



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS DE BAJA FRECUENCIA
PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN LA ELABORACIÓN DE
QUESOS EXTREMEÑOS DOP DE PASTA BLANDA**

Abel Teodoro Crespo Bermejo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

2022



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS DE BAJA FRECUENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD
EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS EXTREMEÑOS DOP DE PASTA BLANDA**

Abel Teodoro Crespo Bermejo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Conformidad de los directores

Antonio Jiménez Barco

Alberto Martín González

**Santiago Ruiz-Moyano Seco
de Herrera**

La conformidad de los directores consta en el original en papel de esta tesis doctoral

2022

Agradecimientos

En este apartado de agradecimientos, quisiera reconocer tal y como fueron aconteciendo los hechos, la ayuda prestada tanto por las instituciones como por las personas que han hecho posible la culminación de este trabajo, y poner a disposición los conocimientos generados tanto al sector quesero, especialmente al sector que elabora quesos de pasta blanda extremeños, como a quien lo considere necesario, para seguir avanzando en la tarea de conseguir quesos y alimentos más seguros de mejor calidad.

Mi primer agradecimiento va dirigido a la institución que representa CTAEX y a todos mis compañeros. Trabajar en un Centro que dispone tanto de unas instalaciones como de un equipo humano de primer nivel, me han permitido adquirir los conocimientos y experiencia necesarios para con su ayuda, emprender y terminar el mayor reto académico de mi vida.

En segundo lugar, quisiera expresar mi sentimiento de gratitud al doctor y director de tesis Antonio Jiménez, puesto que con él empezó todo. Recuerdo cuando se acercó un día a Villafranco del Gadiana a contarme lo que eran los ultrasonidos, sus posibilidades y los trabajos previos del Grupo de Radiaciones no Ionizantes de la Universidad de Extremadura. A partir de ahí, emprendimos un nuevo camino en el que abracé la metodología científica como antes no había conocido, y una admiración por su trabajo y persona que hoy me siguen inspirando. Nuevo camino, que también compartimos con Santiago Pajuelo y su hermano Ignacio, dos empresarios con verdadera vocación innovadora que pusieron a disposición su empresa, Hermanos Pajuelo S.A.T., quesería y medios, para acometer a través de un proyecto financiado de I+D, gran parte de los objetivos planteados en este estudio.

Agradecer la financiación obtenida a partir del Fondo Regional Europeo para el Desarrollo (FEDER) y Ministerio de Ciencia Innovación y Universidades del Gobierno de España a través del proyecto con referencia CIT-060000-2008-0008 y de la Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital (Junta de Extremadura) y FEDER a través de los proyectos con referencias: GR18089, GR18165 y IB16038; puesto que, de otro modo, no hubiera sido posible acometer el trabajo de esta tesis doctoral. En este punto, me gustaría dar las gracias a las personas que hicieron posible la realización tanto de los ensayos, como de muchos de los análisis realizados durante el proceso. De este modo, quisiera mencionar especialmente a mis compañeros Pedro, Juan, Felipe, M^a José, Patricia, Santiago, Alfonso, Carmen, Raquel, Montse, José Antonio e Isa. Del mismo modo, quisiera reconocer también la ayuda prestada por todos los miembros del Grupo de Radiaciones no Ionizantes y de Inspección Ultrasónica, muy especialmente al colaborador Juan Piedehierro, cuyo trabajo y dedicación permitió sentar las bases de todo lo necesario para continuar con el proyecto.

Tratándose de un trabajo multidisciplinar, una ampliación de las líneas de investigación del proyecto fue necesaria a través de la experiencia y conocimientos del Grupo de Investigación

CAMIALI de la Universidad de Extremadura. Expresar por tanto mi personal afecto y aprecio por los doctores pertenecientes al Grupo y también directores de la tesis, Santiago Ruíz-Moyano y Alberto Martín, compañero y profesor de promoción míos en CYTA, respectivamente, sin cuya implementación de conocimientos junto con todo su grupo en el ámbito de la ciencia y tecnología de los alimentos, impulsó este trabajo e hizo posible completar el proyecto. Agradezco muy sinceramente lo fácil que me lo han puesto todo, la comunicación, la ayuda y orientación prestada en todos los ámbitos del proceso, pero muy especialmente, por la dimensión y dirección científica llevados a efecto en los objetivos y resultados de la tesis. Mención especial el trato cercano dispensado por parte de Santiago, quien, con su paciencia, consejos, ánimos y empatía, me incentivó para llegar a la meta final.

De forma particular, me gustaría mostrar mi respeto por la profesionalidad y ayuda del maestro quesero de la por entonces quesería Hermanos Pajuelo S.A.T., Diego Lindo, ya que por muchos libros sobre quesos que yo leyese, no iba a llegar nunca a “interpretar” la leche para comprender el singular y complejo proceso de elaboración de la “Torta del Casar” durante los ensayos. Del mismo modo, no hay palabras que puedan expresar la admiración que siento por mi amigo y compañero profesional Antero Manuel Murillo. Con su pasión y valores, me transmitió todo lo necesario para amar el mundo del queso en general, y el de quesos de pasta blanda en particular. Sin sus conocimientos, apoyo emocional y ayuda durante todos estos años, no hubiera sido posible terminar el trabajo y transferir al texto la singularidad que tales quesos merecen.

Me gustaría mostrar también mi reconocimiento a los trabajadores de las queserías pertenecientes tanto a la DOP “Torta del Casar” y DOP “Queso de La Serena” que han facilitado los quesos para el estudio, así como a los directores técnicos de ambas DOP por proporcionar datos de interés actualizados.

También deseo acordarme de mis amigos, por estar siempre pendientes, especialmente de Elena, ya que ella entendía cómo me sentía en cada etapa de la tesis y me orientaba en todo momento con cariño por analogía.

Por último, estoy infinitamente agradecido a mi familia, Teodoro, Mary Carmen, Mario, Carlota, Carlotita, Mariete, mi esposa e hijos. Han sido muchos años y por diferentes circunstancias, la pendiente ha estado muchas veces hacia arriba. Por eso, quiero disculparme con mis hijos, Alba y Abel, y con mi mujer, Patricia, por todo el tiempo que les he robado. Espero que todo el sacrificio, esfuerzo y satisfacción que siento ahora por culminar este trabajo, sirva como ejemplo de motivación en la vida para nuestros hijos. Todavía recuerdo cuando, mientras trabajaba con el portátil sobre mis rodillas en el sillón del salón para que mis hijos me sintieran cerca, una pequeña Alba se sentaba a mi lado demandando juegos y atención y me decía: -Papá, ¿otra vez con los números? Gracias, Patricia, por entender y animarme en el proceso, por redoblar esfuerzos en tu trabajo para que yo dispusiera de más tiempo, por ayudarme y, en definitiva, por estar siempre ahí.

Para terminar, acordarme de mi deporte preferido, el tenis. Aunque ellos no lo sepan, sin los jugadores y compañeros que compartimos afición, no hubiera sido capaz de evadirme para retomar cada vez un bolígrafo, un papel y el ordenador.

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

Isaac Newton. Cita de Bernardo de Chartres

ÍNDICE

Índice

Resumen	3
INTRODUCCIÓN	7
1.- EL QUESO.....	9
1.1.- CLASIFICACIÓN DE QUESOS.....	10
1.2.- EL SECTOR QUESERO EN ESPAÑA	13
1.2.1.- El consumo y producción	13
1.2.2. Comercio exterior	16
1.2.3. Quesos de calidad diferenciada	18
2.- QUESOS DE OVEJA DE PASTA BLANDA CON DOP EN EXTREMADURA	22
2.1.- LA “TORTA DEL CASAR” Y EL “QUESO DE LA SERENA”	22
2.2.- PROCESO DE ELABORACIÓN.....	25
2.2.1.- Etapas.....	25
2.2.2.- Evolución de población microbiana	27
2.2.3.- Cambios Bioquímicos.....	31
2.2.2.1.- Glucolisis	31
2.2.2.2.- Lipolisis.....	35
2.2.2.3.- Proteólisis.....	40
2.3.- COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD	44
2.4.- DEFECTOS Y ALTERACIONES	48
2.4.1.- Asociados a la composición de la leche	48
2.4.2.- Asociados a aspectos tecnológicos	49
2.4.3.- Asociados a las condiciones higiénicas y microbiológicas	52
2.4.3.1- Hinchazón temprana.....	54
2.4.3.2- Hinchazón tardía	55
3.- CONTROL DE CALIDAD EN EL PROCESO DE ELABORACION DEL QUESO	57
3.1- CONTROL DE LA ETAPA DE CUAJADO DE LA LECHE.....	57
3.2-CONTROL DE ETAPA DE MADURACIÓN DEL QUESO	59

3.3. MÉTODOLÓGÍAS NO DESTRUCTIVAS PARA EL CONTROL DEL PROCESO DE ELABORACION DE QUESOS	61
4- APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS	63
4.1.- TÉCNICAS DE INSPECCIÓN NO DESTRUCTIVA CON ULTRASONIDOS	64
4.1.1.- Técnica de pulso-eco.....	64
4.1.2.- Técnica de transmisión	65
4.2.- APLICACIÓN EN EL SECTOR LÁCTEO.....	65
4.2.1.- Características de la leche.....	66
4.2.2.- Coagulación de la leche y corte de la cuajada	66
4.2.3.- Detección de cuerpos extraños.....	69
4.2.4.- Determinación de las propiedades de textura.	70
OBJETIVOS	73
2.- OBJETIVOS.....	75
MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	79
3.1.- DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL	79
3.1.1.- Reactivos químicos y medios de cultivo	79
3.1.2.- Material biológico	79
3.1.3.- Equipamiento	80
3.1.3.1.- Equipos para el proceso de cuajado de la leche y elaboración de quesos..	80
3.1.3.2.- Equipos de ultrasonidos.....	81
3.1.3.3.- Conservación y análisis de las muestras	84
3.2.- MÉTODOS	87
3.2.1.-Determinación de los parámetros de ultrasonidos en medio líquido durante la etapa de coagulación de la leche	87
3.2.2.- Determinación de parámetros ultrasónicos en queso durante la etapa de maduración y producto final.....	92
3.2.3.- Elaboración de los quesos Torta del Casar	95
3.2.4.-Determinación de parámetros fisicoquímicos en leche durante su coagulación y en queso.....	96

3.2.5.-Determinación de parámetros de textura en queso	97
3.2.6.-Determinación de parámetros microbiológicos en queso	98
3.2.7.-Determinación de parámetros sensoriales en queso	99
CAPÍTULO I	101
4. CAPÍTULO I: Contribuciones a la monitorización por ultrasonidos del proceso de cuajado de la leche	103
4.1. Diseño experimental.....	103
4.2. Análisis estadístico de los datos	105
4.3. Parámetros fisicoquímicos y ultrasónicos de las muestras de leche cruda.....	105
4.4. Monitorización del proceso de coagulación	107
4.5. Estudio de las correlaciones	111
CAPÍTULO II	115
5. CAPÍTULO II: Aplicación de ultrasonidos para control de calidad del proceso de maduración de la Torta del Casar	117
5.1. Diseño experimental.....	117
5.2. Análisis estadístico de los datos	119
5.3. Parámetros fisicoquímicos y de textura de los quesos.....	121
5.4. Evolución de la población microbiana durante la maduración del queso	123
5.5. Parámetros de los ultrasonidos	125
5.6. Relación entre las propiedades fisicoquímicas y de textura de la Torta del Casar con los parámetros de los ultrasonidos durante su proceso de maduración.	127
5.7. Discriminación de los defectos del queso tipo “Torta” por parámetros de los ultrasonidos durante la maduración	130
CAPÍTULO III	137
6. CAPÍTULO III: Los ultrasonidos como herramienta para el control de calidad de los quesos de pasta blanda de leche cruda de oveja	139
6.1. Diseño experimental.....	139
6.2. Análisis estadístico de datos	140
6.3. Parámetros de ultrasonidos	140

6.4. Parámetros microbiológicos, físico-químicos y de textura.....	142
6.4.1. Análisis microbiológicos	142
6.4.2. Parámetros fisicoquímicos	143
6.4.3. Análisis de textura	145
6.5. Análisis sensorial	145
6.6. Relación de parámetros microbianos, físico-químicos, texturales y sensoriales con parámetros de ultrasonidos	147
CONCLUSIONES	157
5. CONCLUSIONES.....	159
BIBLIOGRAFÍA.....	161
6. BIBLIOGRAFÍA.....	163
ANEXO	197

