



REPÚBLICA ARGENTINA
PODER EJECUTIVO NACIONAL
MINISTERIO DE PRODUCCIÓN

INSTITUTO NACIONAL de la PROPIEDAD INDUSTRIAL

TÍTULO DE PATENTE DE INVENCION

AR110037B1

LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE PATENTES, CONFORME LO RESUELTO EN EL EXPEDIENTE RESPECTIVO Y EN VIRTUD DE LO DISPUESTO POR LA LEY 24.481 (T.O.1996), Y SU DECRETO REGLAMENTARIO(DECRETO 260/96, ANEXO II), EXTIENDE EN NOMBRE DE LA NACIÓN ARGENTINA EL PRESENTE TÍTULO A CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET); COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA. INVENTOR / ES MAGALLANES, JORGE FEDERICO; STURNIOLO, HECTOR LUIS; BARBERIS, SONIA ESTHER.

QUE ACREDITA LA CONCESIÓN DE PATENTE DE INVENCION SOBRE: PROCEDIMIENTO PARA PREDECIR, CONTROLAR Y OPTIMIZAR LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS DE QUESO DE CABRA PARA EL DISEÑO DE ADITIVOS A MEDIDA PARA SISTEMAS ALIMENTICIOS DETERMINADOS CUYA DOCUMENTACIÓN ANEXA ES COPIA FIEL DE LA DEPOSITADA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL CONFORME A LO ESTABLECIDO EN EL ART. 35 DE LA LEY 24.481(DECRETO 260/96 - ANEXO I), EL TÉRMINO POR EL QUE SE ACUERDA LA PATENTE ES POR VEINTE AÑOS IMPRRORROGABLES CONTADOS A PARTIR DE LA PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD, POR LO CUAL EXPIRARÁ EL DÍA: 30 DE ENERO DE 2035.

BUENOS AIRES, 12 DE ENERO DE 2022.



Patentes de Invención
Modelos de Utilidad



Marcas



Modelos y Diseños
Industriales



Transferencia de
Tecnología



Información
Tecnológica

Memoria Descriptiva de la Patente de invención.

Sobre:

“PROCEDIMIENTO PARA PREDECIR, CONTROLAR Y OPTIMIZAR LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS DE QUESO DE CABRA PARA EL DISEÑO DE ADITIVOS A MEDIDA PARA SISTEMAS ALIMENTICIOS DETERMINADOS”

Solicitada por:

.CONICET
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS
CNEA

Inventores:

SONIA ESTHER BARBERIS
HECTOR LUIS STURNIOLO
JORGE FEDERICO MAGALLANES

Domicilio:

Rivadavia 1917, (C.P.: 1033), Dirección de Vinculación Tecnológica;

Por el plazo de: **20** años.

PROCEDIMIENTO PARA PREDECIR, CONTROLAR Y OPTIMIZAR LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS DE QUESO DE CABRA PARA EL DISEÑO DE ADITIVOS A MEDIDA PARA SISTEMAS ALIMENTICIOS DETERMINADOS

Campo técnico de la Invención

La invención se relaciona con un procedimiento para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de los hidrolizados proteicos particularmente provenientes del queso de cabra que utiliza un conjunto de herramientas estadísticas y quimiométricas.

Arte previo

La modificación de las proteínas ha sido extensamente estudiada, y se refiere usualmente a los tratamientos físicos, químicos o enzimáticos que cambian su conformación, su estructura y consecuentemente, sus propiedades bioquímicas, funcionales y físico-químicas (Kinsella, 1976; Cheftel, 1977; Friedman, 1977, 1979; Feeney y Whitaker, 1977; Kinsella y Shetty, 1979; Phillips y Beuchat, 1981; Morr, 1982; Whitaker y Puigserver, 1982; Cheftel y col., 1985).

De los muchos usos potenciales y actuales de las enzimas para modificar y mejorar las proteínas, la hidrólisis de las mismas (proteólisis) es la más frecuentemente usada e involucra la acción de enzimas proteolíticas seleccionadas para clivar uniones específicas en una proteína (Fox y col., 1982; Whitaker, 1974, 1977).

La utilización de *enzimas proteolíticas* para la producción de hidrolizados proteicos tiene algunas ventajas sobre los tratamientos químicos, pues estos últimos usan drásticas condiciones de reacción, no son específicos y presentan dificultades cuando hay que eliminar los reactivos residuales en los productos finales. Mientras que las reacciones enzimáticas se llevan a cabo en condiciones suaves y lo más importante, con *alta especificidad*. Las hidrólisis enzimáticas se llevan a cabo en rangos de pH 5 a 7 y temperaturas de 45 a 50 °C, mientras que las hidrólisis ácidas se realizan a pH entre 0 y 1 y temperaturas entre 100 y 125 °C (Illanes Frontaura, 1994).

Desde el punto de vista ambiental, las enzimas son proteínas biodegradables que ayudan a proteger el medioambiente, reduciendo los efluentes y la necesidad de usar reactivos químicos agresivos. Además, los procesos de producción por vía enzimática son más eficientes en términos de costo y los productos obtenidos presentan alta calidad (Sumathi y col., 2014).

Actualmente, los hidrolizados de proteínas son producidos industrialmente usando ácido clorhídrico, y son ingredientes usuales de sopas (stockes cubes), salsa y otros productos saborizados (Zheng y col., 2015).

Los aspectos relacionados con la seguridad del producto resultante de la hidrólisis química de las proteínas son los que impulsaron el desarrollo de la hidrólisis enzimática de las mismas en los últimos años.

La selección de la enzima a utilizar es un aspecto importante, no solo porque debe ser segura para su uso en alimentación y por ende, aprobada por los organismos oficiales: Food and Drugs Administration (FDA), Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), Organización Mundial de la Salud (OMS), Food Agriculture Organization (FAO), Comunidad Económica Europea (CEE)), sino también porque no debe producir hidrólisis indeseadas. Así, por ejemplo, cuando se hidrolizan productos cárnicos con proteasas generalmente se producen péptidos de sabor amargo si el grado de hidrólisis supera el 10 % (porcentaje requerido para lograr una solubilización satisfactoria del producto). Recientemente, se aislaron exopeptidasas que ya se encuentran disponibles comercialmente y degradan los péptidos amargos, permitiendo un grado de hidrólisis de 50 % (Flavourzyme®, 2014).

Los hidrolizados de las proteínas cárnicas presentan propiedades (funcionales) ideales para preparar productos marinados o escabechados y para mejorar el sabor de otros productos cárnicos industrializados (debido a las pérdidas por cocción o rebanado) (Bhaskar y col., 2008).

Diferentes proteasas han sido usadas para preparar extractos de carnes y en la recuperación de gelatina, a partir de residuos de huesos de matadero y de cortes de carnes bovinas, porcinas, de pavo y de pollo. Las proteasas se usan también para digerir subproductos cárnicos (hígado, intestino, pulmón y materiales residuales de aves de corral, cerdos, etc.) que se incorporan a alimentos para mascotas (Novozymes®, 2007).

Desde hace años, se aplican enzimas proteolíticas (provenientes de diversas fuentes) a productos alimenticios de origen vegetal, tales como la producción de leche de soja y en la obtención de diferentes productos texturados y extrudados. Asimismo, algunas proteínas de pescado fueron también hidrolizadas para potenciar su sabor (Lieske y Konrad, 1990, Noguchi y col., 1975; Yamasaki y Maekawa, 1978; Mc Gregor, 2004).

Más recientemente, se comenzaron a utilizar enzimas proteolíticas en la obtención de los denominados “*alimentos funcionales*”, que se definen como aquellos que contienen componentes biológicamente activos, en su estado natural o bien a través de ciertas modificacio-

nes del alimento, y se consumen como parte de una dieta normal; de manera que contribuyen a mejorar o mantener el estado de salud, reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades (Sturmiolo y Barberis, 2007; He y col., 2007; Vairo Cavalli y col., 2008; Radha y col., 2008).

Es importante no confundir entre “alimento funcional” (que se vincula con la actividad biológica del mismo) y “propiedades funcionales” (propiedades físico – químicas y reológicas, tales como: actividad emulsificante, gelante, espumante, etc.) de un alimento, objeto de esta Invención.

La hidrólisis enzimática de proteínas se aplica también a quesos, leche y sus derivados, en la preparación de masas, pastas, bebidas, etc.

A partir de queso, leche o crema, y por medio de procesos de lipólisis y proteólisis controlados, se pueden crear sabores concentrados lácteos que presentan un sabor potenciado y mejoran el “mouthfeel” (sensación en la boca) del nuevo producto diseñado, generándose una sensación más placentera en el paladar (Hannon y col., 2006).

Por medio de procesos enzimáticos se reproducen o aceleran los procesos naturales que generan el sabor característico en los lácteos, obteniéndose lo que se denominan “*Ingredientes Lácteos Modificados Enzimáticamente*” (en inglés EMDI) (Kilara y col., 2011).

El proceso de obtención de estos sabores se inicia acondicionando las materias primas mediante el agregado de sales, ajuste de acidez, temperatura, etc. a las necesidades específicas que requerirán las enzimas para hidrolizar las proteínas y las grasas en forma controlada. De esta forma, se incrementa la liberación de péptidos y ácidos grasos volátiles de cadena corta, y se logran productos entre 25 y 35 veces más potenciados en su sabor que una solución del producto natural sin tratar.

Desde el punto de vista industrial, los EMDI's pueden agregarse a ingredientes lácteos para realzar el sabor de las notas lácteas ya existentes en un producto, o bien pueden incorporarse a formulaciones que no contengan otros ingredientes lácteos. Este último es el caso de los productos industriales en donde se complica la inclusión de ingredientes lácteos, sensibles al desarrollo microbiano y de difícil almacenamiento.

Durante el proceso de industrialización de los derivados lácteos frecuentemente se pierden parcial o totalmente las notas características de sabor del producto, por lo que es necesario reforzarlo, tal es el caso de los quesos análogos y extendidos. Además, los productos lácteos afrontan diferencias sensoriales a lo largo del año y las mismas pueden ser compensadas con el uso de los EMDI's, que aportan al producto final un sabor consistente, estable y parejo. Desde el punto de vista económico, los EMDI's no influyen significativamente en el

costo del proceso debido a las bajas dosis necesarias para realzar el sabor lácteo del producto final (Amelia y col., 2013).

Desde el punto de vista legal, los EMDI's son capaces de cubrir los requerimientos de la declaración de ingredientes lácteos simples, y algunos de ellos no necesitan ser declarados en los rótulos por ser 100 % provenientes del producto natural.

Los EMDI's pioneros fueron desarrollados para ser utilizados como "sistemas de saborización", mientras que actualmente se están estudiando otras aplicaciones tales como aceleradores de la maduración de quesos duros. La maduración del queso es un proceso costoso y relativamente largo, por eso existe un creciente interés económico en acortarlo mediante la incorporación de hidrolizados de queso que permita la aceleración de la formación del aroma y sabor del queso (Kilcawley y col., 2012).

Muchos de los estudios realizados en este sentido se han centrado sobre la proteólisis, al ser éste el proceso fundamental que ocurre durante la maduración de la mayoría de los quesos.

La proteólisis que ocurre durante la maduración del queso proporciona péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que intervienen en el sabor básico del mismo y son precursores de compuestos volátiles que inciden en sus características finales. La forma en que estos procedimientos afectan a las reacciones de formación de volátiles es un tema de investigación sobre el que existen pocos datos todavía. (Bergamini y col., 2006)

Los hidrolizados proteicos de queso (cheese like systems o pastas de queso) son papi-llas con un contenido aproximado en sólidos totales de 40%, en las que se desarrolla un completo aroma y sabor después de ser incubadas a 30°-35 °C durante 4-5 días. La incorporación de proteasas, lipasas y oligoelementos a las pastas mejora su efectividad.

Las enzimas proteolíticas se suman a la acción de la plasmina natural de la leche. La caseína es degradada a péptidos de alto peso molecular y algunos péptidos son convertidos en aminoácidos por las proteasas de la microflora. La transformación de las proteínas en péptidos y aminoácidos vuelven más mórbida la cuajada y su sabor se ve fuertemente potenciado. Los aminoácidos, especialmente la metionina, son precursores de reacciones determinantes de aromas y sabor en los quesos (Diezhandino y col., 2015).

A pesar de ser un objetivo muy deseado por la industria alimentaria, la maduración acelerada todavía no ha conseguido resultados satisfactorios para los quesos de mesa, a veces por la pérdida de armonía entre los procesos de proteólisis primaria y secundaria, otras por el elevado costo de los procesos descriptos (Kumar y col., 2013).

Problema técnico

Una proteína alimentaria puede tener una alta calidad nutritiva y *no poseer propiedades funcionales adecuadas para su incorporación en un determinado sistema alimentario.*

La habilidad de un ingrediente alimenticio para interactuar con otros e impartir propiedades deseables a un sistema alimentario es conocida como propiedades funcionales o simplemente, funcionalidad (Pilosof y Bartholomai, 2000).

Las propiedades funcionales de las proteínas son de gran importancia tecnológica, y existe un gran interés por conocer los mecanismos implicados en las mismas para poder modificarlas adecuadamente y extender el rango de aplicabilidad del producto (Yang y col., 2014; Baú y col, 2012).

El estudio de la relación entre estructura proteica y funcionalidad es la base del diseño racional de ingredientes proteicos para ser aplicados al desarrollo de alimentos con determinadas características texturales y organolépticas, a la formulación de alimentos para deportistas y de uso clínico, o sencillamente como estabilizantes, gelificantes, agentes de espumado o de emulsificación. A manera de ejemplo, se pueden citar los estudios estructurales y funcionales realizados a las caseínas de la leche, las cuales se usan como ingredientes en la elaboración de confituras (bombones, merengues, caramelos) (Fox, 1970; Mercier y col. 1971, 1973, 1976; Ribadeau-Dumas y col., 1993; Brignon, y col., 1972).

Desde el *punto de vista funcional*, los péptidos producidos por proteólisis presentan menor tamaño molecular y estructura secundaria que las proteínas y por ende, se espera que muestren una mayor solubilidad, menor viscosidad y cambios significativos (no predecibles a priori) en la capacidad de retener agua, en la hidrofobicidad, en las propiedades espumantes, gelificantes y emulsificantes con respecto a la proteína de origen.

Si bien la proteólisis y los cambios organolépticos que se producen durante la misma ha sido ampliamente estudiada en relación con el proceso de maduración de los quesos, no existe información bibliográfica disponible respecto de la modificación de las propiedades funcionales de los quesos maduros por hidrólisis enzimática. Hasta el momento solo existe escasa información que reporta el estudio de la actividad biológica de péptidos obtenidos por hidrólisis de quesos maduros (cheese like systems) y de otros productos casearios (Hernández-Ledesma y col. 2002, 2005 y 2007; Silva y col. 2006). Por tal razón, *aquel aspecto constituye la principal novedad científica de esta Invención.*

Para estudiar el proceso de hidrólisis de las proteínas (proteólisis) de un queso maduro es importante conocer previamente los procesos bioquímicos involucrados en la maduración

del mismo, en los cuales incluyen no solo la proteólisis, sino también la lipólisis y la glicólisis (Fox y col., 1990, Fox y Law, 1991).

La proteólisis es el principal y más complejo evento que ocurre durante el proceso de maduración de los quesos y conduce a la formación de péptidos grandes e insolubles en el agua (comparables en tamaño a las caseínas intactas); péptidos medianos y pequeños, solubles en agua; y aminoácidos libres (Folkertsma y Fox 1992; Grappin y Beuvier, 1997). Este proceso contribuye significativamente al desarrollo de la textura, el gusto y el aroma del queso maduro (Ardö, 1999).

Las fracciones peptídicas de bajo peso molecular (<500 Da) y solubles en agua, así como también los aminoácidos libres, son los que contribuyen más al sabor y al aroma de los quesos (Mc Sweeney y Fox, 1997). Los aminoácidos libres son los precursores de los compuestos volátiles del aroma, a través de reacciones que ocurren entre los mismos y con otros compuestos del queso. Por otra parte, la proteólisis puede conducir también a sabores indeseables amargos, principalmente causados por la formación de péptidos hidrofóbicos (Mc Sweeney, 2004).

Entonces, la hidrólisis de proteínas con proteasas resulta ser una forma atractiva de mejorar las propiedades psicosensoriales de los quesos maduros.

Desde el *punto de vista nutricional* la hidrólisis proteica tiene importancia debido al uso cada vez mayor de los hidrolizados en dietas especiales donde se necesita que los nutrientes sean rápidamente absorbidos, como en el caso de disfunciones en el sistema digestivo. Muchas dietas elementales se componen de aminoácidos libres sintéticos, péptidos, carbohidratos de bajo peso molecular, vitaminas, minerales y cantidades mínimas de grasa; lo cual permite que dichos nutrientes puedan ser absorbidos en ausencia de enzimas digestivas o luego de una amputación importante de intestino (Fox y Flyn, 1994).

Particularmente, las fórmulas hipoalergénicas de leches maternizadas, que se utilizan como dieta alternativa para los infantes alérgicos a la leche de la vaca, están basadas en proteínas hidrolizadas y sometidas a tratamiento térmico para evitar la unión de las mismas a anticuerpos específicos (Rosendal y Barkholt, 2000).

Desde el *punto de vista funcional*, los péptidos producidos por proteólisis presentan menor tamaño molecular que las proteínas y por ende, se espera que muestren una mayor solubilidad, menor viscosidad y cambios significativos (no predecibles a priori) en la capacidad de retener agua, en la hidrofobicidad, en las propiedades espumantes, gelificantes y emulsificantes con respecto a la proteína de origen (Morr y Foegeding, 1990).

Los péptidos producidos por proteólisis de diferentes proteínas vegetales (soja) y animales (carne, lácteos, pescado) son de utilidad en numerosas operaciones de procesamiento de alimentos, pero es necesario conocer previamente su comportamiento funcional (Adler-Nissen, 1976, 1979, 1984; Adler-Nissen y Olsen, 1979; Olsen y Adler-Nissen, 1979; Gunther, 1979; Adler-Nissen y col., 1983).

Adler-Nissen y Olsen (1979) informaron que la solubilidad de un hidrolizado de proteínas de soja con *alcalasa* fue independiente del pH, haciéndola útil para su inclusión en bebidas frutales y otros alimentos ácidos.

Otros autores señalaron que la capacidad espumante y emulsificante de las proteínas hidrolizadas del suero de la leche dependían de la enzima proteolítica utilizada; puesto que ambas propiedades mejoraron después de una hidrólisis con pepsina, pero lo contrario ocurrió como consecuencia de la hidrólisis excesiva que produjo *pronasa*, en similares condiciones (Kuehler y Stine, 1974).

Chobert y col. (1988) informaron que la proteólisis de caseína comercial purificada por una proteasa de *Staphylococcus aureus* V8 aumentó su solubilidad en el rango de pH: 4 – 5,1, pero en esa condición disminuyó abruptamente la actividad emulsificante. Estos autores atribuyeron sus resultados a la posible floculación de las proteínas en las cercanías del pI, pero presuponen que quizás influyan otros factores tales como la presencia de una mayor cantidad de residuos cargados negativamente o de péptidos no anfifílicos (como se necesitan para obtener buenas propiedades emulsificantes) después de la hidrólisis.

Estos ejemplos representativos, de los múltiples que presenta la bibliografía, demuestran que cada proceso de hidrólisis proteica debe ser estudiado individualmente con la enzima de interés y que los resultados óptimos de los parámetros funcionales (propiedades emulsionantes, gelificantes, espumantes, solubilidad, etc.) implican generalmente situaciones de compromiso de las variables operacionales (pH, temperatura, tiempo de hidrólisis, relación enzima:sustrato, cantidad de agua agregada, etc.) que habrá que resolver para obtener las condiciones tecnológicas que maximicen la producción del hidrolizado proteico deseado.

La metodología propuesta por la mayoría de los autores, estudia en forma independiente cada variable de la reacción de hidrólisis (Whitaker, 1974, 1977; Sorgentini y col. 1995; Radha y col. 2008). Es decir, *no considera las interacciones que pueden producirse entre las variables y su incidencia sobre los parámetros funcionales de interés.*

Por otra parte, el control del tamaño de los péptidos es esencial para lograr cambios óptimos y reproducibles en las propiedades funcionales del producto hidrolizado. Algunos investigadores intentaron ejercer dicho control variando algunas condiciones de hidrólisis

(tiempo de reacción, temperatura y actividad enzimática) para modificar la velocidad de clivaje de las uniones peptídicas (Adler-Nissen y Olsen, 1979). Luego, separaron los péptidos obtenidos por ultracentrifugación continua y los analizaron por cromatografía con el objeto de vincular estos datos con los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos producidos en cada condición estudiada.

Sin embargo, cuando el producto a hidrolizar contiene una mezcla de proteínas (como la que contiene el queso de cabra) la separación de los péptidos obtenidos y su correlación con los parámetros funcionales de interés serían muy engorrosas.

Es por ello que, la presente invención tiene por objeto desarrollar un diseño estadístico de las variables involucradas en el proceso de hidrólisis del queso semiduro de cabra y realizar el posterior análisis de los parámetros funcionales de los hidrolizados obtenidos mediante técnicas quimiométricas, con el objeto de determinar las condiciones operacionales que permitan obtener hidrolizados con propiedades funcionales óptimas para su incorporación a diferentes sistemas alimentarios. Mediante esta estrategia se evita la separación de los péptidos obtenidos por hidrólisis y su vinculación con las propiedades funcionales.

Desde el *punto de vista psicosensorial*, las proteínas en su estado natural no contribuyen químicamente a la formación de sabores en los alimentos. En cambio, los productos de hidrólisis tienen péptidos y aminoácidos que le confieren sabor y son mucho más reactivos frente a otros componentes de los alimentos como los azúcares y las grasas, creando sabores específicos (Flavourzyme®, 2014).

Recientemente, en la industria alimenticia se comenzaron a comercializar quesos estacionados (cheddar, parmesano, regianito y provolone) modificados enzimáticamente, con el objeto de obtener un producto primario (pasta) cuya intensidad de sabor es varias veces superior a la del queso original; y como tal se puede utilizar para saborizar alimentos o para ser agregada durante la elaboración de otros quesos con el objeto de acelerar su maduración (Novarom®, 2008).

De acuerdo a lo informado y publicitado por las mismas empresas, en la producción de los hidrolizados se priorizó realzar y potenciar el sabor de los quesos maduros, utilizando enzimas lipolíticas y proteolíticas (capaces de hidrolizar grasas y proteínas, respectivamente), generando moléculas más pequeñas (ácidos grasos libres, péptidos y aminoácidos) que influyen sobre el desarrollo del gusto, aroma y textura del producto final. La evaluación de los mismos se realizaría mediante análisis psicosensorial de los hidrolizados obtenidos. Los quesos enzimáticamente modificados reemplazan ventajosamente a los quesos rallados en cual-

quier aplicación industrial: galletitas, productos para copetín, horneados o extrudados, comidas, caldos y sopas, rellenos, chacinados, etc. (Unilever Food Solutions Argentina, 2008).

Se presentan en forma de pasta o de polvo seco, cuyo tamaño de partícula y sabor fue estandarizada (Novarom ®, 2008).

No obstante, las características sapidoaromáticas del producto hidrolizado van a depender del queso del que se parte, del tipo y de las proporciones de las enzimas utilizadas, así como de las variables involucradas en el tratamiento de las muestras.

No existe información disponible que estos tratamientos hayan sido realizados en quesos semiduros de cabra.

Por otra parte, la empresa Novozymes publicitó un complejo fungal de exo y endopeptidasas para ser utilizado en la industria de los alimentos funcionales (food functionality industry) con el objeto de hidrolizar una gran cantidad de proteínas, entre ellas las de la leche (milk protein modification) (Novozymes ®, 2007).

Los “ingredientes funcionales”, como los denomina la empresa Novozymes, se producen a partir de proteínas alimentarias hidrolizadas con enzimas tales como Alcalase ® y Neutrase ®. Algunas propiedades importantes de las proteínas hidrolizadas y sus aplicaciones en alimentos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Propiedades funcionales de las proteínas hidrolizadas y sus aplicaciones en alimentos.

Propiedades	Aplicaciones
Emulsificantes	Carnes, aderezos de ensaladas, salsas, blanqueadores de café.
Hidratación	Masas, pastas y carnes, salsas.
Viscosidad	Bebidas, masas y pastas.
Gelación	Quesos, gelatinas y salsas.
Espumantes	Merengues y tortas.
Cohesión (o unión cohesiva)	Masas, pastas y productos texturados.
Propiedades texturales	Alimentos texturados.

Algunos hidrolizados de proteínas que se comercializan son: soja soluble isoelectrica (ISSPH), sustituto de clara de huevo (proteínas hidrolizadas de soja), emulsificantes de proteínas de soja, gluten de trigo soluble, espumante de gluten de trigo, hidrolizados de células de sangre, de proteínas de suero de quesería, de caseína, de gelatina, de proteínas solubles de

carne y extracto de levadura (Aletor, 2010; Liu y col., 2015; Luo y col., 2014; Xu y col., 2012).

Es importante destacar que no hay patentes (ni otros avales científicos) que indiquen que a los hidrolizados industriales de quesos se les hayan realizado estudios de las propiedades funcionales (emulsificación, espumado, hidratación, gelación, hidrofobicidad, etc.), las cuales constituyen un aspecto tecnológico esencial cuando un aditivo o ingrediente va a ser incorporado en la elaboración de diferentes sistemas alimentarios (sopas, pastas, confituras, panes, salsas, etc.).

El análisis de los resultados de la proteólisis (propia de la maduración del queso o inducida posteriormente con enzimas proteolíticas) es a menudo algo complicado y multivariante en su naturaleza. Existen antecedentes bibliográficos del análisis de datos sensoriales después de la proteólisis mediante técnicas estadísticas multivariantes (Pripp y col. 2000). Sin embargo, no se han aplicado dichas técnicas quimiométricas al estudio de las modificaciones de las propiedades funcionales debidas a la proteólisis, objeto de esta Invención.

Entonces, encontrar una correlación significativa en un modelo multivariante indicaría un vínculo importante entre los análisis (bioquímicos, físico-químicos y reológicos) y el comportamiento funcional del alimento hidrolizado a ser usado como ingrediente o aditivo de diferentes sistemas alimentarios; mientras que si las correlaciones son poco significantes, estaría indicando que las diferencias representadas por los análisis antes mencionados tienen bajo impacto sobre el comportamiento funcional del alimento hidrolizado.

Por todo lo expuesto previamente, la presente invención desarrolla un novedoso procedimiento estadístico para determinar la correlación entre las variables involucradas en el proceso de hidrólisis proteica del queso semiduro de cabra y los parámetros funcionales de los hidrolizados obtenidos, con el objeto de determinar las condiciones operacionales óptimas para obtener hidrolizados con propiedades funcionales a medida para su incorporación a diferentes sistemas alimentarios.

Para llegar a este objetivo se consideró que:

- El hidrolizado proteico de queso semiduro de cabra va a poseer características funcionales más adecuadas que el producto original para su uso como, ingrediente o aditivo alimentario.
- La aplicación de técnicas estadísticas multivariantes a los hidrolizados proteicos de queso de cabra permite formular modelos empíricos – estadísticos para predecir y controlar el comportamiento funcional de éstos.

- Mediante estrategias de análisis para múltiples respuestas, tales como gráficos de contorno y funciones de deseabilidad, es posible optimizar los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos de queso de cabra en función de la aplicación deseada.

Objetivos

La presente invención tiene por objeto desarrollar una estrategia para predecir, controlar y optimizar las *propiedades funcionales* de los hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra para el diseño de *aditivos funcionales a medida* para determinados sistemas alimenticios; utilizando una enzima proteolítica de origen vegetal, disponible comercialmente, de bajo costo y aprobada para uso alimenticio, como es papaína (*Carica papaya*).

Para llevar a cabo este objetivo y otros que se harán evidentes de la lectura de la presente descripción, se provee un procedimiento para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso, que comprende las etapas de: a-hidrolizar dispersiones acuosas de queso mediante el agregado de diferentes cantidades de una enzima proteolítica en un buffer variando los siguientes factores de proceso: la temperatura, el tiempo de hidrólisis, la cantidad de buffer agregado, relación enzima/sustrato y el pH de las dispersiones, donde los experimentos de hidrólisis se llevan a cabo aplicando un diseño Estadístico Experimental Doehlert multinivel (DOE),

b-Determinar la variación de los parámetros funcionales del queso y de los hidrolizados proteicos obtenidos en el paso a), donde dichos parámetros funcionales se seleccionan del grupo que comprende al menos una de las siguientes: el nitrógeno amínico libre (NA), el nitrógeno soluble total (NT), el índice de solubilidad de proteínas (ISP), la viscosidad, la capacidad de absorción de agua (WHC), el agua retenida (HW), el índice de actividad emulsificante (IAE), el índice de estabilidad de la emulsión (IEE), la capacidad espumante (FC), la estabilidad de la espuma (FS) y la hidrofobicidad superficial (So), bajo diferentes condiciones de pH, temperatura, relación enzima:sustrato, tiempo de hidrólisis y cantidad de buffer agregado,

c-Analizar y modelar los resultados obtenidos mediante técnicas quimiométricas, y

d-Optimizar los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos en función del sistema alimentario al cual van a ser incorporados utilizando estrategias de análisis para múltiples respuestas, tales como gráficos de contorno y de funciones de deseabilidad.

En otra modalidad preferida de la invención se provee un procedimiento para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de acuerdo con la reivindicación 1, que además incluye la etapa de evaluar el grado de hidrólisis

obtenido, en las condiciones previamente establecidas, mediante métodos cromatográficos (HPLC) y electroforéticos (SDS-PAGE).

Preferentemente, el procedimiento de la presente invención utiliza una enzima proteolítica, mas preferentemente, una enzima proteolítica de origen vegetal, tal como la papaina.

En otra modalidad preferida de la invención, el procedimiento de la presente invención comprende además, una etapa de hidrólisis de dispersiones de queso, con preferencia dispersiones de queso de cabra, donde al menos una de las condiciones operativas del proceso de hidrólisis (factores del proceso de hidrólisis) seleccionadas entre el pH, la relación enzima: sustrato, la temperatura, el tiempo de hidrólisis y la cantidad de buffer, se varía dentro de rangos predefinidos. Ellos son los siguientes rangos:

el pH se varía entre 4 y 10, preferentemente entre 5 y 9;

la relación enzima: sustrato se varía entre $4 \cdot 10^{-3}$ y 0,3 (mg /g de caseína del queso), preferentemente entre $5,5 \cdot 10^{-3}$ y 0,22 (mg /g de caseína del queso);

la temperatura se varía entre 25 y 85 °C, preferentemente, entre 35 y 70° C;

los tiempo de hidrólisis se varían entre 25 y 320, preferentemente, entre 30 a 270 min;

la cantidad de buffer se varía entre 8 y 36 (g de buffer / g de proteína), preferentemente, entre 10 y 30 (g de buffer / g de proteína).

Los hidrolizados obtenidos por medio del presente procedimiento poseen propiedades óptimas y pueden ser incorporados a diversos sistemas alimentarios, tal como salsas y sopas, mousse de queso, productos de panificación y aceleradores de la maduración de otros quesos duros.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Superficie de respuesta de nitrógeno amínico libre (NA) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra y la interacción entre la temperatura y la cantidad de buffer agregado.

Figura 2: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de nitrógeno amínico libre (NA) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 3: Superficie de respuesta de nitrógeno soluble total (NT) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra y las interacciones de la cantidad de buffer agregado con: (a) la temperatura y (b) la relación E:S.

Figura 4: SDS-PAGE comparativo de las muestras ID N° 27 e ID N° 15 (Tabla 6) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

Figura 5: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de nitrógeno soluble total (NT) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 6: Correlación entre el índice de solubilidad de proteínas (ISP) calculado y experimental, y la cantidad de buffer agregado a los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

Figura 7: Correlación entre el índice de solubilidad de proteínas (ISP) y el nitrógeno soluble total (NT) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra (coeficiente de correlación: 0,5861).

Figura 8: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados para el índice de solubilidad de proteínas (ISP) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 9: Superficie de respuesta de la viscosidad (η) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra y la interacción entre la temperatura y la cantidad de buffer agregado.

Figura 10: Correlación del error relativo porcentual de los valores modelados de nitrógeno total (NT) respecto a los experimentales vs los valores experimentales de nitrógeno total (NT).

Figura 11: Dependencia de la viscosidad (η) con la temperatura de los hidrolizados proteicos de queso de cabra, según el modelo logarítmico para soluciones acuosas poliméricas.

Figura 12: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de viscosidad (η) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 13: Correlación entre el índice de solubilidad de proteínas (ISP) y el nitrógeno soluble total (NT) de los hidrolizados de queso semiduro de cabra.

Figura 14: Cromatogramas comparativos obtenidos por HPLC de los hidrolizados proteicos de queso de cabra (N° ID 10 y 27) y su respectivos blanco sin papaína.

Figura 15: Espectros de masa (EM) de las fracciones separadas y colectadas por HPLC (t_R : A: 3 min y B: 62,5 min de la muestra ID N° 27), correspondiente al hidrolizado proteico de queso de cabra.

Figura 16: Superficie de respuesta del índice de actividad emulsificante (IAE) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra y la interacción entre la relación E:S y el tiempo de hidrólisis.

Figura 17: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados para el índice de actividad emulsificante (IAE) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 18: Superficie de respuesta del índice de estabilidad de la emulsión (IEE) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra y la interacción entre la temperatura y la relación E:S.

Figura 19: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados del índice de estabilidad de la emulsión (IEE) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 20: Independencia de la capacidad espumante (FC) respecto de los factores estudiados (temperatura, pH, relación E:S, cantidad de buffer agregado y tiempo de hidrólisis).

Figura 21: Dependencia de la estabilidad de la espuma (FS) con el tiempo de hidrólisis de los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

Figura 22: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados del índice de estabilidad de la espuma (FS) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 23: Dependencia de la capacidad de retención de agua (WHC) con (a) el pH y la relación E:S, (b) la cantidad de buffer agregado y la relación E:S, y (c) la cantidad de buffer agregado y el pH de los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

Figura 24: Dependencia del índice de solubilidad de proteínas (ISP) con la capacidad de retención de agua (WHC) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

Figura 25: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de la capacidad de retención de agua (WHC) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 26: Superficie de respuesta del porcentaje de agua retenida (HW) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra y la interacción de la temperatura y la cantidad de buffer agregado.

Figura 27: Dependencia del índice de solubilidad de proteínas (ISP) con el porcentaje de agua retenida (HW) de los hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra.

Figura 28: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados del agua retenida (HW) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño estadístico experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 29: Superficie de respuesta de la hidrofobicidad superficial (So) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra y la interacción entre el tiempo de hidrólisis y la temperatura.

Figura 30: Correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de la hidrofobicidad superficial (S_o) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según el diseño experimental mostrado en la Tabla 6.

Figura 31: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs relación E:S y cantidad de buffer agregado para el diseño de un aditivo para panificación con propiedades funcionales a medida.

Figura 32: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs. pH y tiempo de hidrólisis para el diseño de un aditivo para panificación con propiedades funcionales a medida.

Figura 33: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs. temperatura y tiempo de hidrólisis para el diseño de un aditivo para panificación con propiedades funcionales a medida.

Figura 34: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs relación E:S y cantidad de buffer agregado para el diseño de un aditivo para salsas y sopas con propiedades funcionales a medida.

Figura 35: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs. pH y tiempo de hidrólisis para el diseño de un aditivo para salsas y sopas con propiedades funcionales a medida.

Figura 36: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs. temperatura y tiempo de hidrólisis para el diseño de un aditivo de salsas y sopas con propiedades funcionales a medida.

Figura 37: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs. temperatura y tiempo de hidrólisis para el diseño de un aditivo para acortar la maduración de otros quesos duros con propiedades funcionales a medida.

Figura 38: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs. pH y tiempo de hidrólisis para el diseño de un aditivo para acortar la maduración de otros quesos duros con propiedades funcionales a medida.

Figura 39: Función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra vs. relación E:S y cantidad de buffer agregado para el diseño de un aditivo para acortar la maduración de otros quesos duros con propiedades funcionales a medida.

Descripción detallada de la invención

En nuestro país el Código Alimentario Argentino define al **queso** como “el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes” (artículo 605 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAG-PyA N° 33/2006 y N° 563/2006)).

Se entiende por **queso fresco** el que está listo para el consumo poco después de su fabricación, mientras que por **queso madurado** el que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso.

Para la clasificación de los quesos se utilizan distintos criterios generales y no se impide el establecimiento de denominaciones y requisitos más específicos, característicos de cada variedad de queso.

De acuerdo con el contenido de materia grasa del extracto seco en porcentaje, los quesos se clasifican en:

Extra graso o doble crema: cuando contengan no menos del 60%.

Grasos: cuando contengan entre 45,0 y 59,9%.

Semigrasos: cuando contengan entre 25,0 y 44,9%.

Magros: cuando contengan entre 10,0 y 24,9%.

Descremados: cuando contengan menos de 10,0%.

De acuerdo con el contenido de humedad, en porcentaje, los quesos se clasifican en:

Quesos de baja humedad (generalmente conocidos como de pasta dura): humedad hasta 35,9%.

Quesos de mediana humedad (generalmente conocidos como de pasta semidura): humedad entre 36,0 y 45,9%.

Quesos de alta humedad (generalmente conocidos como de pasta blanda o macíos): humedad entre 46,0 y 54,9%.

Quesos de muy alta humedad (generalmente conocidos como de pasta muy blanda o mole): humedad no menor a 55,0%. Los quesos de muy alta humedad se clasificarán a su vez de acuerdo con: si han recibido o no, tratamiento térmico luego de la fermentación, en:

- Quesos de muy alta humedad tratados térmicamente.

- Quesos de muy alta humedad.

Siguiendo con el artículo 605 del Código Alimentario Argentino: en la elaboración de quesos se utilizarán:

- ✓ Ingredientes obligatorios: Leche y/o leche reconstituida (integral o entera, semidesnatada o parcialmente descremada, desnatada o descremada y/o suero lácteo). Se entiende por leche la proveniente de especies bovina, caprina, ovina o bufalina. Cuando no exista una referencia específica de la especie, entiéndase como leche bovina. Coagulante apropiado (de naturaleza física y/o química y/o bacteriana y/o enzimática).
- ✓ Ingredientes opcionales: Cultivo de bacterias lácticas u otros microorganismos específicos, cloruro de sodio, cloruro de calcio, caseína, caseinatos, sólidos de origen lácteo, especias, condimentos u otros ingredientes opcionales, permitidos solamente conforme a lo previsto explícitamente en los artículos que describen variedades individuales o grupos de variedades individuales de ciertas variedades particulares de quesos.
- ✓ Aditivos: Podrán ser utilizados en la elaboración de quesos los aditivos indicados en la lista que figura a continuación en la que se indica además la clase de queso para la o las cuales están autorizados. La utilización de otros aditivos podrá estar autorizada en los artículos que describen variedades individuales o grupos de variedades individuales de quesos.

Tabla 2: Aditivos permitidos en la elaboración de quesos.

INS	Nombre	Función máxima	Límite / Conc.	Clase de queso (*)
330	Ácido cítrico	Regulador de acidez	b.p.f.	m.a.h.
270	Ácido láctico	Regulador de acidez	b.p.f.	m.a.h.
260	Ácido acético	Regulador de acidez	b.p.f.	m.a.h.
	Aroma natural de ahumado	Aromatizante	b.p.f.	m.a.h., a.h., m.h.,
	Aromatizantes (excepto aromas a queso y crema)	Aromatizante	b.p.f.	m.a.h.
234	Nisina	Conservador	12,5 mg/kg de queso	m.a.h., a.h., m.h.,
200	Ácido sórbico	Conservador	1000 mg/kg de queso en ácido sórbico	m.a.h.,
201	Sorbato de sodio			a.h., m.h.,
202	Sorbato de potasio			b.h.
203	Sorbato de calcio			

INS	Nombre	Función máxima	Límite / Conc.	Clase de queso (*)
251 252	Nitrato de sodio Nitrato de potasio (solos o combinados)	Conservador	50 mg/kg de queso (en nitrato de sodio)	m.h., b.h.
1105	Lisozima	Conservador	25 mg/l de le-	m.h., b.h.
235	Natamicina (sólo en la superficie de los quesos, quesos cortados o feteados)	Conservador	1 mg/dm ² máx. 5 mg/kg no detectable a 2 mm de profundidad. Ausencia en la masa	m.a.h., a.h., m.h., b.h.
160a ii	Carotenoides naturales			
160b	Betacaroteno, Bixina, Norbixina, Urucu, Annatto, Rocú	Colorante	10 mg/kg de queso (como norbixina)	m.a.h., a.h., m.h., b.h.
140 i 140 ii 141 i	Clorofila Clorofilina Clorofila cúprica, sales de Na y K	Colorante	15 mg/kg de queso (en clorofila)	a.h., m.h., b.h.
100	Cúrcuma, Curcumina	Colorante	b.p.f.	m.a.h., a.h., m.h.,
120	Carmín	Colorante	b.p.f.	m.a.h.
160a i	Betacaroteno sintético (idéntico al natural)	Colorante	600 mg/kg de queso	m.a.h., a.h., m.h., b.h.
101 i	Riboflavina	Colorante	b.p.f.	
162	Rojo de remolacha	Colorante	b.p.f.	
928	Peróxido de Benzoilo	Colorante	20 mg/l de leche	a.h., m.h., b.h.
171	Dióxido de Titanio	Colorante	b.p.f.	a.h., m.h.,
466	Carboximetilcelulosa	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
407	Carragenina	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
412	Goma Guar	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
410	Goma de Algarrobo o jatai (1)	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
415	Goma xantano	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
416	Goma karaya	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
414	Goma arábica	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
406	Agar	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)

INS	Nombre	Función máxima	Límite / Conc.	Clase de queso (*)
400	Ácido algínico	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
401	Alginato de sodio			
403	Alginato de amonio			
404	Alginato de calcio			
405	Alginato de propilenglicol			
440	Pectina o pectina amidada	espesante/estabilizante	5 g/kg de queso	m.a.h. (**)
402	Alginato de potasio	espesante/estabilizante	500 mg/kg de queso	m.a.h. (**)
	Almidones modificados	espesante/estabilizante	b.p.f.	m.a.h. (**)
	Lipasas	Agente de maduración	b.p.f.	m.h., b.h.
	Proteasas	Agente de maduración	b.p.f.	b.h.

