rica.
- MUTHUKUMARAPPAN, K & KARUNANITHY, C. 2010. Texture. *In* Nollet, L.M. & Toldrá, F. eds. Handbook of dairy foods analysis. CRC Press, Estados Unidos.
- NACMCF. 2004. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. INTERNET. [http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/8d886a4d-6ddc-48c2-8b70-50bdbcd77a7f/NACMCF\\_Pasteurization\\_082704.pdf?MOD=AJPERES](http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/8d886a4d-6ddc-48c2-8b70-50bdbcd77a7f/NACMCF_Pasteurization_082704.pdf?MOD=AJPERES). Visitado el 20/05/2015.
- NGUYEN, H.A. & ANEMA, S.G. 2010. Effect of ultrasonication on the properties of skim milk used in the formation of acid gels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11: 616-622.
- O'CALLAGHAN, D.J. & GUINEE, T.P. 2004. Rheology and texture of cheese. *In* Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. & Guinee, T.P. eds. Cheese: chemistry, physics and microbiology. 3ra edición. Elsevier, Italia.
- O'DONNELL, C.P., TIWARI, B.K., BOURKE, P. & CULLEN, P.J. 2010. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*. 21: 358-367.
- ODONKOR, S.T. & AMPOFO, J.K. 2013. Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*. 4: 5-11.
- OECD/FAO. 2014. Dairy. OECD-FAO Agricultural outlook 2014. INTERNET. [http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2014/dairy\\_agr\\_outlook-2014-12-en#page2](http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2014/dairy_agr_outlook-2014-12-en#page2) Visitado el 12/02/2015.
- O'RIORDAN, E. D., DUGGAN, E., O'SULLIVAN, M & NORONHA, N. 2011. Production of analogue cheeses. *In* Tamime, A.Y. ed. Processed cheese and analogues. Wiley-Blackwell, Estados Unidos.
- PAPADEMAS, P. & ASPRI, M. 2015. Dairy pathogens: characteristics and impact. *In* Papademas, P. ed. Dairy microbiology: a practical approach. CRC Press Taylor & Francis Group, Estados Unidos.

- PARDO, M.E. & ALMANZA, F. 2003. Guía de procesos para la elaboración de productos lácteos. Convenio Andrés Bello, Bogotá.
- PATIST, A. & BATES, D. 2008. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9: 147–154.
- PEREDA, J., FERRAGUT, V., QUEVEDO, J.M., GUAMIS, B. & TRUJILLO, A.J. 2007. Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*. 90: 1081-1093.
- PEREIRA, R.N. & VICENTE, A.A. 2010. Novel technologies for milk processing. *In* Dos Reis Combría, J.S. & Teixeira, J.A. eds. *Engineering aspects of milk and dairy products*. CRC Press Taylor & Francis Group, Estados Unidos.
- PIYASENA, P., MOHAREB, E. & MCKELLAR, R.C. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 87: 207-216.
- PRUDENCIO, E.S., MULLER, C.M.O., FRITZEN-FREIRE, C.B., CASTANHO, R.D.M. & CUNHA, J.C. 2014. Effect of whey nanofiltration process combined with diafiltration on the rheological and physicochemical properties of ricotta cheese. *Food Research International*. 56: 92-99.
- RAMESH, C.C. 2011. Principles of cheese technology. *In* Ramesh, C.C. & Kilara, A. eds. *Dairy ingredients for food processing*. Wiley-Blackwell, Estados Unidos.
- REVILLA, A. 1996. Tecnología de la leche. IICA, Costa Rica.
- ROMERO DEL CASTILLO, R & MESTRES, J. 2004. Productos lácteos: tecnología. Ediciones UPC, España.
- SAN MARTIN, B., BRAVO, V. & BORIE, C. 2005. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando E. coli como bacteria indicadora. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 37(2):117-123.
- SÁNCHEZ, L & PÉREZ, M.D. 2012. Physical properties of dairy products. *In* Arana, I. ed. *Physical properties of food: novel measurement techniques and applications*. CRC Press, Estados Unidos.
- SCHMIDT, R.H. 2008. Microbiological considerations related to dairy processing. *In* Chandan, R.C., Kilara, A. & Shah, N.P. eds. *Dairy processing and quality assurance*. Wiley-Blackwell, Estados Unidos.