Tablas

Tabla 1.1 Clasificación de quesos mediante su textura, contenido de humedad, agentes de maduración (Microorganismos), tipología y procedencia (Ordóñez et al., 1998).....	11
Tabla 1.2. Denominaciones de Origen Protegida Españolas de quesos registradas en diciembre de 2019.	20
Tabla 1.3. Características de la leche cruda para la elaboración de queso tipo torta según pliego de condiciones de cada DOP.	25
Tabla 1.4. Características físico-químicas y composición química de la “Torta”.	45
Tabla 1.5. Aplicaciones de técnicas no destructivas para la evaluación de la calidad de quesos (2004 y 2020).	61
Tabla 3.1. Características de los transductores utilizados.	82
Tabla 3.2. Parámetros ultrasónicos relacionados con la velocidad.	94
Tabla 4.1. Información sobre las muestras de leche usadas en el proceso de cuajado....	104
Tabla 4.2. Parámetros fisicoquímicos y de ultrasonidos en las muestras de leche estudiadas.	106
Tabla 5.1. Número de muestras totales inspeccionadas a lo largo del periodo de maduración de los diferentes lotes de queso.	120
Tabla 5.2. Parámetros fisicoquímicos y de textura de los lotes de queso de “Torta del Casar” durante el proceso de maduración ^{1,2}	122
Table 5.3. Estadísticos descriptivos de los parámetros de los ultrasonidos medidos con los transductores “V150” and “V151” en los quesos durante su procesado.	126
Table 5.4. Parámetros físico-químicos y de textura correlacionados significativamente ($p < 0.01$) con parámetros de los ultrasonidos durante el procesamiento de “Torta del Casar”.	128
Tabla 5.5. Eficiencia en la calibración y predicción del ADL en la clasificación de los defectos estudiados en las muestras de queso “Torta del Casar” durante su procesado.	131
Tabla 5.6. Predicción de la pertenencia a los grupos estudiados de las muestras de queso con un periodo de maduración de 6 a 8 semanas en base al modelo ADL realizado.....	132
Tabla 5.7. Predicción de la pertenencia a los grupos estudiados de las muestras de queso con un periodo de maduración de 8 a 10 semanas en base al modelo ADL realizado.	133
Table 5.8. Performance in calibration and prediction of LDA classification applied to the “Torta del Casar” cheese samples after 6–8 and 8–10 weeks of processing considering the batches PD1 and MD one only sample group.	133

Tabla 6.1. Número de muestras totales para la inspección por ultrasonidos, análisis físico-químicos y microbiológicos en el producto final.....	139
Table 6.2. Estadísticos descriptivos de los parámetros de ultrasonido medidos con dos transductores diferentes en los quesos estudiados.	141
Tabla 6.3. Parámetros microbianos, fisicoquímicos y de textura de los quesos estudiados.	144
Table 6.4.- Atributos sensoriales descriptivos de los quesos y su correlación con la aceptación general.	146
Table.6.5. Correlaciones significativas (sig <0.05) entre parámetros microbianos, físico-químicos, texturales y sensoriales de quesos blandos con parámetros de ultrasonidos obtenidos con los transductores estudiados.	147
Tabla 6.6. Indicadores estadísticos, coeficientes de los modelos RLM y su significación para los modelos RLM desarrollados para el parámetro firmeza TCA y el atributo sensorial “intensidad” utilizando la técnica de regresión escalonada.	153

Figuras

Figura 1.1 Esquema de clasificación de quesos basado en el método de coagulación como criterio principal y dividido en categorías teniendo en cuenta el agente de maduración y características tecnológicas (McSweeney et al., 2004).....	12
Figura 1.2. Evolución del abastecimiento y consumo de kg per cápita de queso en España en el periodo de 2006 a 2019 (MAPA, 2020).....	14
Figura 1.3. Evolución del consumo de kg per capita de queso en los hogares españoles en el periodo de 2012 a 2019 (MAPA, 2020).	15
Figura 1.4. Evolución de la producción de queso en España por tipo de queso en base al origen de la leche en el periodo de 2009 a 2019 (MAPA, 2020).	15
Figura 1.5. Evolución de la producción de queso puro de oveja en la Unión Europea en el periodo de 2009 a 2019 (MAPA, 2020).....	16
Figura 1.6. Evolución de las exportaciones de queso en el periodo de 2005 a 2019 (MAPA, 2020).....	17
Figura 1.7. Evolución de las importaciones de queso en el periodo de 2005 a 2019 (MAPA, 2020).....	18
Figura 1.8. Evolución de la producción y quesería certificadas de “Torta del Casar” en el periodo de 2008 a 2020. Los datos de exportación son solo referidos al periodo 2016-2020 (Consejo Regulador de la Torta del Casar (https://tortadelcasar.eu/); MAPA, 2021	23
Figura 1.9. Diagrama de flujo del proceso de la elaboración de la “Torta del Casar” y el “Queso de la Serena”	26
Figura 1.10. Coloraciones irregulares en “Queso de la Serena” de pasta blanda en fase final de maduración.....	31
Figura 1.11. Esquema general de los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración de la “Torta” (Adaptado de McSweeney, 2017).....	32
Figura 1.12. Vías metabólicas generales del metabolismo del ácido láctico en el queso (Adaptado de McSweeney, 2004).	34
Figura 1.13. Vías metabólicas generales del metabolismo del citrato en el queso (Adaptado de McSweeney et al., 2017).....	36
Figura 1.14. Rutas metabólicas generales del catabolismo de los ácidos grasos en el queso (Adaptado de Thierry et al. 2017).	38
Figura 1.15. Rutas metabólicas generales del catabolismo de los aminoácidos en el queso (Adaptado de Curtin & McSweeney et al., 2004).....	42

Figura 1.16. Ojos mecánicos en la pasta en queso Gouda (A), tipo “Torta” durante el proceso de maduración (B) y tipo “Torta” finalizada la maduración (C).	51
Figura 1.17. Pigmentación azul causada por <i>Ps. Fluorescens</i> (A). Hinchazón temprana en queso tipo “Torta” (B). Ojos en la pasta por producción de gas por coliformes (C). Grietas en queso de pasta dura por hinchazón tardía por <i>Clostridium</i> spp. (D).	54
Figura 3.1. Procedencia de los quesos con D.O.P. Torta del Casar y D.O.P. Queso de La Serena.....	80
Figura 3.2. Equipamiento planta piloto de lácteos del CTAEX: (A) Cuba de acero inoxidable, (B) prensa neumática, y (C) estantería con quesos en cámara de maduración.....	80
Figura 3.3. Transductores utilizados: (A) Transductores de inmersión V318-SU, (B) transductores de contacto V150-RB, y (C) transductores de contacto V151-RB.	81
Figura 3.4. Estructuras metálicas para la alineación de los transductores: (A) Estructura metálica para alineación de transductores V318-SU, y (B) estructura metálica para alineación de transductores V150-RB y V151-RB.....	83
Figura 3.5. Emisores-receptores Panametrics (A) modelo 5058PR y (B) modelo 5077PR. .	83
Figura 3.6. (A) Osciloscopio Tektronix TM TDS1012B, y (B) Osciloscopio InfiniiVision DSO-X 3032A de KEYSIGHT emisor-receptor modelo 5077PR V150-RB.	84
Figura 3.7. (A) Texturómetro modelo TA.XTA2i con sonda esférica de acero inoxidable (P / 1S) para medida de la firmeza de los quesos, y (B) con accesorio TTC Spreadability Rig (HDP / SR) para la sonda con capacidad de extender la pasta del queso.....	86
Figura 3.8. Diseño del montaje de los transductores en la estructura metálica y esquema de la configuración utilizada para las mediciones de parámetros ultrasónicos en medio líquido durante la etapa de coagulación.	88
Figura 3.9. Ejemplo de un A-scan típico recibido por el transductor Panametrics V318 con los ecos de la señal de ultrasonido después del pulso de disparo.	88
Figura 3.10. FFT de las señales recibidas en la inspección mostrada en la Figura 3.9.....	89
Figura 3.11. Cepstrum correspondiente a la FFT mostrada en la Figura 3.10. Se muestran los momentos t y $2t$ correspondientes a las excitaciones periódicas.	90
Figura 3.12. Periodograma de la frecuencia acumulada de la FFT mostrada en la Figura 3.10. Se indican los percentiles de las frecuencias 25º, 50º, 75º y 99º.	91
Figura 3.13. Estructura metálica diseñada para garantizar la alineación de los transductores cara a cara en el queso y configuración utilizada para la inspección por ultrasonido de los quesos.....	92
Figura 3.14. A-scan típico (amplitud vs. tiempo, t) obtenido con uno de los transductores de onda transversal.	93

Figura 3.15. Curva de atenuación obtenida del A-Scan de una de las tortas medidas.....	95
Figura 4.1. Diagrama de flujo del proceso de cuajado del queso utilizado en el estudio.	104
Figura 4.2. Periodograma de frecuencia acumulada correspondiente a las cuatro muestras de leche cruda.	106
Figura 4.3. Regresión lineal entre la velocidad (UPV) y los valores de la FFT correspondientes al percentil 50 (FFT ₅₀) para el conjunto de muestras de leche estudiadas.	107
Figura 4.5. Cambios relativos del tiempo de vuelo (Δ TOF) de las ondas de ultrasonido durante el cuajado de las muestras de leche. Las líneas verticales indican el tiempo de corte indicado por el maestro quesero.	108
Fig. 4.5. Evolución de la atenuación ultrasónica (α) durante el cuajado de las muestras de leche. Las líneas verticales indican el tiempo de corte indicado por el quesero.	109
Figura 4.6. Evolución de los valores de la FFT correspondientes al percentil 75 (<FFT ₇₅ >) durante el cuajado de las muestras de leche. Las líneas verticales indican el tiempo de corte indicado por el maestro quesero.	109
Figura 4.7. Regresión lineal entre la atenuación ultrasónica (α) de las muestras de leche cruda y los cambios relativos en el tiempo de vuelo (Δ TOF) de las ondas ultrasónicas medidas en los tiempos de corte correspondientes a sus respectivos procesos de cuajado.	111
Figura 4.8. Regresiones lineales del contenido de proteína de las muestras de leche cruda con FFT ₅₀ y con FFT ₇₅	112
Figura 4.9. Regresiones lineales del contenido de proteína de las muestras de leche cruda con la atenuación ultrasónica (α) medida en el tiempo de corte, y con las variaciones en la FFT ₅₀ (Δ FFT ₅₀) de las ondas ultrasónicas entre el tiempo de corte y los valores medidos en el tiempo inicial.	113
Figura 5.1. Detalle del centro de los quesos de los cuatro lotes de “Torta del Casar” al final del periodo de maduración: Lote estándar (S), Lote con defectos de textura (PD1), Lote con exceso de presión (PD2), y Lote con defectos microbianos (MD).....	118
Figura 5.2. Evolución de los recuentos de (A) bacterias ácido lácticas, (B) levaduras y (C) enterobacterias durante la maduración de los lotes de quesos estándar (ST), defecto de presión 1 (PD1), defecto de presión 2 (PD2) y población microbiana anómala (MD). BIC = barra del intervalo de confianza utilizando la prueba post-hoc de comparación de medias Tukey.	124
Figura 5.3. Muestras de queso agrupadas en lotes S, PD2 y PD1+DM y cargas de las variables proyectadas en planos definidos por los factores discriminantes (DF) DF1 y DF2 para muestras a las semanas 6–8 y 8–10 de maduración.....	135

Figura 6.1. Gráficas de carga y de puntuación después del ACP de los atributos de calidad y parámetros de ultrasonido de los quesos de cuerpo blando “Torta del Casar” y “Torta de la Serena” en los planos definido por los componentes principales (PC1 y PC2).....	150
Figura 6.2. Gráficas de carga y de puntuación después del ACP de los atributos de calidad y parámetros de ultrasonido de los quesos de cuerpo blando “Torta del Casar” y “Torta de la Serena” en los planos definido por los componentes principales 2 y 3 (PC2 y PC3).....	151
Figura 6.3. Comparación entre los valores del atributo sensorial “intensidad” (A) y la firmeza (TSA) observados y pronosticados (A) y para la regresión lineal múltiple (RLM) y aceptación general (C) para la regresión lineal simple (RLS).	154

RESUMEN

Resumen

Esta tesis doctoral tuvo como objetivo general establecer los métodos y parámetros ultrasónicos de inspección que pueden ser útiles para el control de calidad en el proceso de elaboración de **quesos de Extremadura de pasta blanda elaborados a partir de leche cruda de oveja y coagulante vegetal**, Torta del Casar y Queso de la Serena. El uso de los **ultrasonidos como herramienta de control** de calidad abarcó tanto el **proceso de cuajado** y de **maduración** como la calidad del **producto terminado**.