(*) m.a.h. quesos de muy alta humedad.

a.h. quesos de alta humedad.

m.h. quesos de mediana humedad.

b.h. quesos de baja humedad.

(**) quesos de muy alta humedad tratados térmicamente.

(1) Entiéndase "Goma Garrofin" como sinónimo de Goma de Algarrobo o Jatai.

- ✓ Coadyuvantes de tecnología / elaboración: Podrán ser utilizados en la elaboración de los quesos de muy alta humedad tratados térmicamente los cultivos de bacterias lácticas u otros microorganismos específicos.

También en el Código Alimentario Argentino se establecen prácticas de higiene para la elaboración del producto. La leche a ser utilizada deberá ser higienizada por medios mecánicos adecuados y sometida a pasteurización, o tratamiento térmico equivalente para asegurar fosfatasa residual negativa (AOAC, 1995, 979.13 p.823) combinado o no con otros procesos físicos o biológicos que garanticen la inocuidad del producto. Queda excluida de la obligación de ser sometida a pasteurización o tratamiento térmico la leche higienizada que se destine a la elaboración de quesos que se sometan a un proceso de maduración a una temperatura superior a los 5°C durante un lapso no menor de 60 días.

Los quesos deberán responder a las siguientes exigencias:

1. Criterios macroscópicos y microscópicos: el producto no deberá contener sustancias extrañas de cualquier naturaleza.
2. Criterios microbiológicos: los quesos deberán cumplir con lo establecido en la Tabla 3.

3. Contaminantes: los contaminantes orgánicos e inorgánicos no deben estar presentes en cantidades superiores a los límites establecidos en el Código Alimentario Argentino.

Tabla 3: Requisitos microbiológicos de los quesos de mediana humedad (36% < humedad < 46%):

Microorganismos	Criterios de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
Coliformes/g (30°C)	n = 5 c = 2 m = 1000 M = 5000	5	FIL 73A : 1985
Coliformes/g (45°C)	n = 5 c = 2 m = 100 M = 500	5	APHA 1992, Cap. 24 (APHA, 1992)
Estafilococos coag. positiva /g.	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1000	5	IL 145 : 1990
Salmonella spp /25 g.	n = 5 c = 0 m = 0	10	FIL 93A : 1985
Listeria monocytogenes/ 25g	n = 5 c = 0 m = 0	10	FIL 143 : 1990

n: número de unidades de muestra analizada.

c: número máximo de unidades de muestra cuyos resultados pueden estar comprendidos entre m (calidad aceptable) y M (calidad aceptable provisionalmente).

m: nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable.

M: nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable provisionalmente.

Fuente: ICMSF - Métodos de Muestreo para Análisis Microbiológicos.

Método de toma de muestra: FIL 50 C: 1999.

El artículo 611 del Código Alimentario Argentino establece las condiciones en que debe comercializarse el queso excluyendo el contenido de sustancias extrañas o de microorganismos, larvas o insectos, como así también los que contengan toxinas, o residuos de plaguicidas, antimicrobianos o cualquier sustancia química en cantidades superiores a lo permitido por el mismo Código.

Maduración del queso

El queso en su origen fue una forma de conservar los principales nutrientes de la leche (proteínas y lípidos). Así, se evitó el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes por la combinación de acidificación, deshidratación, bajo potencial redox y salado.

Sin embargo, en la mayoría de las variedades de queso la actividad de agua que se mantiene permite una serie de cambios bioquímicos, microbiológicos y enzimáticos que dependen de la composición de la cuajada, microbiota existente y actividad residual de las enzimas nativas de la leche y del cuajo, y contribuyen a la maduración durante su almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura controladas.

Las características de cada tipo de queso son debidas al proceso de elaboración y al origen de la leche utilizada (vaca, oveja o cabra), tal como se describe en la Tabla 4.

Tabla 4: Factores en la producción que originan distintos estilos de queso.

Origen de la leche	Cuajada	Temperatura de cocción de la cuajada	Microbiota acompañante
Vaca	○ Ácida.	○ Pasta cruda	○ Bacterias lácticas
Oveja	- Acción de microorganismos	○ Pasta cocida	a. Homo- o hetero-fermentativas.
Cabra	(inóculos o microbiota nativa).		b. Mesófilas, termófilas.
Otros:			c. Adjuntos no iniciadores.
yegua,	- Ajuste directo del pH (glucógeno, lactosa, ácidos orgánicos).		○ Levaduras superficiales.
camella,	○ Enzimática.		○ Mohos superficiales.
etc.	- Cuajo animal.		○ Bacterias superficiales.
	- Cuajo microbiano.		○ Mohos interiores.
	- Quimosina recombinante.		
	- Cuajo vegetal.		
	○ Mixta.		

La maduración del queso implica cambios en las propiedades de la cuajada, acompañados por el desarrollo de sus características típicas. La glicólisis, lipólisis y proteólisis son reacciones primarias de hidrólisis de los principales componentes de la leche: lactosa, triglicé-

ridos y proteínas, y son en gran parte responsables de los cambios de textura y del sabor básico del queso.

Posteriormente, ocurren numerosas transformaciones de los productos finales de estas reacciones primarias hasta compuestos directamente implicados en el desarrollo del aroma y sabor típico del mismo (Fox y Law, 1991).

Glicólisis

La lactosa de la leche se elimina en gran parte durante el drenaje del suero de quesería, pero la fracción remanente (0,7 – 1,5%) es fermentada principalmente a ácido L-láctico. El ácido L-láctico producido es metabolizado hasta CO_2 y H_2O , y una serie de ácidos de cadena corta, o sus correspondientes sales, dependiendo de la microbiota y la tecnología de elaboración de cada variedad de queso. El ácido L-láctico producido en la fermentación de la lactosa junto con los ácidos volátiles, aldehídos y alcoholes contribuye al aroma del queso.

La transformación de la lactosa en ácido L-láctico por las bacterias del cultivo iniciador ocurre fundamentalmente en la cuba de fermentación, aunque también continúa durante el prensado y el oreo. El pH disminuye hasta valores próximos a 5,2-5,5.

Además, la lactosa puede ser utilizada por las bacterias del cultivo, pero en ocasiones también puede utilizarse por bacterias heterofermentativas indeseadas, lo que da lugar a la aparición de defectos como agrietamiento u ojos en el queso (Fox y col., 1996).

En ciertas variedades, tales como los quesos tipo Emmental, se añaden bacterias propiónicas junto al cultivo iniciador para dar lugar a una fermentación secundaria del ácido L-láctico con producción de ácidos propiónico y acético, así como también CO_2 responsable de la formación de ojos en la pasta del queso (Shin y col., 2011).

Algunas bacterias lácticas como *Leuconostoc* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* metabolizan el citrato que permanece en la cuajada tras el desuerado originando principalmente acetoina y diacetilo, compuestos que intervienen en el aroma de quesos y de la manteca (Fox y col. 1990).

Lipólisis

La lipólisis no es un fenómeno predominante en la maduración de la mayoría de los quesos, a excepción de los madurados por mohos y algunas variedades de quesos elaborados con pastas de cuajo. Los productos que se generan a partir de la grasa de leche son ácidos grasos libres, algunos de los cuales son volátiles y contribuyen en gran medida al aroma del queso. Además, son precursores de otros compuestos involucrados en el aroma como ésteres etí-

licos y metílicos y metilcetonas. El exceso de lipólisis puede dar lugar a sabores rancios, a jabón y otros defectos (Mc Sweeney y Sousa, 2000).

Las enzimas lipolíticas del queso pueden proceder de la leche, de los microorganismos o de las preparaciones enzimáticas (pastas de cuajo), que se añaden a la leche como coagulante en la elaboración de quesos italianos como el Romano y el Parmesano y algunos españoles como el Majorero de Fuerteventura. Sin embargo la lipasa nativa de la leche es termosensible por lo que esta enzima sólo es activa en el queso elaborado con leche cruda (Battistotti y col. 1993; Prado y col. 1993).

Las bacterias lácticas presentan débil actividad lipolítica, aunque se han detectado actividades esterásicas en *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Khalid y Marth, 1990; Williams y Banks, 1997).

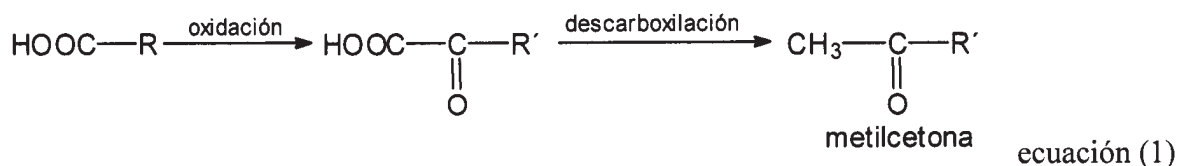
Los enterococos, presentes en algunos quesos como consecuencia de la contaminación ambiental también presentan actividad lipolítica aunque su actividad proteolítica es superior (Menéndez y col 1999a; Tzanetakis y Litopoulou Tzanetaki, 1989).

Las bacterias psicrótrofas pueden proliferar en la leche durante la refrigeración (especialmente si la leche no ha recibido un tratamiento de termización previo a la pasteurización o esterilización), y si esto sucediese serían una fuente importante de enzimas lipolíticas. Las lipasas de estos microorganismos son termorresistentes y se asocian a la superficie del glóbulo graso, quedando retenidas en la cuajada. De esta forma, las lipasas de las bacterias psicrótrofas pueden seguir actuando durante la maduración del queso (Sørhaug y Stepaniak, 1997).

Los micrococos ejercen su actividad lipolítica sobre los ácidos grasos de cadena larga, proporcionando mono y diglicéridos hidrolizables por las bacterias lácticas, modificando el desarrollo del aroma (Menendez y col., 1999b).

Los mohos que crecen en la superficie o en el interior de ciertos tipos de quesos poseen una actividad lipolítica importante. En los quesos azules, las lipasas de *Penicillium roqueforti* hidrolizan la grasa de la leche liberando principalmente los ácidos butírico, caproico, caprílico y cáprico, así como también otros ácidos grasos de cadena larga. En este tipo de quesos, el sabor y aroma se debe principalmente a la presencia de metilcetonas producidas por oxidación de los ácidos grasos libres (Fox y col. 1996).

Los hongos del género *Aspergillus* y *Penicilium* son capaces de producir lipoxidasas, enzimas que catalizan la incorporación de O₂ en la cadena del ácido graso, según la ecuación (Barberis y Quiroga, 2008).



Proteólisis

La proteólisis, proceso mediante el cual la caseína (proteína mayoritaria de la leche) se hidroliza a compuestos de menor peso molecular como péptidos y aminoácidos libres, es uno de los fenómenos más importantes que tienen lugar durante la maduración de muchos tipos de quesos, pues contribuye tanto a la textura como al aroma y sabor del producto terminado.

Los fenómenos proteolíticos pueden dividirse en proteólisis primaria y secundaria.

La proteólisis primaria corresponde a la hidrólisis de las caseínas, liberando péptidos de distinto tamaño. Se produce como resultado de la acción del cuajo (quimosina y pepsina), de las proteasas nativas de la leche (plasmina) y en menor medida de las proteasas de las bacterias lácticas del fermento (Hayaloglu y col., 2013).

La proteólisis secundaria convierte estos péptidos en aminoácidos libres, y estos sirven de sustrato para la producción de otras sustancias sápidas. Los microorganismos del queso son los principales responsables de la proteólisis secundaria (Murtaza y col., 2014).

La proteólisis influye en la textura debido a la rotura de la malla proteica, al incremento del pH por formación de NH_3 y a la mayor capacidad de retener agua por los grupos amino y carboxilo formados. La formación de péptidos de pequeño tamaño molecular y aminoácidos influye directamente en el sabor básico del queso. Además, los aminoácidos son precursores de otros compuestos responsables del aroma (Oliszewski y col., 2013).

En la proteólisis también se originan compuestos responsables de características organolépticas no deseadas, como péptidos amargos, cuyo nivel en determinadas ocasiones puede superar el umbral de percepción sensorial del amargor. La acción de las enzimas proteolíticas desempeña un papel especial en la formación de sabores amargos. En contra de opiniones previas, que relacionaban el sabor amargo con aminoácidos específicos o con la longitud de la cadena peptídica, Ney (1979) fue el primero en relacionar el amargor de los productos lácteos con la hidrofobicidad promedio de los péptidos, y encontró que los péptidos de 100-600 Da con una hidrofobicidad promedio de más de 1400 cal/mol daban lugar a sabores amargos. Posteriores trabajos indican que la presencia de un aminoácido básico (como la arginina) en el extremo N-terminal o la presencia de un aminoácido hidrofóbico en el extremo C-terminal aumentarían el amargor (Kanehisa y Okai, 1984; Shigenaga y col., 1984).

El grado de proteólisis varía entre los distintos tipos de queso, desde las variedades con poca proteólisis como el Mozzarella, a aquellas otras como los quesos azules madurados por mohos, donde la proteólisis es muy intensa (Cais-Sokolińska y col., 2014).

Agentes proteolíticos

En la degradación de la caseína intervienen distintas enzimas proteolíticas, entre las que destacan:

- La quimosina, así como otros cuajos de origen animal, vegetal y microbiano, participan en el proceso de coagulación (por hidrólisis) de la K-caseína y son responsables de la hidrólisis inicial de la αS_1 - caseína durante la maduración del queso (Bijl y col., 2014).
- Las enzimas proteolíticas endógenas de la leche, están constituidas mayoritariamente por la plasmina y la catepsina, siendo la κ -caseína el sustrato preferido de la plasmina (Khaldi y col., 2014).
- Las proteasas microbianas presentes en la leche cruda proceden principalmente de las bacterias psicotrofas. Estos microorganismos, fundamentalmente del género *Pseudomonas*, sintetizan proteasas termorresistentes que pueden dar lugar a efectos adversos durante la elaboración y maduración del queso. La mayoría de las proteasas de psicrotrofos tienen actividad coagulante de la leche, porque degradan κ - y α -caseínas y tienen una actividad variable sobre proteínas séricas no desnaturalizadas (Sørhaug y Stepaniak, 1997).
- Las enzimas proteolíticas de las bacterias lácticas que forman parte del cultivo iniciador en la elaboración del queso son de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, y actúan hidrolizando la caseína y los polipéptidos originados por el cuajo, dando péptidos pequeños y aminoácidos (Visser, 1993).
- Las enzimas proteolíticas de bacterias lácticas que no forman parte del cultivo iniciador (NSLAB, según sus iniciales en inglés) provienen de lactobacilos heterofermentativos facultativos, y constituyen la población microbiana mayoritaria al final de la maduración de muchos quesos. En algunos tipos de quesos también se encuentran enterococos, microorganismos que poseen un sistema proteolítico muy activo (Bhowmik y Marth, 1990).
- Otras enzimas proteolíticas microbianas proceden de la microbiota secundaria y de contaminación. Entre ellos, los micrococos poseen un sistema proteolítico muy importante, que participa en la degradación de la αS - y κ -caseína (Bhowmik y Marth, 1990; Menéndez y col. 1999a). Las proteinasas de microorganismos de *Penicillium spp.*, *Geotrichum candidum* y *Brevibacterim linens* juegan un papel importante en la proteólisis de quesos madurados por mohos (Gripon y Fox, 1993).

La intensidad de la proteólisis durante la maduración del queso depende de la naturaleza y concentración de las enzimas proteolíticas arriba mencionadas y de varios factores que modifican su actividad, tales como pH, temperatura, concentración de sales y potencial redox (Shahab Lavasani y col., 2012).

Maduración acelerada de los quesos

La maduración del queso es un proceso costoso y relativamente largo, de ahí las indudables ventajas económicas que redundarían del control de este proceso mediante la aceleración en el desarrollo de sus características organolépticas.

Muchos de los estudios realizados en este sentido se han centrado sobre la proteólisis, al ser éste el proceso fundamental que ocurre en la maduración de la mayoría de los quesos. Los cambios bioquímicos que se producen durante la maduración deben realizarse de forma acompasada para obtener un queso de la calidad requerida.

A pesar de ser un objetivo muy deseado por la industria alimentaria la maduración acelerada todavía no ha conseguido resultados satisfactorios para los quesos de mesa, a veces por la pérdida de armonía entre los procesos de proteólisis primaria y secundaria, otras por el elevado costo de los procesos descritos.

La proteólisis que ocurre durante la maduración del queso proporciona péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que intervienen en el sabor básico del mismo y son precursores de compuestos volátiles que inciden en el resultado final.

Los procedimientos basados en el aumento de la proteólisis están orientados a acelerar la formación del aroma y el sabor del queso. La forma en que estos procedimientos afectan a las reacciones finales de la formación de los compuestos volátiles es un tema de investigación sobre el que existen pocos datos todavía.

Los métodos para acelerar la maduración del queso son motivo de atención y revisión periódica (El Soda y Pandian, 1991; Fox y col., 1996; Izco y col., 1999; Manning y col., 1984). La elevación de la temperatura de maduración, la inclusión de enzimas exógenas, la utilización de fermentos con modificaciones químicas, físicas o genéticas, y el uso de cultivos adjuntos o de homogeneizados de queso son los métodos estudiados hasta el momento para acelerar la proteólisis del queso y son revisados a continuación.

Elevación de la temperatura

El incremento de la temperatura de maduración es un método efectivo, sin dificultades técnicas, que no supone elevados costos ni barreras legales. No obstante, su aplicación, además de aumentar el riesgo de crecimiento de microorganismos alterantes, sólo es factible en

ciertas variedades de queso (Folkertsma y col., 1996). Es de destacar que debido a su acción inespecífica puede dar lugar a la aparición de alteraciones.

Adición de enzimas

La adición de enzimas ha sido el método más estudiado para acelerar la proteólisis de los quesos (Ezzat, 1990; Fernández García y col., 1993; Fernández García y col., 1994; Kosikowski y Iwasaki, 1974), pero su aplicación no parece ser comercialmente viable al presentar una serie de desventajas como son: barreras legales en diferentes países, falta de control sobre su actuación durante la maduración del queso, y dificultad de una distribución uniforme en la cuajada. La encapsulación de las enzimas permite solucionar este último problema pero hasta la fecha la eficiencia del proceso es baja y los costos elevados (Lariviere y col., 1991; Picon y col., 1995, 1996, 1997).

Existen numerosos trabajos en los que se ha estudiado la adición de combinaciones de enzimas con distinta especificidad. En queso tipo Manchego la adición de FlavourAge (mezcla de proteinasas, peptidasas y lipasas de *A. oryzae*) acortó la maduración sin alterar las características sensoriales del producto (Jin y Park, 1996). En queso Manchego se han utilizado también preparados enzimáticos con actividad lipolítica, con buenos resultados organolépticos (Fernández García y col., 1993).

Pastas de queso ("Cheese slurries")

Este método fue desarrollado inicialmente como un método de estudio en el laboratorio sobre los fenómenos de maduración de una forma acelerada. Las pastas de queso son papiillas con un contenido aproximado en sólidos totales del 40%, en las que se desarrolla un completo aroma y sabor después de ser incubadas a 30°-35 °C durante 4-5 días (Thakar y Upadhyay, 1992). Estas pastas así maduras pueden ser añadidas en el proceso de elaboración del queso, tanto a la leche como a la cuajada, para acelerar la maduración (Ammar y col., 1994). La incorporación de proteinasas, lipasas y oligoelementos a las pastas mejora su efectividad.

El principal inconveniente de la utilización de las pastas de queso es el alto riesgo de contaminación microbiana.

Este método ha derivado en una tecnología explotada comercialmente que produce los quesos modificados enzimáticamente, que son utilizados como base para hacer productos con sabor a queso (Kilcawley y col., 1998).

Adición de adjuntos

La adición de adjuntos, especialmente lactobacilos de elevada actividad peptidásica, para acelerar el desarrollo del aroma y sabor del queso tiene un gran interés potencial. En este

sentido se ha descrito cómo el empleo de cepas seleccionadas de lactobacilos mesófilos aumenta la concentración de aminoácidos precursores del aroma, mejorando las características sensoriales del queso (Mc Sweeney, 2004). No obstante aún son necesarios más estudios con el fin de seleccionar aquellas cepas que aporten las características óptimas deseadas.

Adición de aminoácidos

Al intervenir los aminoácidos en el sabor básico del queso y ser precursores de otros compuestos responsables del aroma, se ha abordado la aceleración de la maduración del queso mediante la adición directa de los mismos. No obstante, Wallace y Fox (1997) observaron que la adición de un contenido muy alto de aminoácidos a la cuajada de queso Cheddar no intensificaba el aroma, poniendo de relieve el importante papel que juegan las posteriores reacciones de conversión de estos aminoácidos. Por otra parte, a escala industrial esta práctica no es económicamente rentable.

Selección/modificación de cultivos iniciadores

Los métodos basados en la selección y/o modificación de microorganismos ofrecen numerosas posibilidades. Dentro del grupo de microorganismos modificados se incluye tanto a los que han sido sometidos a tratamientos físicos o químicos para alterar algunas de sus funciones celulares (atenuados) como a aquellos otros modificados genéticamente con el fin de incrementar o disminuir algunas de sus actividades enzimáticas.

Las enzimas proteolíticas de los microorganismos son fundamentales y se suman a la plasmina natural de la leche. La caseína es degradada a péptidos de alto peso molecular por efecto de una intensa actividad proteolítica aportada por diversos microorganismos y algunos péptidos son convertidos en aminoácidos por las peptidasas de la microflora. La transformación de las proteínas en péptidos y aminoácidos vuelven más mórbida la cuajada, la que de gomosa y /o dura pasa a cremosa y sabrosa.

Los aminoácidos son precursores de reacciones determinantes de aromas y sabor en los quesos, especialmente metionina que es un importante componente del sabor (Barberis, 2002).

Otros métodos

Se pueden utilizar *microorganismos modificados genéticamente* (OMG) como adjuntos de mutantes deficientes en actividad lactasa (Lac-), lo que permite aumentar el número de células viables presentes en la matriz del queso y con ello acelerar la maduración (Rodríguez y col., 1996). Se han obtenido buenos resultados en ensayos realizados a escala piloto, aunque

el costo de producción de la masa celular que se requiere a escala industrial puede disminuir la rentabilidad de esta alternativa.

Actualmente, la *lisis celular* como método de aceleración de la proteólisis y con ello de la maduración del queso, es una de las principales líneas de investigación. En este sentido, los estudios se han centrado tanto en el empleo de cepas con elevada actividad autolítica como cultivos iniciadores o adjuntos, como en el desarrollo de métodos que provoquen la lisis celular. Estos métodos incluyen tratamientos con lisozima, choques térmicos (frío o calor), altas presiones, tratamientos permeabilizantes de membranas y pulsos eléctricos. No obstante, los estudios se dirigen a producir la lisis celular por otros procedimientos como termoinducción (El Soda y col., 1999), inducción de fagos (Kawabata y col., 1997), clonaje de genes líticos (De Ruyter y col., 1997) y empleo de bacteriocinas (Garde y col., 1997; Oumer y col., 1999).

Alta presión hidrostática

La tecnología de tratamiento de alimentos mediante alta presión isostática es una de las más prometedoras entre las llamadas tecnologías emergentes.

La mayoría de los desarrollos se han orientado hacia la conservación de alimentos, pero el potencial para transformar productos no es menos importante.

Se ha comprobado que un tratamiento del queso a 50 MPa causa una aceleración de la proteólisis durante el tiempo de mantenimiento de la presión, volviendo al ritmo normal cuando se libera la presión. La efectividad de este tratamiento es mayor cuanto menor es el tiempo de maduración previo al tratamiento por alta presión.

Por otro lado, un tratamiento corto e intenso (400 MPa durante 5 min) produce un incremento permanente en el ritmo de la proteólisis. La intensidad de este tratamiento causa una inactivación parcial del cuajo residual, interfiriendo en la proteólisis primaria. La hidrólisis de la κ -S-caseína es menor a causa de esta inactivación. El resultado es una mayor proporción de péptidos hidrófobos. También el tratamiento a 400 MPa reduce en unos 3 órdenes de magnitud los recuentos de bacterias lácticas correspondientes al fermento.

El aumento de la actividad proteolítica en estos quesos se debió a un aumento en la actividad de las peptidasas provenientes del citoplasma de las bacterias lácticas tras su lisis o gracias a la mayor permeabilidad de la membrana favorecida por la presión. La aceleración de la proteólisis se ve favorecida por el mayor pH y mayor actividad de agua de los quesos tratados por alta presión.

Al tratar el queso mediante alta presión se provoca un cambio en su microestructura que se refleja en los cambios de textura, y en menor medida en el color. Los quesos se con-

vierten en menos quebradizos y su color en menos luminoso y más intenso (con un mayor valor de chroma). La microestructura se convierte en más compacta, con una red proteica más regular y continua (Saldo Periago, 2002).

Queso tipo artesanal natural de leche de cabra

El queso semiduro de cabra es producido en diversas instalaciones distribuidas en nuestro país a partir de leche entera pasteurizada de cabra. No existe ninguna reglamentación específica sobre estos quesos, y por tanto las prácticas de elaboración no están totalmente estandarizadas.

La fabricación de los mismos a nivel industrial proviene de la recuperación y tipificación de las pautas tradicionales de elaboración y maduración, para lograr la calidad deseada de forma reproducible. Los quesos se elaboran a partir de leche entera de cabra previa pasteurización, sin químicos ni féculas.

El queso tipo artesanal natural de leche de cabra (La Blanquita S.A., San Luis, Argentina) presenta una corteza lisa, consistencia firme, homogénea y sin cáscara. Posee tamaño chico (350 g), forma cilíndrica, caras paralelas y perfil convexo. El interior es compacto, sin cavidades mecánicas y de un color blanco-amarillento uniforme. Su textura es firme y poco untuosa. Tiene un sabor y aroma bien desarrollado y característico.

El proceso de elaboración es el típico de un queso semigraso (33 %), de mediana humedad (38 %), elaborado con leche entera estandarizada, acidificado por cultivos de bacterias lácticas, y coagulado por cuajo y/o enzimas específicas. La masa es cocida, moldeada, prensada, salada y sometida a una maduración mínima de 1 mes.

El rotulado nutricional se presenta en conformidad con las exigencias establecidas por el Código Alimentario Argentino:

Tabla 5: Rotulado nutricional del queso de cabra (La Blanquita S.A., San Luis).

Cantidades	Porción (20 g)	% VD
Valor energético	78 kcal (326 kJ)	3,9
Carbohidratos	0,63 g	0,2
Proteínas	6,08 g	8,1
Grasas Totales	5,73 g	10,4
Grasas Saturadas	2,85 g	12,9
Grasas Trans	0,00 g	0,0

Cantidades	Porción (20 g)	% VD
Fibra Alimentaria	0,10 g	0,4
Sodio	108,40 mg	4,5

Porcentaje de valor diario (% VD) en base a una dieta de 2000 kcal u 8400 kJ (los valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas).

Hidrolizados proteicos casearios

Los compuestos saborizantes ayudan a completar el perfil organoléptico de productos con sabores muy suaves o que han perdido su potencia a través de las etapas de desarrollo. Una novedosa forma de saborizar naturalmente es mediante los procesos enzimáticos, que generan nuevos compuestos aromáticos y de sabor, mejorando el “mouthfeel” del alimento.

En la producción de saborizantes se utilizan productos proteicos (quesos, carnes) y de origen vegetal modificado enzimáticamente. Generalmente, las proteasas y lipasas son las más utilizadas para estas aplicaciones.

A continuación se describen algunas enzimas comerciales:

Enzeco® Fungal Protease Concentrate: derivada del *Aspergillus oryzae* a 500.000 HUT. Es un concentrado de proteasas ácidas y neutras fúngicas, de costo moderado, para la hidrólisis de proteínas en general. Es activo en el rango de pH de 3,0 a 6,0 y a temperaturas de hasta 50°C.

Enzeco® Fungal Protease 400: derivada de *Aspergillus oryzae* a 400.000 HUT y compuesta por proteasas ácidas, neutras y alcalinas. Presenta un mayor contenido en aminopeptidasas, como la LAP (leucina aminopeptidasa), y otras peptidasas ácido-estables como la GTG-asa (sustrato Glu-Tyr-Glu), que el ***Fungal Protease Concentrate***. Es activa a pH 5,0 a 11,0; con niveles óptimos de 7,0 y 11,0. Su rango de temperatura de trabajo es de hasta 60°C.

Cabe aclarar que el Código Alimentario Argentino en el Artículo 605 permite el agregado de lipasas y proteasas como agentes de maduración.

Sabores lácteos enzimáticamente modificados

Por medio de procesos enzimáticos se reproducen e incluso aceleran los procesos naturales que generan el sabor característico en los lácteos, obteniéndose lo que se denominan “**Ingredientes Lácteos Modificados Enzimáticamente**” (en inglés EMDI).

A partir de queso, leche, o crema y por medio de procesos de lipólisis y proteólisis controlados se pueden crear sabores concentrados lácteos que solo aportan las características

de sabor buscadas, y mejoran el “mouthfeel” (sensación en la boca) del nuevo producto diseñado (Kilara y col., 2011).

Propiedades de los EMDI

Los EMDIs pueden utilizarse conjuntamente con ingredientes lácteos, para realzar y/o reforzar el sabor de las notas lácteas ya existentes en un producto, o pueden adicionarse a productos formulados sin ingredientes lácteos, tales como los quesos análogos y extendidos. Resultan de utilidad en procesos donde se complica la inclusión de ingredientes lácteos, sensibles al desarrollo microbiano.

Los productos lácteos afrontan diferencias sensoriales a lo largo del año, y las mismas pueden ser “compensadas” con el uso de los EMDIs que aportarán al producto final un sabor consistente, estable y parejo. Desde el punto de vista económico, se obtiene un beneficio debido a las bajas dosis necesarias para realzar el sabor de estos productos. Los rangos van desde décimas porcentuales hasta un 2 %, en el caso de los quesos reprocesados.

Los EMDIs desarrollados para ser utilizados como “sistemas de saborización” suelen estar exceptuados de ser declarados en los rótulos, por ser 100 % provenientes del producto natural (<http://www.alimentación.enfasis.com>).

El proceso de obtención de estos sabores es a partir de queso, butteroil (fase grasa de la manteca), leche o crema. Estas materias primas se acondicionan, ya sea por el agregado de sales, ajuste de acidez, temperatura, etc., a las necesidades específicas de las enzimas utilizadas.

Chr. Hansen de México ha desarrollado una amplia gama de sabores lácteos por medio de procesos biotecnológicos de última generación, tales como:

EMC (Enzyme Modified Cheese): son sabores de queso tipo cheedar, parmesano, suizo, mozzarella, etc., logrados a través de modificaciones enzimáticas.

EMDF (Enzyme Modified Dairy Flavor): son sabores lácteos a partir de yogurt, crema y leche desarrollados a través de procesos enzimáticos.

Los sabores de Chr. Hansen son obtenidos vía fermentación y/o reacción enzimática y se presentan en polvo (encapsulados), líquidos o como pastas solubles en agua o en grasas. Su dosificación oscila entre 0,05 % - 2,0 % dependiendo de la aplicación (<http://chr-hansen.es/>).

Propiedades funcionales.

Las propiedades funcionales de los ingredientes y aditivos alimenticios juegan un rol clave cuando son incorporados a determinado proceso alimenticio. Sin embargo, un atributo considerado deseable en un ingrediente puede ser indeseable para otro. Por ejemplo, un ingre-

diente que aporta alta viscosidad es deseable en una sopa o en una salsa pero no lo es en una bebida.

Del mismo modo, una alta capacidad de formar espuma es deseable en la preparación de mousse, merengues y tortas; pero no lo es en la elaboración de una salsa. O bien, una alta capacidad de retención de agua, es deseable en panificación pero es innecesario en un aderezo.

La habilidad de un ingrediente para interactuar con otros e impartir propiedades deseables a un sistema alimenticio es conocido como *funcionalidad* (Pilosof y Bartholomai, 2000).

Los alimentos son sistemas complejos que están formados por varios componentes (proteínas, grasas, carbohidratos, sales minerales) los cuales influyen conjuntamente en las propiedades funcionales. Por lo tanto, la funcionalidad de un ingrediente no puede ser considerada independiente de otros. Más bien, los efectos funcionales observados son el resultado de la interacción entre los ingredientes. Esta interacción ha dificultado el estudio de la funcionalidad. Sin embargo, las proteínas juegan un papel preponderante en las propiedades funcionales de los alimentos y se espera que los estudios de la funcionalidad de las mismas sean útiles para predecir, controlar e impartir características deseables a sistemas alimentarios más complejos.

A continuación se describen brevemente las propiedades funcionales estudiadas en este trabajo.

Solubilidad

La solubilidad de un material proteico describe la capacidad de formar soluciones coloidales y no puede ser definido por los productos de solubilidad usados por ejemplo para sales. Este comportamiento complica la definición de solubilidad y dado que no se puede hacer una definición termodinámica, existen diferentes definiciones operacionales.

La solubilidad se define como la proporción de nitrógeno (o de proteína) de una muestra proteica que se solubiliza luego de un determinado procedimiento de solubilización. Se expresa comúnmente como nitrógeno soluble en agua, índice de solubilidad de nitrógeno (NSI), proteína soluble en agua o índice de proteína soluble (PSI) o índice de dispersibilidad de proteína (PDI). Cada una de estas expresiones se corresponde con diferentes medios y procedimientos experimentales para separar y cuantificar la proteína soluble.

La solubilidad de las proteínas depende del estado físico-químico de sus moléculas que puede ser alterado por el calentamiento, procesamiento, secado y condiciones de almacenamiento. La solubilidad de la mayoría de las proteínas depende del pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de solventes orgánicos.

Absorción y retención de agua

El agua es usualmente el componente mayoritario de los alimentos. El contenido y/o estado físico del agua influye tanto en las propiedades organolépticas y de textura de un alimento como en su estabilidad microbiológica y físico-química. Las propiedades de hidratación están vinculadas a la interacción de las proteínas con el agua e influyen en diversos aspectos inherentes a la formulación, procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Piloso y Bartholomai, 2000).

La propiedad de absorción de agua de las proteínas es importante en productos de panadería ya que se incrementa el rendimiento de la masa y mejora las características de manipulación de la misma. En otros casos, es deseable una determinada absorción de agua para que el producto alcance la consistencia deseada.

En productos cárnicos se usan concentrados de proteína de soja preparados por lixiviación con alcohol de hojuelas desgrasadas. Esto mejora la absorción de agua y minimiza el encogimiento durante la cocción.

La interacción agua-proteína es también un factor clave para impartir una textura similar a la de productos cárnicos preparados por extrusión a base de harinas de soja. Estos productos absorben de 2,4 a 3,4 veces su peso seco después de la hidratación y la textura crujiente se transforma en masticable (como la de la carne).

Viscosidad

La viscosidad es una propiedad importante en los alimentos que afecta la palatabilidad, la calidad de la textura y el manejo mecánico de los materiales fluidos. La mecánica de fluido de las proteínas está relacionada con la solubilidad (Piloso y Bartholomai, 2000).

Los fluidos como el agua o el aceite fluyen sobre la superficie en forma de capas. La capa externa siempre se mueve a mayor velocidad que cada una de las capas inferiores adyacentes a ella. Este fenómeno se produce porque existe una resistencia a fluir entre las capas de fluido. Las fuerzas que ocasionan la resistencia al movimiento entre las capas se denominan fuerzas viscosas.

Entonces, la viscosidad de un fluido (gas o líquido) se define como la propiedad de éstos que se manifiesta por la resistencia al movimiento que ofrece una capa de dicho fluido sobre otra capa adyacente a él.

El SI de unidades de medida de viscosidad de un fluido es Newton . seg / m² (N.s/m²), aunque también es usual expresar los resultados en centipoise (cP).

Tomando como base los cambios que experimenta la viscosidad según el fluido en el que se determine, éstos se clasifican en cinco tipos:

1. Fluidos ideales: es un fluido imaginario incompresible y no tiene viscosidad.
2. Fluidos reales: como se infiere de su denominación, todos los fluidos son reales y por lo tanto tienen algún valor de viscosidad, pequeño o grande. En general, si son líquidos su viscosidad se reduce con el aumento de la temperatura y si son gases, la viscosidad aumenta con la temperatura.
3. Fluidos Newtonianos: son aquellos fluidos reales que obedecen a la Ley de Newton.

Es decir, la tensión de corte (shear stress, τ) que se produce entre varias capas de fluido es proporcional a la velocidad de la fuerza de corte (shear strain, F) o gradiente de velocidad. Es decir:

$$\tau = \frac{F}{A} \quad \text{ecuación (2)}$$

Donde:

τ : tensión de corte.

F: fuerza aplicada.

A: área transversal del fluido.

Si un fluido Newtoniano se mueve a lo largo de una superficie sólida se producirá una tensión de corte (τ) sobre la superficie y su velocidad en ese punto es 0, pero a cierta altura de dicha superficie el flujo del fluido tiene la velocidad propia de éste. La región entre esos dos puntos se denomina “capa límite o capa de Nerst” (boundary layer).

La tensión de corte (τ) impartida sobre la superficie límite, como resultado de la pérdida de velocidad, se expresa de la siguiente forma (ecuación 3):

$$\tau = \eta \cdot \left. \frac{du}{dy} \right|_{y=0} \quad \text{ecuación (3)}$$

Donde:

η : viscosidad dinámica del fluido.

u : velocidad del fluido a lo largo del límite.

y : espesor de la capa límite.

4. Fluidos no Newtonianos: son aquellos fluidos reales que no obedecen a la Ley de Newton de viscosidad. En dichos fluidos la tensión de corte (τ) impartida sobre la superficie límite no es proporcional al gradiente de velocidad (du/dy) (ecuación 3).
5. Fluidos plásticos: son aquellos que no fluyen hasta que son sometidos a un esfuerzo constante límite determinado, llamado esfuerzo de deformación plástica, umbral de fluencia o límite de fluencia.

La viscosidad de un fluido depende de numerosas variables tales como: la temperatura, la concentración, el tipo de solución (polímeros vs. solutos de bajo peso molecular), la fuerza iónica, etc.

En particular, la dependencia de la viscosidad con la temperatura es un fenómeno que a menudo resulta complicado de explicar dada la cantidad de factores (además de la temperatura) que intervienen en la determinación de la viscosidad de una solución.

Como se mencionó previamente, se espera que la viscosidad de un líquido tienda a decrecer a medida que aumenta la temperatura, según alguno de los siguientes modelos:

1) *Modelo exponencial*

$$\eta = \eta_0 \times e^{(-bT)} \quad \text{ecuación (4)}$$

Donde:

T : temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

η : viscosidad (cP).

η_0 y b : coeficientes.

Este es un modelo empírico que usualmente funciona para un rango limitado de temperaturas.

2) *Modelo de Arrhenius*

Se basa en asumir que el flujo de un fluido obedece a la ecuación de Arrhenius para cinética molecular:

$$\eta = \eta_0 \times e^{\left(\frac{E}{RT}\right)} \quad \text{ecuación (5)}$$

Donde:

T: temperatura (°C).

η : viscosidad (cP).

η_0 : coeficiente.

E: energía de activación.

R: constante universal de los gases.

3) *Modelo de Williams-Landel-Ferry*

$$\eta(T) = \eta_0 \times e^{\left(\frac{-C_1(T-T_r)}{C_2+T-T_r}\right)} \quad \text{ecuación (6)}$$

Donde:

T: temperatura (°C).