- SENER, N., APAR, D.K. & OZBEK, B. 2006. A modelling study on milk lactose hydrolysis and  $\beta$ -galactosidase stability under sonication. *Process Biochemistry*. 41: 1493-1500.
- SENGÜL, M., ERKAYA, T., BASLAR, M. & ERTUGAY, M.F. 2011. Effect of photosonication treatment on inactivation of total and coliform bacteria in milk. *Food Control*. 22: 1803-1806.
- SFAKIANAKIS, P. & TZIA, C. 2014. Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: a review. *Foods*. 3: 176-193.
- SHANMUGAM, A., CHANDRAPALA, J. & ASHOKKUMAR, M. 2012. The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 16: 251-258.
- SHAW, M.B. 1996. Modern cheese making: soft cheeses. 2da edición. *In* Robinson R.K. ed. *Modern dairy technology: advances in milk products*. Blackie Academic & Professional, Estados Unidos.
- SINGH, A., SINGH, N., TEJ, P. & RAMASWAMY, H.S. 2014. Applications of ohmic heating to milk and dairy products. *In* Ramaswamy, H.S., Marcotte, M., Sastry, S. & Abdelrahim, K. eds. *Ohmic heating in food processing*. CRC Press Taylor and Francis Group, Estados Unidos.
- STRATFORD, M & EKLUND, T. 2003. Organic acids and esters. *In* Rusell, N.J. & Gould, G.W. eds. *Food preservatives*. 2da edición. Plenum Publishers, Estados Unidos.
- TIWARI, B.K. & MASON, T.J. 2012. Ultrasound processing of fluid foods. *In* Cullen, P.J., Tiwari, B.K. & Valdramidis, V. eds. *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*. Elsevier, Estados Unidos.
- TORRES, H.A. 2001. El queso maduro y sus secretos. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Perú.
- USPHS & FDA. 2011. Grade A pasteurized milk ordinance. INTERNET. <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM291757.pdf>. Visitado el 25/05/2015.
- USTUNOL, Z. 2015. Dairy starter cultures. *In* Özer, B.H. & Akdemir-Evrendilek, G. eds. *Dairy microbiology and biochemistry*. CRC Press, Estados Unidos.

- VAN HOORDE, K & VAN LANDSCHOOT, A. 2015. Application of adjunct cultures and their influence on the sensory properties of hard and semi-hard cheese varieties. *In* Ravishankar, V & Bai, J.A. eds. Beneficial microbes in fermented and functional foods. CRC Press, Estados Unidos.
- WAAGNER, E. 2006. Principles of production of cheese. *In* Hui, Y.H. ed. Handbook of food science, technology and engineering. Taylor & Francis Group, Estados Unidos.
- WALSTRA, P., WOUTERS, J.M. & GEURTS, T.J. 2006. Dairy science and technology. 2da edición. CRC Press Taylor and Francis Group, Estados Unidos.
- WONG, E., PEREZ, A.M. & VAILLANT, F. 2008. Combined effect of osmotic pressure and sonication on the reduction of *Salmonella* spp. in concentrated orange juice. *Journal of Food Safety*. 28(4): 499-513.
- ZISU, B & CHANDRAPALA, J. 2015. High power ultrasound processing in milk and dairy products. *In* Datta, N & Tomasula, P.M. eds. Emerging dairy processing techniques: opportunities for the dairy industry. John Wiley and Sons, Gran Bretaña.
- ZISU, B., SCHLEYER, M. & CHANDRAPALA, J. 2013. Application of ultrasound to reduce viscosity and control the rate of age thickening of concentrated skim milk. *International Dairy Journal*. 31: 41-43.