En cuanto al proceso de cuajado, la evaluación de varios parámetros ultrasónicos permite determinar el estado de la leche cuajada de forma rápida y económica, satisfaciendo así las demandas a las que se enfrentan los industriales de este sector. Así, **el primer capítulo** de este trabajo describe un **método ultrasónico no destructivo** que permite la monitorización *in situ* de las **propiedades físicas cambiantes de la leche durante el proceso de cuajado**. Los objetivos básicos de esta parte del estudio fueron, por un lado, confirmar la utilidad de los parámetros de ultrasonidos convencionales (**tiempo de vuelo (TOF)** y **atenuación (AT)** de las ondas ultrasónicas) en el seguimiento del proceso el cuajado de la leche de oveja, y, por otro, incluir otros parámetros de ultrasonido que no han sido considerados previamente en estudios de control de calidad, en particular, los parámetros proporcionados por el estudio de la señal en el dominio de la frecuencia mediante la **Transformada Rápida de Fourier (FFT)**. El estudio experimental se llevó a cabo a escala industrial sobre cuatro muestras de leche cruda de 52 litros en las que se sumergieron transductores de ultrasonidos de 500 kHz. Se midieron los **parámetros fisicoquímicos más relevantes de la leche cruda** (pH, materia seca, proteína, grasa y lactosa), así como la **temperatura** de las muestras de manera simultánea a las **mediciones ultrasónicas** durante los procesos de cuajado. Los cambios en los parámetros de ultrasonido se correspondieron con la **fase enzimática y la de agregación del cuajado**, con un aumento en la primera fase de la velocidad de propagación (UPV), y disminuciones en la atenuación y frecuencia de las ondas ultrasónicas transmitidas, hasta alcanzar las respectivas mediciones cierta estabilidad que se mantuvo hasta el final del proceso de coagulación. De estos resultados se dedujo que el **tiempo de corte es aproximadamente 6 veces el tiempo de cuajado**. El tratamiento de estos datos también incluyó el análisis de correlación lineal de los parámetros de ultrasonidos antes mencionados y las propiedades fisicoquímicas de la cuajada. Así, el comportamiento de los parámetros extraídos de la **FFT se correlacionó positivamente con el de la UPV** mientras que leches crudas que tenían

coeficientes de atenuación de ultrasonido más bajos experimentaron una disminución relativa menor en el tiempo de vuelo de las ondas medido durante el cuajado. De particular interés fueron las **correlaciones observadas entre: (a) el contenido de proteína de la leche cruda y los parámetros frecuenciales, y (b) el contenido de proteína y la atenuación de los parámetros frecuenciales durante el proceso de cuajado.**

El segundo capítulo de este trabajo tuvo como objetivos específicos establecer los **parámetros de ultrasonidos** que pueden ser útiles para **clasificar los defectos en quesos de leche cruda de oveja de pasta blanda** durante el proceso de maduración tomando como modelo la Torta del Casar. La técnica para la evaluación de los quesos por ultrasonidos fue mediante transmisión utilizando dos parejas de transductores con diferentes frecuencias de resonancia (V150 y V151). Durante el proceso de maduración se evaluaron por ultrasonido 1 lote de **queso estándar** y 3 lotes de **queso defectuoso (población microbiana anómala, cuajada de prensado inadecuado y cuajada de prensado excesiva)**. Se calcularon diversos parámetros ultrasónicos relacionados con la **velocidad, atenuación y frecuencia** y se correlacionaron con las **propiedades fisicoquímicas y reológicas** de los quesos. Los datos de ultrasonido obtenidos con el transductor más eficiente (con frecuencias de resonancia próximas a 250 kHz; V150) se consideraron variables en el **análisis discriminante lineal** para intentar la clasificación del queso en diferentes períodos del proceso de maduración. Los modelos permitieron distinguir los quesos blandos defectuosos de los estándares **con buena precisión**, principalmente en las etapas finales de maduración. La diferenciación de las muestras de queso de 2 de los lotes de queso defectuosos (**población microbiana anómala y cuajada de prensado inadecuada**) del estándar se atribuyó principalmente a diferentes valores de los **parámetros relacionados con la atenuación**, mientras que para las muestras del otro lote defectuoso (**cuajada de prensado excesiva**), varios parámetros relacionados con la **velocidad y la frecuencia** fueron responsables de tal discriminación.

En el **tercer capítulo** se estudió la **relación entre los atributos de calidad** y los **parámetros de ultrasonidos** de los quesos de pasta blanda con Denominación de Origen Protegida (DOP) de “Torta del Casar” y “Queso de La Serena”. Para ello, se tomaron muestras de queso de seis industrias lácteas diferentes (tres por cada DOP) en dos temporadas diferentes. La técnica para la evaluación ultrasónica fue la misma que se utilizó en el capítulo 2. Los parámetros de ultrasonidos relacionados con la **velocidad, atenuación y frecuencia** se calcularon y correlacionaron con las **propiedades fisicoquímicas, microbiológicas, reológicas y sensoriales** de los quesos.

Varios parámetros ultrasónicos mostraron una alta correlación con los cambios en las propiedades fisicoquímicas, texturales y sensoriales de este producto, que se asociaron parcialmente con la actividad microbiana. Entre estos, destaca la **correlación negativa del descriptor sensorial “firmeza” con el módulo elástico de volumen (κ)**. Los modelos predictivos logrados por el método de **regresión lineal multivariante (MLR)** mostraron los coeficientes de correlación más altos para la firmeza por análisis de compresión de **textura (TCA)** y el **descriptor sensorial “intensidad”**, incluyendo como variables explicativas para ambos modelos, los parámetros frecuenciales extraídos de la **Transformada Rápida de Fourier (FFT)** y los **parámetros de atenuación**. Este trabajo destaca la capacidad en línea del ultrasonido para la evaluación de la calidad no destructiva de quesos tradicionales de pasta blanda de Extremadura basado en el potencial predictivo de varios parámetros ultrasónicos secundarios no empleados habitualmente en este tipo de estudio.

INTRODUCCIÓN

1.- EL QUESO

El término queso es el nombre genérico con el que se designa a un grupo de alimentos producidos a base de coagulación de leche y en ocasiones su posterior maduración donde se produce una fermentación que da lugar a una amplia gama de sabores y formas en todo el mundo. Una definición sencilla sería la dada por el diccionario de la **Real Academia Española** que define al queso como “el producto obtenido por maduración de la cuajada de la leche con características propias para cada uno de los tipos según su origen o método de fabricación”. En la norma de calidad para el queso y quesos fundidos (**Real Decreto 1113/2006**) “se entiende por queso el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del coagulante u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche”.

Una definición más ajustada y específica es la encontrada en la norma general del **Codex Alimentarius** para el queso (CODEX STAN 283-1978): Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

(a) coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del coagulante u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o (b);

(b) técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado (a).

Por otro lado, se especifica los siguientes aspectos:

- Se entiende por queso sometido a maduración el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se

produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión.

- Se entiende por queso madurado por mohos un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso.
- Se entiende por queso sin madurar el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación.

1.1.- CLASIFICACIÓN DE QUESOS

Sandine y Elliker (1970) describieron la existencia de 1000 variedades de quesos en el mundo. Esta amplia variedad de quesos existentes hace que no sea sencillo realizar una clasificación de estos. Walter y Hargrove (1972) describieron más de 400 variedades y propusieron un agrupamiento en 18 tipologías en base a su proceso de elaboración, mientras que Burkhalter (1981) clasificó aproximadamente 500 variedades teniendo en cuenta tres factores: tipología de la leche, contenido de humedad y maduración. Más recientemente, se ha indicado que el número de tipos de quesos puede ser de aproximadamente 1500 (Fox et al., 2017).

Los quesos han sido clasificados desde el siglo XX por distintos autores en diferentes grupos atendiendo a diferentes aspectos. La clasificación más básica y comúnmente extendida es la basada en las **propiedades reológicas** como criterio principal, categorizándolos en muy duro, duro, semiduro, semisuave, blando, atendiendo al contenido de humedad del queso. Schulz (1952) fue el primer autor en proponer una clasificación estableciendo como criterio principal la textura del queso, dividiéndolos en 5 grupos principales en base al contenido en humedad (seco, rallado, duro, blando y fresco). La inclusión de otros factores como el **tratamiento térmico, prensado y contenido en sal** dio lugar a una clasificación más definida. Davis (1965) tomando como base una clasificación basada en las propiedades reológicas consideró otras variables como el **tipo de leche, método de coagulación, corte de la cuajada, escaldado de la cuajada, desuerado, método de salado y moldeado**, con el fin de dar cabida a la amplia variedad de quesos. En su trabajo propuso la idea de una posible clasificación en base a los cambios bioquímicos que ocurren durante el proceso de maduración. Sin embargo, aunque se han realizado grandes avances en este sentido, debido al gran número de variables que influyen en el proceso resulta complejo establecer una clasificación basada en este criterio. Posteriormente, Scott (1986), en la misma línea de una clasificación basada en la textura, realizó subdivisiones considerando otros aspectos como la **microbiota secundaria** y no el método de coagulación. En la Tabla 1.1 se muestra una clasificación en base a la textura, contenido en humedad, microorganismos responsables de la maduración y procedencia. Estos criterios permiten englobar la mayoría de los quesos europeos.

Tabla 1.1 Clasificación de quesos mediante su textura, contenido de humedad, agentes de maduración (Microorganismos), tipología y procedencia (Ordóñez et al., 1998).

Textura	Humedad	Agente de maduración	Tipos de queso	Procedencia
Muy duro	<25%	Bacterias	Parmesano, Romano	Italia
Duro	25-36%	Bacterias (Con ojos)	Emmental	Suiza
			Gruyére	Francia
		Bacterias (Sin ojos)	Cantal	Francia
			Manchego, Castellano, Mahón, Zamorano	España
			Cheddar	Reino Unido
			Edam, Gouda	Holanda
			Cacicavallo	Italia
Semiblandos	36-40%	Bacterias	Gallegos, Manchego	España
			St. Paulin	Francia
			Lancashire	Reino Unido
		Bacterias y levaduras superficiales	Limburguer	Bélgica
			Tilsit	Alemania
			Bel Paese	Italia
			Munster	Francia
		Mohos internos	Roquefort	Francia
			Cabrales	España
			Gorgonzola	Italia
			Stilton	Reino Unido
			Danablu	Dinamarca
		Blandos	>40%	Mohos superficiales
Sin maduración	Mozzarella			
Sin maduración	Cottage			Reino Unido
	Burgos, Villalón			España
	Petit Suisse			Francia

Un cambio en cuanto al criterio principal de clasificación fue el propuesto por el Prof. Walstra, considerando el **ratio agua/proteína** en lugar de la textura (Fox, 1993). Ottogalli (2001) propuso una clasificación basada en tres grandes familias, lo cual permite agrupar quesos con características similares de todo el mundo. Sin embargo, esta clasificación requiere un conocimiento muy detallado del proceso de elaboración de cada variedad. El primer grupo denominado "*lacticina*" engloba productos obtenidos mediante coagulación ácida, con o sin calentamiento, y se subdivide en siete familias. El grupo "*formatica*" contiene aquellos productos obtenidos mediante coagulación enzimáticas y por tanto la mayoría de las variedades de queso, siendo un grupo muy heterogéneo todas ellas coaguladas con cuajo. Este grupo se subdivide en cinco familias, tomando como criterio esencial el contenido de humedad: muy duro, duro, semiduro, semisuave, y suave, y posteriormente cada familia se divide en base al proceso de maduración. El último grupo es denominado "*miscellanea*" con

una colección de variedades que incluye quesos procesados, ahumados, rallados y quesos encurtidos, quesos que contienen ingredientes no lácteos, análogos de queso y quesos obtenidos mediante ultrafiltración.