T_r : temperatura de transición vítrea (°C) = $T_g + 43$ °K.

η : viscosidad (cP).

η_0 : coeficiente.

C_1 : 8,86 (parámetro empírico).

C_2 : 101,6 °K.

Es usado para polímeros fundidos u otros fluidos que tienen una temperatura de transición vítrea.

4) *Modelo de Seeton*

Se basa en el ajuste de curvas de viscosidad de muchos líquidos (refrigerantes, hidrocarburos y lubricantes) y la dependencia con la temperatura. Se aplica sobre amplios rangos de temperatura y viscosidad.

La viscosidad para soluciones acuosas con una precisión de 2,5 % en un rango de 0 a 370 °C viene dado por la ecuación:

$$\eta = f \times 0,02414 \times 10^{(247,8/(T-140))} \quad \text{ecuación (7)}$$

Donde:

η : viscosidad (cP)

T: temperatura (° K).

f: factor de conversión.

Propiedades emulsificantes

La emulsificación es una propiedad funcional importante en la elaboración de salchichas, batidos pasteleros y masas, cremas para el café, postres helados y aderezos para ensaladas. En este sentido las más utilizadas son las proteínas de soja debido a su capacidad de formar emulsiones agua-aceite.

Las proteínas de soja son particularmente eficientes en las emulsiones debido a que sus moléculas tienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas. En soluciones acuosas la región hidrofílica está asociada con el agua, y la región hidrofóbica es expuesta al interior de la proteína globular. Durante la emulsificación, la interfase aceite-agua permite que la región hidrofóbica (lipofílica) de la molécula se asocie a la fase grasa mientras que la región hidrofílica permanece asociada con la fase acuosa. Por lo tanto, la proteína que es soluble en la fase acuosa cuando se forma la emulsión, tiene una mayor oportunidad de orientarse correctamente en la interfase para estabilizar la emulsión.

Por esta razón, se espera que las variables que afectan a la solubilidad, también influyan sobre las propiedades de emulsificantes (Xue y col., 2013).

La capacidad de formar emulsión informada en diversos productos de proteína de soja varía de 2-20 ml de aceite por g de proteína.

La estabilidad de la emulsión se ve afectada por las propiedades inherentes a la emulsificación de la proteína, y a las condiciones bajo las cuales se realiza dicha emulsificación. El pH y la energía suministrada durante la formación de la emulsión tienen un profundo efecto en la estabilidad de la emulsión. El incremento de la energía durante la preparación de la emulsión incrementa la estabilidad de la misma hasta alcanzar un punto límite. La relación entre el pH y la estabilidad de la emulsión es similar a la relación entre el pH y la solubilidad de las proteínas.

Formación de espuma

El fenómeno de formación de espuma es similar a la emulsificación, excepto por que la fase discontinua es aire o gas en lugar de grasa (Pilosof y Bartholomai, 2000).

La proteína que tradicionalmente se usaba como espumante en productos de confitería (coberturas, postres y pasteles) es la albúmina de huevo, pero la proteína de soja es un buen sustituto parcial o total de este ingrediente tradicional más caro.

Durante la formación de espuma, la proteína se concentra en la interfase de la burbuja de gas y el líquido, reduciendo la tensión superficial e incrementando la viscosidad. Así se mantiene la burbuja de gas y se minimiza el drenado del líquido.

Para tener un desempeño satisfactorio, gran parte de la proteína debe ser inicialmente soluble y orientar sus superficies polares y no polares con las fases líquida y gaseosa, respectivamente. Las moléculas de proteína deben interactuar unas con otras para formar una película estable, pero la interacción no debe ser demasiado fuerte sino la proteína se coagula y se rompe la película, resultando en la ruptura de la espuma.

Existen muchas variables en los sistemas alimenticios que pueden afectar este delicado balance requerido para desarrollar y mantener la espuma.

El volumen de la espuma depende de la concentración de proteína y del pH, siendo preferidos los valores por encima del punto isoeléctrico. Las trazas de lípidos en los aislados de soja actúan como inhibidores de la espuma y su remoción mejora las propiedades espumantes. La presencia de sucrosa disminuye el volumen de espuma pero mejora la estabilidad de ésta. El cloruro de sodio incrementa el volumen de la espuma y mejora la estabilidad de la espuma.

Actualmente se utilizan hidrolizados de proteína de soja para mejorar las propiedades espumantes y aditivos en base a jarabe de maíz para estabilizar la espuma (Wijeratnel, 2005).

Hidrofobicidad Superficial

Las propiedades funcionales están relacionadas con el contenido de aminoácidos hidrofóbicos y su ubicación espacial en la proteína. Los aminoácidos hidrofóbicos tienden a localizarse en el interior de las moléculas de proteínas globulares en solución, evitando un contacto con el medio acuoso. Sin embargo, debido a impedimentos estéricos no todos los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran en el interior de la proteína. La extensión de superficies apolares expuestas determinan la solubilidad, absorción a interfases, y otras propiedades funcionales de las proteínas.

Materiales y Métodos

Preparación de la muestra:

Se trabajó con queso semiduro de cabra (La Banquita S.R.L., San Luis, Argentina) con un mes de maduración y sin agregado de aditivos ni saborizantes. La composición del mismo permite tipificarlo como un queso semiduro, semigraso y de mediana humedad.

Se prepararon dispersiones acuosas de queso de cabra previamente procesado, durante 2 min en un homogenizador manual de laboratorio. A 10 g de muestra procesada se le agregaron diferentes cantidades de buffer fosfato (pH: 5 a 9) y de papaína; y se mantuvieron bajo agitación a 200 rpm, utilizando un agitador orbital rotatorio (Marca GFL, Alemania). Las temperaturas y los tiempos de hidrólisis se variaron de 35 a 70° C, y de 30 a 270 min, respectivamente.

Diseño estadístico de experimentos (DOE):

Debido al considerable número de variables (factores y respuestas) intervinientes en el proceso de hidrólisis del queso de cabra (pH, temperatura, tiempo de hidrólisis, cantidad de buffer agregado, relación enzima: sustrato, nitrógeno soluble total, nitrógeno amínico libre, solubilidad, propiedades emulsionantes, viscosidad, capacidad de retención de agua, hidrofobilidad superficial, propiedades espumantes), es necesario llevar a cabo la medición en forma eficiente, es decir con una adecuada economía del número de ensayos, tiempo y costos. Además, dichas mediciones deben proveer precisión suficiente. Estos aspectos son incumbencia del *diseño de experimentos*.

En este caso, se llevó a cabo un Diseño Doehlert, este es un diseño simétrico multinivel clasificado como “de celda uniforme”. Esto significa que los puntos de muestreo se ubican, para los casos de más de tres variables, en la superficie de una hiperesfera de radio 1, y en su centro. Todos los puntos son equidistantes del centro en el espacio multidimensional y el diseño resulta ortogonal. Trabajar con diseños ortogonales redunda en el beneficio de obtener modelos de expresión más sencilla como se detallará más adelante.

Para 5 variables el diseño Doehlert resulta ser el más económico en número de experimentos respecto de otros diseños multinivel. Otra característica fundamental es que los factores tienen diferentes números de niveles, para más de tres factores el número de niveles es: 3 para uno de ellos, 5 para otro y 7 para todos los restantes (Doehlert, 1970). De modo que se pueden asignar libremente mayor número de niveles a los factores que necesitan más descripción y menor número de niveles a los factores difíciles de cambiar experimentalmente. Los rangos de las variables intervinientes en el proceso de hidrólisis del queso de cabra se establecieron en ensayos previos y se muestran a continuación:

pH: 5 a 9, (7 niveles).

Temperatura: 35 a 70 °C, (7 niveles).

Tiempo de hidrólisis: 30 a 270 min, (7 niveles).

Cantidad de buffer agregado: 10 a 30 (g de buffer / g de proteína), (3 niveles).

Relación enzima: sustrato: $5,5 \cdot 10^{-3}$ a 0,22 (mg /g de caseína del queso), (5 niveles).

Las respuestas medidas en las 31 corridas (por duplicado) del Diseño Doehlert fueron: proteínas solubles, nitrógeno amínico libre, solubilidad, propiedades emulsionantes (actividad y estabilidad de la emulsión), viscosidad, capacidad de retención de agua, hidrofobicidad superficial, propiedades espumantes (capacidad de formar espuma y estabilidad de la espuma). Además, se demostró el grado de hidrólisis mediante el análisis de péptidos y aminoácidos por HPLC y SDS-PAGE.

Determinación de proteínas solubles totales y nitrógeno amínico libre:

Las muestras hidrolizadas se trataron a ebullición (para frenar la actividad enzimática) y luego se enfriaron a -4°C y se centrifugaron a $3000 \times g$, durante 15 min. Se analizaron proteínas solubles y nitrógeno amínico libre en los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación, libres de grasa y filtrados con papel Whatman N° 1, mediante los métodos de Kjeldahl y fenol-hipoclorito modificado, respectivamente (AOAC, 1995; Fawcett y Scott, 1960).

Determinación de la solubilidad:

La solubilidad se define como la proporción de nitrógeno (o proteína) de una muestra proteica que se solubiliza luego de un procedimiento específico, puesto que no puede aplicarse una definición termodinámica de solubilidad como para sales (basada en los productos de solubilidad). Dicho parámetro describe la capacidad de la muestra de formar soluciones coloidales y depende del pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de solventes orgánicos (Morr y col. 1985).

Se puede expresar como índice de nitrógeno soluble (NSI) o como índice de solubilidad de proteína (ISP). Para nuestro caso se expresó como índice de solubilidad de proteína (AOCS, 1987):

$$\text{ISP} = \frac{\text{Cantidad de proteínas soluble}}{\text{Cantidad de proteína total}} \times 100 \quad \text{ecuación (8)}$$

Para calcular este índice a partir de los datos obtenidos, se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{ISP} = \frac{\text{Concentración de proteína en el sobrenadante (mg/ml)} \times \text{Volumen de sobrenadante (ml)}}{\text{Peso de muestra (mg)} \times \text{Concentración de proteína en la muestra (mg/100 mg de muestra)}} \times 100 [=] \% \quad \text{ecuación (9)}$$

La proteína soluble de los sobrenadantes y de la muestra se cuantificaron por el método de Kjeldahl, citado previamente.

Propiedades emulsionantes:

Determinación de la actividad y estabilidad de la emulsión.

El área interracial que puede ser cubierta por una concentración dada de proteína tiene relación con la capacidad de crear y estabilizar emulsiones. A su vez existe una relación simple entre la turbidez producida por una dispersión de partículas y el área interfacial de una emulsión, por lo que es posible evaluar turbidimétricamente las propiedades emulsionantes de las proteínas:

$$T = K \cdot \pi \cdot a^2 \cdot N \quad \text{ecuación (10)}$$

Donde, la turbidez (T) de una solución que contiene partículas esféricas es proporcional al radio medio de las partículas (a), al número de partículas (N) y al coeficiente de difusión de la luz (K).

En este trabajo, se determinó el índice de la actividad emulsionante (IAE, m²/g) y el índice de la estabilidad de la emulsión (IEE, min) de los hidrolizados proteicos, tomando como base el método turbidimétrico de Pearce y Kinsella (1978) modificado por Tang y col. (2005).

Para formar la emulsión se utilizaron 2 ml de la solución sobrenadante del hidrolizado de queso de cabra y se diluyeron con 18 ml del mismo buffer utilizado para la hidrólisis. Se adicionaron 6 ml de aceite de maíz (θ : 0,23) y se agitó durante 3 min a máxima velocidad, en un homogenizador. De la emulsión se tomaron 50 μ l y se volcaron sobre 2,5 ml de SDS al 0,1 % (DF: 51). Se mezclaron en un vortex y se midió la absorbancia a 500 nm (A_0). Se midió nuevamente la absorbancia a los 20 minutos (A_{20}). El dato de absorbancia obtenido inmediatamente (A_0) permitió obtener el índice de actividad emulsificante (IAE), y también calcular el índice de estabilidad de la emulsión (IEE).

$$IAE = \frac{2 \times 2,303 \times A_0 \times DF}{c \times \phi \times (1 - \theta)}$$

ecuación (11)

$$IEE = \frac{A_0}{A_0 - A_{20}} \times 20$$

ecuación (12)

Donde:

c: es la concentración de proteínas en el sobrenadante (mg/ml).

ϕ : es el camino óptico (0,01 m).

$T: 2,303 \times A_0 / \phi$

θ : es la fracción de aceite usado para formar la emulsión.

DF: es el factor de dilución.

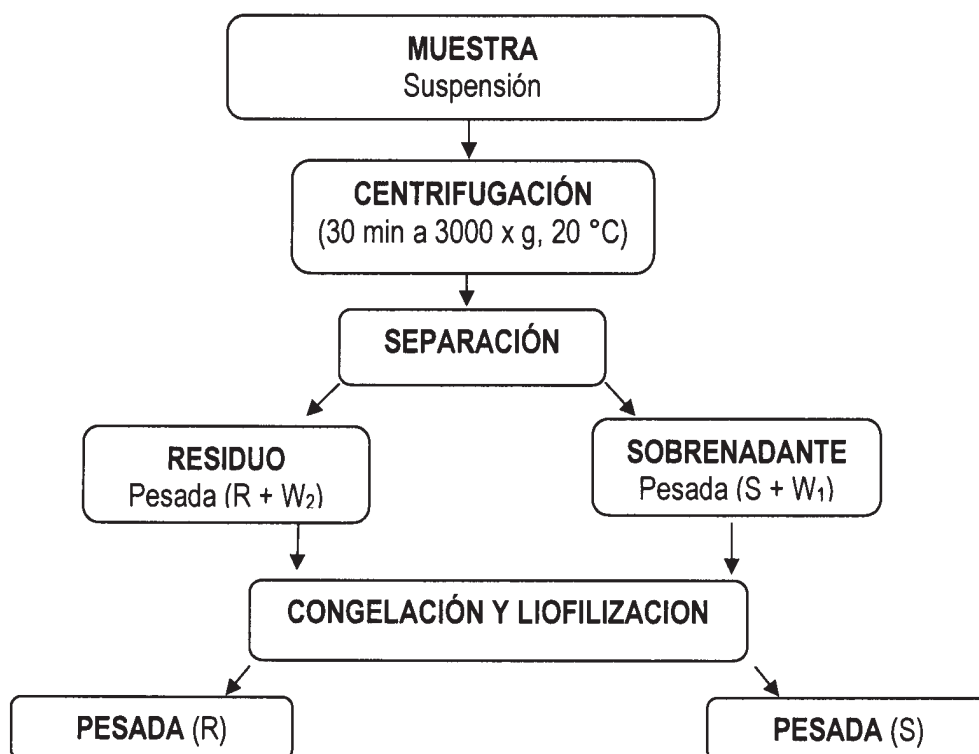
Determinación de la viscosidad:

Dada la naturaleza no newtoniana y tixotrópica de los agregados proteicos (interacción proteína – proteína que incluye la floculación, coagulación y gelificación) en estudio, se determinó la viscosidad aparente (Hermansson 1978, 1979). Estas medidas son fuertemente dependientes de la instrumentación usada. En este trabajo, la viscosidad de los hidrolizados y de la muestra original procesada se determinó mediante un reómetro programable (Marca Brookfield, Modelo DV-III). Las mediciones se realizaron a 24°C, con una rutina de 9 mediciones a distintas revoluciones (desde 100 a 140 rpm), a partir de las cuales se obtuvo la viscosidad media. Se midió paralelamente la viscosidad de un ensayo en blanco sin la enzima en las mismas condiciones (Surówka y col., 2004).

Determinación de la capacidad de retención de agua:

La cantidad de agua que un material proteico puede retener bajo la acción de una fuerza centrífuga depende de las condiciones de centrifugación. Estandarizando la fase de centrifugación es posible reducir los efectos de las condiciones de operación.

En este trabajo, se aplicó el procedimiento desarrollado por Piva y col. (1981), en el cual se tiene en cuenta la fracción de proteína solubilizada durante el procedimiento.



Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

$$WHC = W_2 / R \quad \text{ecuación (13)}$$

$$HW = [W_2 / (W_1 + W_2)] \times 100 \quad \text{ecuación (14)}$$

Donde:

WHC = retención de agua (en inglés water holding capacity) [=] (g H₂O / g de residuo seco).

HW = agua retenida (en inglés held water) [=] %.

Determinación de la hidrofobicidad superficial:

Las medidas de hidrofobicidad superficial de las muestras originales e hidrolizadas fueron llevadas a cabo mediante una sonda de 1-anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS), utilizando el método de Kato y Nakai (1980). Los sobrenadantes de los hidrolizados de queso de cabra se diluyeron en forma seriada con buffer fosfato 0,01 M (pH: 7) para obtener concentraciones de proteínas entre 0,01 – 1 mg/ml. Las concentraciones de proteína en el sobrenadante fueron determinadas por el método de Bradford (1976). Luego, 40 µl de ANS (8 mM en buffer fosfato 0,1 M, pH: 7) se adicionaron a 2 ml de muestra. La intensidad de fluorescencia se midió con un espectrofotómetro de fluorescencia (Perkin-Elmer 2000) a 365 nm (excitación) y 484 nm (emisión). La pendiente inicial de la curva IF vs. Concentración de proteínas (por análisis de regresión lineal) se usó como índice de hidrofobicidad de proteínas (Hayakawa y Nakai, 1985; Sorgentini y col. 1995; Molina Ortiz y col., 2004).

Determinación de las propiedades espumantes:

Capacidad de formar espuma y estabilidad de la espuma.

La formación de espuma se midió usando una columna de vidrio graduada con un disco de vidrio poroso (tipo G 4) en el fondo. Se insufló gas N₂ a un flujo (fr, ml/min) de 180 ml/min a través de 30 ml de las fracciones solubles y totales de los hidrolizados (conteniendo 0,5 a 2 mg / ml) disueltas en NaCl 0,5 M, hasta que un volumen fijo de espuma alcance un volumen final (Vf, ml) de 275 ml. Se registró el tiempo para alcanzar este volumen (tf, min). Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y se compararon con un blanco de queso de cabra procesado sin hidrolizar. La capacidad de formar espuma (FC) se calculó como:

$$FC = \frac{Vf}{fr \cdot tf} \quad \text{ecuación (15)}$$

Simultáneamente, se registró el volumen de líquido remanente en el tubo de vidrio a diferentes tiempos, hasta el final del burbujeo. Se determinó el volumen de líquido que se incorporó a la espuma al final del burbujeo ($V_{\max}$, ml). Se midió el tiempo ($t_{1/2}$) para drenar la mitad del líquido incorporado a la espuma al final del burbujeo. La estabilidad de la espuma se midió como constante específica de velocidad de drenado (FS) (Sorgentini y col., 1995; Kato y Nakai, 1980; Elizalde y col. 1990).

$$FS = \frac{1}{V_{\max} \cdot t_{1/2}} \quad \text{ecuación (16)}$$

Grado de hidrólisis obtenido:

Análisis de péptidos y aminoácidos por SDS-PAGE y HPLC:

Los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 3000 x g durante 30 min se filtraron a través de papel Whatman N° 1. Las soluciones obtenidas se filtraron nuevamente a través de membranas de 0,45 a 0,5 μm (Miller – LCR₁₃ ó Millex - Millipore).

En el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) se utilizó una alícuota del filtrado con una concentración de 1 mg/ml. Se sembraron patrones de pesos moleculares de proteínas. El gel de poliacrilamida tuvo una concentración de 14 % (p/v) (Laemmli, 1970).

Los análisis por HPLC se llevaron a cabo en un equipo Gilson, utilizando una columna RP-18 a 40 °C. Se inyectaron 60 μl de filtrado y la detección se realizó a 214 nm. El eluyente A fue TFA (0,1 %) en agua y el eluyente B fue TFA (0,07 %) en agua y acetonitrilo (1:9 v/v). La separación se efectuó mediante un flujo de 1 ml / min del eluyente A durante 10 min y luego, se aplicó un gradiente lineal de 0 a 30 % y de 30 a 66 % de eluyente B, durante 80 y 20 min, respectivamente (Elizalde y col., 1990; Bergamini, y col., 2006).

Espectroscopia FTIR (Fourier transform infrared technique):

Los espectros infrarrojo se realizaron a 25 °C, utilizando un espectrómetro infrarrojo Nicolet Protégé (modelo 460) con transformada de Fourier, provisto de un beamsplitter de CsI en el rango comprendido entre 225 y 4000 cm^{-1} . La resolución espectral fue mejor que 1 cm^{-1} en el rango estudiado (1500–1800 cm^{-1}).

Las determinaciones espectrométricas IR se realizaron usando una fracción de los liofilizados obtenidos a partir de los sobrenadantes de los hidrolizados de queso de cabra. Se mezcló la muestra con 600 mg de KBr y se formó una pastilla con una prensa hidráulica. Estudios previos de microscopía demostraron que no hay ninguna alteración en el espectro infrarrojo de las proteínas causadas por el KBr (Prestrelski y col. 1993; Dong y col., 1995; Van der

Weert y col., 2001). El espectro final fue obtenido por sustracción de la señal correspondiente al vapor de agua en la región comprendida entre 1500 y 1800 cm^{-1} (Dong y Caughey, 1994). Además, se llevó a cabo un espectro de referencia de cada uno de los blancos (sin enzima) de las muestras analizadas, los cuales fueron sustraídos de los espectros de aquellos.

La corrección de la línea base y la segunda derivada del espectro se realizó utilizando el programa OMNIC del espectrómetro. Las cantidades relativas de los diferentes componentes de la banda amida I fueron determinadas por medio del análisis de la segunda derivada. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

Evaluación quimiométrica de los resultados obtenidos

El estudio de sistemas complejos que carecen de modelos teóricos deductivos y que involucran a un número grande de variables es competencia de la *infometría*. Hay variantes dentro de este vocablo general que pertenecen a ramas específicas de la ciencia, como son: quimiometría, econometría, biometría, etc. La quimiometría comprende una combinación de técnicas matemáticas, estadísticas y computacionales para resolver problemas *multivariantes* (Massart, y col., 1988, 1997; Berthold y Hand, 2003).

En general, el estudio del tipo de problema tratado aquí comprende varios pasos, cuyo objetivo final es obtener un *modelo empírico-estadístico* que permita predecir el comportamiento del sistema. Además, el modelo una vez elaborado sirve habitualmente para optimizar los parámetros del proceso de manera de obtener la máxima eficiencia en algunas de sus características.

Para optimizar el número de experiencias necesarias y la calidad de los resultados estadísticos obtenidos, se eligió un diseño tipo Doehlert; es decir un diseño *mutinivel* que permite evaluar variables (factores y respuestas), determinar cuáles son los factores significativos y sus asociaciones.

Las respuestas evaluadas fueron: proteínas solubles, nitrógeno amínico libre, solubilidad, propiedades emulsionantes (actividad y estabilidad de la emulsión), viscosidad, capacidad de retención de agua, hidrofobicidad superficial y propiedades espumantes (capacidad de formar espuma y estabilidad de la espuma).

Los factores estudiados fueron: pH, temperatura, relación enzima : sustratos (E:S), cantidad de buffer agregado y tiempo de hidrólisis.

El análisis estadístico se llevó a cabo por técnicas de cálculo lineal y no lineal, empleando técnicas multivariantes básicas como Anova múltiple y componentes principales (Zupan y Gasteiger, 1999; Kohonen, 1995).

Se desarrollaron modelos lineales para comprender el comportamiento de las variables, es decir la influencia del conjunto de factores sobre las respuestas (parámetros funcionales).

Por último, se validaron los modelos obtenidos para estimar si reunían las características esperadas en cuanto a errores de predicción, rango abarcado de factores y respuestas y valor final de los mismos.

Optimización de los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos de queso de cabra en función de la aplicación deseada

Finalmente, se realizó la optimización de los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos de queso de cabra en función de la aplicación deseada, utilizando estrategias de análisis para múltiples respuestas, tales como gráficos de contorno y funciones de deseabilidad (Meyers y Montgomery, 1995; Wu y Hamada, 2000).

Así, se diseñaron cuatro aditivos funcionales a medida en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra, para ser adicionados a: salsas y sopas, mousse de queso (cheese cake), productos de panificación y aceleradores de la maduración de otros quesos duros.

Resultados y Discusión

Debido al considerable número de variables que intervienen en el proceso de hidrólisis de las proteínas del queso de cabra (pH, temperatura, tiempo de hidrólisis, cantidad de buffer agregado, relación enzima:sustrato), se llevó a cabo un Diseño Estadístico Experimental Doehlert multinivel. Mediante dicho diseño se evaluaron todas las variables (factores y respuestas) cuya relación no es lineal. La Tabla 6 muestra los niveles experimentales usados para obtener resultados estadísticos significantes de los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

Tabla 6: Niveles experimentales del diseño estadístico Doehlert.

Nº ID	Relación Enzima/Sustrato (mg/g de caseína del queso)	pH	Tiempo de hidrólisis (min)	Temperatura (°C)	Cantidad de buffer agregado (g de buffer/g proteína)
	5 niveles	7 niveles	7 niveles	7 niveles	3 niveles
1	0,11275	7	150	52,5	20
2	0,22	7	150	52,5	20
3	0,166375	8,732	150	52,5	20
4	0,166375	7,57736	247,92	52,5	20
5	0,166375	7,57736	174,4956	66,334975	20

Nº ID	Relación Enzima/Sustrato (mg/g de caseína del queso)	pH	Tiempo de hidrólisis (min)	Temperatura (°C)	Cantidad de buffer agregado (g de buffer/g proteína)
6	0,166375	7,57736	174,4956	55,2671	27,746
7	0,0055	7	150	52,5	20
8	0,059125	5,268	150	52,5	20
9	0,059125	6,42264	52,08	52,5	20
10	0,059125	6,42264	125,5044	38,665025	20
11	0,059125	6,42264	125,5044	49,7329	12,254
12	0,166375	5,268	150	52,5	20
13	0,166375	6,42264	52,08	52,5	20
14	0,166375	6,42264	125,5044	38,665025	20
15	0,166375	6,42264	125,5044	49,7329	12,254
16	0,059125	8,732	150	52,5	20
17	0,11275	8,15464	52,08	52,5	20
18	0,11275	8,15464	125,5044	38,665025	20
19	0,11275	8,15464	125,5044	49,7329	12,254
20	0,059125	7,57736	247,92	52,5	20
21	0,11275	5,84536	247,92	52,5	20
22	0,11275	7	223,4244	38,665025	20
23	0,11275	7	223,4244	49,7329	12,254
24	0,059125	7,57736	174,4956	66,334975	20
25	0,11275	5,84536	174,4956	66,334975	20
26	0,11275	7	76,5756	66,334975	20
27	0,11275	7	150	63,567875	12,254
28	0,059125	7,57736	174,4956	55,2671	27,746
29	0,11275	5,84536	174,4956	55,2671	27,746
30	0,11275	7	76,5756	55,2671	27,746
31	0,11275	7	150	41,432125	27,746

Los rangos de las variables que intervienen en el proceso de hidrólisis del queso de cabra se establecieron en ensayos previos y se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Rangos y variables que intervienen en el proceso de hidrólisis proteica del queso de cabra.

Variables	Rango	Niveles
Relación enzima/sustrato (E:S)	$5,5 \cdot 10^{-3}$ / 0,22 (mg/g de caseína del queso)	5
pH	5 a 9	7
Tiempo de hidrólisis	30 a 270 min.	7
Temperatura	35 a 70 °C	7
Cantidad de buffer agregado	10 a 30 g /g de proteína	3

Las variables de dicho diseño fueron escaladas desde el diseño original Doehlert para 5 variables tal como muestra la Tabla 8.

Tabla 8: Valores escalados para un diseño Doehlert de 5 variables.

	X1	X2	X3	X4	X5
Experimento Nº	5 niveles	7 niveles	7 niveles	7 niveles	3 niveles
1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
3	0,5	0,866	0	0	0
4	0,5	0,28868	0,816	0	0
5	0,5	0,28868	0,20413	0,79057	0
6	0,5	0,28868	0,20413	0,15812	0,7746
7	-1	0	0	0	0
8	-0,5	-0,866	0	0	0
9	-0,5	-0,28868	-0,816	0	0
10	-0,5	-0,28868	-0,20413	-0,79057	0
11	-0,5	-0,28868	-0,20413	-0,15812	-0,7746
12	0,5	-0,866	0	0	0
13	0,5	-0,28868	-0,816	0	0
14	0,5	-0,28868	-0,20413	-0,79057	0
15	0,5	-0,28868	-0,20413	-0,15812	-0,7746
16	-0,5	0,866	0	0	0
17	0	0,57732	-0,816	0	0
18	0	0,57732	-0,20413	-0,79057	0
19	0	0,57732	-0,20413	-0,15812	-0,7746
20	-0,5	0,28868	0,816	0	0
21	0	-0,57732	0,816	0	0
22	0	0	0,61187	-0,79057	0
23	0	0	0,61187	-0,15812	-0,7746
24	-0,5	0,28868	0,20413	0,79057	0
25	0	-0,57732	0,20413	0,79057	0
26	0	0	-0,61187	0,79057	0
27	0	0	0	0,63245	-0,7746
28	-0,5	0,28868	0,20413	0,15812	0,7746
29	0	-0,57732	0,20413	0,15812	0,7746
30	0	0	-0,61187	0,15812	0,7746
31	0	0	0	-0,63245	0,7746

Las respuestas que se midieron a través de 31 corridas (por duplicado) del Diseño Doehlert son: nitrógeno amínico libre, nitrógeno soluble total, índice de solubilidad de proteínas (ISP), viscosidad, capacidad de absorción de agua (WHC), agua retenida (HW), propiedades emulsificantes (IAE: índice de actividad emulsificante, IEE: índice de estabilidad de la emulsión), propiedades espumantes (FC: capacidad espumante, FS: estabilidad de la espuma) e hidrofobicidad superficial (So).

Cada respuesta se analizó por regresión lineal múltiple, según el siguiente modelo:

$$\text{Respuesta} = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \dots + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{1,1} \cdot X_1^2 + \beta_{1,2} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{1,3} \cdot X_1 \cdot X_3 + \dots + \beta_{1,5} \cdot X_1 \cdot X_5 + \dots + \beta_{5,5} \cdot X_5^2$$

ecuación (17)

Siendo:

X_1 : relación enzima:sustrato

X_2 : pH

X_3 : tiempo de hidrólisis

X_4 : temperatura

X_5 : cantidad de buffer agregado

La Tabla 9 muestra el ordenamiento experimental diario seguido para controlar cada uno de los parámetros experimentales a fin de evitar sesgos en los resultados por probables efectos de bloqueo.

Tabla 9: Ordenamiento de las experiencias por día.

Día	N° ID			
1°	1	6	10	19
2°	2	28	25	11
3°	3	29	1	23
4°	4	30	16	15
5°	5	31	1	27
6°	7	18	14	26
7°	8	24	21	13
8°	9	22	12	17
9°	20			

Los modelos obtenidos fueron corroborados por análisis probabilístico Bayes-Gibbs (Hamada y Wu 1992; Chipman y col. 1997; Brown y col. 1998; Bernardo 2005). En la gran mayoría de los casos ambas predicciones fueron coincidentes, pero en aquellos casos excepcionales donde se encontraron diferencias, se eligió el modelo más representativo.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre el nitrógeno amínico libre.

En la Tabla 10 se presentan las respuestas de nitrógeno amínico libre (NA) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 10: Determinación de nitrógeno amínico libre (NA, g/ml). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
1	1	6	10	19
respuesta	0,70	0,63	0,39	0,50
replicado	0,69	0,63	0,43	0,41
2	2	28	25	11
respuesta	0,40	0,59	1,51	0,18
replicado	0,58	0,58	1,33	0,12
3	3	29	1	23
respuesta	1,11	0,28	0,83	0,61
replicado	1,19	0,26	0,78	0,59
4	4	30	16	15
respuesta	0,52	0,13	0,90	0,46
replicado	0,46	0,15	0,94	0,40
5	5	31	1	27
respuesta	0,42	0,74	0,75	1,50
replicado	0,39	0,67	0,77	1,23
6	7	18	14	26
respuesta	0,21	0,52	0,68	1,12
replicado	0,20	0,51	0,64	1,43
7	8	24	21	13
respuesta	0,75	0,81	0,49	0,68
replicado	0,78	0,87	0,47	0,75
8	9	22	12	17
respuesta	0,29	0,53	1,43	0,59
replicado	0,27	0,51	1,50	0,65
9	20			
respuesta	0,34			
replicado	0,31			

Según la Tabla 10, se obtuvieron valores máximos de 1,365 g/ml para la muestra ID N° 27 y mínimos de 0,41 g/ml para la muestra ID N° 10. Esto significa que el grado de hidrólisis de las proteínas solubles en el sobrenadante se incrementó hasta 188 % respecto del aislado proteico sin hidrolizar, es decir como resultado de la optimización del proceso de hidrólisis.

El análisis estadístico de NA mediante el modelo lineal propuesto en la ecuación (17), dio resultados significativos de 1° orden de NA para la temperatura, y la interacción cantidad de buffer agregado y temperatura, y de 2° orden para el pH, según la ecuación (18).

Solo para este caso se trabajó con un t (Student) crítico para una probabilidad del 90%, en lugar del habitual 95%, entonces aparece como significativo el término pH^2 y los errores

residuales del modelo son más bajos, lo que permite un mejor ajuste a los valores experimentales.

$$Y = \beta_0 + \beta_4 \cdot X_4 + \beta_{2,2} \cdot X_2^2 + \beta_{4,5} \cdot X_4 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (18)}$$

Donde:

Y : NA	β_0 : 0,5171
X_2 : pH	β_4 : 0,3056
X_4 : temperatura	$\beta_{2,2}$: 0,6661
X_5 : cantidad de buffer agregado	$\beta_{4,5}$: -1,2768

Como se mencionó precedentemente, trabajar con modelos de diseño ortogonal redundada en expresiones más sencillas y, los coeficientes β_i resultan independientes entre sí.

Sin embargo, a partir del modelo normalizado se puede obtener el modelo calculado con variables reales y sus nuevos valores de β_i , donde aparecen términos adicionales y/o nuevas asociaciones entre las variables. Por ejemplo, la ecuación (18), expresada en variables normalizadas, se transforma en la ecuación (19) con variables y unidades reales:

$$Y = \beta_0 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{2,2} \cdot X_2^2 + \beta_4 \cdot X_4 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (19)}$$

Donde:

Y : NA (g/ml)	β_0 : 0,1
X_2 : pH	β_2 : -2,331
X_4 : temperatura (°C)	$\beta_{2,2}$: 0,167
X_5 : cantidad de buffer agregado (g / g de proteína)	β_4 : 0,1635
	β_5 : 0,38
	$\beta_{4,5}$: $-7,3 \times 10^{-3}$

Para los modelos sucesivos solo se presentará la ecuación con coeficientes normalizados para lograr mayor simplicidad en el análisis.

La Figura 1 muestra la superficie de respuesta de NA y la interacción entre la temperatura y la cantidad de buffer agregado según la ecuación (18), usando el software estadístico Statistica (Statsoft Inc.). Los círculos en la Figura 1 muestran los puntos experimentales sobre la superficie de respuesta. Cuando aparecen varios círculos en una misma ubicación de coordenadas (X_4 , X_5), éstos muestran la variabilidad de NA con el resto de las variables, en ese punto.

Altos valores de pH y temperatura, permitieron maximizar el grado de hidrólisis de las proteínas solubles del queso de cabra en el sobrenadante (NA), a la menor cantidad de buffer agregado (10 g de buffer/g de proteína). Sin embargo, a gran cantidad de buffer agregado (30 g de buffer/g de proteína) se produjo una disminución de NA con el aumento de la temperatura. Este efecto fue debido a la interacción negativa de ambas variables (ecuación 18).

Este comportamiento fue debido a que la enzima papaína es activa y estable hasta la temperatura de 80 °C y tiene un pH óptimo de 9 (Glazer y Smith, 1971; Kim et al. 2012), favoreciendo el proceso de hidrólisis de las proteínas solubles del hidrolizado en dichas condiciones operacionales. No obstante, la ecuación propuesta es válida sólo hasta el nivel superior del rango de pH experimentado, es decir pH 9 (Kimmel y Smith, 1954).

La Figura 2 muestra la correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de nitrógeno amínico libre (NA) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales. El error relativo porcentual se calculó según la ecuación (20):

$$\text{Error relativo \%} = \frac{(\text{Valor experimental} - \text{Valor calculado})}{\text{Valor experimental}} \times 100 \quad \text{ecuación (20)}$$

Los valores experimentales de NA mayores a 0,7 g/ml mostraron un máximo error relativo porcentual de aproximadamente $\pm 30\%$.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre el nitrógeno soluble total.

En la Tabla 11 se presentan las respuestas de nitrógeno soluble total (NT) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 11: Determinación de nitrógeno soluble total (NT, g/l). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
1	1	6	10	19
respuesta	4,17	4,12	3,19	5,32
replicado	4,03	4,03	3,42	5,50
2	2	28	25	11
respuesta	4,03	5,28	3,37	4,39
replicado	3,83	5,01	3,00	4,57
3	3	29	1	23
respuesta	4,70	3,72	5,04	5,54
replicado	5,04	3,55	4,70	5,32

4	4	30	16	15
respuesta	2,69	3,06	5,38	6,87
replicado	3,02	2,97	5,04	7,18
5	5	31	1	27
respuesta	4,53	2,69	4,57	4,03
replicado	4,30	2,55	4,37	3,70
6	7	18	14	26
respuesta	1,01	4,76	4,02	4,20
replicado	1,21	4,71	3,93	4,94
7	8	24	21	13
respuesta	3,70	3,00	3,63	3,36
replicado	3,90	3,28	3,76	3,49
8	9	22	12	17
respuesta	2,35	3,56	4,03	3,43
replicado	2,42	3,88	3,83	3,56
9	20			
respuesta	4,50			
replicado	4,44			

Según la Tabla 11, se obtuvieron valores máximos de 7,025 g/l para la muestra ID N° 15 y mínimos de 1,11 g/l para la muestra ID N° 7. Esto significa que la liberación de las proteínas solubles del queso de cabra al sobrenadante se incrementó hasta 278%, respecto del aislado proteico sin hidrolizar; es decir, como resultado de la optimización del proceso de hidrólisis.

El análisis estadístico del NT contenido en todos los hidrolizados estudiados dio resultados significativos de 1° orden para la relación E:S, pH y cantidad de buffer agregado, y para las interacciones de la cantidad de buffer agregado - temperatura y la relación E:S, según la ecuación (21).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{1,5} \cdot X_1 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (21)}$$

Donde:

Y: NT

X₁ : relación E:S

X₂ : pH

X₄ : temperatura

X₅ : cantidad de buffer agregado

β_0 : 3,9684

β_1 : 0,6912

β_2 : 0,6162

β_5 : - 0,9961

$\beta_{1,5}$: - 2,3322

$\beta_{4,5}$: 2,5061

Al eliminar la muestra ID N° 7 en el extremo del rango (menor relación E:S; 0,0055 mg de papaína/g de caseína) se elimina un término ($\beta_1 \cdot X_1$) en la ecuación (21), obteniéndose la ecuación (22).

$$Y = \beta_0 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{1,5} \cdot X_1 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (22)}$$

Donde:

Y: NT	β_0 : 4,0638
X_1 : relación E:S	β_2 : 0,6160
X_2 : pH	β_5 : - 0,9961
X_4 : temperatura	$\beta_{1,5}$: - 2,3322
X_5 : cantidad de buffer agregado	$\beta_{4,5}$: 2,5061

El signo (-) del coeficiente β_5 en las ecuaciones (21) y (22) indica que el aumento en la cantidad de buffer agregado disminuye la liberación de NT desde la matriz (queso semiduro de cabra) al sobrenadante, probablemente debido a un simple efecto de dilución. El efecto se acentúa aún más para valores altos de la relación E:S y valores bajos de temperatura, debido al efecto de las interacciones.

La Figura 3(a, b) muestra las superficies de respuesta de NT y las interacciones de la cantidad de buffer agregado con la relación E:S y la temperatura, según las ecuaciones (21) y (22), usando el software Statistica (Statsoft Inc).

Los valores máximos promedio de NT se obtuvieron a los más altos valores de pH (9) y a la más baja cantidad de buffer agregado (10 g de buffer/g de proteína). Este efecto fue más evidente a la más alta relación E:S (0,22 mg de papaína/g de caseína de queso) y a la más baja temperatura (35°C), debido a los efectos interactivos entre dichos factores.

Analizando las Figuras 1 y 3 (a) se observa que a bajo contenido de buffer agregado (10 g / g de proteína) y alta temperatura (70°C) se obtiene la mayor liberación de NA, a pesar de no haberse obtenido la concentración de NT máxima. Esto significa que en dicha condición se obtiene el máximo grado de hidrólisis de las proteínas solubilizadas en el sobrenadante (expresado como NA), pero no se obtuvo la máxima liberación de dichas proteínas del queso de cabra al sobrenadante.