Fox et al. (2000) y McSweeney et al. (2004) partiendo de la propuesta de clasificación de Fox (1993) de clasificación de quesos en grandes familias basándose en el método de coagulación propusieron un sistema complejo tomando como criterio principal igualmente el método de coagulación con subdivisiones basándose en agente de maduración y características del proceso tecnológico (Figura 1.1)

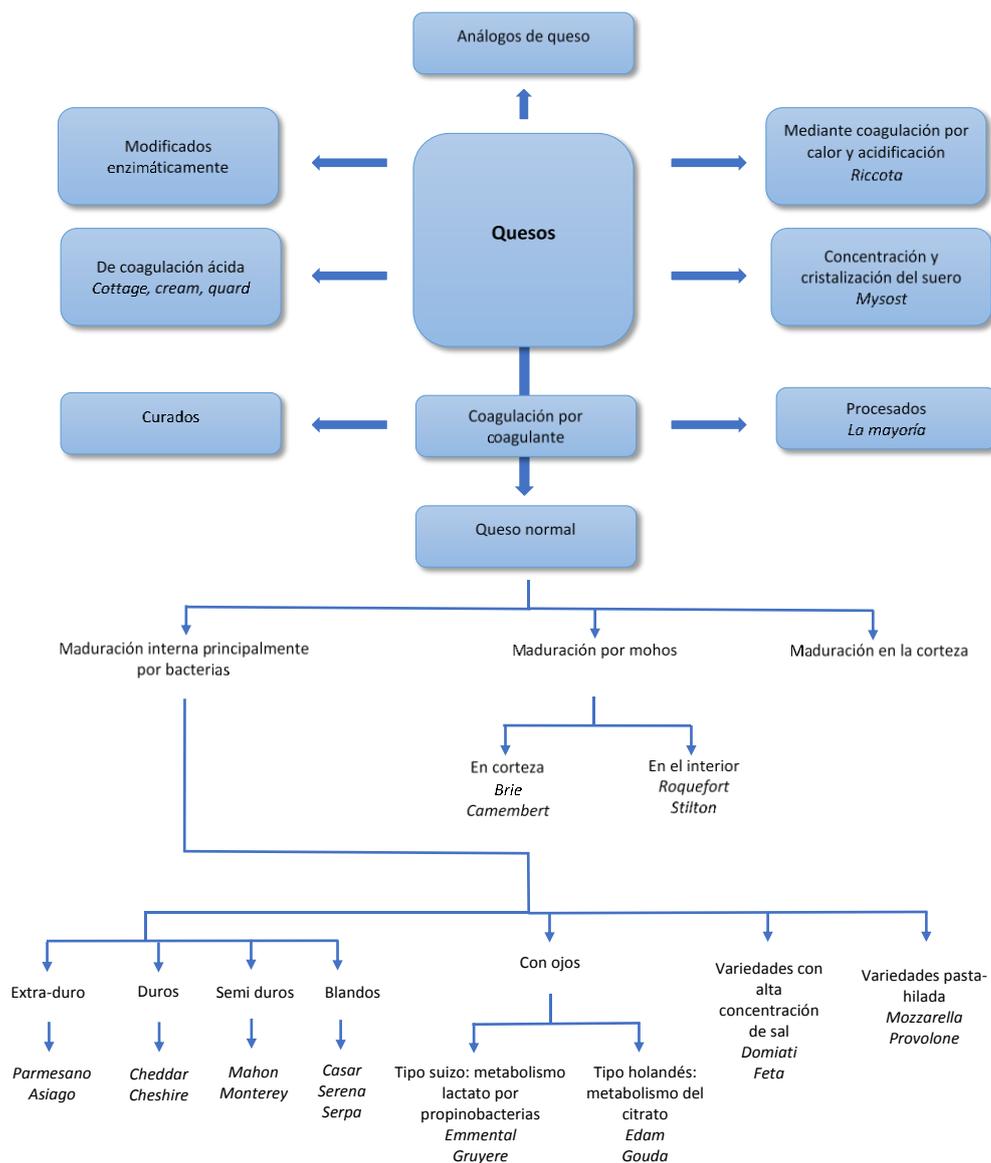


Figura 1.1 Esquema de clasificación de quesos basado en el método de coagulación como criterio principal y dividido en categorías teniendo en cuenta el agente de maduración y características tecnológicas (McSweeney et al., 2004).

Lenoir et al. (1985) propusieron un sistema de clasificación basado en tres aspectos: el método de coagulación, desuerado y operaciones del procesado (corte de la cuajada y manejo de la cuajada: agitado y calentamiento), y la maduración del queso. La aplicabilidad de estos tres criterios para dar cabida a la amplia diversidad de quesos, hicieron que Noël (2002) se basara en ellos con el objetivo de lograr un sistema de clasificación global aplicable a la diversidad existente. Han sido varias las propuestas de modelos o esquemas de clasificación de las diferentes variedades de quesos en diferentes familias que agrupen la amplia diversidad existente. Sin embargo, debido a la amplia diversidad de quesos y variedad de criterios para su clasificación propuestos hace que no exista un consenso en relación con su clasificación. En este contexto, la inclusión de los **índices químicos de maduración** podría ser una opción útil para agrupar las diferentes tipologías de quesos existentes en el mundo (Fox & McSweeney, 2017).

1.2.- EL SECTOR QUESERO EN ESPAÑA

1.2.1.- El consumo y producción

El **consumo** de queso en España ha experimentado un claro incremento en los últimos años hasta llegar a situarse en un consumo por persona de 14,10 kg/año en el año 2020 (Figura 1.2). El consumo interior total ha pasado de 458910 toneladas en el año 2006 a 669407 toneladas en 2020, lo que ha supuesto un incremento de aproximadamente el 46%, en parte debido al aumento de la población. En relación con el consumo de queso en los hogares españoles, se aprecia una cierta estabilidad en los últimos años, si bien la tendencia muestra un aumento del 13% respecto al año 2019, con valores aproximados de 8, 8 kg/per cápita, sin embargo, el consumo de queso de oveja muestra una cierta tendencia al alza (Figura 1.3). El consumo de queso de oveja en los hogares se situó en el año 2020 en 20.786,21 toneladas, lo que supone el 5,11% del total.

La compra de queso por parte de los hogares españoles durante el año 2020 se ha intensificado en todos los meses durante la pandemia. El mayor incremento se registró durante el mes de abril y mayo, apreciándose un repunte significativo también durante el mes de octubre. El menor crecimiento se experimentó en agosto, pese a esto, cerró en ese mes con una evolución del 1,9 % favorable con respecto agosto 2019 (MAPA, 2021a).

En el sector de los lácteos el consumo de queso en kg por persona y año se sitúa en segundo lugar detrás de los yogures. Sin embargo, en términos de gastos es el primero y concentra el 46,62% del total (MAPA, 2021a). Estos datos muestran una cierta tendencia al alza del consumo de queso en nuestro país y con una mayor preferencia por el queso de oveja. Otro aspecto positivo dentro de este sector es que el autoabastecimiento en los últimos años se ha incrementado en aproximadamente un 10% para situarse en valores superiores al 70% (Figura 1.2). En este sentido el aumento del consumo unido a un mayor autoabastecimiento supone un incremento de la producción nacional de queso.

A nivel mundial **España no se encuentra entre los principales países productores**. Así, a nivel europeo en el año 2020 ocupaba la 6ª posición con el 6% de la producción total, aunque distanciada de las grandes potencias Alemania, Francia e Italia. En general, el sector mantiene una tendencia positiva, con una producción total de aproximadamente 472 mil toneladas en el año 2020 (Figura 1.4). Por tipos de queso, España destaca por la producción de queso de oveja. Los principales países productores de leche de oveja a nivel mundial se encuentran en la cuenca mediterránea donde la mayor parte de la producción de esta leche se dedica a la producción de queso. España en el año 2018 era el tercer país productor de queso de oveja a nivel mundial con el 11% de la producción detrás de Grecia (20%) e Italia (12%) (MAPA, 2021a). A nivel europeo en la Figura 1.5 se muestra la evolución de España en la producción de queso puro de oveja en los últimos 10 años. La producción, aunque con fluctuaciones anuales muestra una tendencia clara ascendente hasta situarse en el año 2020 en las 70 mil toneladas, muy cerca del mayor productor Italia (73 mil toneladas) y por encima de Francia (63 mil toneladas).

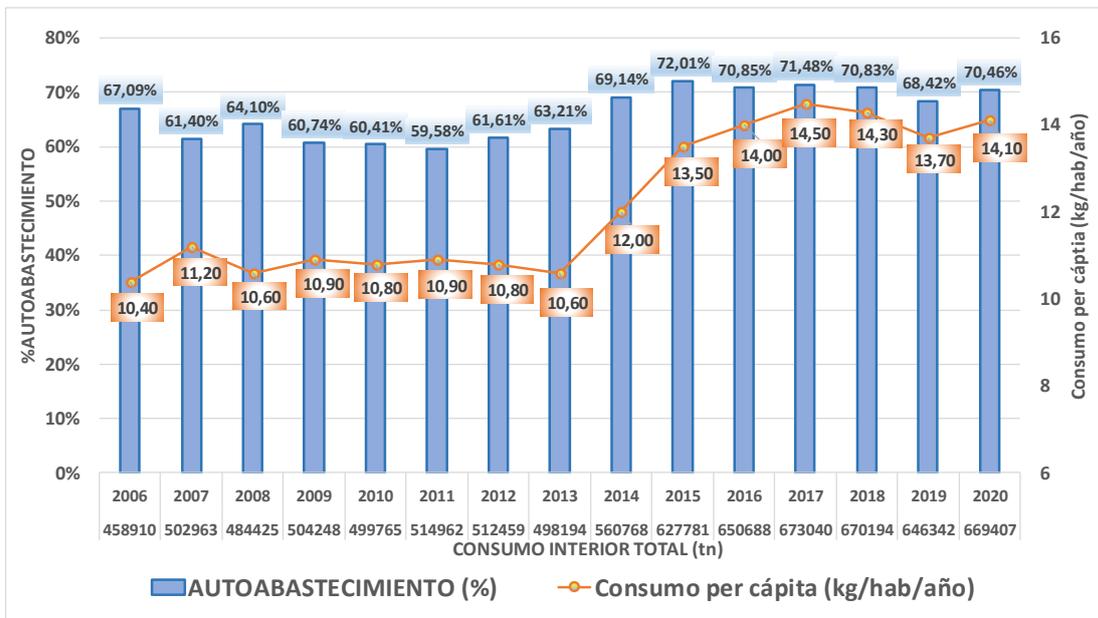


Figura 1.2. Evolución del abastecimiento y consumo de kg per cápita de queso en España en el periodo de 2006 a 2020 (MAPA, 2021a).

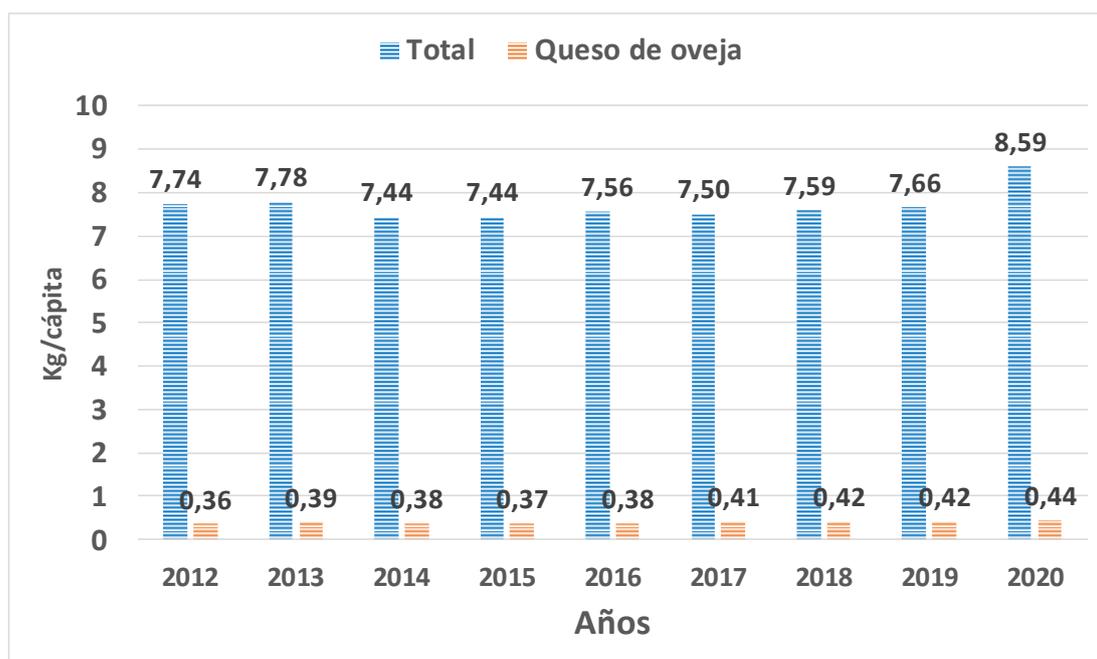


Figura 1.3. Evolución del consumo de kg per cápita de queso en los hogares españoles en el periodo de 2012 a 2020 (MAPA, 2021a).

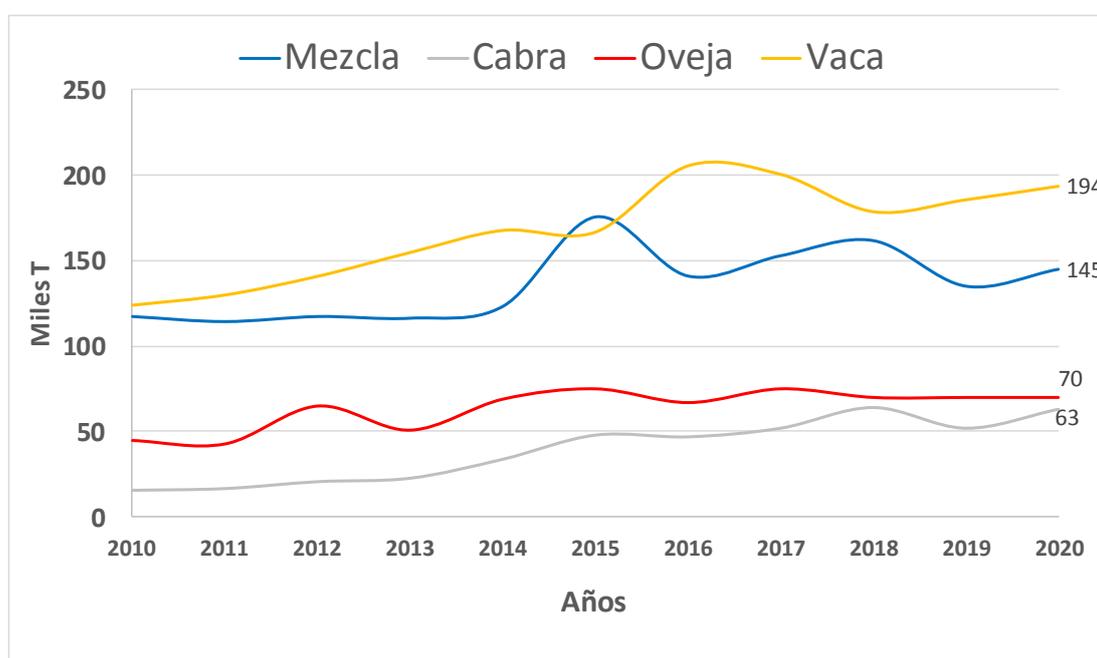


Figura 1.4. Evolución de la producción de queso en España por tipo de queso en base al origen de la leche en el periodo de 2009 a 2020 (MAPA, 2021a).

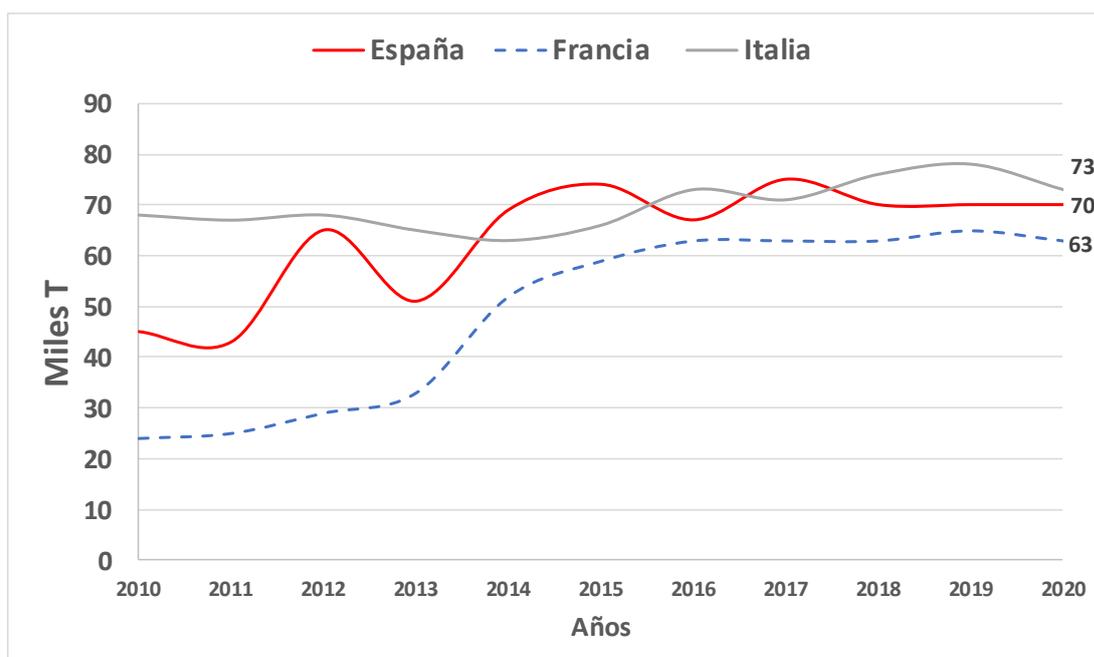


Figura 1.5. Evolución de la producción de queso puro de oveja en los tres principales países productores de la Unión Europea en el periodo de 2009 a 2020 (MAPA, 2021a).

La producción nacional de quesos en el año 2020 se elevó a 472.000 toneladas, un volumen superior en un 7 % al del año anterior. De esta producción total, el 41,10% fueron quesos de leche de vaca; 14,83 % de leche de oveja y 13,35 % de leche de cabra. El resto, fueron quesos elaborados con leche de distintas cabañas. En cuanto a los tipos de queso, del total producido, 11.51% fueron quesos de pasta blanda, 8.50% de pasta semiblanda, 21.69% de pasta semidura, 17.59% de pasta dura, 1.11% de pasta extradura y 39.62% fueron quesos frescos. Comparando las producciones por tipos de queso de 2020 con las del año anterior, permanecieron invariables. Asimismo, por tipos de leche, se produjeron 1,70 % más de quesos de cabra que el año anterior y un 0,23% más en quesos de mezcla de leches. En cambio, la producción de quesos de leche de vaca disminuyó un 0,99%, del mismo modo que los quesos de leche de oveja (0,93%) (MAPA 2021b).

1.2.2. Comercio exterior

El comercio exterior de quesos está muy dinámico en los últimos años y presenta un incremento tanto de las exportaciones y de las importaciones (Figuras 1.6, 1.7). En el año 2020 con 305 mil toneladas las importaciones triplicaron las exportaciones. En base a los datos de aduana y del MAPA (2021a), **las exportaciones** de queso en el mercado comunitario tuvieron en 2020 un valor de 359,3 millones de euros, prácticamente la misma cifra que el año anterior. Por otro lado, el valor de **las importaciones** fue de 1028,8 millones de euros, con un descenso del 7,8% respecto al año 2019. En el mercado extracomunitario, el valor de las importaciones es mínimo, con 5 millones de euros en el 2020, mientras que las exportaciones son un valor claramente emergente con 148,9 millones, aunque decrezca un

1,7% respecto a 2019. En datos de volumen, las importaciones solo experimentaron un ligero descenso y están prácticamente centradas en el mercado de la Unión Europea (Figura 1.7), mientras que las exportaciones presentan una clara tendencia al alza desde el año 2013, con un volumen de 107 mil toneladas en el año 2020 (Figura 1.6). Las exportaciones, aunque en volumen son solo 1/3 de las importaciones, en valor son aproximadamente el 46% con aproximadamente 508 millones de euros.

El destino de las exportaciones, aunque en un 80% se dirigen a la **Unión Europea**, la dinámica positiva del sector ha hecho que se expanda a nuevos mercados aumentando el volumen de las exportaciones extracomunitarias hasta llegar a suponer aproximadamente un 20% del total de estas. El 56% del total de las exportaciones son de queso fresco, rallado, fundido y de pasta azul. Los principales destinos de las exportaciones en la UE son Francia (26%), Italia (26%) y Portugal (21%), mientras que fuera de la Unión Europea el principal destino es EEUU (43%), Andorra (7%) y menores porcentajes a países de centro América como Cuba y República Dominicana y menor cantidad a diversos países de la geografía mundial. En las **exportaciones extracomunitarias** presentan una dinámica diferente a las de la Unión Europea y se centran en otras variedades de quesos distintas al grupo formado por el queso fresco, rallado, fundido y de pasta azul que solo suponen el 24%.

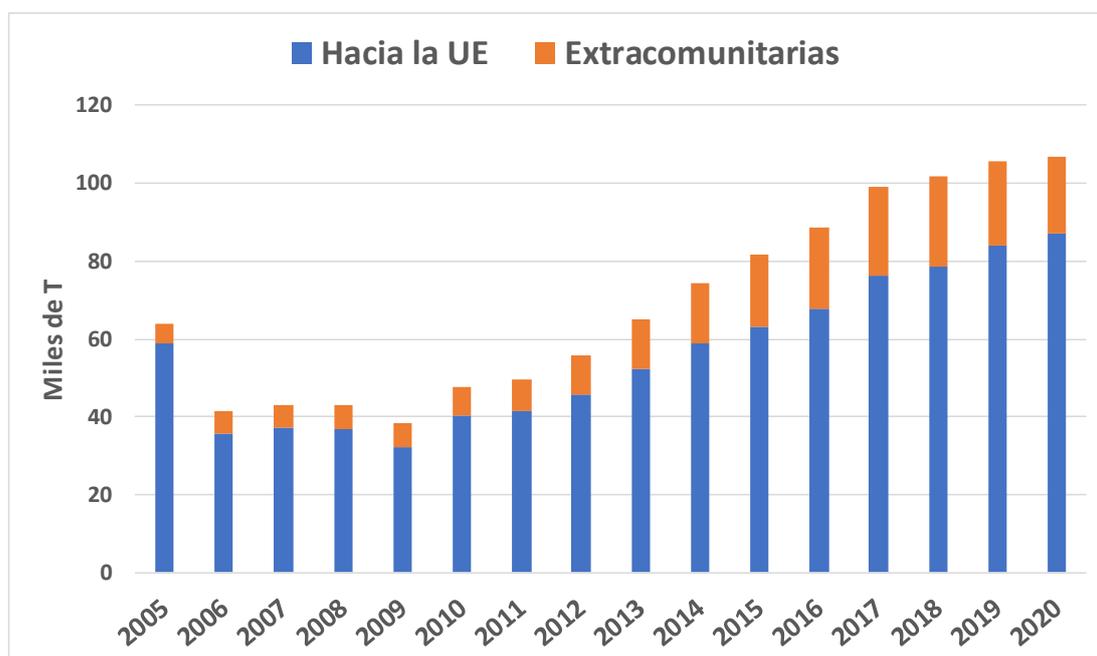


Figura 1.6. Evolución de las exportaciones de queso en el periodo de 2005 a 2020 (MAPA, 2021a).

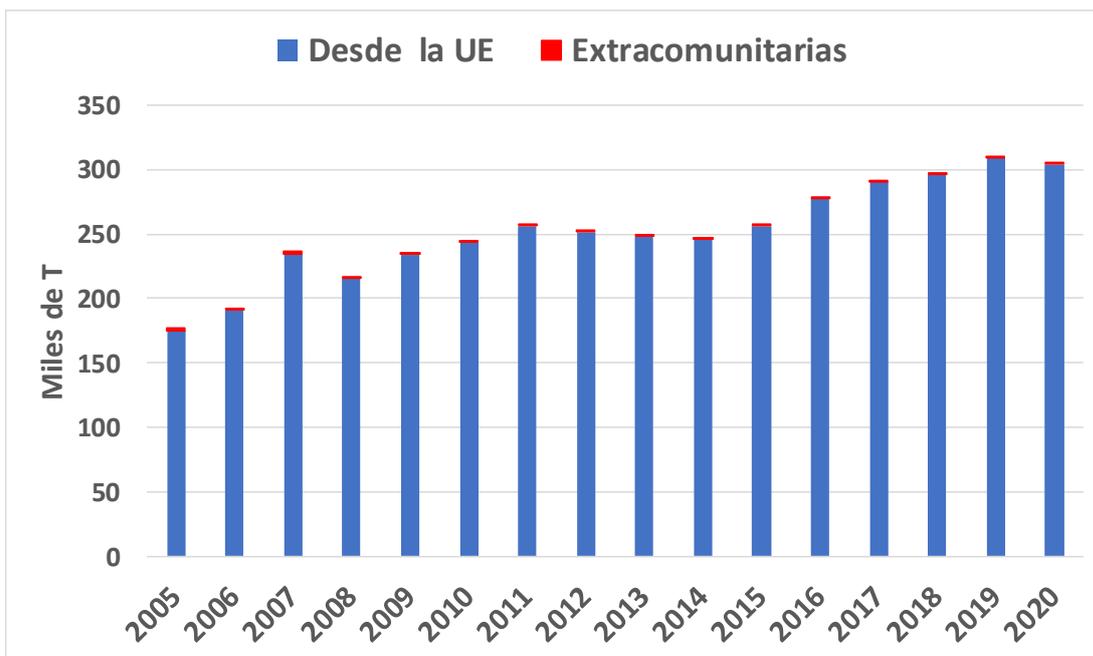


Figura 1.7. Evolución de las importaciones de queso en el periodo de 2005 a 2020 (MAPA, 2021a).