Este fenómeno fue verificado por SDS-PAGE de los sobrenadantes de las muestras ID N° 27 e ID N° 15, en las cuales se obtuvieron valores máximos de NA y NT respectivamente (Figura 4).

Los Blancos de la muestra ID N° 15 mostraron una fuerte banda a 32 KDa que corresponde a la α S₂-caseína, la cual no fue hidrolizada en la muestra. Además, se produjeron componentes de alto peso molecular (péptidos y proteínas solubles), que fueron degradadas por la enzima en la muestra ID N°15.

En el Blanco de la muestra ID N°27 se observan varias bandas de 16, 18, 30 y 32 kDa las cuales corresponden a β caseína, β lactoalbúmina, α S₁- y α S₂-caseína, respectivamente (Pardo y Natalucci, 2002; Vairo Cavalli y col., 2008). Dichas bandas fueron hidrolizadas en la muestra ID N° 27.

Por otra parte, la relación E:S afectó la liberación de péptidos y proteínas del queso al sobrenadante pero no influyó sobre su posterior hidrólisis en fragmentos de menor peso molecular, como se desprende de las ecuaciones (18) y (21).

La Figura 5 muestra la correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de nitrógeno soluble total (NT) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales. El error relativo porcentual se calculó según la ecuación (20).

Los valores experimentales de NT mayores a 3 g/l mostraron un máximo error relativo porcentual de aproximadamente 20 %.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre la solubilidad.

En la Tabla 12 se presentan las respuestas del índice de solubilidad de proteínas (ISP) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 12: Determinación del índice de solubilidad de proteínas (ISP, %). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
1	1	6	10	19
respuesta	53,16	72,98	40,68	41,58
replicado	51,45	71,41	43,62	42,96
2	2	28	25	11
respuesta	51,45	93,39	43,03	34,30
replicado	48,88	88,68	38,32	35,69
3	3	29	1	23
respuesta	60,02	65,92	64,31	43,31
replicado	64,31	62,78	60,02	41,58
4	4	30	16	15
respuesta	34,30	54,15	68,60	53,70
replicado	38,59	52,58	64,31	56,13

Día	N° ID			
5	5	31	1	27
respuesta	57,77	34,30	58,31	51,45
replicado	54,82	32,58	55,74	47,16
6	7	18	14	26
respuesta	12,86	45,39	51,29	53,65
replicado	15,43	49,52	50,11	63,08
7	8	24	21	13
respuesta	47,16	38,32	46,30	42,87
replicado	49,73	41,86	48,02	44,59
8	9	22	12	17
respuesta	30,01	45,39	51,45	43,73
replicado	30,87	49,52	48,88	45,45
9	20			
respuesta	57,45			
replicado	56,59			

Según la Tabla 12, se obtuvieron valores máximos de 91% para la muestra ID N° 28 y mínimos de 14 % para la muestra ID N° 7. Es decir, la solubilidad de las proteínas (ISP) en los hidrolizados proteicos de queso de cabra aumentó 231 % con respecto a los aislados proteicos sin hidrolizar, como consecuencia de la optimización de los parámetros funcionales del proceso de hidrólisis.

El análisis estadístico de ISP de todos los hidrolizados estudiados dio resultados significativos de 1° orden solamente para la cantidad de buffer agregado, según la ecuación (23).

$$Y = \beta_0 + \beta_5 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (23)}$$

Donde:

Y: ISP β_0 : 50,35

X_5 : cantidad de buffer agregado β_5 : 11,67

En consecuencia, el aumento de la cantidad de buffer agregado incrementa la solubilidad de las proteínas de queso de cabra. Los otros factores no influyeron sobre la respuesta ISP.

Si se convierten los coeficientes escalados en coeficientes experimentales, para una apreciación del modelo en unidades reales del sistema, la relación se puede expresar:

$$Y = 27,02 + 1,167 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (24)}$$

Donde:

Y: ISP (%)

X_5 : cantidad de buffer agregado (g / g de proteína)

La Figura 6 muestra la correlación entre la cantidad de buffer agregado y los valores experimentales y predichos de ISP. La recta con los valores experimentales de ISP se obtuvo tomando un promedio con todas las combinaciones posibles de niveles sin fijar el resto de las variables (X_1 a X_4). La variabilidad de los valores calculados de ISP para la misma cantidad de buffer se debió a la combinación de niveles con el resto de las variables.

Este hecho plantea la primera situación de compromiso entre los parámetros analizados hasta el momento: NA, NT e ISP.

Relacionando los perfiles de las Figuras 1, 3 y 6 se observa que los mayores valores de NA y NT se obtienen a la menor cantidad de buffer agregado, pero en dicha condición se presenta el menor índice de solubilidad (ISP) de dichas proteínas. Este fenómeno se refleja en la buena correlación de la regresión entre el ISP y NT, presentado en la Figura 7.

Puesto que en la formulación de aditivos saborizantes se requieren péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos porque ellos aumentan el sabor y son más reactivos que las proteínas con otros componentes de los alimentos (Pires et al., 2013), se deberían seleccionar los menores valores de cantidad de buffer agregado dentro del rango estudiado.

Sin embargo, la cantidad de buffer agregado debe ser regulada según la solubilidad deseada en el producto final, ya que ésta puede verse afectada como previamente se mencionó.

La Figura 8 muestra la correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados del índice de solubilidad de proteínas (ISP) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según la ecuación (20). Los valores experimentales de ISP mayores de 35% presentan un error relativo porcentual máximo de ($\pm$) 40 %. En este caso puede notarse que el error relativo alcanza valores altos en los extremos del rango de las variables.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre la viscosidad.

En la Tabla 13 se presentan las respuestas de viscosidad (η) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 13: Determinación de la viscosidad (η , cP). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
1	1	6	10	19
respuesta	1,57	1,52	1,25	1,56
replicado	1,56	1,50	1,28	1,57
2	2	28	25	11

Día	N° ID			
respuesta	1,58	1,48	1,51	1,36
replicado	1,57	1,45	1,50	1,43
3	3	29	1	23
respuesta	1,53	1,49	1,57	1,55
replicado	1,56	1,49	1,56	1,51
4	4	30	16	15
respuesta	1,66	1,38	1,57	1,55
replicado	1,52	1,40	1,58	1,65
5	5	31	1	27
respuesta	1,71	1,38	1,73	1,75
replicado	1,69	1,39	1,57	1,73
6	7	18	14	26
respuesta	1,42	1,39	1,46	1,53
replicado	1,42	1,47	1,40	1,48
7	8	24	21	13
respuesta	1,45	1,58	1,49	1,50
replicado	1,40	1,62	1,49	1,47
8	9	22	12	17
Respuesta	1,45	1,40	1,56	1,57
Replicado	1,43	1,40	1,47	1,55
9	20			
Respuesta	1,56			
Replicado	1,53			

Según la Tabla 13, se obtuvieron valores máximos de 1,74 cP para la muestra ID N° 27 y mínimos de 1,265 cP para la muestra ID N° 10. Es decir, la viscosidad (η) en los hidrolizados proteicos de queso de cabra aumentó hasta 40 % con respecto a los aislados proteicos sin hidrolizar, como consecuencia de la optimización de los parámetros funcionales del proceso de hidrólisis.

El análisis estadístico de η en todos los hidrolizados estudiados dio resultados significativos de 1° orden para todos los factores involucrados en este diseño y la interacción entre la cantidad de buffer adicionado y la temperatura, según la ecuación (25).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_4 \cdot X_4 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (25)}$$

Donde:

Y: η	$\beta_0:$	1,5044
X_1 : relación E:S	$\beta_1:$	0,0812
X_2 : pH	$\beta_2:$	0,0710

X_3 : tiempo de hidrólisis	β_3 : 0,0425
X_4 : temperatura	β_4 : 0,1346
X_5 : cantidad de buffer agregado	β_5 : - 0,0762
	$\beta_{4,5}$: - 0,1133

La Figura 9 muestra la superficie de respuesta de η y la interacción entre la temperatura y la cantidad de buffer agregado, según la ecuación (25). El gráfico se obtuvo utilizando el software Statistica (Statsoft Inc.).

Los círculos en la Figura 9 muestran los puntos experimentales sobre la superficie de respuesta. La variabilidad de η en una misma posición de coordenadas X_4 , X_5 se debió a las diferentes combinaciones con el resto de las variables.

De acuerdo con la ecuación (25), η aumenta con el incremento de la temperatura, la relación E:S y el tiempo de hidrólisis; y con la disminución de la cantidad de buffer agregado. Entonces, máximos valores de η de 1,74 cP se obtuvieron a 70°C, 0,22 mg de papaína/g de caseína de queso, 270 min y 10 g de buffer/g de proteína.

Sin embargo, el incremento de η con la temperatura se compensó con el aumento de la cantidad de buffer agregado debido al efecto de la interacción negativa entre ambos factores, cuando los mismos son de similar magnitud (los coeficientes β_4 y β_5 son aproximadamente iguales pero de signo opuesto).

En concordancia con lo anterior, una importante disminución de η se observó cuando se agregó la máxima cantidad de buffer (30 g/g de proteína) a la máxima temperatura estudiada (70°C).

Según otros autores, la η de los hidrolizados proteicos siempre disminuye aunque los tratamientos enzimáticos hayan sido limitados (Lamsal et al, 2007). En contradicción con dichos resultados, la ecuación (25) predice un incremento de η con el aumento del grado de hidrólisis (NA y NT), el cual se observó a altos valores de pH y temperatura, y a baja cantidad de buffer agregado.

En efecto, de acuerdo con la Figura 9 se observó un agudo aumento de η con el aumento de la temperatura, a la más baja cantidad de buffer agregado (10 g/g de proteína).

Nosotros hipotetizamos que este comportamiento podría ser debido al hecho que los péptidos y aminoácidos liberados del queso de cabra al sobrenadante por hidrólisis enzimática se agregaran o bien que nuevos péptidos de mayor tamaño se formaran a partir de los fragmentos peptídicos previamente liberados al sobrenadante (síntesis catalizada por papaína), siendo ambos procesos (hidrólisis y síntesis) favorecidos por el aumento de la temperatura.

De acuerdo a la bibliografía, papaína tiene capacidad de catalizar en medios acuosos: - la escisión de uniones peptídicas (capacidad proteolítica) y, - la síntesis de nuevas uniones peptídicas (capacidad amidolítica) (Mitin y col., 1997; Barberis y col., 2008). La capacidad de las proteasas para catalizar la síntesis de nuevas uniones peptídicas ha sido demostrada por numerosos autores y dio origen a un área de intensa investigación y desarrollo sobre la síntesis de péptidos en medios no acuosos (Barberis y col., 2002; Illanes y col., 2009).

Intentando demostrar nuestra hipótesis, simulamos el comportamiento de la η con la temperatura para diferentes tipos de soluciones acuosas, según las ecuaciones (2 a 7).

El ajuste de los datos experimentales a los diferentes modelos previamente descriptos se muestra en la Figura 10 (a-d).

Los datos experimentales no ajustaron a los modelos previamente descriptos de η vs. temperatura para soluciones acuosas, puesto que en dichas soluciones η disminuye con el aumento de la temperatura.

La Figura 11 muestra la dependencia de los datos experimentales de η según el modelo teórico logarítmico de η para soluciones acuosas poliméricas con la temperatura. Según la bibliografía, dichas soluciones muestran un comportamiento lineal con pendiente positiva cuando se grafica el log de la viscosidad (cP) con la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), en el rango de 0 a 60 $^{\circ}\text{C}$ (<http://www.newton.dep.anl.gov/askasci/mats05025.htm>).

Los parámetros estadísticos del modelo de la Figura 10 muestran un mejor ajuste que los del modelo presentado en la Figura 11, lo que parece afirmar alguna de las hipótesis antes enunciadas.

En la Figura 11, los parámetros estadísticos r y r^2 mejoraron sensiblemente al promediar los valores experimentales para cada temperatura ($r^2 = 0,7303$, $r = 0,8546$, $p = 0,0143$).

La Figura 12 muestra la correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de la viscosidad (η) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según la ecuación (20). Los valores experimentales de η mostraron un buen ajuste al modelo y un error relativo porcentual máximo de $\pm 6\%$.

Para corroborar nuestra hipótesis y al mismo tiempo, definir si se forman agregados proteicos cuando aumenta la temperatura o se sintetizan nuevos polímeros a partir de los fragmentos obtenidos por hidrólisis, se analizaron los hidrolizados proteicos por FTIR y HPLC-EM.

Las condiciones operacionales seleccionadas para obtener los hidrolizados proteicos son aquellas que permitieron alcanzar la menor y la mayor viscosidad (señalados con círculos rojos en la Tabla 13). En ambos casos, se corrieron blancos preparados en idénticas condiciones que las muestras, pero sin enzima.

La Figura 13 muestra la deconvolución de la segunda derivada del espectro de FTIR de las muestras de hidrolizados proteicos de queso de cabra (N° ID: 10 y 27), previa sustracción de sus respectivos blancos sin papaína.

La posición de los diferentes componentes de la banda amida I de los hidrolizados proteicos de queso de cabra (Tabla 14), fue asignada en base a estudios bibliográficos llevados a cabo sobre numerosas proteínas (Dong y col., 1990, 1994, 1995; Huang y col., 1995; Barth, 2000).

Tabla 14: Posición de los diferentes componentes de la banda amida I.

Bandas	Frecuencia ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$)	Bandas	Frecuencia ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$)
Cadenas Laterales	1622	β -sheet	1698
	1615		1689
	1608		1635
β Turn	1683	α -helix	1659
	1669		
	1674		
Random	1653		
	1647		

La mayoría de las bandas de la muestra ID N° 27 mostró menos absorbancia que las de la muestra ID N° 10, excepto para las bandas de las cadenas laterales y las bandas β -sheet a elevados números de onda (Figura 13). La muestra ID N° 27 presenta absorbancias máximas a 1683 cm^{-1} y 1698 cm^{-1} que corresponden a estructuras β -turn y β -sheet, respectivamente. La disminución o incluso la desaparición de la banda β -sheet a 1689 cm^{-1} y la aparición de una banda β -sheet a mayores números de onda (1698 cm^{-1}) de la muestra ID N° 27 son indicativos de agregación proteica (Dong y col., 1995). Este hecho indica que el aumento de la viscosidad con la temperatura observado en la Figura 9 pudo ser debido a la agregación de las proteínas.

Además el aumento en el ancho y la desviación en la posición y en la absorbancia relativa de las bandas a 1683 y 1698 cm^{-1} son indicativos del desenrollamiento de una proteína (Dong y col., 1996).

El análisis de la segunda derivada permite analizar la semejanza entre dos espectros. Pretrelski y col. (1993) desarrollaron un proceso matemático para calcular el coeficiente de similitud espectral (similitud, r):

$$r = \frac{\sum xi \cdot yi}{\sqrt{\sum xi^2 \cdot \sum yi^2}} \quad \text{ecuación (26)}$$

Donde xi e yi son los valores de absorbancia del espectro de referencia y de la muestra respectivamente, a una posición de frecuencia i (cm^{-1}) en la banda amida I. Dicho valor de correlación es igual a 1 cuando no hay cambios conformacionales en la proteína.

Cuando hay grandes cambios conformacionales, las diferencias espectrales también son grandes por lo que el coeficiente r se hace pequeño. De esta manera, el coeficiente r para la relación entre los espectros de los hidrolizados proteicos de queso de cabra (muestras ID N° 10 y 27) es de 0,825; confirmando que hay cambios conformacionales de las proteínas de los hidrolizados en ambas condiciones. La muestra ID N° 10 presenta absorbancias máximas a 1653 cm^{-1} y 1659 cm^{-1} que corresponden a estructuras random y α -helix, respectivamente. Los componentes random (o desordenados) se definieron por medio de estudios de cristalografía de rayos X como aquellos componentes que no son α -helix, ni β -sheet, ni β -turn (Richardson, 1991; Dong y col., 1990).

Las áreas relativas de los componentes de la banda amida I de las proteínas de los hidrolizados proteicos de queso de cabra (muestras ID N° 10 e ID N° 27), se determinaron después de corregir la línea base de la segunda derivada del espectro infrarrojo original y se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Áreas relativas de los componentes de la banda amida I en el espectro infrarrojo de las proteínas de los hidrolizados de queso de cabra (ID N° 10 e ID N° 27).

Bandas	Frecuencia ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$)	Áreas relativas	
		ID N° 27	ID N° 10
β -sheet	1636 1689 1698	0,00197	0,00485
α -helix	1660	0,00058	0,00257
Random	1647 1653	0,0019	0,0048
β -turn	1669 1674 1683	0,00263	0,00383
Cadenas laterales	1622 1615 1608	0,00291	0,00078
Área total	(1600 – 1700)	$9,99 \cdot 10^{-3}$	0,01683

Comparando la relación de áreas β -sheet / α -helix de las muestras ID N° 27 e ID N° 10 se observó que dicha relación es de 3,396 para la primera y de 1,887 para la segunda. Una estructura secundaria de mayor carácter β -sheet (en hoja plegada) indica mayor presencia de uniones puente de hidrógeno intermoleculares y agregación proteica, lo cual justifica el incremento de la η para la muestra ID N° 27.

Es importante recordar que métodos tales como la espectrometría IR solo pueden determinar una conformación promedio del conjunto de proteínas de la muestra analizada, pero no puede medir el número de moléculas proteicas ni cada una de ellas como componentes individuales. Sin embargo, es evidente que las condiciones de hidrólisis influyeron sobre las fuerzas no covalentes (uniones puente de hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofóbicas y de Van der Waals) que mantienen la estructura secundaria de las proteínas solubles del queso de cabra y modificaron sus propiedades tecnofuncionales.

De este modo, se corrobora la hipótesis que la formación de agregados proteicos (en los hidrolizados de queso de cabra) conduce a un aumento de la viscosidad con la temperatura.

La Figura 14 muestra los cromatogramas obtenidos por HPLC de los hidrolizados de queso de cabra (N° ID: 10 y 27) y sus respectivos blancos sin papaína.

Se colectaron las fracciones que se supuso pueden corresponder a polímeros polipeptídicos obtenidos por síntesis catalizada por papaína –a partir de los péptidos y aminoácidos liberados previamente por hidrólisis- y se analizaron por EM, para dilucidar su estructura.

La Figura 15 muestra los espectros de masa (EM) de las fracciones con (t_R : 3 y 62,5 min de la muestra ID N° 27.

Para el pico con t_R : 3 min, las M/Z : 69, 77, 79, 91, 105, 107, 115, 119, 121, 129, 133, 135, 143, 149, 173, 178, 189, 191, 259, 273, 279, 283, 313, 325, 329, 353, 355 y 367; corresponden a fragmentos de un péptido formado por Ser-Asp-Tyr-Phe-Cys.

Para el pico con t_R : 62,5 min, las M/Z : 69, 70, 79, 81, 84, 91, 105, 117, 121, 145, 147, 163, 241, 313, 327, 353, 368, 369, 381 y 395; corresponden a fragmentos del pentapéptido Cys-Cys-Ser-Lys-Phe.

Sin embargo, la hipótesis que la formación de nuevos péptidos de mayor tamaño conducen a un aumento de la viscosidad de los hidrolizados proteicos de queso de cabra con el incremento de la temperatura no pudo ser verificada debido a la complejidad del análisis de los mismos.

Entonces, el comportamiento atípico de η en los hidrolizados proteicos de queso de cabra fue atribuido al incremento de los puentes de H intermoleculares de la estructura secundaria con más alto carácter β -sheet, también como a la agregación de las proteínas solubles en aquellas condiciones, como se demostró mediante los espectros de FTIR.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre el índice de la actividad emulsificante.

En la Tabla 16 se presentan las respuestas del índice de actividad emulsificante (IAE) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 16: Determinación del índice de actividad emulsificante (IAE, m^2 / g). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	Nº ID			
1	1	6	10	19
respuesta	84,94	143,55	119,63	138,77
replicado	90,80	140,65	108,87	132,08
2	2	28	25	11
respuesta	154,35	118,54	141,11	76,46
replicado	157,70	118,14	150,35	86,85
3	3	29	1	23
respuesta	187,43	162,20	142,85	77,62
replicado	171,30	170,31	132,95	80,86
4	4	30	16	15
respuesta	231,53	177,52	119,17	132,74
replicado	215,89	190,01	127,11	116,81
5	5	31	1	27
respuesta	74,12	171,38	136,86	143,00
replicado	81,65	173,23	134,80	158,48
6	7	18	14	26
respuesta	211,86	85,27	81,21	63,13
replicado	176,55	81,57	86,23	69,74
7	8	24	21	13
respuesta	93,27	126,99	158,05	72,64
replicado	90,01	120,91	149,97	117,86
8	9	22	12	17
respuesta	214,02	112,34	163,43	189,60
replicado	203,03	98,26	172,03	180,73
9	20			
respuesta	133,48			
replicado	131,38			

Según la Tabla 16, se obtuvieron valores máximos de 223,71 m²/g para la muestra ID N° 4 y mínimos de 66,43 m²/g para la muestra ID N° 26. Esto significa que el IAE en los hidrolizados proteicos de queso de cabra aumentó hasta 225 % con respecto a los aislados proteicos sin hidrolizar, como consecuencia de la optimización de los parámetros funcionales del proceso de hidrólisis proteica.

Del análisis estadístico del IAE en todos los hidrolizados estudiados se obtuvieron resultados significativos de 1° orden para la interacción de la relación E:S y el tiempo de hidrólisis, según la ecuación (27).

$$Y = \beta_0 + \beta_{1,3} \cdot X_1 \cdot X_3 \quad \text{ecuación (27)}$$

Donde:

Y: IAE

β_0 : 134,01

X_1 : relación E:S

$\beta_{1,3}$: 106,64

X_3 : tiempo de hidrólisis

La Figura 16 muestra la superficie de respuesta del IAE y la interacción entre la relación E:S y el tiempo de hidrólisis, según la ecuación (27), usando el software Statistica (Statsoft Inc.).

El índice de actividad emulsificante (IAE) aumentó significativamente con el aumento del tiempo de hidrólisis y la relación E:S.

Es probable que el aumento en el tiempo de hidrólisis promueva la difusión de los péptidos y la interacción péptido-lípido, favoreciendo el anclaje de las moléculas péptidicas en la interfase agua-aceite y el incremento del IAE. A baja concentración de proteínas, la absorción de las proteínas en la interfase agua-aceite presenta un control cinético de difusión y depende del tiempo hasta que se alcanza el estado estacionario (Agyare et al., 2009; Seki et al., 2013).

Además, los mayores valores de la relación E:S han aumentado la viscosidad (η) y disminuido la hidrofobicidad superficial (S_o). Entonces, η y S_o podrían haber influido sobre el IAE de los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

En general, el aumento del grado de hidrólisis de las proteínas ha modificado las propiedades emulsificantes de los subproductos de gluten de trigo, arroz y soja (Agyare y col., 2009; Li y col., 2013; Surowka y col., 2004).

Sin embargo, este tipo de comportamiento no ha sido observado en este trabajo y las correlaciones entre NA, NT e IAE no se pudieron verificar. Esto significa que ni la concentración de proteínas solubles (NT) liberadas al sobrenadante desde la matriz del queso semiduro de cabra, ni el acortamiento de las proteínas solubles en el sobrenadante (NA) han afectado el IAE en las condiciones estudiadas.

La Figura 17 muestra la correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados del índice de actividad emulsificante (IAE) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según la ecuación (20). Los valores experimentales mayores a 90 m²/g mostraron un error relativo porcentual máximo de $\pm 30\%$.

El error general del sistema se estimó repitiendo varias medidas en el centro del diseño (o sea, la media de los rangos de todas las variables) (datos no mostrados).

El error para cada modelo (Se) se calculó según la ecuación (28).

$$Se (\%) = \frac{Se}{\bar{X}} \cdot 100 \quad \text{ecuación (28)}$$

Donde:

Se (%): Error para cada modelo en el centro del diseño.

$\bar{X}$: media de todos los valores de cada respuesta.

En este caso (IAE), $Se (\%) = 28$

En la ecuación (20) el error no es promediado con el número de grados de libertad como en Se y por lo tanto, los valores que se obtienen son mayores. Sin embargo, los dos puntos inferiores del lado derecho de la línea roja caen aproximadamente en 28.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre el índice de la estabilidad de la emulsión.

En la Tabla 17 se presentan las respuestas del índice de estabilidad de la emulsión (IEE) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 17: Determinación del índice de estabilidad de la emulsión (IEE, min). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
	1	6	10	19
respuesta	70,30	40,42	44,64	63,68
replicado	68,57	38,35	46,04	61,03
2	2	28	25	11

Día	N° ID			
respuesta	58,29	39,81	57,78	55,00
replicado	50,77	40,84	62,98	56,52
3	3	29	1	23
respuesta	37,05	34,74	71,52	74,21
replicado	30,76	37,36	74,55	72,31
4	4	30	16	15
respuesta	40,40	29,18	40,00	52,00
replicado	41,15	30,08	45,16	56,70
5	5	31	1	27
respuesta	42,31	43,77	68,33	50,40
replicado	46,00	44,62	75,69	46,83
6	7	18	14	26
respuesta	47,76	43,61	85,60	51,18
replicado	43,13	45,82	85,38	55,12
7	8	24	21	13
respuesta	37,05	78,13	37,23	41,03
replicado	41,82	66,67	36,63	42,19
8	9	22	12	17
respuesta	49,25	79,39	46,45	72,20
replicado	40,76	48,08	47,47	68,06
9	20			
respuesta	28,14			
replicado	26,53			

Según la Tabla 17, se obtuvieron valores máximos de 85,49 min para la muestra ID N° 14 y mínimos de 27,34 min para la muestra ID N° 20. Esto significa que el IEE en los hidrolizados proteicos de queso de cabra aumentó hasta 210 % con respecto a los aislados proteicos sin hidrolizar, como consecuencia de la optimización de los parámetros funcionales del proceso de hidrólisis proteica.

Del análisis estadístico del IEE en todos los hidrolizados estudiados se obtuvieron resultados significativos de 1° orden para la cantidad de buffer agregado y la interacción entre la relación E:S y la temperatura, y de 2° orden para el pH, según la ecuación (29).

$$Y = \beta_0 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{1,4} \cdot X_1 \cdot X_4 + \beta_{2,2} \cdot X_2^2 \quad \text{ecuación (29)}$$

Donde:

Y: IEE

β_0 : 52,5

X_2 : pH

β_5 : -13,5

X_1 : relación E:S

$\beta_{1,4}$: -41,5

X_4 : temperatura

$\beta_{2,2}$: -13,3

X_5 : cantidad de buffer agregado

La Figura 18 muestra la superficie de respuesta del IEE y la interacción entre la relación E:S y la temperatura, según la ecuación 29, usando el software Statistica (Statsoft Inc.).

Máximos valores del IEE se alcanzaron en dos condiciones:

- a altas temperaturas (60 a 70°C) y con la mínima concentración de enzima;
- a bajas temperaturas (35 a 40°C) y con la máxima concentración de enzima.

Según la ecuación (29) el IEE disminuye con el aumento del pH debido al alto grado de hidrólisis de las proteínas solubles (NA) obtenido en estas condiciones.

En consecuencia, el excesivo acortamiento de las proteínas solubles del queso de cabra causó una disminución del IEE, lo cual fue observado por otros autores para hidrolizados de gluten (Lam y Nickerson, 2013).

Probablemente, estas condiciones hayan disminuido el IEE debido al aumento de la repulsión electrostática entre las capas de los péptidos absorbidos en la superficie de la gota de aceite, limitando la estabilización por repulsión estérica de los polipéptidos de alto peso molecular. Según Damodaran (2005), la repulsión estérica entre los polipéptidos evita el contacto directo entre las gotas de aceite, impidiendo la floculación y la coalescencia.

Por otra parte, el aumento en la cantidad de buffer agregado disminuyó la concentración de nitrógeno total (NT), aumentó el índice de solubilidad de las proteínas (ISP) y disminuyó la viscosidad (η) de los hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra. No obstante, la dependencia entre la solubilidad (ISP) y el índice de estabilidad de la emulsión (IEE), observada por otros autores, no fue verificada en este trabajo (Luo y col., 2014).

La Figura 19 muestra el error relativo porcentual de los valores calculados del índice de estabilidad de la emulsión (IEE) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según la ecuación (20).

Los valores experimentales de IEE mayores a 30 min mostraron un buen ajuste al modelo en casi todo el rango de la variable y se obtuvo un error relativo porcentual máximo de aproximadamente $\pm 30\%$.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre la capacidad espumante.

En la Tabla 18 se presentan las respuestas de la capacidad espumante (FC) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tablas 18: Determinación de la capacidad espumante (FC). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	Nº ID			
1	1	6	10	19
respuesta	0,44	0,03	0,03	0,52
replicado	0,42	0,03	0,02	0,47
2	2	28	25	11
respuesta	0,32	0,31	0,06	0,05
replicado	0,85	0,32	0,02	0,06
3	3	29	1	23
respuesta	0,21	0,10	0,43	0,38
replicado	0,20	0,06	0,38	0,40
4	4	30	16	15
respuesta	0,26	0,04	0,26	0,49
replicado	0,57	0,03	0,21	0,45
5	5	31	1	27
respuesta	0,45	0,03	0,42	0,03
replicado	0,42	0,02	0,40	0,05
6	7	18	14	26
respuesta	0,29	0,40	0,33	0,05
replicado	0,27	0,26	0,31	0,04
7	8	24	21	13
respuesta	0,65	0,08	0,03	0,68
replicado	0,66	0,03	0,04	0,66
8	9	22	12	17
respuesta	0,25	0,03	0,43	0,50
replicado	0,23	0,03	0,41	0,52
9	20			
respuesta	0,53			
replicado	0,56			

Según la Tabla 18, se obtuvieron valores máximos de 0,65 – 0,68 para las muestras ID Nº 8 y 13 y mínimos de 0,03 para varias muestras. Estos valores de FC para los hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra son notablemente inferiores a los informados en la literatura para otros hidrolizados proteicos. Así, por ejemplo, Surowka y col (2004) consideraron que valores de FC de 11 a 18 son aceptables para hidrolizados de proteínas de soja.

Esto indica claramente que, en general, el aumento del grado de hidrólisis no favorece la capacidad espumante de los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

Varios autores observaron que la solubilidad (ISP) y la capacidad espumante (FC) de los hidrolizados proteicos de suero y de soja aumentaron significativamente con el tiempo de hidrólisis y con la relación E:S, pero este efecto no fue observado en este trabajo.

Además, se sabe que el pH modifica la carga neta de las proteínas, la cual usualmente afecta no solo la formación de espuma sino también las propiedades viscoelásticas del film (Drago y González, 2000). Sin embargo, no se observó ningún efecto del pH sobre la FC de los hidrolizados proteicos del queso de cabra, bajo las condiciones estudiadas.

Es evidente que cierta estructura proteica se debe mantener para obtener buena capacidad espumante y que la ruptura de las cadenas polipeptídicas disminuye la FC.

A pesar de las bajas concentraciones usadas de papaína en este diseño experimental (DOE), es probable que la amplia especificidad de esta enzima proteolítica haya destruido excesivamente la estructura proteica del queso.

Es también evidente que la FC de las proteínas hidrolizadas depende de la especificidad de las enzimas proteolíticas usadas, de la naturaleza físico-química de dichas proteínas y de las condiciones experimentales de la proteólisis.

El análisis estadístico de FC no mostró ninguna relación significativa con los factores estudiados (Figura 20).

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre la estabilidad de la espuma.

En la Tabla 19 se presentan las respuestas del índice de estabilidad de la espuma (FS) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 19: Determinación de la estabilidad de la espuma (FS, seg/ml). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
1	1	6	10	19
respuesta	1,11	0,06	0,16	0,96
replicado	1,04	0,25	0,12	1,15
2	2	28	25	11
respuesta	1,27	0,50	0,56	0,71
replicado	1,18	0,54	0,55	0,73
3	3	29	1	23
respuesta	1,27	0,25	1,06	0,86
replicado	1,29	0,25	1,08	0,80
4	4	30	16	15
respuesta	0,26	0,15	1,24	1,20
replicado	0,35	0,13	1,27	1,21
5	5	31	1	27
respuesta	0,70	0,27	1,06	0,26
replicado	0,78	0,25	1,03	0,58
6	7	18	14	26

Día	N° ID			
respuesta	0,34	0,49	0,71	0,70
replicado	0,40	0,40	0,65	0,78
7	8	24	21	13
respuesta	1,48	0,44	0,08	1,53
replicado	0,84	0,43	0,13	1,49
8	9	22	12	17
respuesta	1,55	0,19	0,65	0,60
replicado	1,42	0,17	0,67	0,58
9	20			
respuesta	0,28			
replicado	0,30			

Según la Tabla 19, se obtuvieron valores máximos promedio de FS de $1,48 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para la muestra ID N° 9 y mínimos de $0,1 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en varias muestras.

El análisis estadístico de FS en todos los hidrolizados estudiados dio resultados significativos de 1° orden para el tiempo de hidrólisis, según la ecuación (30):

$$Y = \beta_0 + \beta_3 \cdot X_3 \quad \text{ecuación (30)}$$

Donde:

$$Y : \text{FS} \quad \beta_0: \quad 0,756$$

$$X_3 : \text{tiempo de hidrólisis} \quad \beta_3: \quad -0,500$$

Este modelo en unidades reales sería:

$$Y = 1,38 - 0,00416 \cdot X_3 \quad \text{ecuación (31)}$$

La ecuación (30) indica que el aumento del tiempo de hidrólisis provoca una disminución de FS. Este efecto fue debido al drenaje gravitacional y a la coalescencia de las burbujas. La coalescencia ocurre porque el líquido drena desde el film (lamella) mientras dos burbujas de gas se aproximan, conduciendo al debilitamiento del film y a su ruptura (Damodarán, 2005; Palazolo, 2005).

La adición de NaCl disminuye la velocidad de drenaje gravitacional y mejora la estabilidad de la espuma de los aislados proteicos de soja. Sin embargo, la fuerza iónica es un factor que no fue incluido en este diseño experimental DOE (Agyare y col., 2009).

Otros autores informaron que la estabilidad de la espuma de los hidrolizados proteicos de suero de quesería y de soja decreció con el aumento del grado de hidrólisis (Calderón de la Barca y col., 2000; Lieske y Konrad, 1990).

En las condiciones estudiadas en este trabajo, se advirtió que independientemente del grado de hidrólisis de las proteínas del queso de cabra la estabilidad de la espuma fue excesivamente baja en las condiciones estudiadas en este trabajo.

La Figura 21 muestra el efecto del tiempo de hidrólisis sobre FS de los hidrolizados proteicos de queso de cabra, después de aplicar un modelo de cálculo lineal.

La Figura 22 muestra la correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de la estabilidad de la espuma (FS) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según la ecuación (20).

Valores experimentales de Fs mayores a $0,6 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ mostraron un máximo error relativo porcentual de aproximadamente $\pm 50\%$. Es probable que otros factores no considerados en este modelo permitan modelar mejor esta respuesta.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre la retención de agua.

En la Tabla 20 se presentan las respuestas de la capacidad de retención de agua (WHC) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 20: Determinación de capacidad de retención de agua (WHC, g H₂O / g de residuo).
Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
1	1	6	10	19
respuesta	1,53	2,28	1,21	1,03
replicado	1,55	2,23	1,19	1,03
2	2	28	25	11
respuesta	2,73	2,45	0,76	0,98
replicado	2,21	2,23	0,89	0,98
3	3	29	1	23
respuesta	2,68	2,23	1,52	0,93
replicado	3,48	2,26	1,56	0,92
4	4	30	16	15
respuesta	1,16	2,33	1,60	0,89
replicado	1,16	2,29	1,52	0,88
5	5	31	1	27
respuesta	1,67	1,02	1,47	1,85
replicado	1,75	1,04	1,55	1,72
6	7	18	14	26
respuesta	0,97	1,36	1,38	1,47
replicado	1,26	1,35	1,06	1,27
7	8	24	21	13
respuesta	1,02	1,12	0,80	1,11
replicado	1,02	1,11	0,89	1,10

Día	N° ID			
	9	22	12	17
respuesta	0,56	1,42	1,60	1,60
replicado	0,54	1,46	1,67	1,62
9	20			
respuesta	0,72			
replicado	0,72			

Según la Tabla 20, se obtuvieron valores máximos promedio de 3,08 g de agua/ g de pellet seco para la muestra ID N° 3 y mínimos de 0,55 g de agua/ g de pellet para la muestra ID N° 9.

El análisis estadístico de WHC (capacidad de retención de agua) dio resultados significativos de 1° orden para la relación E:S, el pH y la cantidad de buffer agregado, según la ecuación (32):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_5 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (32)}$$

Donde:

Y : WHC	β_0 : 1,4325
X_1 : relación E:S	β_1 : 0,5221
X_2 : pH	β_2 : 0,4556
X_5 : cantidad de buffer agregado	β_5 : 0,5905

Como resultado de la optimización del proceso de hidrólisis proteica, se obtuvo un incremento de 450 % en WHC, con respecto al aislado proteico sin hidrolizar. Las condiciones que permitieron maximizar WHC fueron altos pH (9), relación E:S (0,22 mg de papaína / g de proteína) y cantidad de buffer agregado (30 g de buffer / g de proteína).

La Figura 23 (a-c) muestra la dependencia de la capacidad de retención de agua (WHC) con el pH, la relación E:S y la cantidad de buffer agregado.

Además, WHC de los hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra mostró una buena correlación con el índice de solubilidad de proteínas (ISP) debido a que ambas respuestas mostraron dependencia con la cantidad de buffer agregado (Figura 24).

Según otros autores, el aumento del grado de hidrólisis (expresado como NA y NT en este trabajo) de las proteínas de soja disminuyó WHC; mientras que dicha respuesta aumentó con el incremento del grado de hidrólisis de las proteínas de pescado (Surowka et al. 2004, Pires et al., 2013). Sin embargo, tal relación no fue observada en este trabajo, dentro del rango estudiado.

Según otros informes bibliográficos las propiedades reológicas de los hidrolizados proteicos correlacionan bien con su WHC (Sorgentini, y col., 1995; Urbanski, y col, 1982; Yao, y col, 1988). En este caso, la viscosidad de los hidrolizados de queso de cabra, no estuvo correlacionada con su capacidad de retención de agua.

La Figura 25 muestra la correlación entre el error relativo porcentual (%) de los valores calculados de la capacidad de retención de agua (WHC) versus los valores experimentales, según la ecuación (20). Los valores experimentales de WHC mayores a 1,2 g de H₂O/g de residuo seco mostraron un máximo error relativo porcentual de aproximadamente $\pm 40\%$.

En la Tabla 21 se presentan las respuestas del porcentaje de agua retenida (HW) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 21: Determinación de agua retenida (HW, %). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
1	1	6	10	19
respuesta	15,70%	29,35%	16,92%	15,83%
replicado	15,69%	25,27%	16,86%	16,28%
2	2	28	25	11
respuesta	18,12%	27,19%	13,74%	21,66%
replicado	17,24%	27,47%	14,68%	19,63%
3	3	29	1	23
respuesta	17,94%	27,17%	15,27%	12,48%
replicado	16,78%	27,04%	15,48%	13,12%
4	4	30	16	15
respuesta	10,23%	25,39%	15,53%	16,60%
replicado	11,72%	27,63%	15,17%	16,74%
5	5	31	1	27
respuesta	20,18%	10,11%	15,14%	12,04%
replicado	20,70%	10,75%	15,02%	12,17%
6	7	18	14	26
respuesta	12,94%	12,89%	13,92%	14,05%
replicado	13,71%	13,00%	14,93%	13,31%
7	8	24	21	13
respuesta	13,01%	15,33%	12,38%	13,58%
replicado	13,08%	15,42%	12,24%	13,36%
8	9	22	12	17
respuesta	11,57%	14,15%	15,64%	15,37%
replicado	11,05%	15,08%	15,79%	15,12%
9	20			
respuesta	9,38%			
replicado	9,30%			

Según la Tabla 21, los máximos valores de HW fueron de 27% para las muestras ID N° 6, 28 y 29, mientras los valores mínimos fueron de 9,34 % para la muestra ID N° 20.

El análisis estadístico de la respuesta HW (agua retenida) dio resultados significativos de 1° orden para la cantidad de buffer agregado y para la interacción de la temperatura y la cantidad de buffer agregado; y de 2° orden para la cantidad de buffer agregado, según la ecuación (33):

$$Y = \beta_0 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 X_5 + \beta_{5,5} \cdot X_5^2 \quad \text{ecuación (33)}$$

Donde:

Y : HW	β_0 :	0,144
X_4 : temperatura	β_5 :	0,052
X_5 : cantidad de buffer agregado	$\beta_{4,5}$:	0,172
	$\beta_{5,5}$:	0,087

La Figura 26 muestra la superficie de respuesta de HW y la interacción entre la cantidad de buffer agregado y la temperatura según la ecuación (33), usando el software Statistica (Statsoft Inc.)