1.2.3. Quesos de calidad diferenciada

La Unión Europea en 1992 estableció tres planes de calidad para proteger los productos agrícolas, conocidos como Denominación de Origen Protegida (DOP), Indicación Geográfica Protegida (IGP), y los Certificados de Carácter Específico, también conocidos como Especialidad Tradicional Garantizada (ETG). El objetivo era promover y proteger los nombres de ciertos productos agrícolas y alimenticios de calidad.

La DOP junto con la IGP, constituyen un sistema de protección de productos agrarios y alimenticios y de bebidas espirituosas que reúnen determinadas calidades y características derivadas del lugar donde se originan o producen y se elaboran. Tienen en común que poseen un nombre geográfico que se aplica al producto agrícola o alimenticio que procede de esa zona geográfica y además que existe una relación directa entre las características específicas del producto y el medio geográfico del territorio donde se origina, produce o elabora. La diferencia entre ellas es que la DOP exige que el proceso completo, desde el origen de la materia prima al producto final se realice en la misma zona geográfica, mientras que en la IGP esto no es necesario. Por lo que en la DOP el vínculo entre el producto y la zona geográfica es más estricto que en la IGP. Por otro lado, la ETG, tiene por objeto proteger productos que presentan rasgos específicos que los diferencien de otros alimentos de la misma categoría, deben elaborarse a partir de materias primas tradicionales o presentar una composición, un modo de producción o de transformación tradicional o artesanal. Sin embargo, a diferencia de la DOP e IGP no hace referencia al origen geográfico del producto, los productos etiquetados bajo la denominación ETG no corresponden a una zona geográfica específica.

El nuevo Reglamento (CE) 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de noviembre de 2012, sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios, establece las definiciones de Denominación de Origen Protegida (DOP) y de Indicación Geográfica Protegida (IGP). Estas son las dos figuras de protección que se aplican a los productos agrícolas y alimenticios diferentes del vino y de las bebidas espirituosas. Este Reglamento entró en vigor en 2013 sustituyendo a los anteriores (Reglamento CE 2081/1992 y Reglamento 510/2006) con el fin de crear un marco más sólido para la protección y la promoción de productos agrícolas de calidad. En él se define una DOP como “Un nombre que identifica un producto originario de un lugar determinado, una región o, excepcionalmente, un país, cuya calidad o características se deben fundamental o exclusivamente a un medio geográfico particular, con los factores naturales y humanos inherentes a él, y cuyas fases de producción tengan lugar en su totalidad en la zona geográfica definida”. Mientras que una IGP es definida como “Un nombre que identifica un producto originario de un lugar determinado, una región o un país, que posea una cualidad determinada, una reputación u otra característica que pueda esencialmente atribuirse a su origen geográfico, y de cuyas fases de producción, al menos una tenga lugar en la zona geográfica definida”.

En Europa, en noviembre de 2021 hay 187 quesos registrados con DOP, el último de ellos, el queso Ennstaler Steirerkas en mayo de 2021, un queso fermentado ácido bajo en grasa austríaco, de pasta semidura elaborado a partir de leche de vaca, y otras 3 solicitudes en proceso, de las cuales una es española, la correspondiente al Queso de Acehúche, de la zona de Cáceres, caracterizado por ser muy graso y elaborado con leche cruda de cabra. En España existen actualmente 26 quesos registrados con DOP (Tabla 1.2), y tres de ellas pertenecen a la Comunidad Autónoma de Extremadura: “Queso de la Serena” (Regulación (CE) Nº 1107/1996), “Torta del Casar” (Regulación (CE) Nº 1491/2003) y “Queso de Ibores (Regulación (CE) 205/2005)”, todos ellos elaborados con leche cruda. Además, existen dos IGP, “Queso de Valdeón” de leche pasteurizada de vaca y cabra en León y “Queso los Bellos” en Asturias y parte de León principalmente elaborado con leche de vaca, aunque también se puede utilizar de cabra u oveja, y textura semidura o dura.

El informe del MAPA en 2020 sobre la evolución en el mercado de los productos alimenticios con calidad diferenciada mostró en el sector quesero un descenso leve del 0,91% con respecto al último informe del 2019. Sin embargo, este mercado ha experimentado un incremento significativo de 26,46% en los últimos 10 años. Aunque el volumen de producción disminuyó en el último año, la facturación total permaneció invariable con un incremento del 0,03% y las exportaciones el 2,29%. En el año 2020 las DOP/IGP de queso produjeron 28,72 mil toneladas, con una facturación de 300,01 millones de euros y se realizaron exportaciones por valor de 150,44 millones de euros. En el sector quesero las DOP/IGP suponen un valor mínimo en volumen, con aproximadamente un 7% de la producción total de queso, aunque en las exportaciones tienen un papel destacable con el 12,07% del total de las exportaciones en el año 2020. Por lo tanto, muestra una importante competitividad a nivel internacional. Sin embargo, la mayoría de las DOP/IGP del sector quesero presentan una escasa dimensión.

En este sector hay una DOP con un gran potencial que es la DOP “Queso Manchego” que representa aproximadamente el 63% del total de la facturación. Entre las DOP extremeñas la DOP “Torta del Casar” ocupa la posición 9 con una producción de 292,1 toneladas por un valor de 4,03 millones de euros de los que solo provienen de exportación 0,15 millones de euros, mientras que las otras dos DOP extremeñas presentan una menor competencia en el mercado con promedios de facturación en torno a 1,5 millones de euros o incluso inferior.

Tabla 1.2. Denominaciones de Origen Protegida Españolas de quesos registradas en diciembre de 2020.

Tipo de Leche	Textura Pasta	DOP	Comunidad Autónoma
Mezcla o pura de oveja, cabra o vaca	Semiblanda	Cabrales	Asturias
	Semiblanda	Gamonéu	Asturias
	Semiblanda	Picón Bejes-Tresviso	Cantabria
	Semiblanda	Flor de Guía	Islas Canarias
	Semiblanda	Quesucos de Liébana	Cantabria
Vaca	Semidura o Dura	Queso Casín	Asturias
	Semidura o dura	Mahón	Islas Baleares
	Blanda o dura (Curado)	Arzúa-Ulloa	Galicia
	Variable (Fresco a curado)	Cabreiro	Galicia
	Semidura	San Simón Da Costa	Galicia
	Semiblanda	Nata de Cantabria	Cantabria
	Semiblanda	Queso de Tetilla	Galicia
	Blanda	Afuega'l Pitu	Asturias
	Blanda	l'Alt Urgell y la Cerdanya	Cataluña
Cabra	Variable (Fresco a curado)	Queso Camerano	La Rioja
	Variable (Fresco o curado)	Queso de Murcia	Murcia
	Semidura	Queso de Murcia al Vino	Murcia
	Semidura	Queso de Ibores	Extremadura
	Semidura	Queso Majorero	Islas Canarias
	Semidura	Queso Palmero	Islas Canarias
Oveja	Dura	Idiazábal	País Vasco/Navarra
	Dura	Zamorano	Castilla la León
	Semidura-Dura	Queso Manchego	Castilla la Mancha
	Semidura	Roncal	Navarra
	Blanda	Torta del Casar	Extremadura
	Blanda	Queso de la Serena	Extremadura

Los quesos de leche de oveja presentan unas características sensoriales diferenciadas a los obtenidos de otros tipos de leche (Pappa et al., 2006). Estas particularidades se han

asociado a la composición de la leche de oveja con un mayor contenido de grasa y proteína (Rafiq et al., 2016). Entre los 28 quesos certificados con DOP/IGP solo 6 son elaborados con leche pura de oveja y en concreto las DOP extremeñas “Torta del Casar” y “Queso de la Serena” presenta como particularidad que se elaboran con leche cruda y el producto final tiene una textura diferenciada a otros quesos, siendo blanda y en ocasiones casi líquida. Solo en Portugal, hay quesos con unas características similares el “Queijo Serpa” y el “Serra da Estrela”, también protegidos por DOP (Medina & Nuñez, 2017).

2.- QUESOS DE OVEJA DE PASTA BLANDA CON DOP EN EXTREMADURA

2.1.- LA “TORTA DEL CASAR” Y EL “QUESO DE LA SERENA”

La “**Torta del Casar**” está reconocida como DOP desde el año 2003 por el Reglamento (CE) 1491/2003 de la Comisión Europea y modificado por el Reglamento de ejecución (U.E.) 2196/2015. En base al reglamento la zona geográfica que comprende la elaboración de este queso engloba 36 términos municipales dentro de las comarcas cacereñas de los Llanos de Cáceres, Sierra de Fuentes y Montánchez. Según el pliego de condiciones de la DOP su elaboración es a partir de leche cruda de oveja del tronco merino y/o entrefino utilizando como coagulante la maceración de las flores del cardo *Cynara cardunculus* L. con una maduración mínima de 60 días. Las características del producto final son una corteza entre amarillo y ocre y una pasta de color blanca o amarillenta de consistencia blanda o muy blanda y textura cremosa. El olor debe ser de intensidad media o baja de la familia láctica y/o vegetal y sabor amargo medio o bajo, salado bajo, y acidez baja o nula. Las características fisicoquímicas son un contenido mínimo de grasa del 50% en extracto seco, pH entre 5,2 y 5,9 y un máximo del 3% de NaCl. El producto se puede comercializar en tres formatos diferentes, pequeña (200-500g), mediana (501-800g) y grande (801-1100g). Los quesos deben tener una forma cilíndrica con un diámetro mínimo del 7 cm y altura al menos 50% del diámetro. En la actualidad la DOP tiene inscritas 25 ganaderías con 16.200 cabezas de ganado ovino. La leche es transformada en la “Torta del Casar” en 6 queserías certificadas en septiembre de 2021: Doña Francisca S.L., El Castúo S.C., Iberqués Extremadura S.L., Los Casareños S.L., Pastovelia S.L. y Quesos del Casar S.L. El número de queserías certificadas descendió a partir del año 2010 con motivos de la crisis económica en España, al ser un producto considerado gourmet. La evolución de la producción de la “Torta del Casar” ha sido positiva en los últimos 5 años hasta el año 2020 (Figura 1.8). En el año 2020 alcanzó una producción de torta certificada de 292.093 kg, similar al año 2016 (lo que supone un 18,96% menos respecto al año anterior) por un valor de 4,03 millones de euros. El destino de la “Torta del Casar” es principalmente Nacional con aproximadamente el 96,2% de las ventas en nuestro país, siendo las principales áreas de comercio Extremadura con el 30,50% y Madrid el 33,44%. Las exportaciones, aunque han experimentado un ligero descenso, solo son el 3,8% del total (11.173 kg) siendo el principal destino Europa (78%) seguido del continente americano con un 16,18%.

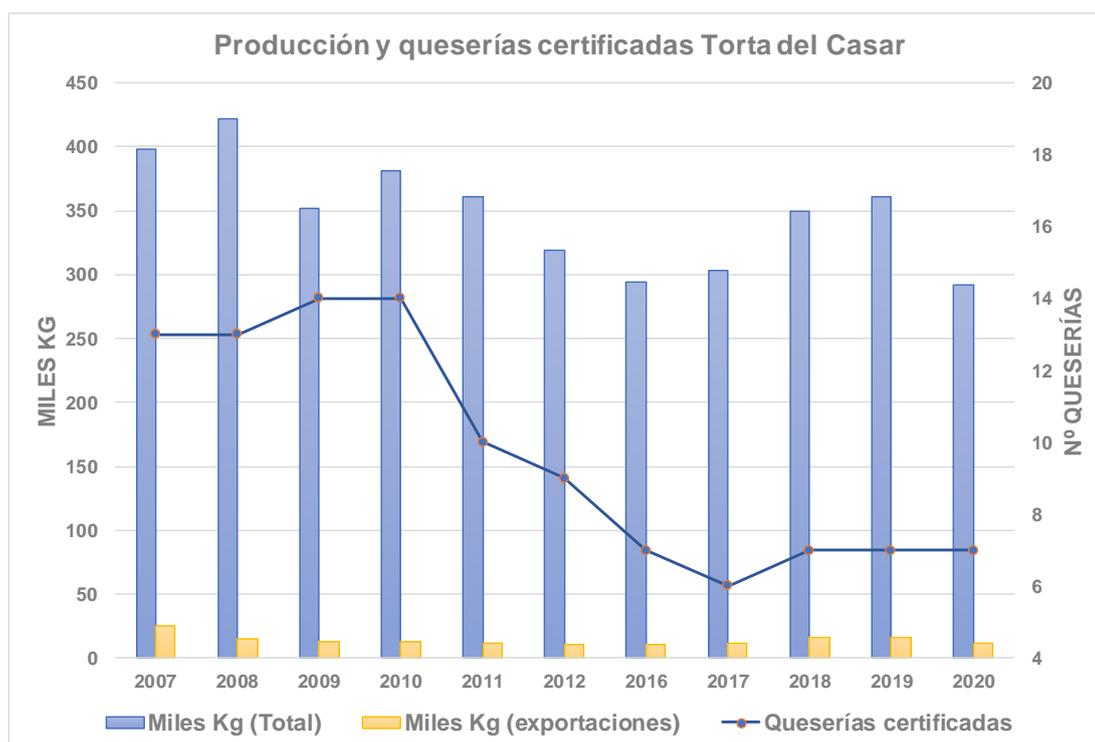


Figura 1.8. Evolución de la producción y queso certificadas de “Torta del Casar” en el periodo de 2008 a 2020. Los datos de exportación son solo referidos al periodo 2016-2020 (Consejo Regulador de la Torta del Casar (<https://tortadelcasar.eu/>); MAPA, 2021c).

La DOP “Queso de la Serena” está certificada desde el año 1996 por el Reglamento (CE) 1107/1996 de la Comisión Europea con una modificación menor (DOUE C 247/08 de 29/07/2017). La zona geográfica que comprende la elaboración de este queso engloba 21 municipios dentro principalmente de la comarca de la Serena y algunos de comarcas limítrofes en la provincia de Badajoz. Según el pliego de condiciones de la DOP su elaboración es a partir de leche cruda de oveja del tronco merino utilizando como coagulante la maceración de las flores del cardo *Cynara cardunculus* L. con una maduración mínima de 60 días. El producto final tiene forma discoidal con caras planas y superficie perimetral convexa. El diámetro del queso debe ser entre 10 y 24 cm, altura de 4 a 8 cm y peso en el rango desde los 750 g a 2000 g. La corteza es semidura y textura de la pasta blanda o semiblanda, mantecosa, con color blanco marfil, cuando presentan estas características son denominados “Torta”. También, aquellos con mayor tiempo de maduración, pueden presentar una textura semidura con color amarillo céreo, los cuales son denominados como “queso”. Es un queso graso o extra-graso con sabor ligeramente amargo, atribuido al coagulante vegetal, no es ácido, poco salado, con un regusto picante y persistente al paladar. Las características fisicoquímicas que presenta son un extracto seco mínimo del 50%, contenido mínimo de grasa del 50% y proteína del 35% en extracto seco y pH final entre 5,2 y 5,9. El producto se puede comercializar en tamaño de 750 g a 2000 g. En base a los últimos datos que constan en el MAPA, la DOP tiene inscritas 56 ganaderías con 50.000 cabezas de ganado ovino del tronco merino. La leche es transformada en 7 queserías certificadas inscritas: Adriano Atalaya

Fernández-Petregal, S.C.L.C. Agrícola Ganadera de Castuera (COVICA), Quesos Sánchez Hidalgo, S.L., Lácteos de Castuera, S.L., Arteserena S.L., Quesería Tierra de Barros, S.L. y Serena Pura, S.L.U. La producción en el año 2020 fue de 48.450 kg, siendo su principal mercado el nacional, con aproximadamente el 86% comercializado en Extremadura. Las exportaciones están por debajo del 14% del volumen total en ese mismo año, siendo Europa su principal destino.

Los quesos de oveja de pasta blanda de las DOP “Torta del Casar” y “Queso de la Serena” son quesos con unas características singulares muy reconocidas a nivel regional y también en el mercado nacional. Sin embargo, son quesos muy delicados y singulares, características que limitan la exportación, que es su gran asignatura pendiente. En los últimos años su calidad y propiedades organolépticas han sido reconocidas a nivel nacional e internacional. A nivel internacional en el certamen “World Cheese Awards” la quesería Arteserena S.L: (DOP Queso de la Serena) fue designado el 2º mejor queso del mundo en la edición de 2016 y “Super Gold” en el 2018, además obtuvo la medalla de oro en el concurso premio Roma 2018. Igualmente, la “Torta del Casar” a través de la Quesería Doña Francisca fue premiada como el 3º mejor queso del mundo en 2019 y recientemente ha conseguido la medalla de bronce en la 33 edición del World Cheese Awards en el año 2021. Además, Las queserías Quesos del Casar S.L. y El Castúo S.C. han sido también distinguidas con una medalla de ORO y medalla de BRONCE en el mismo certamen respectivamente. A nivel nacional, la quesería Arteserena S.L. también resultó ganadora del Premio Especial Alimentos de España al Mejor Queso 2019, mientras que el queso de pasta blanda de la Cooperativa Agrícola y Ganadera de Castuera, se ha alzado recientemente con el segundo galardón en el prestigioso premio nacional al Queso Gourmet que se falla en el Salón del Gourmet celebrado en Madrid en 2021. Por otro lado, la quesería los Casareños, de la DOP “Torta del Casar”, en el 2019 fue designado el Ganador de la X edición del Gourmet Quesos, mientras que, en el mismo certamen de 2021, la “Torta” elaborada por la quesería Iberqués Extremadura S.L. ha resultado ganadora de la XI edición Gourmets como mejor queso de pasta blanda. Además, la quesería Quesos del Casar S.L. ha resultado también ganadora del más prestigioso certamen nacional, la cata – concurso celebrada por el Ministerio de Agricultura, obteniendo la distinción de MEJOR QUESO DE ESPAÑA 2021 en la modalidad en que competía, la de Queso Madurado de Oveja, convirtiéndose en el único queso extremeño con Denominación de Origen que consigue este gran reconocimiento.

Estos reconocimientos a nivel nacional e internacional deben ser un impulso para su expansión, ya que la materia prima no es un problema en la región. Extremadura es la Comunidad Autónoma con mayor ganado ovino, con el 22,2% del total nacional, sin embargo, está destinado en su mayoría a la producción de carne. En producción de leche de oveja, la producción regional solo supone el 2,2% del total nacional (MAPA, 2021b). El impulso internacional de los quesos tipo torta podría suponer también una consolidación de este sector ganadero ovino que podría obtener un rendimiento mixto de carne y leche.

2.2.- PROCESO DE ELABORACIÓN

2.2.1.- Etapas

La elaboración de los quesos de pasta blanda en la DOP “Queso de la Serena” y DOP “Torta del Casar” presentan muchas similitudes (Figura 1.9). Como materias primas se utiliza leche cruda de oveja (sin la adición de cultivo iniciador), coagulante vegetal y sal. La leche tiene que ser del tronco merino en el “Queso de la Serena” y del tronco merino y/o entrefino en la “Torta del Casar”, y suministrada por ganaderías inscritas en las DOP. Como coagulante se utiliza las flores del cardo *Cynara cardunculus* L. que crece de forma natural en diferentes áreas de Extremadura. **La leche** debe estar limpia, sin impurezas, exenta de calostro e inhibidores, antibióticos u otros productos medicamentosos, conservantes, etc., que puedan influir negativamente en la elaboración, maduración y conservación del queso, así como en las condiciones higiénicas y sanitarias del mismo. La leche en las explotaciones ganaderas se mantiene en tanques refrigerados entre 1-6°C y es transportada en camiones cisterna isoterms a las queserías, en un periodo inferior a 72 h desde el ordeño, con el objetivo de mantener la calidad de la leche, manteniendo unas perfectas condiciones higiénicas y conservando todas sus características originales. En la Tabla 1.3 se presentan las características que debe tener la leche cruda para la elaboración de este queso según el pliego de condiciones de cada DOP (Reglamento (CE) 1107/1996; Reglamento (CE) 1491/2003; Reglamento de ejecución (U.E.) 2196/2015).

Tabla 1.3. Características de la leche cruda para la elaboración de queso tipo torta según pliego de condiciones de cada DOP.

Parámetros	Torta del Casar	Queso de la Serena
Proteína	>4,8%	>5%
Materia grasa	No especificado	>7%
Extracto seco	>11%	>18%
Acidez	22ºD	Sin especificar
pH	6,6-6,9	Sin especificar

El **coagulante vegetal** es elaborado por maceración en agua de las flores secas del cardo *Cynara cardunculus* L. Aunque existe una alternativa industrial de un coagulante en polvo elaborado a partir del cardo, obtenido por liofilización de los extractos acuosos de las flores, algunas queserías obtienen la flores secas enteras o molidas recogidas de diferentes zonas de Extremadura donde crece la planta de forma natural, mientras que la mayoría, adquieren el coagulante a través de una empresa, Cuajos Martínez, ubicada en La Morera (Badajoz) con Registro Sanitario que permite la comercialización de pistilos secos de coagulante vegetal. La preparación de la infusión o maceración de las flores del cardo, enteras o molidas, con agua no está estandarizada y cada maestro quesero la elabora en base a su experiencia. En general el coagulante vegetal es preparado diariamente mezclando aproximadamente flores secas del cardo con agua en proporción 1:10 y se deja macerar. La

temperatura y tiempo de maceración es variable según el elaborador. Tras este tiempo, las flores se filtran a través de una tela o gasa y el líquido de color marrón resultante se añade a la leche. La cantidad de coagulante vegetal que se añade a la leche depende de la cantidad de leche a cuajar, la calidad visual de las flores secas y la experiencia del maestro quesero.



Figura 1.9. Diagrama de flujo del proceso de la elaboración de la “Torta del Casar” y el “Queso de La Serena”.

La **etapa de coagulación** se inicia con el calentamiento de la leche a una temperatura en el rango comprendido entre 26-32°C para la “Torta del Casar” y 25-32°C para el “Queso de La Serena”. Posteriormente se añade el coagulante vegetal en proporción adecuada y se deja coagular entre 50-90 min en la “Torta del Casar” y entre 50-70 min en el “Queso de La Serena”. El fin de la etapa de coagulación es a criterio del maestro quesero en base a su experiencia. La cuajada obtenida es cortada con liras mediante sucesivos pases hasta conseguir granos de tamaño fino, tipo grano de arroz (10-20 mm). La cuajada es **cortada** para aumentar la superficie de contacto, facilitando la separación del suero de la cuajada.

Una vez terminado el corte y eliminado gran parte del suero, la cuajada en finos granos es introducida en **moldes** perforados y con un paño de tela en su interior. El tamaño del molde seleccionado depende del tamaño del producto final que se quiera obtener. Hasta hace unos años los moldes más comunes eran aquellos para quesos de 1 kg o superior. Hoy en día son más comunes formatos más comerciales como el mediano, en torno a 600-800 gramos, y el pequeño con 300-500 gramos. En la DOP “Queso de La Serena” se tiende a formatos más grandes que en la DOP “Torta del Casar”.

Cuando los moldes ya están llenos se realizará el **prensado** mecánico. En esta etapa se eliminará la totalidad de suero que pueda retener la cuajada. La presión aplicada y el tiempo dependen del maestro quesero. En el caso de la DOP “Queso de La Serena” solo se especifica que debe hacerse mediante un medio adecuado, mientras que en la DOP “Torta del Casar” se permite un máximo a 3 kg/cm² y máximo de tiempo 8 h.

Al finalizar el prensado, tiene lugar el desmoldado y el queso ya tiene su forma definitiva. Previo a la maduración tiene lugar el **salado**. Este proceso bien se puede hacer en seco, más común en las queserías de la DOP “Queso de La Serena” o vía húmeda en salmuera, método más extendido en las queserías de la DOP “Torta del Casar”. En la “Torta del Casar” el proceso de salado con cloruro sódico se debe hacer de tal manera que la concentración final del producto no supere el 3%. En el “Queso de la Serena” la concentración final de sal permitida en el producto no está especificada. Posteriormente son introducidos en las cámaras para su maduración. En el caso de la DOP “Queso de La Serena” está permitido madurar los quesos en la cámara sobre baldas de madera de pino o roble.