Los máximos valores promedio de 27 % para HW se alcanzaron a las máximas temperatura (70 °C) y cantidad de buffer agregado (30 g /g de proteína), dentro del rango estudiado.

Por otra parte, HW de los hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra mostró una buena correlación con el índice de solubilidad de proteínas (ISP) porque ambas respuestas tuvieron una fuerte dependencia con la cantidad de buffer agregado (Figura 27).

La Figura 28 muestra la correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de agua retenida (HW) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según la ecuación (20).

Los valores experimentales de HW mostraron un buen ajuste al modelo en todo el rango de la variable y se obtuvo un error relativo porcentual máximo de $\pm 30\%$.

Efecto de la hidrólisis de las proteínas casearias sobre la hidrofobicidad superficial.

En la Tabla 22 se presentan las respuestas de hidrofobicidad superficial (So) obtenidas aplicando el diseño estadístico experimental esquematizado en las Tablas 6 y 8.

Tabla 22: Determinación de la hidrofobicidad superficial (So, Intensidad de fluorescencia (IF) / mg de proteína /ml). Diseño estadístico Doehlert. Bloque de experiencias para cada día.

Día	N° ID			
1	1	6	10	19
respuesta	5,05	1,56	5,91	7,20
replicado	5,39	1,72	5,75	7,10
2	2	28	25	11
respuesta	5,20	3,83	2,35	7,77
replicado	5,37	4,08	2,24	7,03
3	3	29	1	23
respuesta	3,30	0,99	4,96	8,83
replicado	3,27	0,92	5,16	8,80
4	4	30	16	15
respuesta	8,78	2,69	11,41	3,99
replicado	8,74	2,69	11,61	4,19
5	5	31	1	27
respuesta	2,44	2,79	5,05	3,61
replicado	2,32	2,49	5,66	3,59
6	7	18	14	26
respuesta	15,88	3,07	2,04	10,90
replicado	15,41	3,35	2,05	10,74
7	8	24	21	13
respuesta	8,39	10,64	7,11	3,87
replicado	9,52	10,39	7,99	3,69
8	9	22	12	17
respuesta	8,39	7,67	1,62	2,98
replicado	8,42	7,38	1,58	2,86
9	20			
respuesta	6,50			
replicado	6,17			

Según la Tabla 22, el máximo valor promedio de So fue de 15,64 IF/(mg de proteína/ml) y se logró en la muestra ID N° 7, mientras el mínimo valor de 0,95 IF/(mg de proteína/ml) se alcanzó en la muestra ID N° 29.

Esto significa que So disminuyó hasta 94% respecto del aislado proteico sin hidrolizar, como resultado de la optimización del proceso de hidrólisis proteica.

El análisis estadístico de So (hidrofobicidad superficial) dio resultados significativos de 1° orden para la relación E:S, la cantidad de buffer agregado y la interacción entre el tiempo de hidrólisis y la temperatura, según la ecuación (34):

La ecuación (34) es para el modelo escalado (adimensional).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{3,4} \cdot X_3 \cdot X_4 \quad \text{ecuación (34)}$$

Donde:

Y : So	β_0 : 4,53
X ₁ : relación E:S	β_1 : -4,67
X ₃ : tiempo de hidrólisis	β_5 : -2,47
X ₄ : temperatura	$\beta_{3,4}$: -7,61
X ₅ : cantidad de buffer agregado	

La ecuación (35) corresponde al modelo con valores reales de los factores experimentales obtenido para la hidrofobicidad superficial (So).

$$Y = -3,954 - 43,56 \cdot X_1 + 0,123 \cdot X_3 + 0,349 \cdot X_4 - 0,191 \cdot X_5 - 2,34 \times 10^{-3} \cdot X_3 \cdot X_4$$

ecuación (35)

Donde:

Y= So (IF/mg de proteína/ml)
X ₁ : relación E:S (mg de papaína / g de caseína)
X ₃ : tiempo de hidrólisis (min)
X ₄ : temperatura (°C)
X ₅ : cantidad de buffer agregado (g/g de proteína)

La Figura 29 muestra la superficie de respuesta de So y la interacción entre el tiempo de hidrólisis y la temperatura, según la ecuación (34), usando el software Statistica (Statsoft Inc.).

Es importante destacar que los menores valores de So son los más deseables, ya que este parámetro es un indicador de la presencia de péptidos amargos en los hidrolizados proteicos.

Según las ecuaciones (34) y (35) y la Figura 29, los más altos valores estudiados de temperaturas (70°C), tiempo de hidrólisis (270 min), relación E:S (0,22 mg de papaína/g de caseína de queso) y cantidad de buffer agregado (30 g de buffer/g de proteína), permitieron optimizar este parámetro (So) y obtener el mínimo de 0,95 IF/(mg de proteína/ml).

Sin embargo, también existe un área de mínimo So a los menores valores de temperatura (35°C) y tiempo de hidrólisis (30 min), debido a los efectos interactivos de dichos factores (Figura 29).

De acuerdo con la bibliografía, So se correlaciona con el grado de hidrólisis (NA y NT), la solubilidad (ISP) y el índice de actividad emulsificante (IAE) de los hidrolizados pro-

teicos. Sin embargo, ninguna correlación se observó entre dichas respuestas en este estudio (Calderón de la Barca y col., 2000; Mahmoud y col., 1992; Qi, 1997; Wagner y Añón, 1990; Li-Chan y col. 2006).

La Figura 30 muestra la correlación entre el error relativo porcentual de los valores calculados de la hidrofobicidad superficial (So) de los hidrolizados proteicos de queso de cabra versus los valores experimentales, según la ecuación (20).

Valores experimentales de So mayores a 4 IF/(mg de proteína/ml) tienen un error relativo porcentual máximo de aproximadamente $\pm 40\%$ en los bordes del diseño experimental.

Diseño de aditivos con propiedades funcionales a medida, en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra

A continuación se presenta un análisis cualitativo de las propiedades funcionales deseables para diseñar cuatro aditivos saborizantes en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra *con propiedades funcionales a medida*, para ser incorporados a diferentes sistemas alimentarios. A saber: -aditivo para salsas y sopas, - ingrediente para mousse de queso, -aditivo para productos de panificación y - acelerador de la maduración de otros quesos duros.

Aditivo para Sopas y Salsas:

Cuando se diseña un *hidrolizado proteico de queso con propiedades funcionales a medida* para ser utilizado como aditivo de sopas y salsas, se pretende que el mismo presente:

- Potenciado sabor a queso: alta concentración de nitrógeno amínico (NA) y alta concentración de nitrógeno proteico soluble (NT).
- Alta viscosidad (η), para que aumente la consistencia y mejore la textura del alimento a ser incorporado.
- Buena solubilidad (ISP) y alta actividad emulsificante (IAE) al mezclarse con el resto de los ingredientes.
- Baja capacidad de formar espuma (FC) y si se forma que su estabilidad sea baja (FS) al mezclarse con el resto de los componentes.
- Buena capacidad de retener agua (WHC).
- Baja hidrofobicidad superficial (So), debe ser compatible con sistemas alimentarios acuosos y además, esta propiedad está vinculada con la producción de péptidos amargos no deseables.

Se subrayaron aquellas propiedades funcionales que se consideraron más relevantes para la producción de un aditivo para salsas y sopas.

Para lograr los objetivos anteriormente citados, se realizó un análisis cuantitativo de la incidencia de los factores estudiados: pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis; sobre cada respuesta funcional individual, a partir de los modelos obtenidos.

La Tabla 23 resume las respuestas funcionales deseadas para el diseño de un aditivo a ser utilizado en salsa y sopas, en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra, y la variación de los factores para lograr dichos parámetros funcionales, según lo predicho por las ecuaciones obtenidas del análisis estadístico y quimiométrico de los resultados experimentales.

En la primera fila de la Tabla 23 se muestran las respuestas funcionales esperadas para el diseño de un aditivo para salsas y sopas en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra; y el sentido de las flechas indica sus valores deseables (altos o bajos). En las filas 2° a 6° de la Tabla 23 se presentan los valores (altos o bajos) que deben tomar los factores para lograr las respuestas funcionales deseadas (de la 1° fila).

Tabla 23: Respuestas funcionales esperadas para el diseño de un aditivo a medida de salsas y sopas en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra. Variación de los factores (pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis) para lograr los parámetros funcionales deseados.

SALSAS Y SOPAS	↑ NA	↑ NT	↑ ISP	↑ η	↑ IAE	↑ IEE	↓ FS	↑ WHC	↓ So	Conclusión
pH	↑	↑	---	↑	---	↓	---	↑	---	↑ pH
Temperatura	↑	↓	---	↑	---	↓	---	---	↑	↑ Temperatura
Cantidad de buffer agregado	↓	↓	↑	↓	---	↓	---	↑	↑	Moderada cantidad de buffer
Relación E:S	---	↑	---	↑	↑	↑	---	↑	↑	↑ Relación E:S
Tiempo de hidrólisis	---	---	---	↑	↑	—	↑	---	↑	↑ Tiempo de hidrólisis

Altos valores de pH contribuyeron a lograr las propiedades funcionales deseadas para el diseño de un aditivo funcional a medida para salsas y sopas, en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra. Sin embargo, tal condición afectó la estabilidad de la emulsión, pero este parámetro no está dentro de los de mayor contribución (peso) para este sistema alimentario (sopas y salsas). Entonces se recomienda usar altos ($\uparrow$) pH.

Siguiendo el mismo razonamiento, la temperatura debería ser establecida en un valor alto, ya que de esa forma se obtiene alto NA (potencia el sabor), alta η y baja So (menor concentración de péptidos amargos). No obstante, altas temperaturas no favorecieron la producción de NT ni el IEE, pero estos parámetros no están dentro de los de mayor contribución (peso) para este sistema alimentario (sopas y salsas). Entonces, se recomienda usar altas ($\uparrow$) temperaturas.

La cantidad de buffer a agregar para producir el hidrolizado proteico de queso de cabra con propiedades funcionales a medida para ser incorporado como aditivo de salsas y sopas, plantea una verdadera situación de compromiso puesto que una baja cantidad de buffer favorece la liberación de NA y NT, y aumentan η , pero aumenta también So (o sea, la producción de péptidos amargos). Al mismo tiempo, se observa que en tales condiciones ISP (solubilidad) y WHC (capacidad de retener agua) disminuyen. Entonces, se recomienda utilizar moderada cantidad de buffer agregado.

La relación E:S debería ser establecida dentro de los máximos valores estudiados, puesto que favorece la liberación de NT, aumenta η , y disminuye So; así como también aumenta IAE, IEE y WHC. Entonces, se recomienda establecer la máxima relación ($\uparrow$) E:S estudiada.

El tiempo de hidrólisis debería ser fijado dentro de los máximos valores estudiados, puesto que aumenta η y IAE; y disminuye So y FS. Entonces, se recomienda establecer máximos ($\uparrow$) tiempos de hidrólisis.

Mousse de queso:

Cuando se diseña un *hidrolizado proteico de queso con propiedades funcionales a medida* para ser utilizado como ingrediente en la preparación de mousse de queso, se pretende que el mismo presente:

- Potenciado sabor a queso: alta concentración de nitrógeno amínico (NA) y alta concentración de nitrógeno proteico soluble (NT).
- Baja viscosidad (η) para que disminuya la consistencia.
- Buena solubilidad (ISP) y alta actividad emulsificante (IAE) al mezclarse con el resto de los ingredientes.
- Alta capacidad de formar espuma y de mantenerse estable (FC y FS).
- Buena capacidad de retener agua (WHC).
- Baja hidrofobicidad superficial (So) compatible con sistemas alimentarios acuosos y además, esta propiedad está vinculada con la producción de péptidos amargos no deseables.

Se subrayaron las propiedades funcionales que se consideraron más importantes para la producción de un aditivo para mousse de queso.

Para lograr los objetivos anteriormente citados, se realizó un análisis cualitativo de la incidencia de los factores estudiados: pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis, sobre cada respuesta funcional individual, a partir de los modelos obtenidos.

La Tabla 24 resume las respuestas funcionales deseadas para el diseño de un aditivo (ingrediente) con propiedades funcionales a medida para preparar mousse de queso en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra y la variación de los factores para lograr dichos parámetros funcionales, según lo predicho por las ecuaciones obtenidas del análisis estadístico y quimiométrico.

En la primera fila de la Tabla 24 se muestran las respuestas funcionales esperadas, y el sentido de las flechas indica sus valores deseables (altos y bajos). En las filas 2ª a 6ª de la Tabla 24 se presentan los valores (altos y bajos) que deben tomar los factores para lograr las respuestas funcionales deseadas (de la 1ª fila).

Tabla 24: Respuestas funcionales esperadas para el diseño de un ingrediente a medida para mousse de queso en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra. Variación de los factores (pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis) para lograr los parámetros funcionales deseados.

MOUSSE DE QUESO	↑ NA	↑ NT	↑ ISP	↓ η	↑ IAE	↑ IEE	↑ FS	↑ WHC	↓ So	Conclusión
pH	↑	↑	---	↓	---	↓	---	↑	---	pH: moderado.
Temperatura	↑	↓	---	↓	---	↓	---	---	↑	Temperatura moderada.
Cantidad de buffer agregado	↓	↓	↑	↑	---	↓	---	↑	↑	Moderada cantidad de buffer
Relación E:S	---	↑	---	↓	↑	↑	---	↑	↑	↑ Relación E:S
Tiempo de hidrólisis	---	---	---	↓	↑	—	↓	---	↑	moderado tiempo de hidrólisis

Al seleccionar altos valores de pH para producir un hidrolizado proteico de queso de cabra con propiedades funcionales a medida para preparar mousse de queso se observa que existe una situación de compromiso entre NA, NT y WHC; frente a η e IEE. Altos valores de pH favorecen a los tres primeros y desfavorecen a los dos segundos. Es por ello que el pH para producir un hidrolizado proteico de queso apto para elaborar mousse deberá ser moderado.

Siguiendo el mismo razonamiento, la temperatura plantea una situación de compromiso entre NA y So vs. NT, η e IEE. En consecuencia, la temperatura deberá ser moderada.

Se considera adecuado agregar una moderada cantidad de buffer para producir el hidrolizado proteico de queso de cabra con propiedades funcionales a medida para elaborar mousse. En este caso, es importante que el producto obtenido sea soluble ($\uparrow$ ISP), poco viscoso ($\downarrow \eta$), retenga buena cantidad de agua ($\uparrow$ WHC) y tenga baja hidrofobicidad ($\downarrow$ So), pero ese valor debe ser tal que no afecte la liberación de nitrógeno soluble total ($\uparrow$ NT) y amínico libre ($\uparrow$ NA), así como también mantenga una buena estabilidad de la emulsión formada ($\uparrow$ IEE).

La relación E:S debería ser establecida dentro de los máximos valores estudiados, puesto que favorece la producción de NT, aumenta IAE, IEE, y WHC, y disminuye So; aunque aumenta η . Entonces, se recomienda agregar alta ($\uparrow$) E:S.

El tiempo de hidrólisis debería ser fijado dentro de los mínimos valores estudiados, puesto que es la única variable que influye sobre la estabilidad de la espuma, en este caso esencial. También permitirá disminuir la viscosidad de los hidrolizados obtenidos pero afectará la actividad emulsificante y la hidrofobicidad superficial que debe ser baja para evitar sabor amargo. Entonces: moderado tiempo de hidrólisis.

Aditivo para acortar el tiempo de maduración de los quesos:

Cuando se diseña un *hidrolizado proteico de queso de cabra con propiedades funcionales a medida* para ser agregado como un aditivo que permita acortar el tiempo de maduración de otros quesos duros, se pretende que el mismo presente:

- Potenciado sabor a queso: alta concentración de nitrógeno amínico (NA) y nitrógeno total (NT).
- Buena actividad emulsificante (IAE) al mezclarse con el producto caseario al cual va a ser incorporado.
- Baja capacidad de formar espuma (FC) y estabilidad de la misma (FC).

- Baja capacidad de retener agua (WHC), para favorecer la sinéresis de la cuajada.
- Baja hidrofobicidad superficial (So), para evitar la formación de péptidos amargos.

Se subrayaron las propiedades funcionales que se consideraron más importantes en el diseño de un aditivo para ser incorporado como acelerador de la maduración de otros quesos duros.

Al igual que en los casos anteriores se realizó un análisis cualitativo de la incidencia de los factores estudiados: pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis sobre cada respuesta funcional individual, a partir de los modelos obtenidos.

La Tabla 25 resume las respuestas funcionales deseadas para el diseño de un aditivo funcional a medida que permita acelerar la maduración de otros queso duros y la variación de los factores para lograr dichos parámetros funcionales, tomando como base las ecuaciones obtenidas del análisis estadístico y quimiométrico de los resultados experimentales.

En la primera fila de la Tabla 25 se muestran las respuestas funcionales esperadas para el diseño de un aditivo con propiedades funcionales a medida para acelerar la maduración de otros quesos duros en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra. El sentido de las flechas indica sus valores deseables (altos y bajos). En las filas 2° a 6° de la Tabla 25 se presentan los valores (altos o bajos) que deben tomar los factores para lograr las respuestas funcionales deseadas (de la 1° fila).

En este caso, se recomienda utilizar altos valores de pH, temperatura, relación E:S y tiempo de hidrólisis; y moderada a baja cantidad de buffer agregado.

Tabla 25: Respuestas funcionales esperadas para el diseño de un aditivo a medida para acortar el periodo de maduración de otros quesos duros, en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra. Variación de los factores (pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis) para lograr los parámetros funcionales deseados.

ACELERADOR DE MADURACION DE QUESOS	↑ NA	↑ NT	↓ ISP	↑ η	↑ IAE	↑ IEE	↓ FS	↓ WHC	↓ So	Conclusión
pH	↑	↑	---	↑	---	↓	---	↓	---	↑ pH
Temperatura	↑	↓	---	↑	---	↓	---	---	↑	↑ Temperatura
Cantidad de buffer agregado	↓	↓	↓	↓	---	↓	---	↓	↑	modelada a ↓ cantidad de buffer agregado
Relación E:S	---	↑	---	↑	↑	↑	---	↓	↑	↑ Relación E:S
Tiempo de hidrólisis	---	---	---	↑	↑	-	↑	---	↑	↑ tiempo de hidrólisis

Aditivo para panificación:

Cuando se diseña un *hidrolizado proteico de queso con propiedades funcionales a medida* para ser utilizado como saborizante de productos de panificación, se pretende que el mismo presente:

- Potenciado sabor a queso (alta concentración de NA y NT).
- Alta solubilidad (ISP) y viscosidad (η).
- Alta capacidad para emulsionar con el resto de los ingredientes (IAE, IEE).
- Alta capacidad de retener agua (WHC).
- Baja hidrofobicidad superficial (S_o).

Para lograr los objetivos anteriormente citados se realizó un análisis cualitativo de la incidencia de los factores estudiados: pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis, sobre cada respuesta funcional individual, a partir de los modelos obtenidos.

La Tabla 26 resume las respuestas funcionales deseadas para el diseño de un aditivo funcional a medida para panificación en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra y la variación de los factores para lograr dichos parámetros funcionales, según las ecuaciones obtenidas del análisis estadístico y quimiométrico de los resultados experimentales.

En la primera fila de la Tabla 26 se muestran las respuestas funcionales esperadas, y el sentido de las flechas indica sus valores deseables (altos o bajos). En las filas 2° a 6° de la Tabla 26 se presentan los valores (altos y bajos) que deben tomar los factores para lograr las respuestas funcionales deseadas (de la 1° fila).

Tabla 26: Respuestas funcionales esperadas para el diseño de un aditivo a medida para panificación en base a hidrolizados proteicos de queso de cabra. Variación de los factores (pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación enzima:sustrato y tiempo de hidrólisis) para lograr los parámetros funcionales deseados.

ADITIVO PARA PANIFICACION	↑NA	↑NT	↑ISP	↑η	↑IAE	↑IEE	↑FS	↑WHC	↓So	Conclusión
pH	↑	↑	---	↑	---	↓	---	↑	---	↑ pH
Temperatura	↑	↓	---	↑	---	↓	---	---	↑	Moderada a ↑ Temperatura
Cantidad de buffer agregado	↓	↓	↑	↓	---	↓	---	↑	↑	Moderada cantidad de buffer agregado
Relación E:S	---	↑	---	↑	↑	↑	---	↑	↑	↑ E:S
Tiempo de hidrólisis	---	---	---	↑	↑	---	↓	---	↑	↑ tiempo de hidrólisis

En este caso, se recomienda utilizar altos valores de pH, relación E:S y tiempo de hidrólisis y moderada cantidad de buffer agregado y temperatura.

La Tabla 27 muestra un resumen de las conclusiones obtenidas en las Tablas 23 a 26. En la misma se presentan los valores (altos, moderados o bajos) que deberían tomar los factores: pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis, para diseñar hidrolizados proteicos de queso de cabra con propiedades funcionales “a medida” para ser incorporados como aditivos o ingredientes para salsas y sopas, mousse de queso, productos de panificación y quesos de largo periodo de maduración.

Tabla 27: Análisis cualitativo de la variación de los factores (pH, temperatura, cantidad de buffer agregado, relación E:S y tiempo de hidrólisis) para diseñar *hidrolizados proteicos de queso de cabra con propiedades funcionales a medida* para salsas y sopas, mousse de queso, aditivos para acortar el tiempo de maduración de otros quesos duros y productos de panificación.

Factor	Aditivo para Salsas y Sopas	Ingrediente para Mouse de queso (cheese cake)	Aditivo para acortar el tiempo de maduración de otros quesos duros	Aditivo para Panificación
pH	↑	Moderado	↑	↑
Temperatura	↑	Moderada	↑	Moderada a ↑
Cantidad de buffer agregado	Moderada	Moderada	Moderada a ↓	Moderada
Relación E:S	↑	↑	↑	↑
Tiempo de hidrólisis	↑	Moderado	↑	↑

Optimización de los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos de queso de cabra en función de la aplicación deseada.

Finalmente, se realizó la optimización de los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos de queso de cabra en función de la aplicación deseada, utilizando estrategias de análisis para múltiples respuestas tales como gráficos de contorno y funciones de deseabilidad.

Usualmente, se pueden utilizar paquetes de optimización estándar, tales como la programación lineal o cuadrática, con el objeto de solucionar problemas de optimización restringidos. Sin embargo, estos sistemas no son adecuados para investigaciones cuyo objetivo es encontrar un balance óptimo entre varias respuestas características.

La optimización de procesos mediante la función “deseabilidad” permite definir la combinación de los valores de los factores en las que se obtienen las respuestas óptimas deseadas.

El cálculo consiste en transformar los rangos seleccionados para una respuesta en un valor d , donde $0 \leq d \leq 1$. Los valores de d aumentan a medida que se aproximan a la óptima respuesta buscada. De esta manera, se puede definir una función deseabilidad global (que considera todas las respuestas de interés en el proceso) como la media geométrica de las deseabilidades (d_i 's).

Esto hace posible calcular para cada proceso en particular las combinaciones de valores óptimos de los factores que maximizan la deseabilidad global.

Según el tipo de problema se pueden aplicar distintas clases de funciones de deseabilidad. Así es posible encontrar tres situaciones:

La primera, cuando al valor “ t ” denominado “target” (valor buscado para la respuesta) se le pueden asignar límites alto y bajo, “ U ” y “ L ”, respectivamente. En este caso la función deseabilidad se define como:

$$d = \left| \frac{\hat{y} - L}{t - L} \right|^{\alpha_1}, L \leq \hat{y} \leq t, \quad \text{y} \quad \text{ecuación (36)}$$

$$d = \left| \frac{\hat{y} - U}{t - U} \right|^{\alpha_2}, t \leq \hat{y} \leq U, \quad \text{ecuación (37)}$$

Además $d = 0$ cuando $\hat{y} < L$ ó cuando $\hat{y} > U$. Siendo $\hat{y}$ el valor de la respuesta estimada por el modelo.

La elección de los valores para α_1 y α_2 es más subjetiva que la elección de L y U . Un pequeño valor de $\alpha < 1$ implicaría que la respuesta acepta un rango ancho de valores (tolerancia) alrededor de “ t ”. Por otro lado, un valor alto de $\alpha > 1$ implicaría un agudo, estrecho, rango de tolerancia alrededor de “ t ”. Si las consecuencias por estar por encima o por debajo del valor deseado son muy diferentes, esta diferencia se puede reflejar en la elección de diferentes valores para α_1 y α_2 en la ecuación (38).

La segunda situación problema sería cuando el valor buscado es el más pequeño, es decir el valor más bajo posible (a). En este caso se elige un valor U como el valor por encima del cual el producto se considera inaceptable. La función deseabilidad viene dada por:

$$d = \left| \frac{\hat{y} - U}{a - U} \right|^\alpha, a \leq \hat{y} \leq U, \quad \text{ecuación (38)}$$

El tercer caso es cuando el valor ideal para la respuesta es el mayor posible (teóricamente tiende a infinito). Ahora el valor L es el límite por debajo del cual el producto se considera inaceptable. La ecuación define la deseabilidad como:

$$d = \left| \frac{\hat{y} - L}{a - L} \right|^\alpha, L \leq \hat{y} \leq a, \quad \text{ecuación (39)}$$

Se puede definir una función de deseabilidad general como la media geométrica de los valores de d (d_i 's, $i=1, \dots, m$).

$$d = \{ d_1 d_2 \dots d_m \}^{1/m} \quad \text{ecuación (40)}$$

Esto se puede ampliar a:

$$d = d_1^{W_1} d_2^{W_2} \dots d_m^{W_m} \quad \text{ecuación (41)}$$

Para reflejar las posibles diferencias en la importancia de las distintas respuestas donde los pesos W_i satisfacen $0 < W_i < 1$ y $W_1 + \dots + W_m = 1$ (Derringer y Suich, 1980).

La Tabla 28 muestra los valores máximo y mínimo de cada respuesta estudiada, así como también los rangos bajos, intermedio y alto de dichas respuestas, para graficar sus funciones de deseabilidad, considerando cuatro hidrolizados proteicos de queso de cabra con propiedades funcionales "a medida", los cuales serán incorporados a diferentes sistemas de alimentarios:

- Aditivo para salsas y sopas,
- Aditivo para mousse de queso,
- Aditivo para productos de panificación, y
- Aditivo para quesos de largo periodo de maduración.

Tabla 28: Rangos y valores máximos y mínimos de cada respuesta funcional de los hidrolizados proteicos de queso de cabra para optimizarlas mediante funciones de deseabilidad.

Parámetro	Valor mínimo	Valor máximo	Rango Bajo	Rango intermedio	Rango alto
NA	0,14	1,465	0,14 - 0,331	0,331 - 0,9935	0,9935 - 1,465
NT	1,11	7,025	1,11 - 2,588	2,588 - 5,544	5,544 - 7,025
ISP	14,14	91,035	14,14 - 33,36	33,36 - 71,81	71,81 - 91,035
η	1,265	1,74	1,265 - 1,384	1,384 - 1,62	1,62 - 1,74
IAE	66,435	223,71	66,435 - 105,753	105,753 - 184,39	184,39 - 223,70
IEE	27,33	85,45	27,33 - 41,86	41,86 - 70,9	70,9 - 85,45
FC	0,025	0,67	0,025 - 0,186	0,186 - 0,508	0,508 - 0,67
FS	0,14	2,285	0,14 - 0,676	0,676 - 1,748	1,748 - 2,285
WHC	0,55	3,08	0,55 - 1,182	1,182 - 2,447	2,447 - 3,08
HW	9,34	27,33	9,34 - 13,84	13,84 - 22,73	22,73 - 27,33
So	0,955	15,64	0,955 - 4,626	4,626 - 11,97	11,97 - 15,64

Las Figuras 31 a 33 muestran la función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales para el diseño un hidrolizado proteico de queso de cabra con propiedades funcionales a medida que será usado como aditivo para panificación (Tabla 26).

De acuerdo con las mismas los rangos óptimos de las variables son los siguientes:

- Relación E:S: 0,12 – 0,22 mg de papaína/g de caseína.
- Cantidad de buffer agregado: 20-30 g/g de proteína.
- pH: 8 – 9
- Tiempo de hidrólisis: 50 a 100 min, 175 a 270 min.
- Temperatura: 40 a 50°C y 60 a 70 °C.

Las Figuras 34 a 36 muestran la función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funciones para el diseño de un hidrolizado proteico de queso de cabra con propiedades a medida que será usado como aditivo de salsas y sopas (Tabla 23).

De acuerdo con las mismas, los rangos óptimos de las variables son los siguientes:

- Relación E:S: en todo el rango de la variable, pero las óptimas respuestas se obtienen en el rango de valores intermedios/altos.
- Cantidad de buffer agregado: 13 - 22 g/g de proteína
- pH: 5 – 9.
- Tiempo de hidrólisis: 75 – 270 min.
- Temperatura: 52 – 70 °C.

Las Figuras 37 a 39 muestran la función deseabilidad de las respuestas de las propiedades funcionales para el diseño de un hidrolizado proteico de queso de cabra con propiedades funcionales a medida que será usado como aditivo para acortar el tiempo de maduración de otros quesos duros (Tabla 25).

De acuerdo con las mismas, los rangos óptimos de las variables son los siguientes:

- Relación E:S: 0,20 a 0,25 g/g de caseína de queso.
- Cantidad de buffer agregado: 10 a 20 g/g de proteína.
- pH: 6 – 9.
- Tiempo de hidrólisis: 270 min.
- Temperatura: 45 – 52 °C.

Finalmente, los parámetros funcionales de un hidrolizado proteico de queso de cabra para ser utilizado como ingrediente de mousse de queso no pudieron ser optimizadas. El rango óptimo de la capacidad espumante es 1,748 – 2,285, y el mismo no está dentro del rango experimental obtenido (0,1 – 1,48).

La Tabla 29 resume los valores óptimos de las variables operacionales para obtener aditivos con propiedades funcionales a medida.

Tabla 29: Valores óptimos de las variables operacionales para obtener aditivos con propiedades funcionales a medida.

Aditivo para:	pH	Temperatura (°C)	E:S (mg de papaína/g de caseína)	Cantidad de buffer (ml)	Tiempo (min)
Panificación	8 – 9	40 – 50 60 – 70	0,12 – 0,22	20 – 30	50 – 100 175 – 270
Salsas y sopas	5 – 9	52 – 70	0,20 – 0,30	13 – 22	75 -270
Acelerador de la maduración de otros quesos duros	6 – 9	45 – 52	0,20 – 0,25	10 – 20	270
Mousse de queso	No pudo ser optimizado				

Este hecho pone en evidencia que aun cuando las propiedades nutricionales y organolépticas de los hidrolizados proteicos de queso de cabra sean óptimas, sus propiedades funcionales inadecuadas para su incorporación como ingrediente a mousse de queso (cheese cake) impiden su utilización en este producto.

Comparando el análisis cualitativo esquematizado en la Tabla 27 con los valores óptimos de las variables operacionales para obtener aditivos con propiedades funcionales a medida (Tabla 29) se observa que éstos últimos aportan precisión y condiciones que no pudieron predecirse cualitativamente.

.

.

.

.

.

.

.

.

Conclusiones

La presente invención tuvo por objeto desarrollar una estrategia para predecir, controlar y optimizar las *propiedades funcionales* de los hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra para el diseño de *aditivos funcionales a medida* para determinados sistemas alimentarios, utilizando una enzima proteolítica de origen vegetal, disponible comercialmente, de bajo costo y aprobada para uso alimenticio, como es papaína (*Carica papaya*). Este desarrollo se traducirá en un incremento de las aplicaciones y una mayor comercialización del producto original.

Inicialmente, el trabajo se focalizó en el estudio y modelamiento de los *parámetros funcionales claves* para la optimización de la producción de los hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra, usando metodologías estadísticas y quimiométricas.

Se desarrolló un diseño estadístico de experimentos (DOE) y una metodología de superficie de respuesta (RSM) para describir el efecto de diferentes factores (pH, temperatura, cantidad de buffer agregado y relación E:S) sobre los siguientes parámetros funcionales (respuestas) de las proteínas hidrolizadas de queso semiduro de cabra: nitrógeno amínico libre (NA), nitrógeno soluble total (NT), índice de solubilidad de proteínas (ISP), viscosidad (η), capacidad de absorción de agua (WHC), agua retenida (HW), propiedades emulsificantes (IAE: índice de actividad emulsificante, IEE: índice de estabilidad de la emulsión), propiedades espumantes (FC: capacidad espumante, FS: estabilidad de la espuma) e hidrofobicidad superficial (So).

Todas las variables (factores y respuestas) fueron evaluadas al mismo tiempo por regresión lineal múltiple y se obtuvieron buenas correlaciones entre los valores experimentales y predichos. Dichas correlaciones permiten predecir, controlar y optimizar cada parámetro funcional en función de los factores del proceso que lo afectan significativamente y los efectos interactivos entre los mismos.

En resumen, para lograr un sabor a queso potenciado del producto original, mediante la hidrólisis proteica, se deben seleccionar las condiciones que maximizaron NA y NT. Es decir, los mayores valores de pH (9) y relación E:S (0,22 mg de papaína / g de caseína); y los más bajos valores de cantidad de buffer agregado (10 g/g de proteína). La temperatura presentó una situación de compromiso ya que máximos valores de NA y NT se obtuvieron a 35 °C y 70 °C, respectivamente.

Además, si para la formulación de aditivos saborizantes se requieren buenas propiedades emulsificantes (IAE y IEE), se deberían seleccionar los más bajos valores de pH (5),

cantidad de buffer agregado (10 g/ g de proteína) y temperatura (35 °C); y los más altos valores de relación E:S (0,22 mg de papaína / g de caseína) y tiempo de hidrólisis (270 min).

Sin embargo, para obtener hidrolizados proteicos con buena solubilidad (ISP) y capacidad de retención de agua (WHC) se requiere alta cantidad de buffer agregado (30 g/g de proteína). Entonces, la cantidad de buffer agregado se debe regular de acuerdo al ISP y WHC deseados en el producto final.

Del mismo modo, el pH se debe regular de acuerdo al IEE deseado en el producto final, ya que altos valores de pH fueron indispensables para lograr hidrolizados proteicos con un sabor a queso potenciado, con alta viscosidad y capacidad de retención agua; pero fueron perjudiciales para mantener una adecuada IEE de los mismos.

Por otra parte, para obtener hidrolizados proteicos en base a queso semiduro de cabra que puedan ser utilizados en el diseño y formulación de aditivos saborizantes, se requiere que los mismos tengan bajas concentraciones de péptidos amargos (So), y para ello, se deben seleccionar los mayores valores de todos los factores, dentro del rango estudiado. Estas condiciones también favorecen altos valores de ISP, WHC e IAE; mientras que las demás respuestas (NA, NT, η , IEE y FS) no alcanzarán sus valores óptimos.

En conclusión, establecer el conjunto de condiciones operacionales que optimizan todos los parámetros funcionales *simultáneamente*, a partir de los modelos obtenidos, resultó prácticamente imposible...

En virtud de lo anterior, se realizó la optimización de los parámetros funcionales de los hidrolizados proteicos de queso de cabra *en función de la aplicación deseada*; utilizando estrategias de análisis para múltiples respuestas, tales como gráficos de contorno y funciones de deseabilidad.

Así, se diseñaron y optimizaron las condiciones operacionales para la producción de hidrolizados proteicos de queso semiduro de cabra con *propiedades funcionales "a medida"*, para ser incorporados a diferentes sistemas de alimentarios: - Aditivo para salsas y sopas, - Aditivo para mousse de queso, - Aditivo para productos de panificación, y - Aditivo para acelerar la maduración de otros quesos duros. No obstante, no fue posible lograr experimentalmente las condiciones requeridas para producir un ingrediente para mousse de queso con propiedades funcionales a medida, debido a la excesiva disminución de las propiedades espumantes en los hidrolizados proteicos de queso de cabra.

Las conclusiones de los resultados de esta Invención ponen en evidencia la intrincada dependencia de las propiedades funcionales deseadas de un ingrediente con las variables estudiadas, lo que ocasiona múltiples situaciones de compromiso desde el punto de vista opera-

cional. A esto se suma que los alimentos son sistemas complejos que están formados por diversos componentes (proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, sales minerales, etc.) los cuales influyen en las propiedades funcionales. Por lo tanto, la funcionalidad total de un ingrediente no puede ser considerada independiente de otros componentes del alimento. Sin embargo, la funcionalidad de los ingredientes individuales son útiles para predecir, controlar y algunas veces para impartir características deseables a sistemas alimentarios reales.

Referencias Bibliográficas

- Adler-Nissen J. (1976) Enzymatic hydrolysis of protein for increase solubility. *J. Agric. Food Chem.* 24: 1090-1093.
- Adler-Nissen J. y Olsen H.S. (1979) In: *Functionality y Proteins Structure*. (Pour-El, A. Ed.); ACS Symposium Series 92, American Chemical Society: Washington, DC, pp. 125-146.
- Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of. hydrolysis of food protein hydrolysates by. trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food. Chem.* 27: 1256-1259.
- Adler-Nissen, J. (1984) Limited enzymic degradation of proteins: a new approach in the industrial application of hydrolases. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32: 138-56.
- Adler-Nissen, J.; Eriksen, S., Olsen, H.S. (1983) In: *Plant Proteins for Human Food*. (Bodwell, C.E., Petit, L. Eds.); Nijhoff: The Hague, p. 297.
- Agyare, K.K., Addo, K. & Xiong, Y.L. (2009). Emulsifying and foaming properties of transglutaminase - treated wheat gluten hydrolysates as influence by pH, temperature and salt. *Food Hydrocolloid*, 23, 72-81.
- Aletor, O. (2010) Soyabean meal versus soyabean protein isolate: A comparative study of the nutritive and functional attributes. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 8 (2): 34-38.
- Alichanidis E. y Polychroniadou A. (1996). "Special features of dairy products from sheep and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view". In: *Production and Utilization of Sheep and Goat Milk* (International Dairy Federation Ed.). International Dairy Federation, Brussels, pp. 21-43.
- Amelia, I., Drake, M., Nelson, B., Barbano, D.M. (2023) A new method for the production of low-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 96 (8): 4870-4884
- American Public Health Association (1992). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Carl Vanderzant and Don F. Splittstoesser (eds), Washington D.C. pp:51-835.

- Ammar El Tahra M.A., El Shazly A., Nasr M.M., El Saadany M. y El Tahra M.A.A. (1994). Effect of using autolyzed starter and cheese slurry on acceleration of Ras cheese ripening made from mixture of goat's and cow's milk. *Egyptian Journal of Dairy Science* 22: 67-80.
- AOAC (1995) "Official Methods of Analysis". Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington, V.A.
- AOCS (1987) "Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society". Champaign, I.L.
- Ardö Y. (1999) Evaluating proteolysis by analyzing the N content of cheese fraction. In: (Y. Ardö Ed.) Bulletin IDF 337, Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Part 2, pp 4-9, Brussels, Belgium. International Dairy Federation.
- Aschaffenburg R. y Dance J. E. (1968). Detection of cow's milk in goat's milk by gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 35: 383.
- Barberis S. y Quiroga G. (2008) Alteraciones de los Alimentos. Apuntes teóricos. Laboratorio de Bromatología. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis.
- Barberis S.E. (2002). Capítulo 7: Leches industrializadas y productos lácteos. Bromatología de la leche. Ed. Hemisferio Sur.
- Barth A. (2000) The Infrared Absorption of Amino Acid Side Chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74: 141-173.
- Battistotti B., Corradini C. y Fox P.F. (1993). Italian cheese. In: (P. F. Fox Ed.), Cheese: Chemistry, Physics y Microbiology. Volume 1. General Aspects. pp. 221-243. London: Chapman & Hall Ltd.
- Baú, T.R., Da Silva, L.C., Garcia, S., Ida, E.I. (2012) Technological functional properties of soy, oat and wheat fibers and soy products with added fibers and fermented with kefir culture. *Semina: Ciencias Agrarias* 33 (2): 3093-3102.
- Bergamini, C.; Hynes, E., Zalazar, C. (2006) Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *Int. Dairy J.*, 16: 856-866.
- Bernardo, J.M. (2005). Reference analysis. In: Handbook of Statistics (edited by D. K. Dey and C. R. Rao), Vol. 25, pp.17-90. Amsterdam: Elsevier.
- Berthold M. y Hand, D.J. (2003) Intelligent Data Analysis. Second Edition. Springer-Verlag, Germany.

- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. y Lalitha, R.G. (2008) Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99 (2): 335-343.
- Bhowmik T. y Marth, E. H. (1990). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science* 73: 859-866.
- Bijl, E. van Valenberg, H., Sikkes, S., Jumelet, S., Sala, G., Olieman, K., van Hooijdonk, T., Huppertz, T. (2014) Chymosin-induced hydrolysis of caseins: Influence of degree of phosphorylation of alpha-s1-casein and genetic variants of beta-casein. *International Dairy Journal* 39 (2): 215-221
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brignon G., Mercier J., Ribodeau-Dumas B. y Das B. (1972) Primary Structure of Bovine Kappa Paracasein. *FEBS Lett* 27: 301.
- Brown, P.J., Vannucci, M. y Fearn, T. (1998) Multivariate Bayesian variable selection and prediction. *J. R. Stat. Soc. Series B*, 60(3): 627-641.
- Cais-Sokolińska, D., Lasik, A., Pikul, J. (2014) Influence of water-soluble nitrogen and free amino groups on sensory attributes of smoked mozzarella cheese. *International Journal of Food Properties* 17 (6): 1369-1378.
- Calderón de la Barca A.M., Wall Medrano A., Jara Marini M., González Córdova A.F. y Ruíz Salazar A.R. (2000) Modificación enzimática de las propiedades funcionales, nutricias y sensoriales de la soya para alimentación especial. *ALAN*, vol.50, no.1, p.26-34. ISSN 0004-0622.
- Cheftel J.C. (1977) In: *Food Proteins* (Whitaker, J.R.; Tannenbaum, S.R. Eds.). Avi: Westport, CT, p. 401.
- Cheftel J.C., Cuq J.L. y Lorient D. (1985) In: *Proteines Alimentaires. Technique et Documentation*. Lavoisier : París, p. 278.
- Chipman H., Hamada M. y Wu C.F.J. (1997) A Bayesian Variable Selection Approach for Analyzing Designed Experiments with Complex Aliasing. *Technometrics* 39: 372-381.
- Chobert J.M., Bertrand-Harb C. y Nicolas, M.G. (1988) Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 36: 838-892.
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70 (3), R54 – R66.

- De Ruyter P.G.G.A., Kuipers O.P., Meijer W.C., de Vos W.M. (1997). Foodgrade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nature Biotechnology*, 15: 976-979.
- Derringer, G. y Suich, R. 1980, "Simultaneous Optimization of Several Response Variables" *Journal of Quality Technology*, 12 (4): 214-219.
- Diezhandino, I, Fernández, D., González, L., McSweeney, P.L.H., Fresno, J.M. (2015) Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). *Food Chemistry* 168, 134-141
- Doehlert D.H. (1970) Doehlert Uniform Shell Designs. *Appl. Statist.* 19: 231.
- Dong A., Huang P. y Caughey W.S. (1990) Protein secondary structure in water from second – derivative amide I infrared spectra. *Biochem* 29, 3303 – 3308.
- Dong A. y Caughey W.S. (1994). Infrared methods for study of hemoglobin reactions and structures. *Methods Enzymol.* 232: 139-175.
- Dong A., Carpenter J.F. y Caughey W.S. (1995) Protein Infrared Database. <http://www.unco.edu/nhs/chemistry/faculty/dong/irdata.htm>
- Dong A., Meyer J.D., Kendrick B.S., Manning M.C., y Carpenter J.F. (1996) Effect of secondary structure on the activity of enzymes suspended in organic solvents. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 406 – 414.
- Drago, S.R., González, R.J. (2000) Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1(4): 269-273
- El Soda M. y Pandian, S. (1991). Recent developments in accelerated cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 74: 2317-2335.
- El Soda M., Madkor S.A., Tong P.S. (1999). Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 3. Properties of heat-shocked adjuncts in buffer and cheese slurry systems. *Milchwissenschaft* 54: 262-265.
- Elizalde B.E., Giaccaglia D., Pilosof A.M.R. y Bartholomai G.B. (1990) Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams. *J. Food Sci.* 56: 24-26.
- Ezzat N. (1990). Accelerated ripening of Ras cheese with a commercial proteinase and intracellular enzymes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Propionibacterium freudenreichii* and *Brevibacterium linens*. *Lait Lyon* 70: 459-466.
- Fawcett J.K., Scott J.E. (1960) A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Path.* 13: 156-159.

- Feeney R.E., Whitaker, J.R. (1977) Food Proteins: Improvement through Chemical and Enzymatic Modification; Advances in Chemistry Series 160; American Chemical Society: Washington, DC, 312 pp.
- Fernández García E., Olano A., Cabezudo D., Martín Alvarez P. J. y Ramos M. (1993). *Accelerated ripening of Manchego type cheese by added commercial enzyme preparation from Aspergillus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology 15: 519-524.
- Fernández García E., López Fandiño R. y Alonso, L. (1994). Effect of a food-grade enzyme preparation from Aspergillus oryzae on free fatty acid release in Manchego type cheese from ovine and bovine milk. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung. A* 199: 262-264.
- Flavourzyme® Marca nominativa (2014). Enzimas para usarse en la industria alimenticia N° Registro 477213. Novozymes A/S. Dinamarca.
- Folkertsma B. y Fox P.F. (1992) Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *J Dairy Res.* 59: 217-224.
- Folkertsma B., Fox P.F. y McSweeney P.L.H. (1996). Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *International Dairy Journal* 6: 1117-1134.
- Fox K.K. (1970) In: By products from milk, 2nd Ed. (Webb, B.H., Whittier, E.O. Eds.), AVI: Westport, CT., p.331.
- Fox P.F., Morrissey P.A., Mulvihill D.M. (1982) In: Development in Food Proteins -1, (B.J.F. Hudson Ed.). Applied Science London, p. 1.
- Fox P.F., Lucey J.A. y Cogan T.M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29: 237-257.
- Fox P.F. y Law J. (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology* 5: 239-262.
- Fox P.F. y Flynn A. (1994). "Biological properties of milk proteins" In: Dairy Products in Human Health and Nutrition (Serrano Ríos y col. Eds.). Bolkema, Rotterdam, pp. 97-111.
- Fox P.F., Wallace J.M., Morgan S., Lynch C.M., Niland E.J. y Tobin, J. (1996). Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 271-297.
- Friedman M. (1977) In: Food Proteins (J.R. Whitaker, S.R. Tannenbaum Eds.). Avi: Westport, CT, p. 446.
- Friedman M. (1979) In: Functionality and Protein Structure (Pour - El, A. Eds.). ACS Symposium Series 92; American Chemical Society, Washington, DC, pp. 225-236.
- Garde S., Gaya P., Medina M. y Nuñez, M. (1997) Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. *Biotechnology Letters*, 19: 1011-1014.

- Glazer A.N. y Smith E.L. (1971) Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes, in (Boyer PD Ed): The Enzymes, Vol III, Hydrolysis: Peptide Bonds. New York, Academic Press, p 501
- Grappin R. y Beuvier E. (1997) Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal* 7 (12): 751-761.
- Gripon J.C. y Fox P.F. (1993) "Mould-ripened cheeses" In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1. General Aspects (P.F. Fox Ed.). Chapman & Hall Ltd, London, UK, pp. 111-136
- Gunther R.C. (1979) Chemical and characteristics of enzyme-modified whipping proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56 (3): 345-349.
- Hannon, J.A., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Beresford, T.P (2006) Production of ingredient-type Cheddar cheese with accelerated flavor development by addition of enzyme-modified cheese powder. *Journal of Dairy Science*, 89 (10): 3749-3762.
- Hamada M. y Wu C.F.J. (1992) Analysis of designed experiments with complex aliasing. *J. Qual. Technol.* 24: 130-137
- Hayakawa S. y Nakai S. (1985) Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.* 50: 486-491.
- Hayaloglu, A.A. , Karabulut, I. (2013) Primary and secondary proteolysis in eleven Turkish cheese varieties. *International Journal of Food Properties.* 16 (8): 1663-1675
- He H.-L., Chen X.-L., Wu H., Sun C.-Y., Zhang Y.-Z. y Zhou B.C. (2007) High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresource Technology* 98 (18): 3499-3505.
- Hermansson A.M. (1978) Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *J. Texture Stud.* 9: 33-58.
- Hermansson A.M. (1979) Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: 272-279.
- Hernández-Ledesma B., Recio I., Ramos M. y Amigo L. (2002) Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.* 12: 805-812.
- Hernández-Ledesma B., Quiros A., (2005) Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *J. Dairy Sci.* 88: (10) 3480-3487.

- Hernández-Ledesma B., Amigo L., Recio I. y Bartolomé B. (2007) ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid. *J. Agr. Food Chem.* 55 (9): 3392-3397.
- <http://www.alimentación.enfasis.com>
- <http://chr-hansen.es/>
- <http://www.newton.dep.anl.gov/askasci/mats05025.htm>
- Huang, P., Dong A. y Caughey W.S. (1995) Effects of dimetil sulfoxide, glycerol and ethilene glycol on secondary structures of cytochrome C and lysozyme as observed by infrared spectroscopy. *J. Pharma. Sc.* 84, 387 – 392.
- Illanes Frontaura A. (1994) “Biotecnología de Enzimas”. Serie Biológica. Monografía N° 35, 254 pág. Programa de Publicaciones Científicas de OEA. Washington. USA.
- Illanes A., Guzmán F. y Barberis, S. (2009) *Proteases as powerful catalysts for organic synthesis*. In: Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. (Andrew B. Hughes, Editor). 683 pag.; Vol. 2, Part Three: Enzymes, pp. 341-361, ISBN-10: 3- 527-32098-9, ISBN-13: 978-3-527-32098-1. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.
- Izco J. M., Torre P. y Barcina Y. (1999) Accelerated cheese ripening. A review. *Alimentaria* 36: 135-144.
- Jin Y.K. y Park Y.W. (1996) SDS-PAGE of proteins in goat milk cheeses ripened under different conditions. *Journal of Food Science*, 61: 490-494, 503.
- Kanehisa H. y Okai H. (1984) Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. V. Bitterness of the synthetic N-terminal analog of des-gly-BPIa (Arg-Pro-Pro-Phe-Ile-Val). *Bulletin of the Chemistry Society of Japan* 57: 301.
- Kato A. y Nakai S. (1980) Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 624: 13-20.
- Kawabata S., Vassal L., Le Bars D., Cesselin B., Nardi M., Gripon J.C. y Chapot Chartier M.P. (1997) Phage-induced lysis of *Lactococcus lactis* during Saint-Paulin cheese ripening and its impact on proteolysis. *Lait* 77: 229-239.
- Khalid N.M. y Marth E.H. (1990) Lactobacilli - their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *Journal of Dairy Science* 73: 2669-2684.
- Khalidi, N., Vijayakumar, V., Dallas, D.C., Guerrero, A., Wickramasinghe, S., Smilowitz, J.T., Medrano, J.F., Lebrilla, C.B., Shields, D.C., German, J.B. (2014) Predicting the important enzymes in human breast milk digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (29): 7225-7232.

- Kilara, A., Chandan, R.C. (2011) Enzyme-modified Dairy Ingredients. In: Dairy Ingredients for Food Processing. (Book Chapter), pp. 317-333. Wiley-Blackwell, USA. ISBN: 978-081381746-0. DOI: 10.1002/9780470959169.ch12
- Kilcawley K.N., Wilkinson M.G. y Fox P.F. (1998) Enzyme-modified cheese. *International Dairy Journal* 8: 1-10.
- Kilcawley, K.N., Nongonierma, A.B., Hannon, J.A., Doolan, I.A., Wilkinson, M.G. (2012) Evaluation of commercial enzyme systems to accelerate Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal* 26 (1): 50-57.
- Kim, C.J., Lee, D.I., Lee, C.H. & Ahn, I.S. (2012). A dityrosine-based substrate for a protease assay: Application for the selective assessment of papain and chymopapain activity. *Analytica Chimica Acta*, 723: 101-107.
- Kimmel J.R. y Smith E.L. (1954) Crystalline papain. I Preparation, specificity, and activation *J. Biol. Chem.* 207 (2): 515-531.
- Kinsella J.E. (1976) Functional Properties of Proteins in Foods: A Survey. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7: 219-280.
- Kinsella J.E. y Shetty J. (1979) In: Functionality and Protein Structure. (A. Pour-El Ed.). ACS Symposium Series No. 92, Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 32-63.
- Kinsella J.E. (1988) Protein modification: effects on functional properties and digestibility. In: Milk Proteins: Nutritional, Clinical, Functional and Technological Aspects, (C.A. Barth y E. Schlimme, Ed.). Steinkopff Verlag Darmstadt, Springer-Verlag, New York (1988), pp. 179-191.
- Kohonen T. (1995) Self-Organizing Maps. Springer-Verlag, Berlin. pp. 378.
- Kosikowski F.V. y Iwasaki T. (1974) Changes in Cheddar cheese by commercial enzyme preparations. *Journal of Dairy Science* 58: 963-970.
- Kuehler C.A. y Stine C.M. (1974) Effect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey protein. *J. Food Sci.* 39: 379-382.
- Kumar, S., Jha, Y.K., Singh, P. (2013) Influence of adjuncts as debittering aids on the sensory and biochemical properties of enzyme modified cheese-base. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences* 83 (3): 347-355.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamsal, B.P., Jung, S., Johnson, L.A. (2007) Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology* 40 (7): 1215-1223

- Lariviere B., El Soda M., Soucy Y., Trépanier G., Paquin P. y Vuilleumard J.C. (1991) Microfluidized liposomes for the acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal* 1: 111-124.
- Ledesma L., Fresno M., Álvarez S., Darias J., Rodríguez E. y Díaz C. (2007) Variations in the mineral composition of goat's milk cheeses according to the goats' diet and the used rennet. *Arch. Zootec.* 56 (Sup. 1): 719-723.
- Li-Chan E., Nakai S. y Wood D.F. (2006) Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J. Food Sci.* 49: (2) 345 - 350.
- Lieske B. y Konrad G. (1990) "Physico-chemical and functional properties of whey proteins as affected by limited papain proteolysis and selective ultrafiltration". In: Milk Proteins. Nutritional, Clinical, Functional and Technological Aspects. (Barth, C.A. y Schlimme, E. Eds.) Steinkopff Verlag Darmstadt, Springer-Verlag: New York, pp. 179-191.
- Liu, S.-X., Qiao, X.-L. (2014) A comparative study of wheat gluten by two pretreatments (Conference Paper) Resources, Environment and Engineering - Proceedings of the 2014 Technical Congress on Resources, Environment and Engineering, CREE 2014 2015, Pages 411-415. 2014 Technical Congress on Resources, Environment and Engineering, CREE 2014; Hong Kong; Hong Kong; 6 September 2014 through 7 September 2014; Code 107253
- Luo, Y., Pan, K., Zhong, Q. (2014) Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. *Food Chemistry* 155: 146-154
- Mahmoud R. y Savello P.A. (1992) Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein films. *J. Dairy Sci.* 75 (4); 942-946.
- Manning D.L., Ridout E.A. y Price J.C. (1984) Non-sensory methods for cheese flavour assessment. In: Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk (F.L. Davies y B. A. Law (Ed.). Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, pp. 229-253
- Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Deming S.N., Michotte Y. y Kaufman L. (1988) Chemometrics: a textbook. Elsevier Science Publisher, The Netherlands.
- Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J. y Smeyers-Verbeke J. (1997) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Part A and B. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Mc Gregor R. (2004) Taste modification in the Biotech Era. *Food Technol.* 58 (5): 24-30.
- Mc Sweeney P.L.H. y Fox P.F. (1997) Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77 (1): 41-76.

- Mc Sweeney P.L.H. y Sousa M.J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* 90: 293-324.
- Mc Sweeney P.L.H. (2004) Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57 (2/3): 127-144.
- Menendez S., Centeno J.A., Rodríguez Otero J.L. y Otero J.R. (1999a). Enterococos en quesos. *Alimentaria* 36: 69-73.
- Menendez S., Centeno J.A. y Rodríguez Otero J.L. (1999b). Micrococos en quesos. *Alimentaria* 36: 65-68.
- Mercier J., Grosclaude F., y Ribadeau-Dumas B. (1971) Primary Structure of Bovine S1 Casein. Complete Sequence. *Eur J Biochem* 23: 41.
- Mercier J., Brignon G. y Ribadeau-Dumas B. (1973) Primary Structure of Bovine Kappa B Casein. Complete Sequence. *Eur. J. Biochem.* 35: 222.
- Mercier J.C., Chobert J.M., Addeo F. (1976) Comparative structure of the caseinmacropeptides from seven species. *FEBS Lett* 7: 208-214.
- Meyers R.H. y Montgomery D.C. (1995) Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments. John Willey & Sons, New York.
- Mitin Y.V., Braun K. y Kuhl P. (1997) "Papain catalyzed synthesis of glyceryl esters of N-protected amino acids and peptides for the use in trypsin catalyzed peptide synthesis" *Biootechnol. Bioeng.* 54: 287-290.
- Molina Ortiz, S., Puppo M.C. y Wagner J.R. (2004) Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates –carrageenan systems. *Food Hydrocolloids* 18: 1045-1053.
- Morr C.V. (1982) In: Developments in Dairy Chemistry. 1- Proteins. (P.F. Fox, Ed.). Applied Science, London, UK, p. 375.
- Morr C.V., German B., Kinsella J.E., Regenstein J.M., Van Buren J.P., Kilara A. Lewis, B.A. y Mangano M.E. (1985) A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J. Food Sci* 50: 1715-1718.
- Morr C.V. y Foegeding E.A. (1990) Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: A status report. *Food Technol.* 44 (4) 100-12.
- Murtaza, M.A., Ur-Rehman, S., Anjum, F.M., Huma, N., Hafiz, I. (2014) Cheddar Cheese Ripening and Flavor Characterization: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 54 (10): 1309-1321.
- Ney K. H. (1979). Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length. In: Food Taste Chemistry (J.C. Bondreau Ed.), Washington D.C. American Chemical Society.

- Noguchi M., Arai S., Yamashita M., Kato H. y Fujimaki M. (1975) Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate. *J. Agr. Food Chem.* 23 (1): 49-53.
- Novarom Sabores (2008) Quesos enzimáticamente modificados (2008) <http://www.novarom.com.ar/especificos1.htm>
- Novozymes (2007) <http://www.novozymes.com/en/MainStructure/ProductsAndSolutions/Dairy>
- Olsen H.S. y Adler-Nissen J. (1979) Industrial production and application of a soluble enzymatic hydrolyzate of soya protein. *Process Biochem.* 14: 6-11.
- Oliszewski, R., Wolf, I.V., Bergamini, C.V., Candioti, M., Perotti, M.C. (2013) Influence of autochthonous adjunct cultures on ripening parameters of argentinean goat's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 93 (11): 2730-2742.
- Oumer A., Garde S., Medina M. y Nuñez M. (1999) Defined starter system including a bacteriocin producer for the enhancement of cheese flavour. *Biotechnology Techniques* 13: 267-270.
- Pardo M.F y Natalucci C.L.(2002) Electrophoretic Analysis (Tricine-SDS-PAGE) of Bovine Caseins. *Acta Farm. Bonaerense* 21 (I): 57-60.
- Pearce K.N. y Kinsella J.E. (1978) Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26: 716-722.
- Phillips R.D. y Beuchat L.R. (1981) In: Protein Functionality in Foods (Cherry, J.P. Ed.) ACS symposium Series 147; American Chemical Society, Washington, DC, pp. 275-288.
- Picon A., Gaya P., Medina M. y Nuñez M. (1995) The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 78: 1238-1247.
- Picon A., Serrano C., Gaya P., Medina M. y Nuñez, M. (1996) The effect of liposome encapsulated cyprosin on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 79: 1699-1705.
- Picon A., Gaya P., Medina M. y Nuñez M. (1997) Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for cheese ripening. *Biotechnology Letters* 19: 345-348.
- Pilosof A.M.R. y Bartholomai G.B. (2000) Caracterización funcional y estructural de proteínas. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Eudeba (Editorial Universitaria de Buenos Aires), Buenos Aires, Argentina. 181 pág.

- Pires, C., Clemente, T. & Batista, I. (2013). Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 93 (4): 771-780.
- Piva M.; Pinnavaia G. y Lerici C.R. (1981) "Idratazione". In: Proprietà funzionali delle proteine. Consiglio Nazionale delle Ricerche, pp. 34-48.
- Prado Alderete B., Arancibia M., Fuentes M., Zazopulos M. y Del Moral A. (1993) Numerical taxonomic study of bacteria isolated from goat milk cheese using selective culture media. *Boletín Micológico* 8: 35-42.
- Prestrelski S.J., Tedeschi N., Arakawa T. y Carpenter J.F. (1993) Dehydration-induced conformational changes in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65: 661-671.
- Pripp A.H., Stepaniak L. y Sørhaug T. (2000) Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 10: 249-253.
- Qi M., Hettiarachchy N.S., y Kalapathy U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science*, 62: 1110-1115.
- Radha C., Ramesh Kumar P. y Prakash V. (2008) Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oilseed flour mixture. *Food Chem.* 106 (3): 1166-1174.
- Ribadeau-Dumas B (1993) *Protéines du lait: structure et fonctions*. In: Biologie de la lactation. (J. Martinet y L. M. Houdebine Eds). INRA. pp. 491-516.
- Richardson J.S. (1991) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34: 167-339
- Rodríguez J., Requena T., Goudedranche H., Maubois J. L. y Juárez M. (1996) Accelerated ripening of reduced fat semi-hard cheese from a mixture of cow's, goat's and ewe's ultrafiltered milk by using a Lac- Prt- strain of lactococci. *Lait*, 76: 513-522.
- Rosendal A. y Barkholt V. (2000) Detection of potentially allergenic material in 12 hydrolyzed milk formulas. *J. Dairy Sci.* 83 (10): 2200-2210.
- Saldo Periago J. (2002) "Cambios en las características de un queso de leche de cabra sometido a alta presión hidrostática. Aceleración de la maduración". Invención. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Seki, K., Komuri, Sh. & Ramachandran, S. (2013). Growth kinetics of circular liquid domains on vesicles by diffusion-controlled coalescence. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 25, 195105. DOI: 10.1088/0953-8984/25/19/19105.

- Shahab Lavasani, A.R., Ehsani, M.R., Mirdamadi, S., Ebrahim Zadeh Mousavi, M.A. (2012) Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. *International Journal of Dairy Technology* 65 (1): 64-70.
- Shigenaga T., Otagiri K. y Kanehisa H. (1984) Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. VII. Bitterness of the retro BPIa (Val-Ile-Phe-Pro-Gly-Arg). *Bulletin of the Chemistry Society of Japan* 57: 103-106.
- Shin, Y.K.a, Oh, N.S.a, Nam, M.S Changes of organic acids and free fatty acids during the ripening of emmental cheese (2011) *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 31 (6): 928-934.
- Silva S.V., Pihlanto A. y Malcata F.X. (2006) Bioactive peptides in ovine and caprine cheese-like systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *J. Dairy Sci.* 89 (9): 3336-3344.
- Sorgentini D.A., Wagner J.R. y Añón M.C. (1995) Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2471-2479.
- Sturniolo H. y Barberis S. (2007) Statistical design of experiments (DOE) applied to the study of new functional cheese derivatives. *Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides alimentarios*. Buenos Aires. Argentina.
- Sumathi T., Srilakshmi A., Kotakadi V.S. y Saigopal D.V.R. (2014) Role of fungal enzymes in polymer degradation: A mini review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5 (2): 1694 – 1711.
- Surówka K., Zmudzinski D. y Surówka J. (2004) Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends Food Sci. Tech.* 15: 153-160.
- Tang C.H., Yang X.Q., Chen Z., Wu H. y Peng Z.Y. (2005) Physicochemical and structural properties of sodium caseinate biopolymers induced by microbial transglutaminase. *J. Food Biochem.* 29: 402-421.
- Thakar P.N. y Upadhyay K.G. (1992) Cheese curd slurry - a review. *Cultured Dairy Products Journal* 27, 9: 11-9, 12.
- Tzanetakis N. y Litopoulou Tzanetaki E. (1989) Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 7: 73-80.
- Unilever Food Solutions Argentina (2008) [http:// www.unileverfs.com.ar/productos](http://www.unileverfs.com.ar/productos)
- Urbanski G.E., Wei L.S., Nelson A.I. y Steinberg M.P., (1982). Rheology and water imbibing of major fractions of soybean beverage. *Journal of Food Science* 47: 1021–1022.

- Vairo Cavalli S., Silva S.V., Cimino C., Malcata F.X. y Priolo N. (2008) Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chem.* 106 (3): 997-1003.
- Van der Weert M., Haris P.I., Hennink W.E. y Crommelin D.J.A. (2001) Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: effect of sampling methods and stress factors. *Anal. Biochem.* 297: 160-169.
- Visser S. (1993) Proteolytic enzymes y their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science* 76: 329-350.
- Wagner J.R. y Añón M.C. (1990) Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. *J. Food Sci.* 55: 765-770.
- Wallace J.M. y Fox P.F. (1997) Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *International Dairy Journal* 7: 157-167.
- Whitaker J.R. (1974) In: Food Related Enzymes (J.R. Whitaker, Eds.). Advances in Chemistry Series 136, American Chemical Society, Washington DC, pp. 31-78.
- Whitaker J.R. (1977) In: Food Proteins: Improvement through chemical and enzymatic modification (R.E. Feeney, J.R. Whitaker, Eds.). Advances in Chemistry Series, 160; American Chemical Society: Washington, DC, pp. 95-155.
- Whitaker J.R. y Puigserver A.J. (1982) In: Modification of proteins: food, nutritional and pharmacological aspects (R.E. Feeney, J.R. Whitaker, Eds.). *Advances in Chemistry Series* 198, American Chemical Society, Washington DC, pp. 57-87.
- Wijeratne W.B. (2005) Propiedades funcionales de las proteínas de soya en un sistema de alimentos. *Revista Industria Alimentaria*. Nov.-Dic. 2005. <http://www.alfaeditores.com/alimentaria>.
- Williams A.G. y Banks J.M. (1997) Proteolytic and Other Hydrolytic Enzyme Activities in Non-starter Lactic acid Bacteria (NSLAB) Isolated from Cheddar Cheese Manufactured in the United Kingdom. *Int. Dairy Journal* 7: 763-774.
- Wu C.F.J. y Hamada M. (2000). Experiments. Planning, Analysis and Parameter Design optimization. Wiley Series in Probability and Statistics. Wiley Interscience Publication. Pag. 409.
- Xue, F., Li, C., Zhu, X., Wang, L., Pan, S. (2013) Comparative studies on the physicochemical properties of soy protein isolate-maltodextrin and soy protein isolate-gum acacia conjugate prepared through Maillard reaction. *Food Research International* 51 (2). 490-495.

- Xu, W., Chi, Y.-J., Chen, C. (2012) Improvement of egg albumen powder functional properties by the Maillard reaction in a dry state. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 10 (2): 186-189.
- Yamasaki Y. y Maekawa K. (1978) A peptide with delicious taste. *Agr. Biol. Chem.* 42 (9): 1761-1765.
- Yang, J., Wang, C.-G., Peng, J., Yang, X.-Q. (2014) Functional properties of soy protein enriched with soybean isoflavones *Modern Food Science and Technology* 30 (7): 98-102 and 178
- Yao J. J., Wei L.S., y Steinberg M.P. (1988). Water-imbibing capacity and rheological properties of isolated soy proteins. *Journal of Food Science* 53: 464–467.
- Zheng, L., Zhao, Y., Xiao, C., Sun-Waterhouse, D., Zhao, M. y Su, G (2015) Mechanism of the discrepancy in the enzymatic hydrolysis efficiency between defatted peanut flour and peanut protein isolate by Flavorzyme. *Food Chem.*, 168: 100-106.
- Zupan J. y Gasteiger J. (1999) *Neural Networks in Chemistry and Drug Design*. 2nd Edition, Wiley-VCH, Weinheim.

REIVINDICACIONES

1-Procedimiento para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra, CARACTERIZADO PORQUE comprende las etapas de:

a-hidrolizar dispersiones acuosas de queso de cabra mediante el agregado de diferentes cantidades de una enzima proteolítica en un buffer donde los siguientes factores de proceso oscilan dentro de los siguientes rangos:

- la temperatura oscila entre 25 y 85 °C
- el tiempo de hidrólisis oscila entre 25 y 320 min:
- la cantidad de buffer agregado oscila entre 8 a 36 g de buffer / g de proteína,
- la relación enzima/sustrato oscila entre $4,4 \cdot 10^{-3}$ y 0,3,
- el pH de las dispersiones oscila entre 4 y 10,

donde los experimentos de hidrólisis se llevan a cabo aplicando un diseño Estadístico Experimental Doehlert multinivel (DOE),

b-determinar la variación de al menos un parámetro funcional del queso y de los hidrolizados proteicos obtenidos en el paso a), para diferentes condiciones de temperatura, tiempo de hidrólisis, cantidad de buffer agregado, relación enzima:sustrato y pH dentro de los rangos definidos en el paso a),

donde dichos parámetros funcionales se seleccionan del grupo que comprende al menos una de los siguientes: el nitrógeno amínico libre (NA), el nitrógeno soluble total (NT), el índice de solubilidad de proteínas (ISP), la viscosidad, la capacidad de absorción de agua (WHC), la agua retenida (HW), el índice de actividad emulsificante (IAE), el índice de estabilidad de la emulsión (IEE), la capacidad espumante (FC), la estabilidad de la espuma (FS) y la hidrofobicidad superficial (So),

c-determinar la ecuación que modela cada parámetro funcional obtenidos en la etapa b) en función de al menos un factor de proceso definido en la etapa a) mediante técnicas quimiométricas, y

d-determinar los parámetros funcionales óptimos de los hidrolizados proteicos en función del sistema alimentario al cual van a ser incorporados utilizando un análisis para múltiples respuestas que incluyen gráficos de contorno y de funciones de deseabilidad.

2-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE además incluye la etapa de evaluar el grado de hidrólisis obtenido, en las condiciones previamente establecidas, mediante métodos cromatográficos (HPLC) y electroforéticos (SDS-PAGE).

3-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para el nitrógeno amínico libre está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{2,2} \cdot X_2^2 + \beta_4 \cdot X_4 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (18)}$$

Y : NA (nitrógeno amínico libre, g/ml),	β_0 :	0,1
X_2 : pH	β_2 :	-2,331
X_4 : temperatura	$\beta_{2,2}$:	0,167
X_5 : cantidad de buffer agregado	β_4 :	0,1635
	β_5 :	0,38
	$\beta_{4,5}$:	$-7,3 \times 10^{-3}$

4-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para el nitrógeno soluble total está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{1,5} \cdot X_1 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (21)}$$

Donde:

Y: NT (nitrógeno soluble total, g/l)	β_0 :	3,9684
X_1 : relación E:S (enzima/sustrato)	β_1 :	0,6912
X_2 : pH	β_2 :	0,6162
X_4 : temperatura	β_5 :	- 0,9961
X_5 : cantidad de buffer agregado	$\beta_{1,5}$:	- 2,3322
	$\beta_{4,5}$:	2,5061

5-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para el índice de solubilidad de proteínas está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_5 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (23)}$$

Donde:

Y: ISP (índice de solubilidad de proteínas, %)	β_0 :	50,35
X_5 : cantidad de buffer agregado	β_5 :	11,67

6-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para la viscosidad está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_4 \cdot X_4 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (25)}$$

Donde:

Y: η (viscosidad, cP)	β_0 :	1,5044
X_1 : relación E:S	β_1 :	0,0812
X_2 : pH	β_2 :	0,0710
X_3 : tiempo de hidrólisis	β_3 :	0,0425
X_4 : temperatura	β_4 :	0,1346
X_5 : cantidad de buffer agregado	β_5 :	- 0,0762
	$\beta_{4,5}$:	- 0,1133

7-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para índice de actividad emulsificante está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_{1,3} \cdot X_1 \cdot X_3 \quad \text{ecuación (27)}$$

Donde:

Y: IAE (índice de actividad emulsificante, m²/g) β_0 : 134,01

X_1 : relación E:S (enzima/sustrato) $\beta_{1,3}$: 106,64

X_3 : tiempo de hidrólisis

8-El procedimiento para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para el índice de estabilidad de la emulsión está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{1,4} \cdot X_1 \cdot X_4 + \beta_{2,2} \cdot X_2^2 \quad \text{ecuación (29)}$$

Donde:

Y: IEE (índice de estabilidad de la emulsión, min) β_0 : 52,5

X_2 : pH β_5 : -13,5

X_1 : relación E:S $\beta_{1,4}$: -41,5

X_4 : temperatura $\beta_{2,2}$: -13,3

X_5 : cantidad de buffer agregado

9-El procedimiento para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de cabra de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para la estabilidad de la espuma está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_3 \cdot X_3 \quad \text{ecuación (30)}$$

Donde:

Y : FS (estabilidad de la espuma, seg/ml) β_0 : 0,756

X_3 : tiempo de hidrólisis β_3 : -0,500

10-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para la capacidad de retención de agua está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_5 \cdot X_5 \quad \text{ecuación (32)}$$

Donde:

Y : WHC (capacidad de retención de agua, g de H₂O/g de residuo)

	β_0 :	1,4325
X_1 : relación E:S	β_1 :	0,5221
X_2 : pH	β_2 :	0,4556
X_5 : cantidad de buffer agregado	β_5 :	0,5905

11-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para el agua retenida está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{4,5} \cdot X_4 X_5 + \beta_{5,5} \cdot X_5^2 \quad \text{ecuación (33)}$$

Donde:

Y : HW (agua retenida, %)	β_0 :	0,144
X_4 : temperatura	β_5 :	0,052
X_5 : cantidad de buffer agregado	$\beta_{4,5}$:	0,172
	$\beta_{5,5}$:	0,087

12-El procedimiento para para predecir, controlar y optimizar las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos de queso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el modelo obtenido en la etapa c) para la hidrofobicidad superficial está representado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_5 \cdot X_5 + \beta_{3,4} \cdot X_3 \cdot X_4 \quad \text{ecuación (34)}$$

Donde:

Y : So (hidrofobicidad superficial, IF (mg de proteína/ml))

	β_0 :	4,53
X ₁ : relación E:S	β_1 :	-4,67
X ₃ : tiempo de hidrólisis	β_5 :	-2,47
X ₄ : temperatura	$\beta_{3,4}$:	-7,61
X ₅ : cantidad de buffer agregado		

13-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE dicha enzima proteolítica es una enzima de origen vegetal.

14-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADO PORQUE dicha enzima proteolítica de origen vegetal es papaína.

15- El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, CARACTERIZADO PORQUE el pH oscila entre 5 y 9.

16-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la relación enzima: sustrato oscila entre $45,5 \cdot 10^{-3}$ y 0,22 (mg /g de caseína del queso).

17-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la temperatura oscila entre 35 y 70° C.

18-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE los tiempos de hidrólisis oscilan entre 30 y 270 min.

19-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la cantidad de buffer oscila entre 8 a 36, preferentemente entre 10 y 30 (g de buffer / g de proteína).

20-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el sistema alimentario se selecciona entre salsas y sopas, mousse de queso, productos de panificación y aceleradores de la maduración de otros quesos duros.

21-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE los rangos óptimos de las variables del proceso de hidrólisis que permiten obtener un hidrolizado de queso de cabra para un aditivo para panificación son los siguientes:

- Relación E:S: 0,12 – 0,22 mg de papaína/g de caseína,

- Cantidad de buffer agregado: 20-30 g/g de proteína,
- pH: 8 – 9,
- Tiempo de hidrólisis: 50 a 100 min, 175 a 270 min,
- Temperatura: 40 a 50°C y 60 a 70 °C.

22-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE los rangos óptimos de las variables del proceso de hidrólisis que permiten obtener un hidrolizado de queso de cabra para aditivo de salsas y sopas son los siguientes:

- Relación E:S: en todo el rango de la variable, pero las óptimas respuestas se obtienen en el rango de valores intermedios/altos,
- Cantidad de buffer agregado: 13 - 22 g/g de proteína,
- pH: 5 – 9,
- Tiempo de hidrólisis: 75 – 270 min,
- Temperatura: 52 – 70 °C.

23-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE los rangos óptimos de las variables del proceso de hidrólisis que permiten obtener un hidrolizado de queso de cabra para aditivo para aceleradores del tiempo de maduración de otros quesos duros son los siguientes:

- Relación E:S: 0,20 a 0,25 g/g de caseína de queso,
- Cantidad de buffer agregado: 10 a 20 g/g de proteína,
- pH: 6 – 9,
- Tiempo de hidrólisis: 270 min,
- Temperatura: 45 – 52 °C.

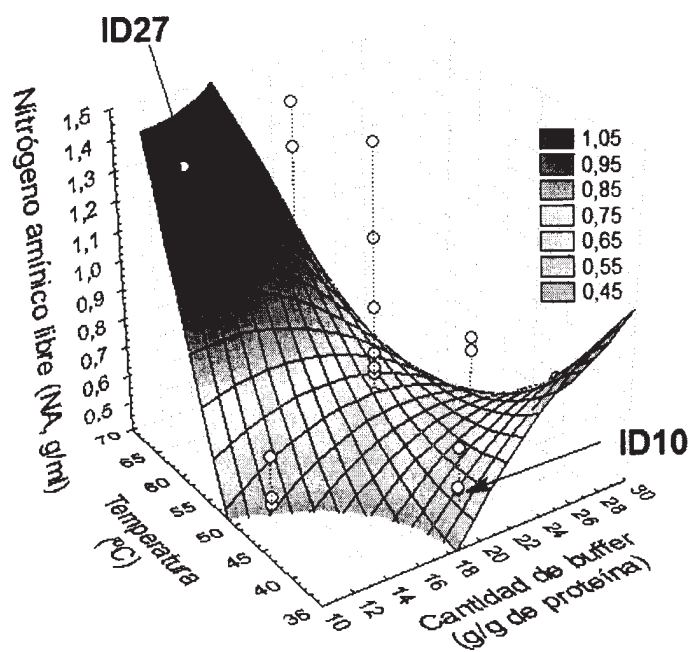


Figura 1

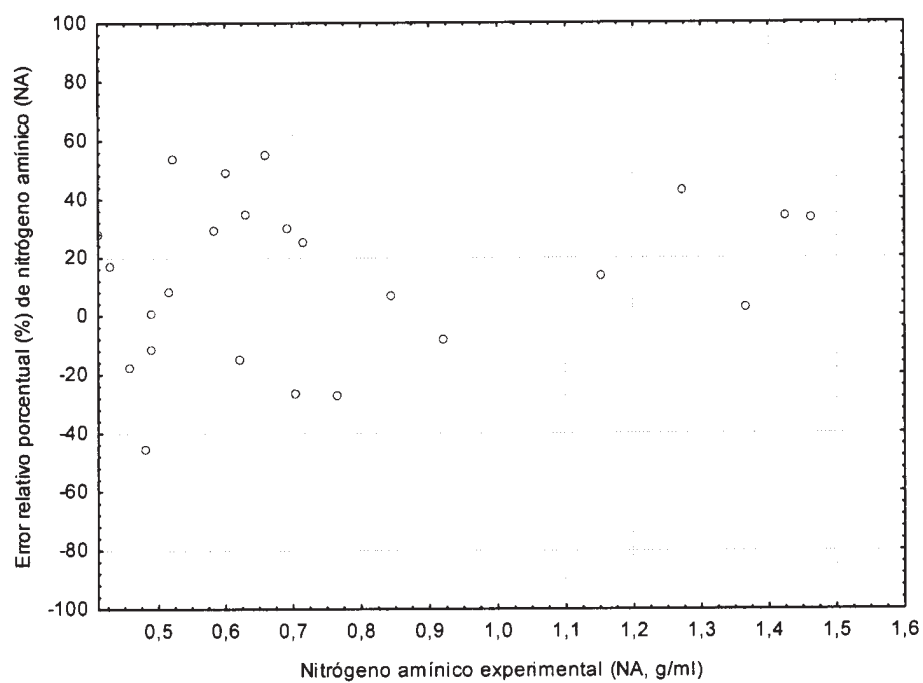


Figura 2

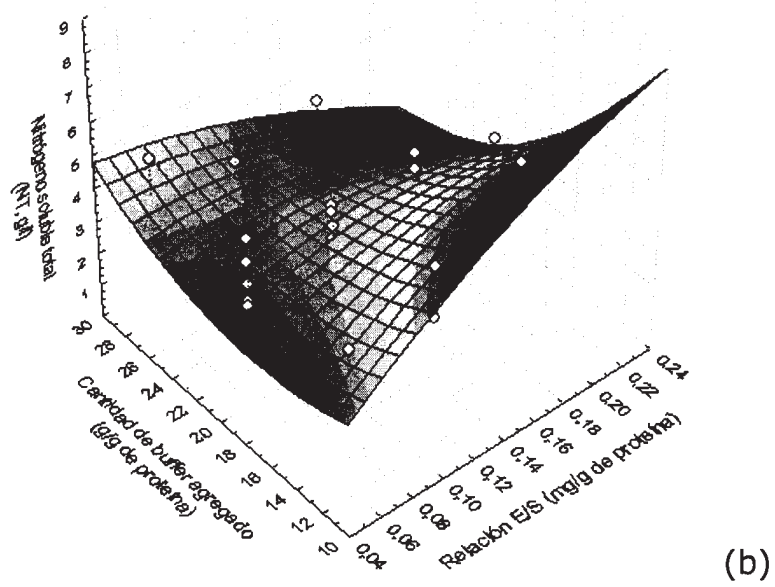
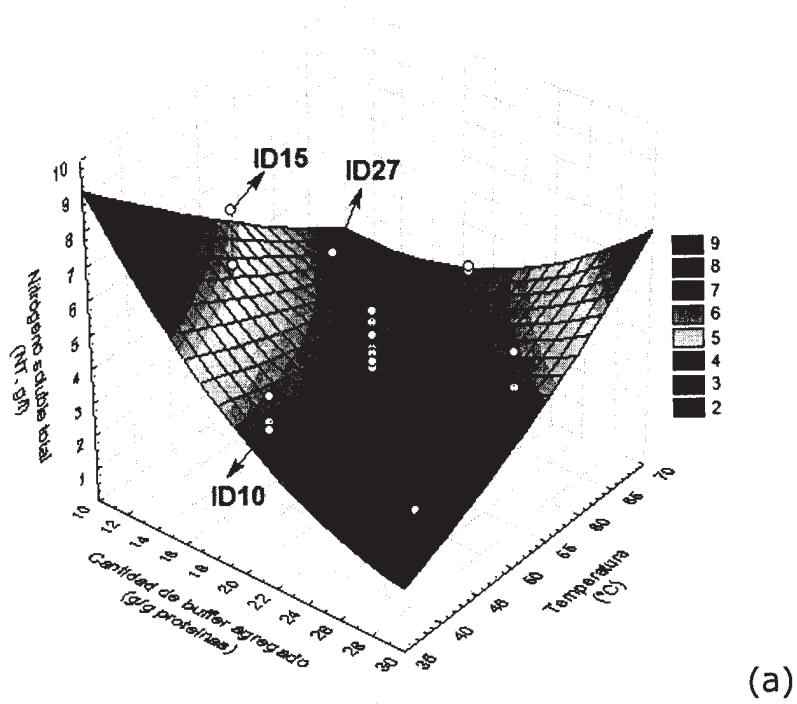


Figura 3

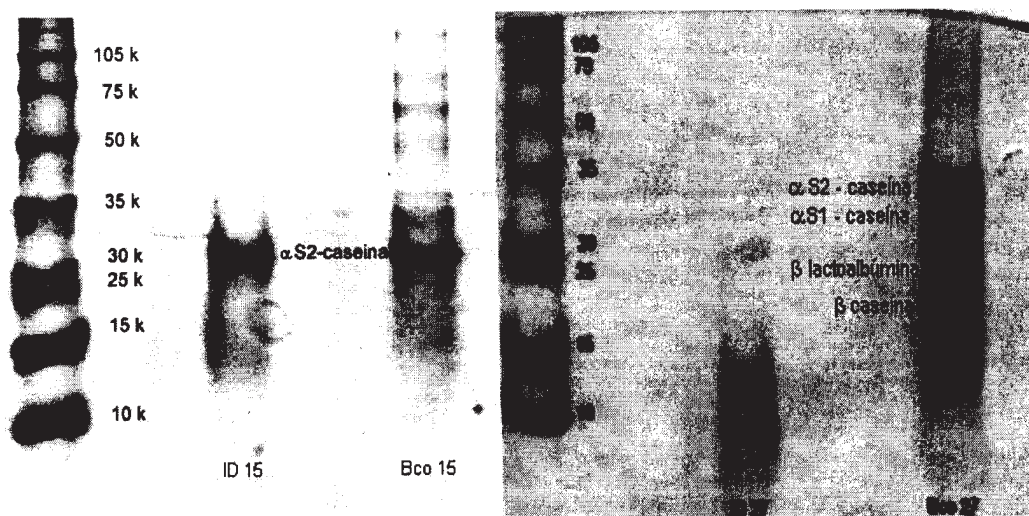


Figura 4

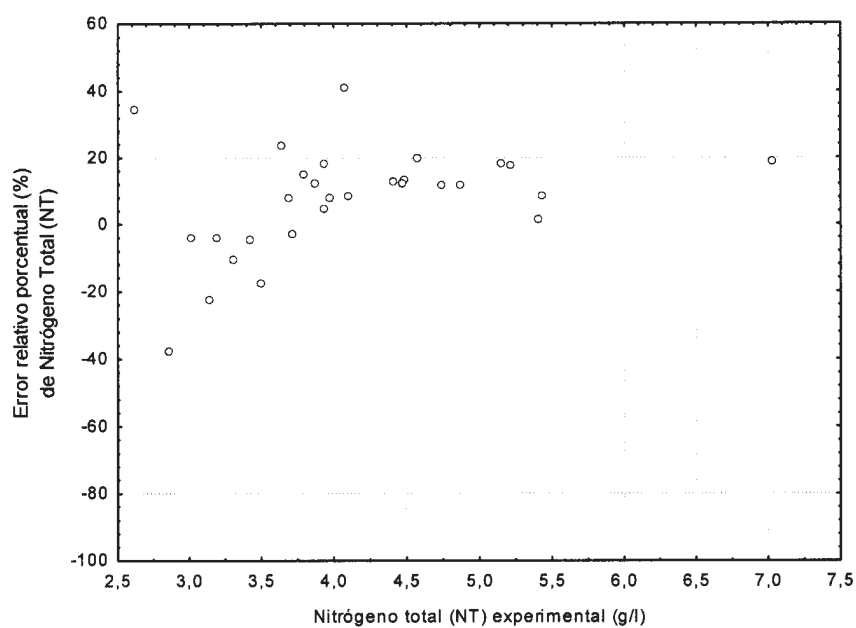


Figura 5.

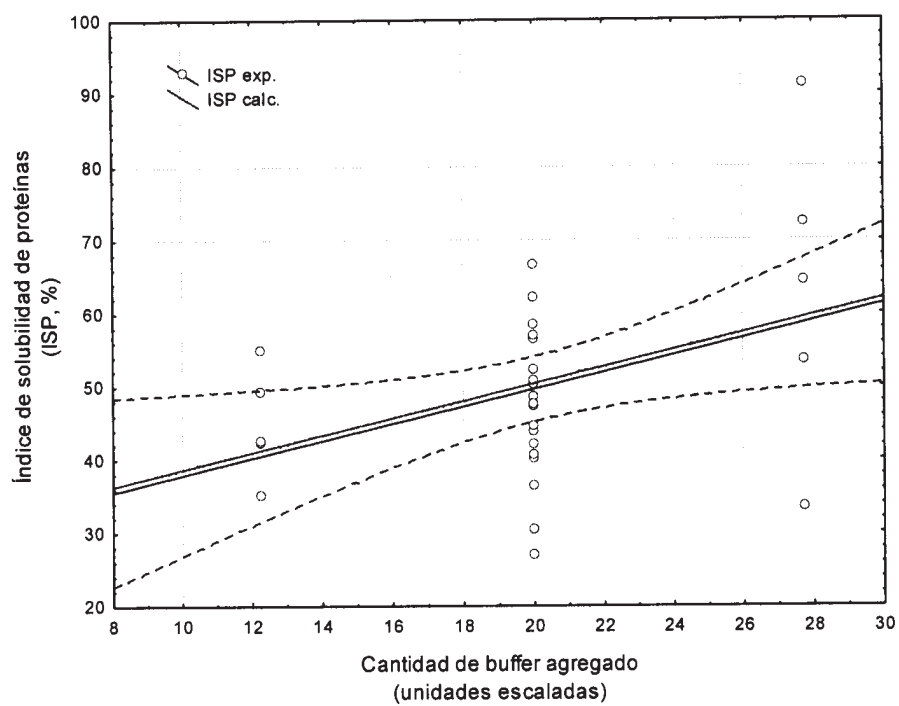


Figura 6

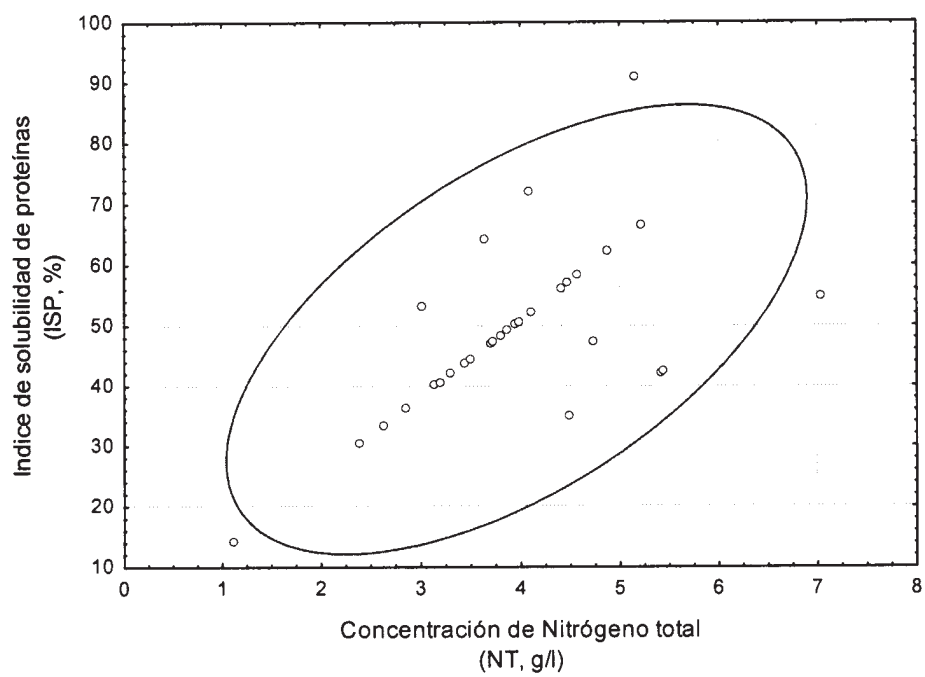


Figura 7

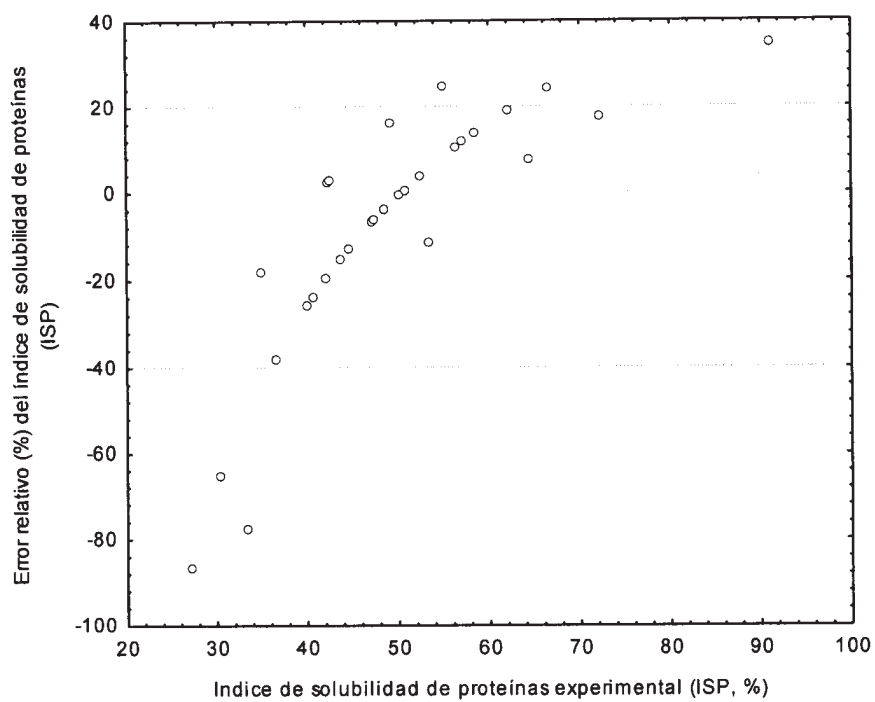


Figura 8

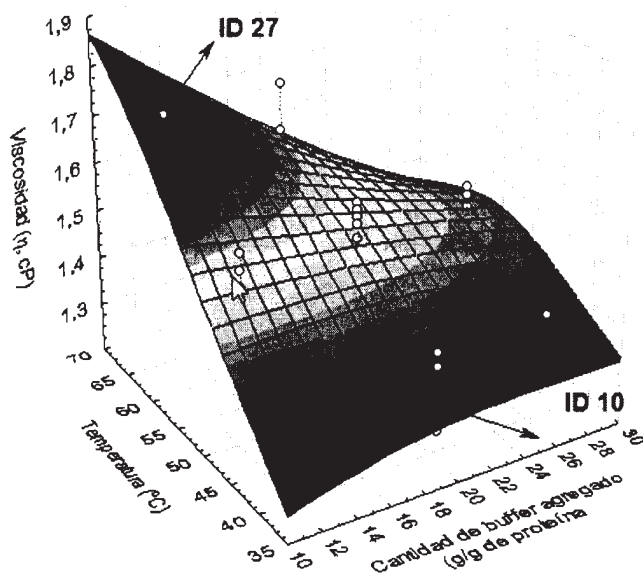


Figura 9

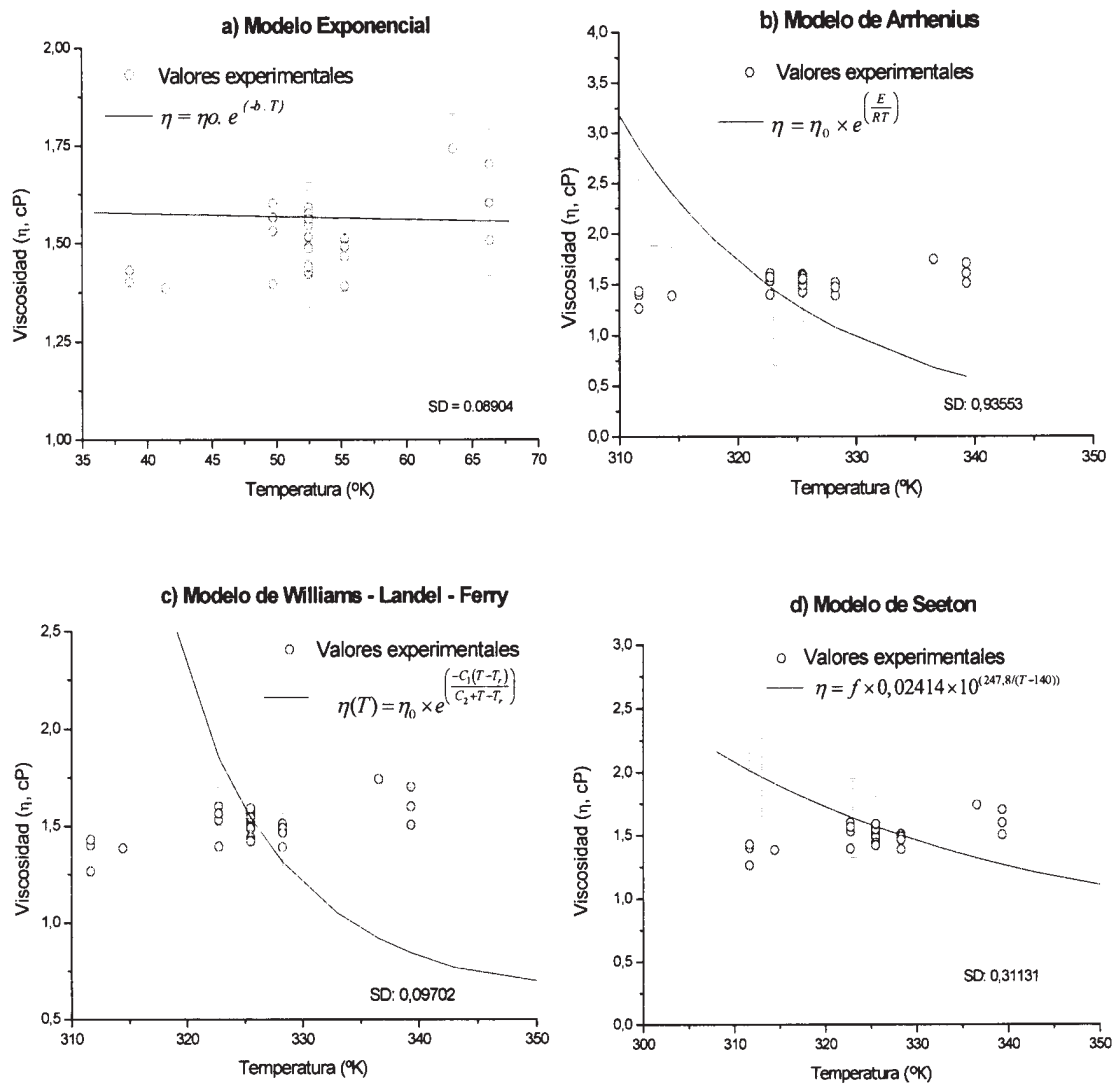


Figura 10

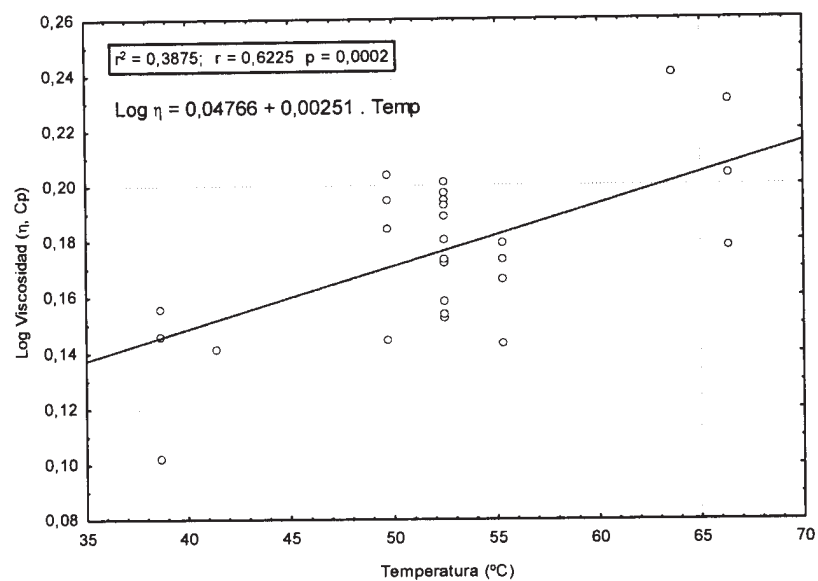


Figura 11

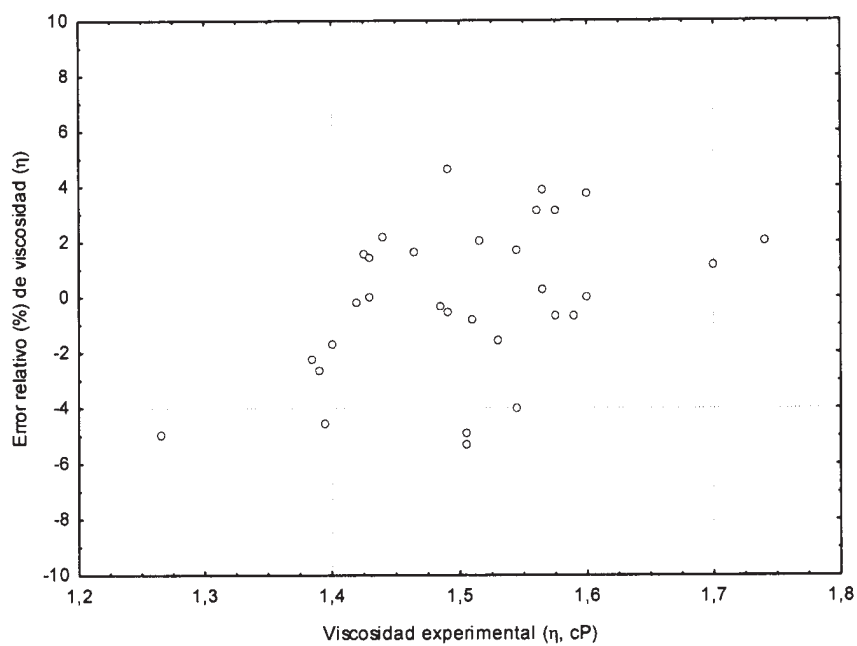


Figura 12

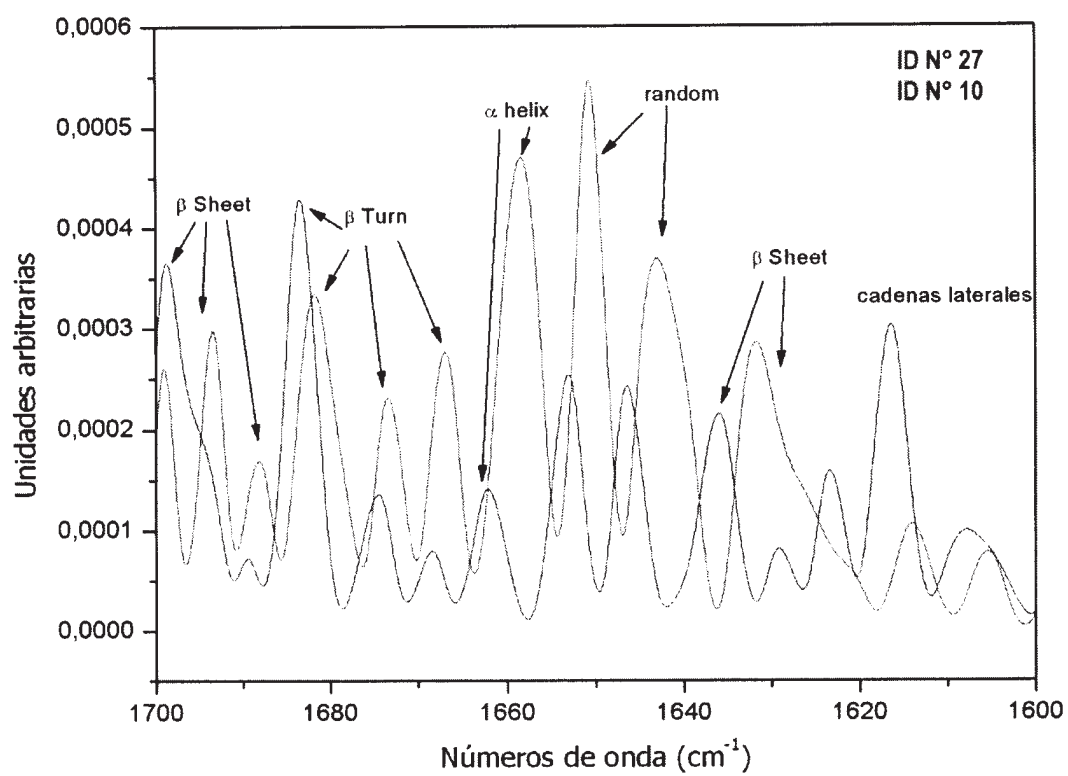


Figura 13

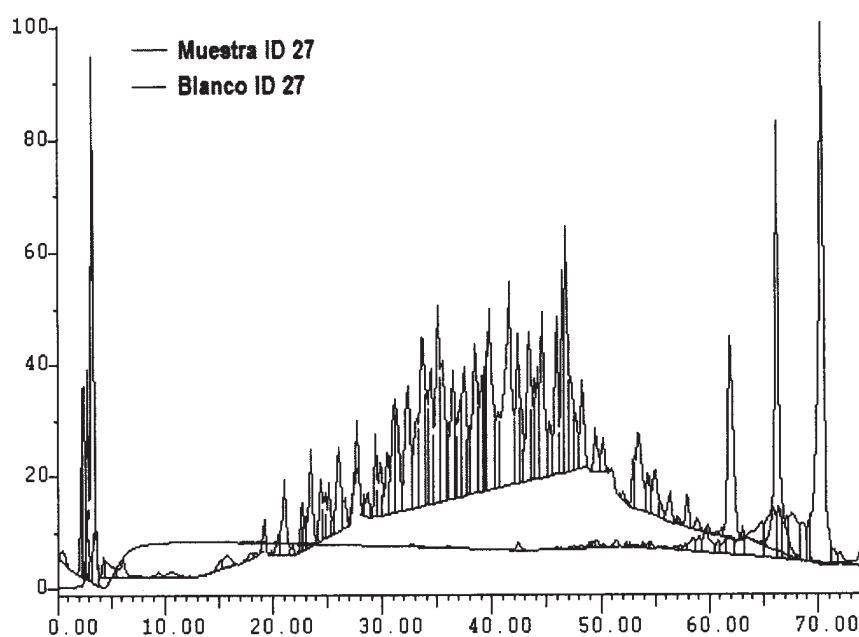
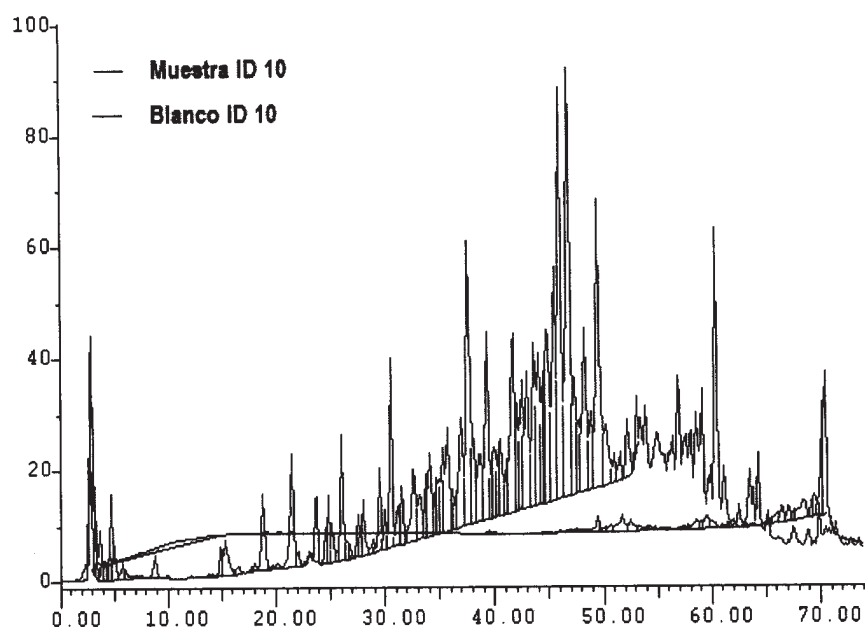


Figura 14

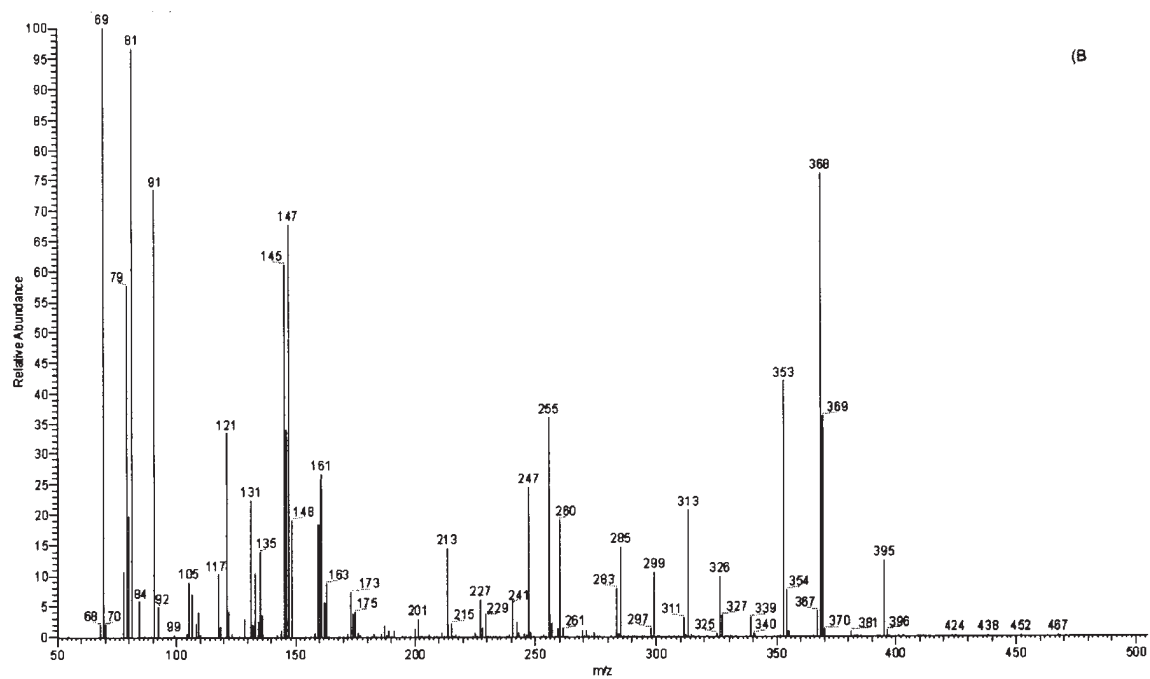
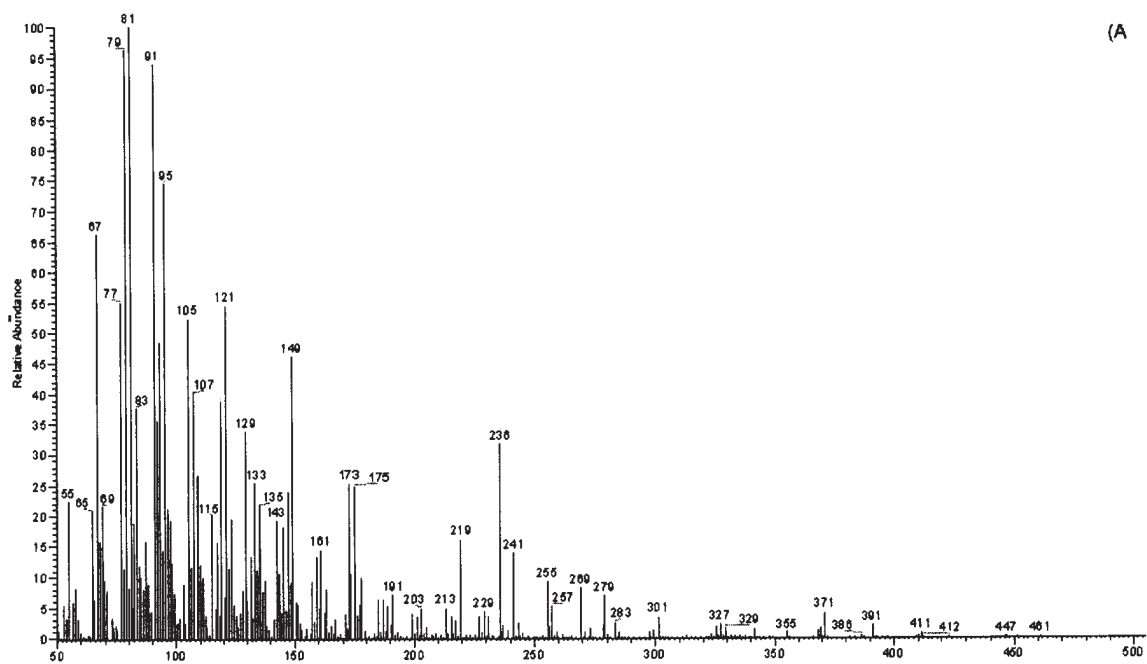


Figura 15

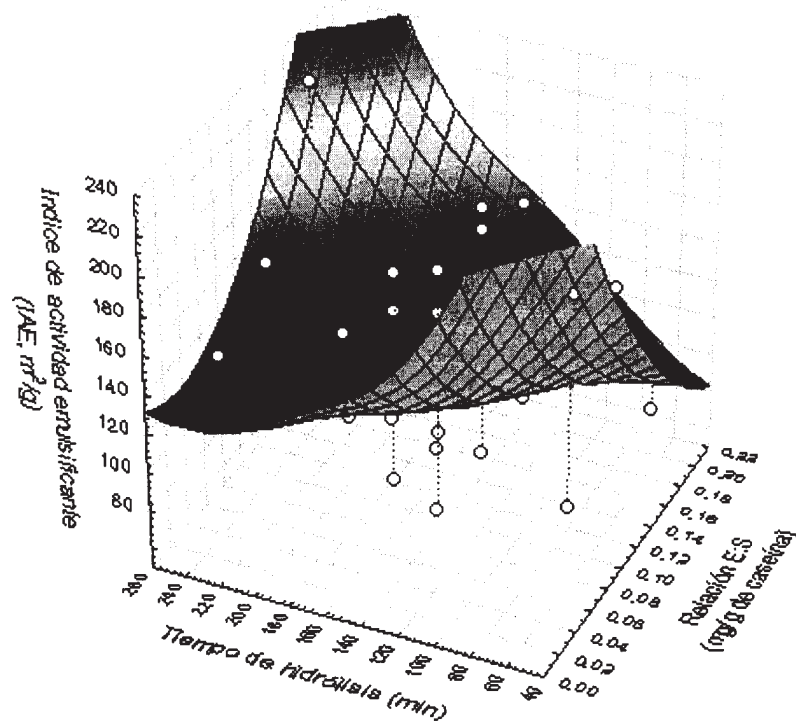


Figura 16.

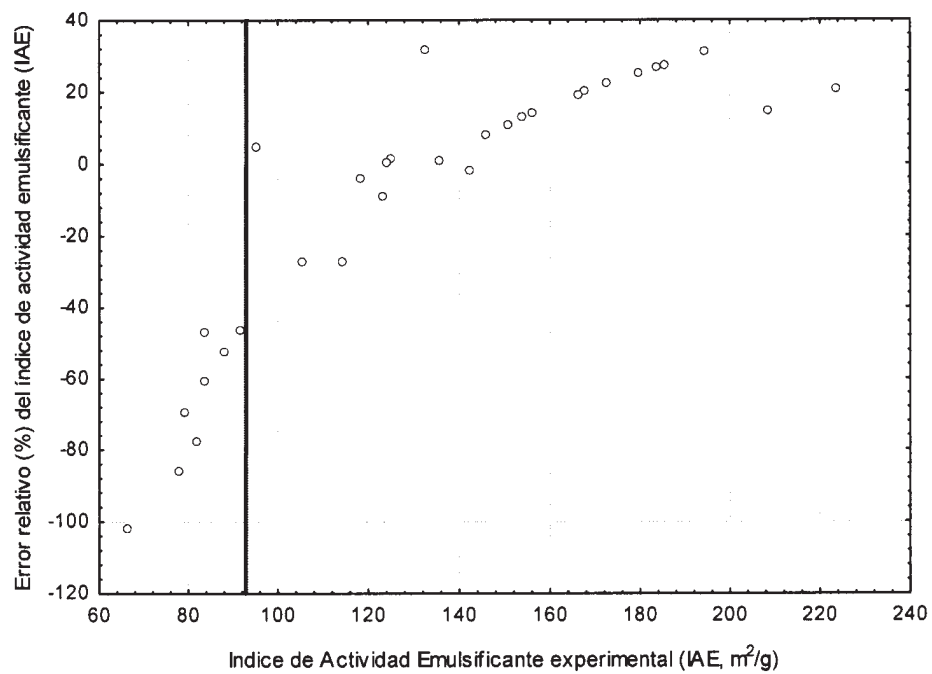


Figura 17

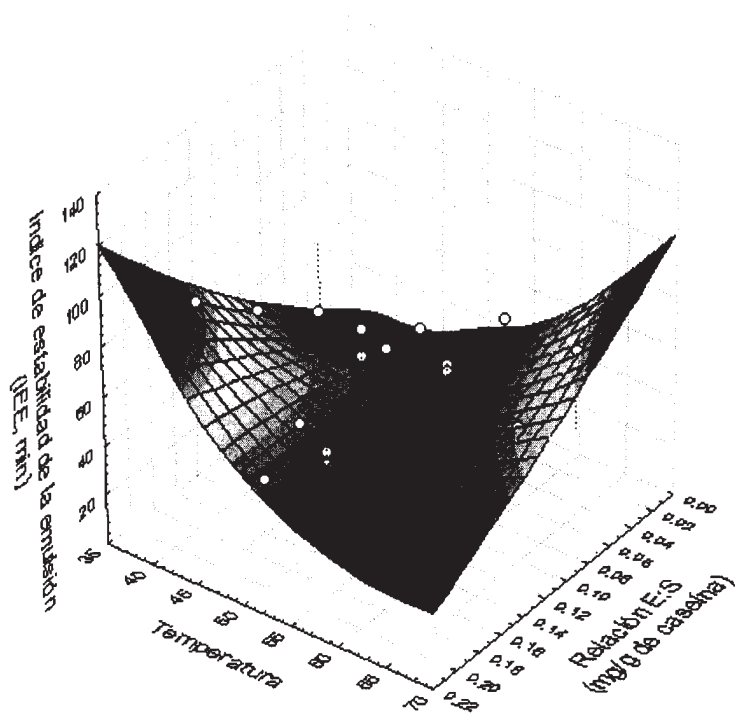


Figura 18

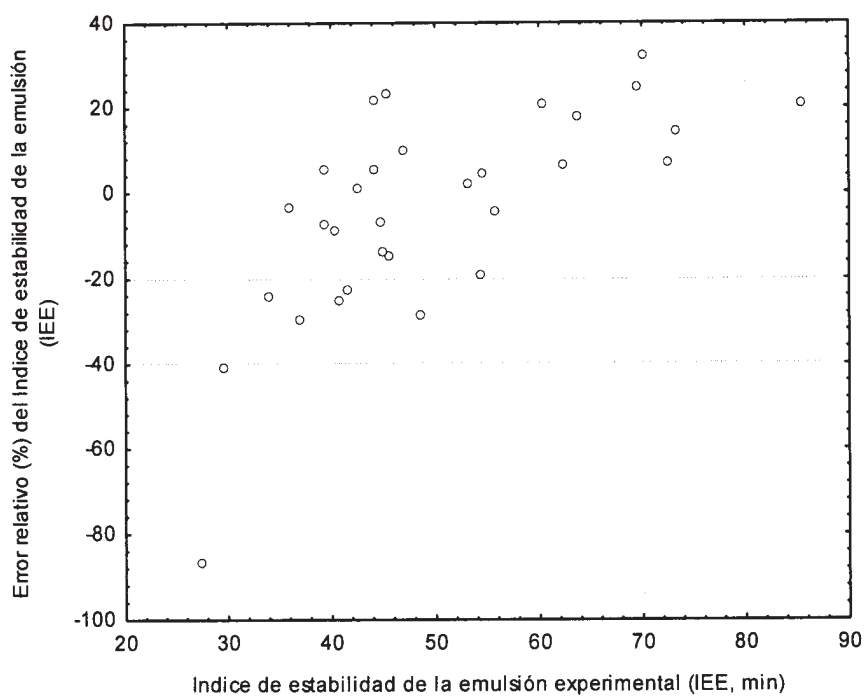


Figura 19

Independencia de FC respecto de las variables estudiadas

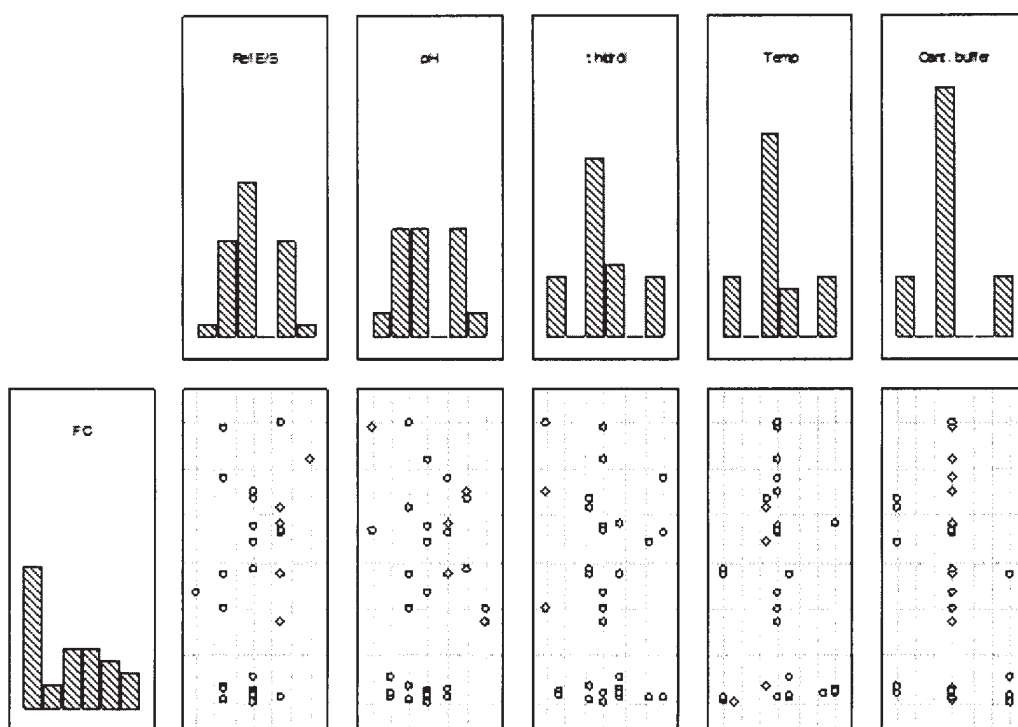


Figura 20

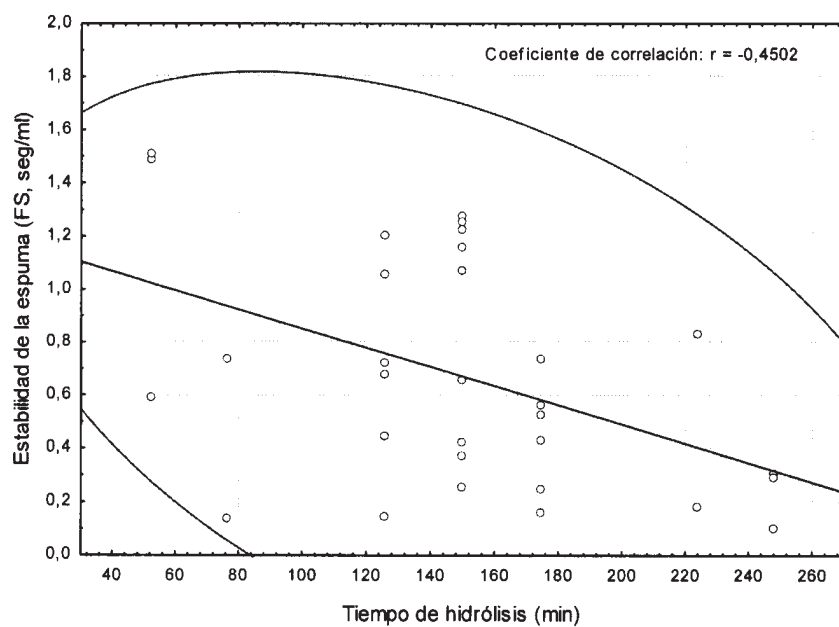


Figura 21

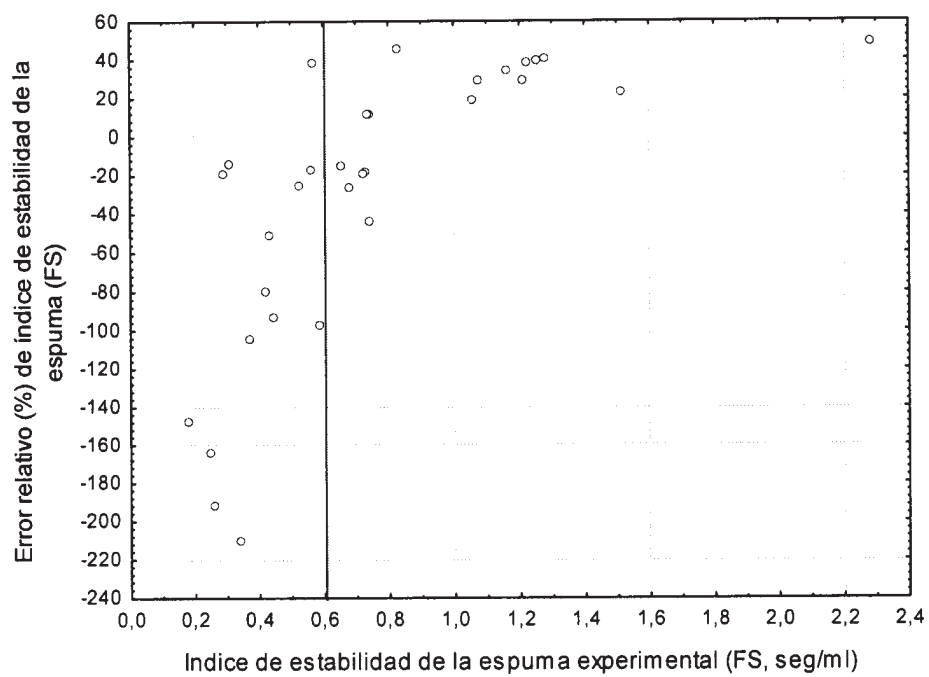
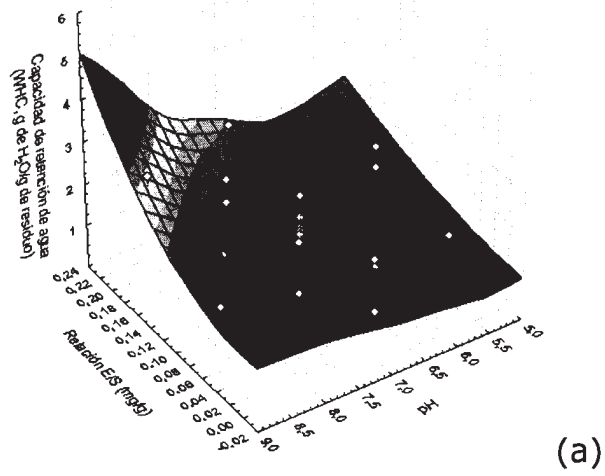
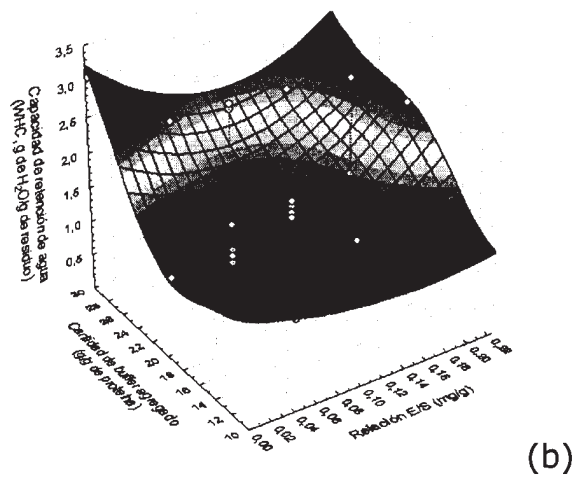


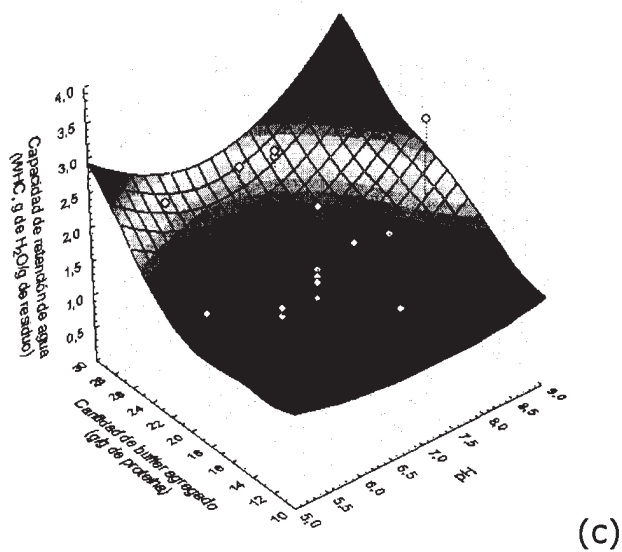
Figura 22



(a)



(b)



(c)

Figura 23

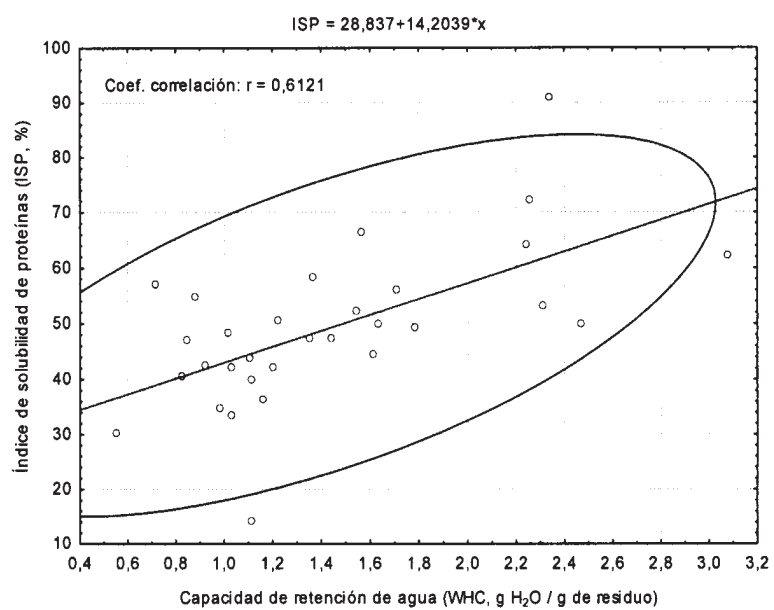


Figura 24

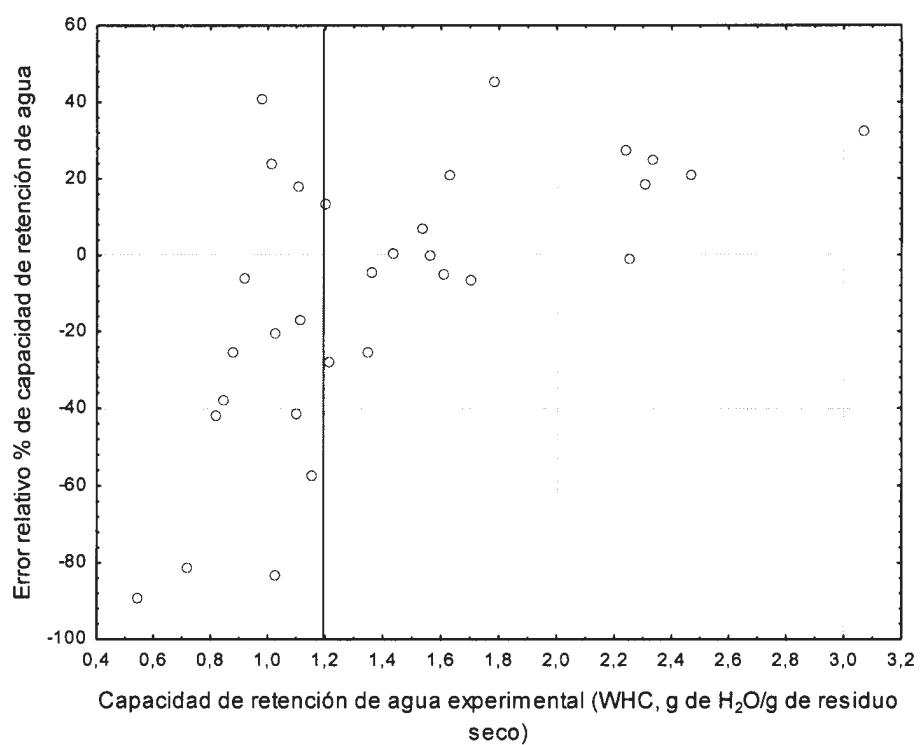


Figura 25

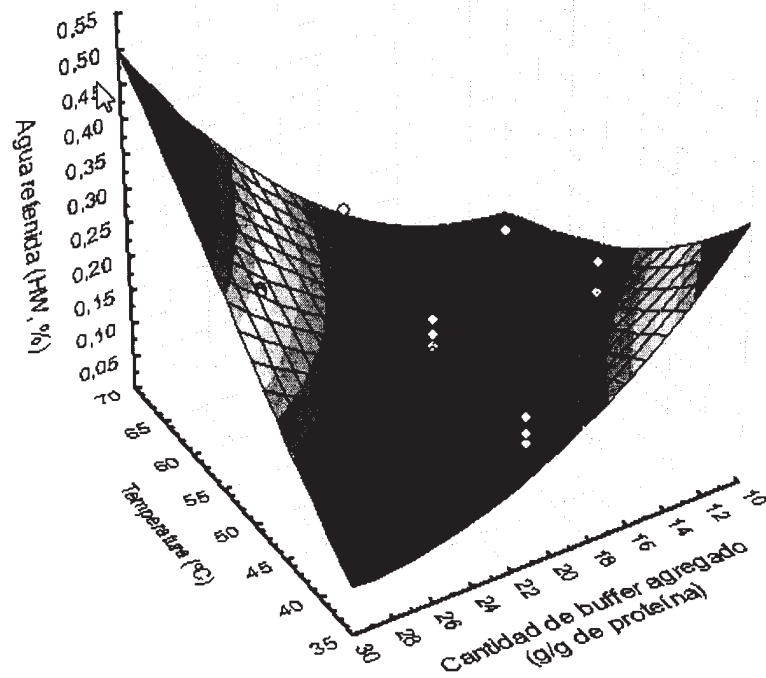


Figura 26

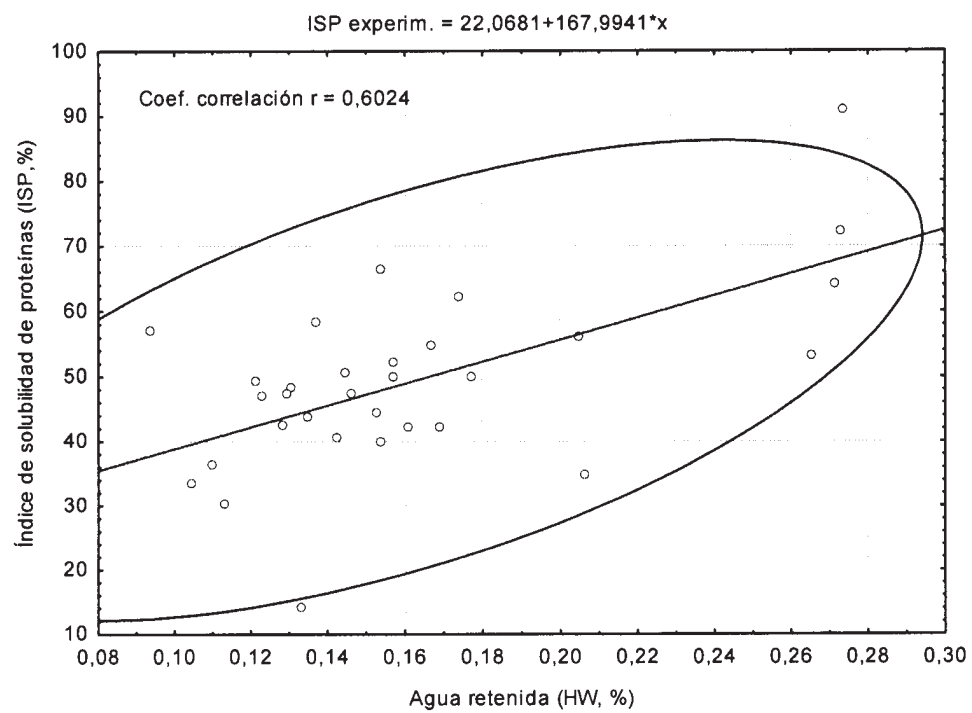


Figura 27

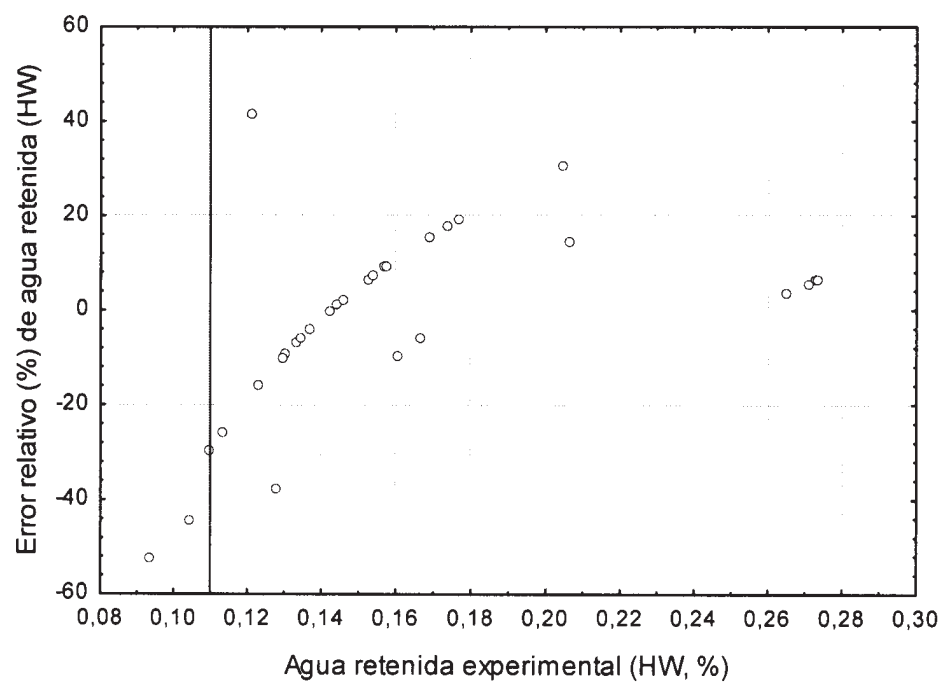


Figura 28

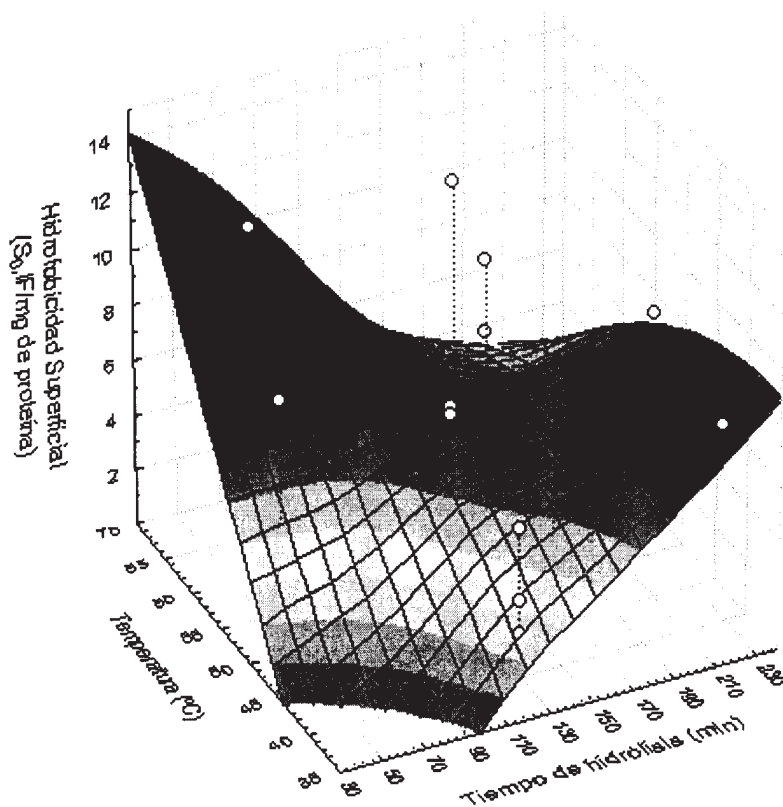


Figura 29

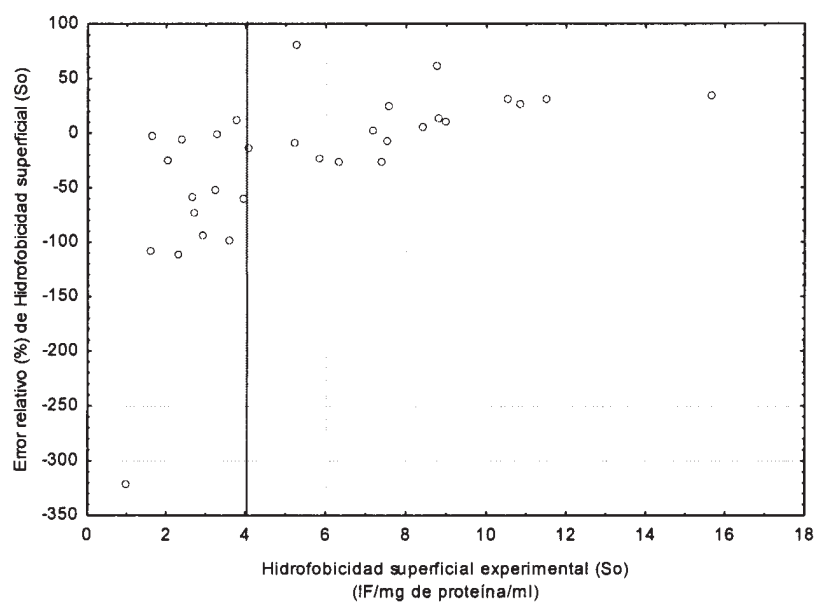


Figura 30

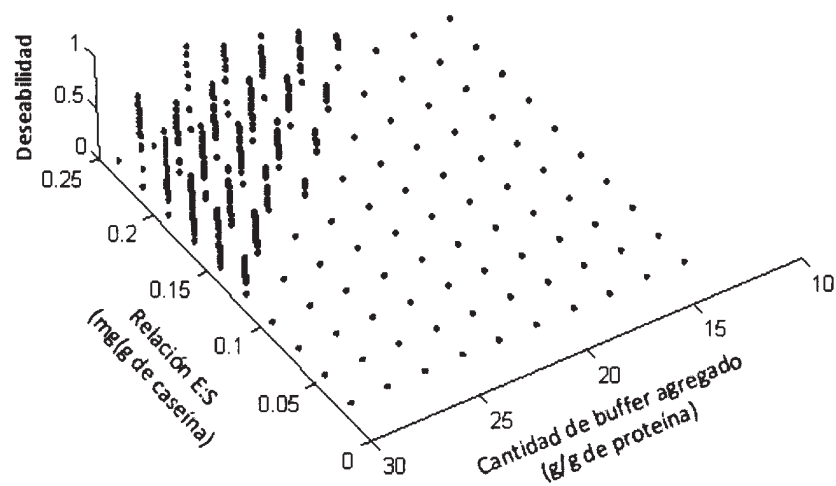
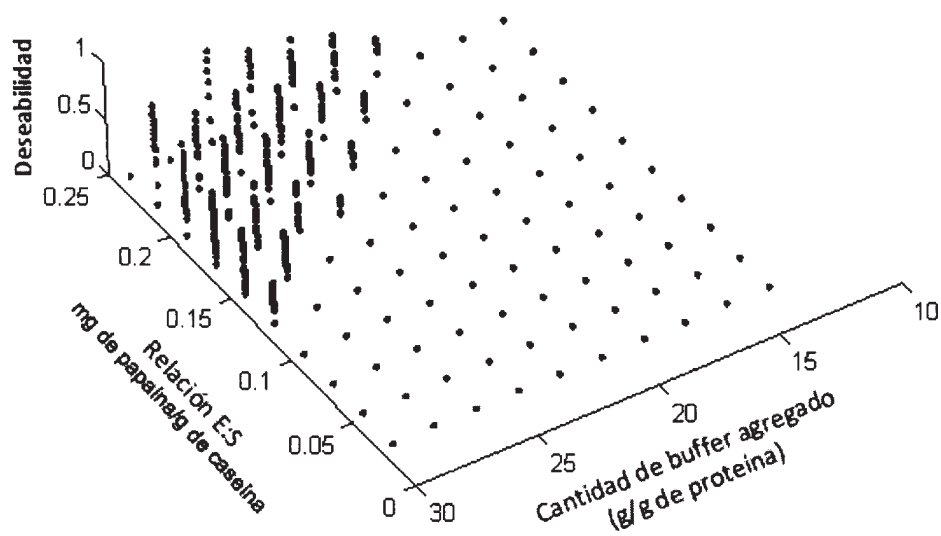


Figura 31

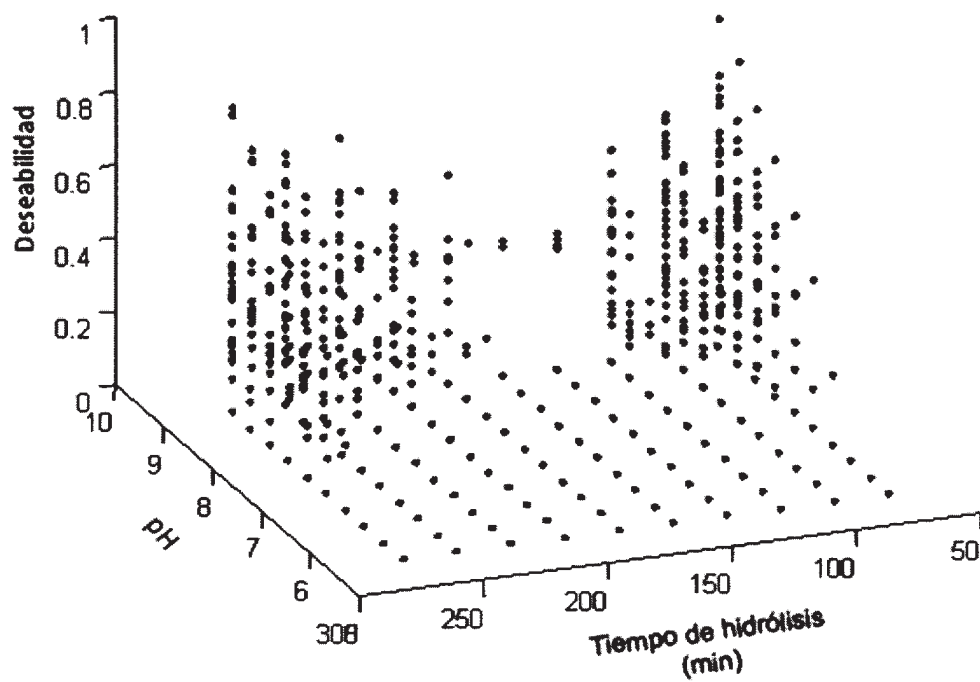


Figura 32

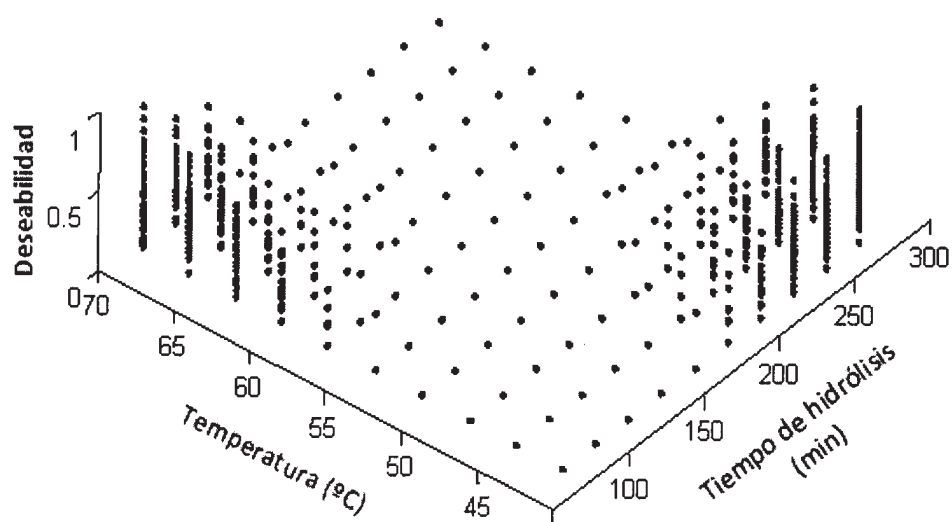


Figura 33

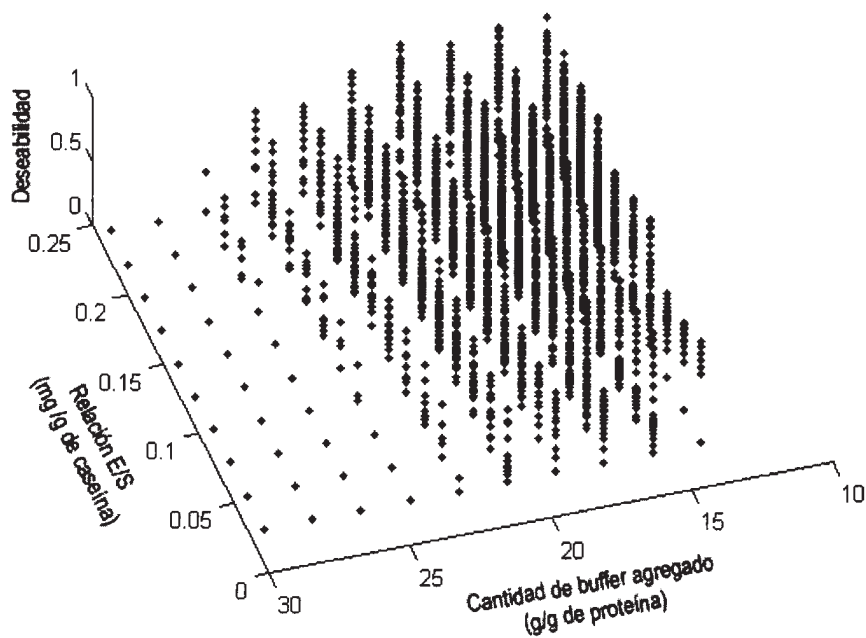
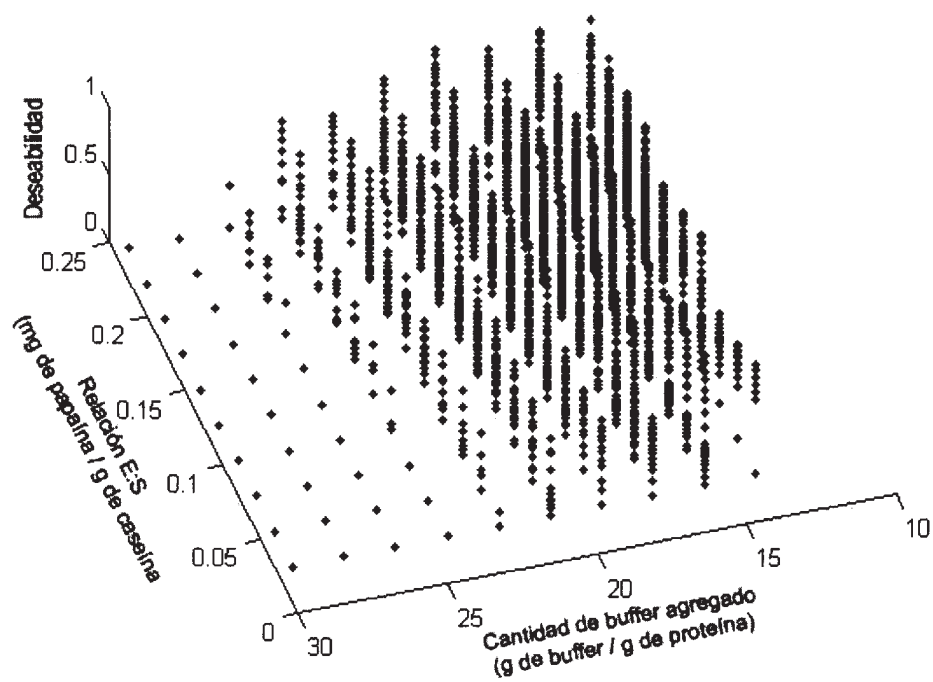


Figura 34

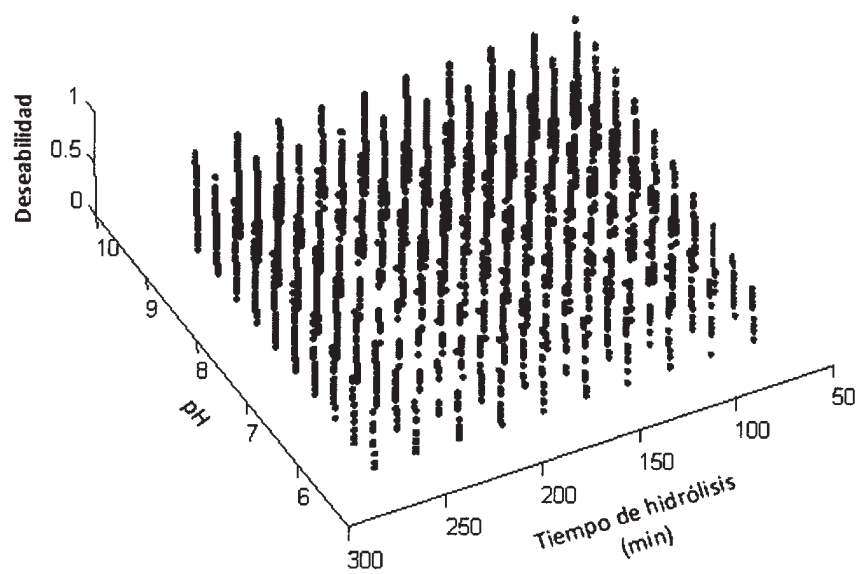


Figura 35

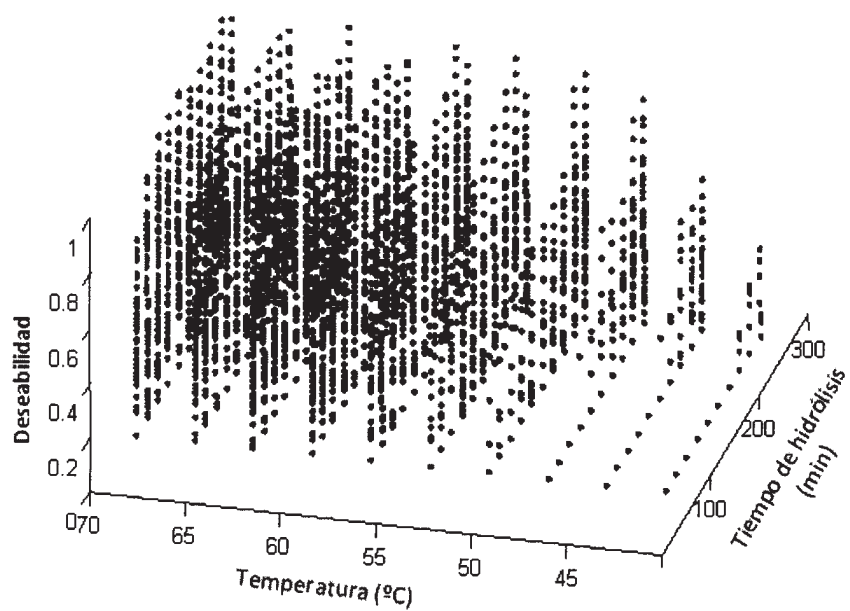


Figura 36

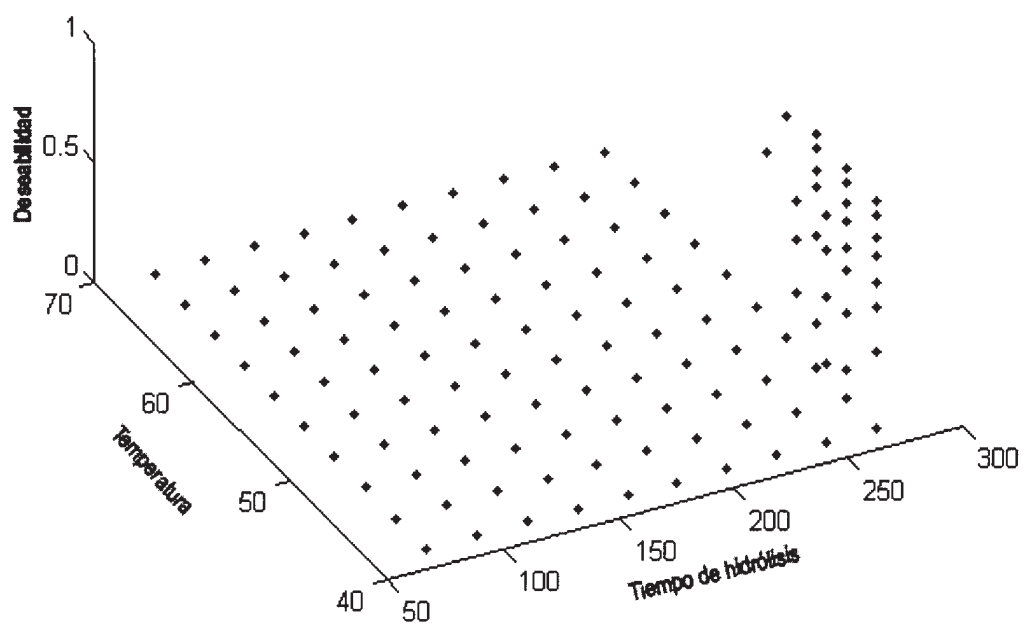


Figura 37

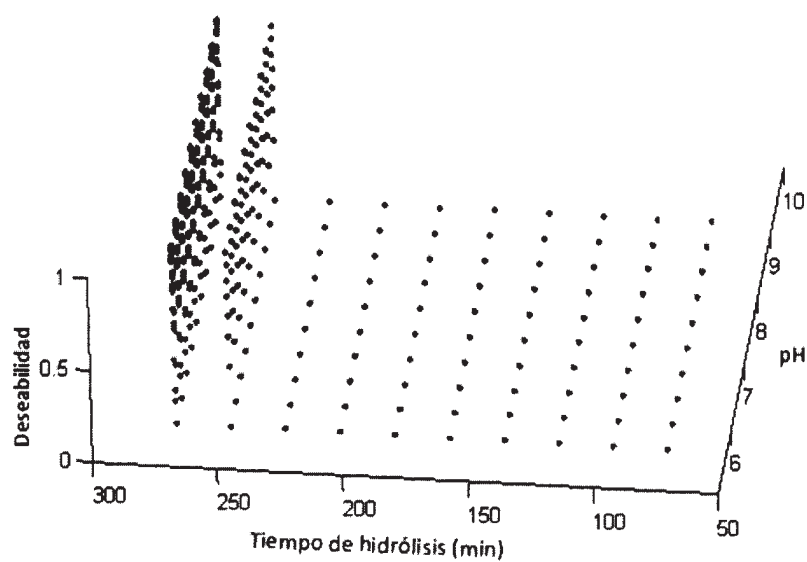


Figura 38

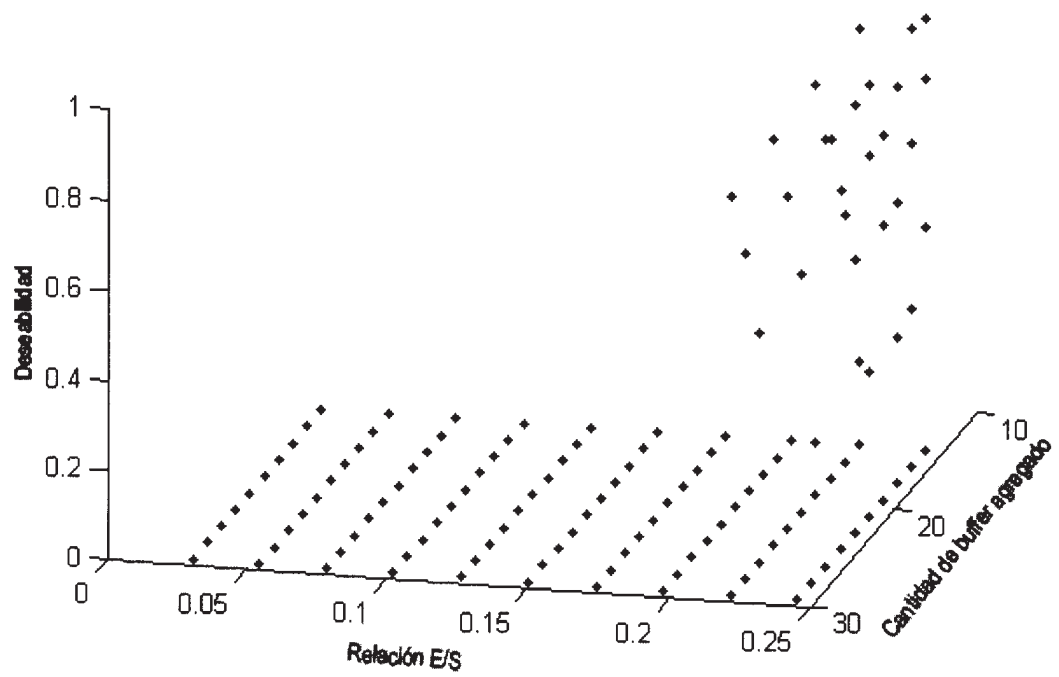


Figura 39



REPÚBLICA ARGENTINA

(10) PATENTE DE INVENCION

(11) RESOLUCION NUMERO: AR110037B1

(--) DISPOSICION GDE NUMERO: DI-2022-8-APN-ANP#INPI

(24) FECHA DE RESOLUCION: 12/01/2022

(--) FECHA DE VENCIMIENTO: 30/01/2035

(21) ACTA NUMERO: P20150100274

(22) FECHA PRESENTACION:30/01/2015

(51) INT.CL.7 : A23C 19/00, A23C 21/00, A23J 3/00, G01N 33/04

(30) PRIORIDAD CONVENIO DE PARIS

(54) TITULO :PROCEDIMIENTO PARA PREDECIR, CONTROLAR Y OPTIMIZAR LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS DE QUESO DE CABRA PARA EL DISEÑO DE ADITIVOS A MEDIDA PARA SISTEMAS ALIMENTICIOS DETERMINADOS

(71) TITULAR :

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET)
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

---- CON RESIDENCIA EN :

RIVADAVIA 1917 CABA, (1033), País AR

AVDA. DEL LIBERTADOR 8250 CABA, (1429), País AR

(74) AGENTE :



INPI

INSTITUTO NACIONAL
DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
ARGENTINA