La última etapa es la de **maduración** en atmósfera o ambiente controlado. Esta etapa tendrá una duración mínima de 60 días, siempre que cumpla la normativa sanitaria vigente, bajo una temperatura de 4 a 12°C y una humedad relativa de 75-95 % en la DOP “Torta del Casar” y de 4 a 15°C y una humedad relativa superior al 75 % en la DOP “Queso de La Serena”. En la cámara de maduración son volteados periódicamente y en la fase final de la maduración se utilizan vendas para evitar que la pasta rompa la corteza y fluya al exterior. Durante la maduración ocurren los cambios bioquímicos, glicolisis, proteólisis y lipólisis, que dan lugar a este queso tan singular por su aroma y textura.

2.2.2.- Evolución de población microbiana

En quesos artesanales como el “Queso de La Serena” y la “Torta del Casar” elaborados con leche cruda de oveja sin la utilización de cultivos iniciadores, la calidad microbiológica y composición de las materias primas utilizadas tienen una gran influencia en el proceso de maduración del queso (Montel et al., 2014; Kongo & Malcata, 2016; Yeluri et al., 2018).

La microbiota al inicio de la maduración en los quesos de pasta blanda elaborados a partir de leche cruda y coagulante vegetal, va a proceder de diferentes fuentes,

principalmente de los microorganismos presentes en dicha leche cruda y en la infusión del coagulante vegetal (Ordiales et al., 2013a), pero además varios estudios han determinado la importancia de la transferencia de microorganismos del ambiente y de las instalaciones de la quesería y su relevancia en el proceso de maduración (Bokulich & Mills, 2013; Calasso et al., 2016). La microbiota presente en la leche cruda es variable debido a la transferencia de microorganismos desde diferentes fuentes como el canal del pezón, las ubres, microbiota presente en los equipos de ordeño, almacenamiento y transporte de la leche. Además, hay que valorar la calidad higiénica en las prácticas de ordeño y manejo del animal (Intensivo, semiextensivo o extensivo) (Yeluri et al., 2018). En un estudio reciente, Frétin et al. (2018) encontró que el 27% de las bacterias presentes en queso elaborado con leche cruda estaban también en la superficie del pezón de las ubres, estando algunas de las especies identificadas (Bacterias ácido-lácticas (BAL) y *Brevibacterium* spp.), involucradas en el desarrollo de las propiedades organolépticas de los quesos. Los principales microorganismos encontrados en leche cruda de oveja son *Pseudomonas* spp., enterobacterias, BAL (Enterococos en mayor medida y también lactococos *Lactobacillus* y *Leuconostoc*), cocos Gram positivo catalasa positivo, *Corynebacterium* y en menor nivel, levaduras (Montel et al., 2014). En estudios científicos sobre la microbiota de quesos de pasta blanda extremeños en la leche de partida, los principales grupos microbianos fueron BAL, enterobacterias, cocos Gram positivo catalasa positivo y en menor medida levaduras (Arqués et al., 2006; Ordiales et al., 2013a, b). Sin embargo, en estos estudios las pseudomonas no se consideraron, las cuales son el principal grupo dominante en la leche cruda durante su almacenamiento en refrigeración (Montel et al., 2014; Vithanage et al., 2016). Además, los resultados obtenidos mostraron diferencias importantes en el número de bacterias totales, aproximadamente 2 log ufc/mL, lo que muestra la gran variabilidad existente en la carga microbiana de la leche partida entre diferentes lotes de estos tipos de quesos. Por otro lado, Ordiales et al. (2013a) mostró que la infusión del coagulante vegetal también presenta una carga microbiana importante, en el rango de 4-5 log ufc/mL, y con gran variabilidad entre lotes de coagulante. Los principales grupos microbianos encontrados en el coagulante vegetal fueron levaduras, cocos Gram positivos catalasa positivo, enterobacterias y lactococos. La gran variabilidad en la carga microbiana inicial de las materias primas y la no utilización de cultivo iniciador puede dificultar el control de los cambios bioquímicos producidos por los microorganismos en la matriz del queso y es una de las principales causas de variabilidad en las características organolépticas y calidad global del producto final, debido a la gran influencia que tienen los microorganismos en los procesos bioquímicos producidos en la matriz del queso durante la maduración (Pereira et al., 2010a, b). Por todo ello, la estandarización de las materias primas y las prácticas de elaboración por parte de las denominaciones de origen son necesarias para conseguir una calidad homogénea en el productor final.

Diferentes estudios en los últimos 25 años han analizado la dinámica de la microbiota durante la maduración de la "Torta del Casar" y el "Queso de La Serena". Al igual que en otros quesos tradicionales de leche cruda de oveja, las BAL son el grupo predominante. Sin

embargo, existen diferencias entre los estudios realizados hasta la fecha debido a varias causas como la mejora en las prácticas higiénicas de elaboración en los últimos años desde el ordeño al producto final, la evolución de las técnicas microbiológicas utilizadas, tiempo de muestreo en la maduración, la influencia de factores como la temporada, industria, prácticas de elaboración y variabilidad en la calidad microbiológica de las materias primas, entre otros.

En general en la “Torta del Casar” y el “Queso de La Serena” el número de microorganismos viables alcanza valores de aproximadamente 9 log ufc/g en los primeros días de maduración y se mantienen estables o experimentan un ligero incremento durante el periodo de maduración (Fernández del Pozo et al., 1988a; Más Mayoral et al., 1991; Pouillet et al., 1991; Sánchez-Rey et al., 1993; Arqués et al., 2006; Ordiales et al., 2013b). **La microbiota dominante** está formada principalmente por BAL, las cuales presentan recuentos ligeramente inferiores a los recuentos totales de microorganismos y siguen una dinámica similar a ellos durante la maduración. Las especies de BAL identificadas son diversas según el estudio y técnica utilizada. En la “Torta del Casar” las especies predominantes de BAL durante la maduración son *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*, *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecalis* (Pouillet et al., 1993). Más recientemente Ordiales et al. (2013b) mediante secuenciación del gen 16S rRNA identificó entre la microbiota dominante las especies *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, y *Enterococcus durans*. Sánchez-Juanes et al. (2020) identificó la microbiota dominante de BAL en queso tipo “Torta” en dos industrias, una certificada por la DOP y otra no, utilizando el perfil de proteínas del microorganismo (MALDI-TOF) y secuenciación del gen pheS. Los resultados mostraron diferencias en la BAL predominantes en cada industria, si bien las especies *Lb. paracasei* y *Leuc. mesenteroides* fueron identificadas en ambas industrias, otras especies como *Lc. Lactis*, *Lb. plantarum*, *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus rhamnosus* estaban asociadas a una de ellas. En “Queso de La Serena” la microbiota ha sido estudiada en menor profundidad y no hay estudios recientes. Fernández del Pozo et al. (1988a) encontró que las BAL predominantes eran las especies *Lc. lactis*, *Lb. casei/paracasei*, *Lb. plantarum*, *Leuc. mesenteroides*, y *Enterococcus faecium*. Por lo tanto, aunque existen diferencias entre estudios en las especies de BAL predominantes, algunas especies como *Lc. Lactis*, *Lb. casei/paracasei*, *Leuc. mesenteroides* y *Enterococcus* spp. se muestran como las más frecuentes entre la microbiota dominante de quesos de pasta blanda elaborados con leche cruda de oveja (Fernández del Pozo et al., 1988a; Macedo et al., 1995; Pouillet et al., 1993; Tavaría & Malcata 1998; Ordiales et al., 2013b; Gonçalves et al., 2018; Sánchez-Juanes et al., 2020). Estas especies de BAL son comúnmente identificadas entre la microbiota dominante de quesos elaborados con leche cruda de diferentes orígenes y las actividades metabólicas que desarrollan contribuyen de forma significativa a las características sensoriales del producto final (Ordiales et al., 2013a; Montel et al., 2014).

La **microbiota secundaria** está constituida principalmente por enterobacterias y micrococáceas con recuentos al final de la maduración en el rango de 5-7 log ufc/g y en menor medida por levaduras con recuentos finales de 3-4 log ufc/g (Sánchez-Rey et al., 1993; Arqués et al., 2006; Ordiales et al., 2013b). Pouillet et al. (1991) en “Torta del Casar” encontró niveles inferiores. Los recuentos de coliformes eran de 5-6 log ufc/g durante el primer mes y decrecían a 2-4 log ufc/g a los 60 días, mientras que el número de Staphylococci coagulasa-positivo eran 2-3 ufc/g durante el primer mes, y se redujeron a 1 log ufc/g a los 60 días.

Cáceres et al. (1997) caracterizó la población de micrococáceas de la “Torta del Casar” mostrando una amplia diversidad de estafilococáceas entre las que dominaban *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus caseolyticus*, las cuales mostraron una destacada actividad lipolítica, por lo que podrían estar implicadas en la formación de ácidos grasos libres relacionados con la formación del aroma de la “Torta”. Ordiales et al. (2013b) también detectó estas mismas especies junto con *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* entre las estafilocáceas dominantes y asoció este grupo microbiano con la formación de determinados compuestos volátiles, ésteres y metil cetonas, relacionados con el aroma del queso (Ordiales et al., 2013a).

Las enterobacterias, vinculadas a la microbiota de los quesos de leche cruda, son utilizadas como indicadores de la calidad microbiológica al ser habitantes del tracto intestinal de los mamíferos, pero también contribuyen a la formación del aroma de la “Torta” (Ordiales et al., 2013b). Dentro de este grupo se encuentran algunas de las principales bacterias patógenas asociadas a alimentos como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Sin embargo, la principal especie detectada en la fase final de la maduración es *Hafnia alvei/paraalvei* (Ordiales et al., 2013b), la cual está también entre la población de enterobacterias dominante de quesos de leche cruda similares a la “Torta” (Macedo & Malcata, 1997b; Gonçalves et al., 2018). Esta especie se caracteriza por su elevada actividad proteolítica y contribuye al aroma final del queso (Irlinger et al., 2012), aunque también debido a la formación de gas puede dar lugar a ojos e hinchazón temprana en la “Torta” (Tabla et al., 2016).

Dentro de la microbiota secundaria también nos encontramos a diferentes especies de levaduras. Sus recuentos en el interior del queso se mantienen estables o disminuyen ligeramente durante la maduración (Ordiales et al., 2013b). Las levaduras crecen mejor en presencia de oxígeno y se desarrollan mejor en la superficie del queso (Fröhlich-Wyder et al., 2019). Las principales especies identificadas en la “Torta” y quesos similares son *Kluyveromyces* spp. *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia* spp. y *Candida* spp. (Ordiales 2013b; Gonçalves et al., 2017; Merchán et al., 2020). Las levaduras debido a su capacidad enzimática, tanto proteolítica como lipolítica, contribuyen positivamente al desarrollo del aroma en determinados quesos. Además, en los quesos las levaduras participan en la maduración metabolizando el ácido láctico y cuando se agota metabolizan aminoácidos produciendo NH₃ por lo que elevan el pH y favorecen el crecimiento de bacterias no ácido-tolerante que contribuyen a la maduración. Por otro lado,

también pueden dar lugar a aromas anómalos cuando se desarrollan en exceso, coloraciones inadecuadas, ojos e hinchazón (Fröhlich-Wyder et al., 2019) y alteración del aspecto exterior (Figura 1.10) tal y como se describirá con más detalles en apartados posteriores.



Figura 1.10. Coloraciones irregulares en “Queso de La Serena” de pasta blanda en fase final de maduración.

2.2.3.- Cambios Bioquímicos

La maduración del queso es un proceso dinámico en el que van a tener lugar una serie de transformaciones complejas que son responsables de las características sensoriales finales del queso como el aroma, sabor, color y textura. Los principales cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración son la glucólisis, la lipólisis y la proteólisis (Figura 1.11). El impacto de estos procesos en las características finales va a depender del proceso de elaboración y maduración del queso.

2.2.2.1.- Glucólisis

El principal hidrato de carbono presente en la leche es la lactosa. La leche de oveja merina contiene aproximadamente un 5% de lactosa (Nudda et al., 2002). Sin embargo, durante el corte de la cuajada y desuerado la mayor parte de la lactosa se pierde en el suero (Huffman & Kristoffersen, 1984). En la cuajada queda retenida aproximadamente el 0,8-1% de la lactosa de la leche (Fox et al., 2000). Para el queso, al ser un producto fermentado, la lactosa residual que queda retenida en la cuajada es transformada principalmente por las BAL presentes en ácido láctico y otros compuestos derivados del metabolismo de la lactosa. El descenso de pH asociado a la producción de ácido láctico tiene gran influencia en el proceso de maduración.

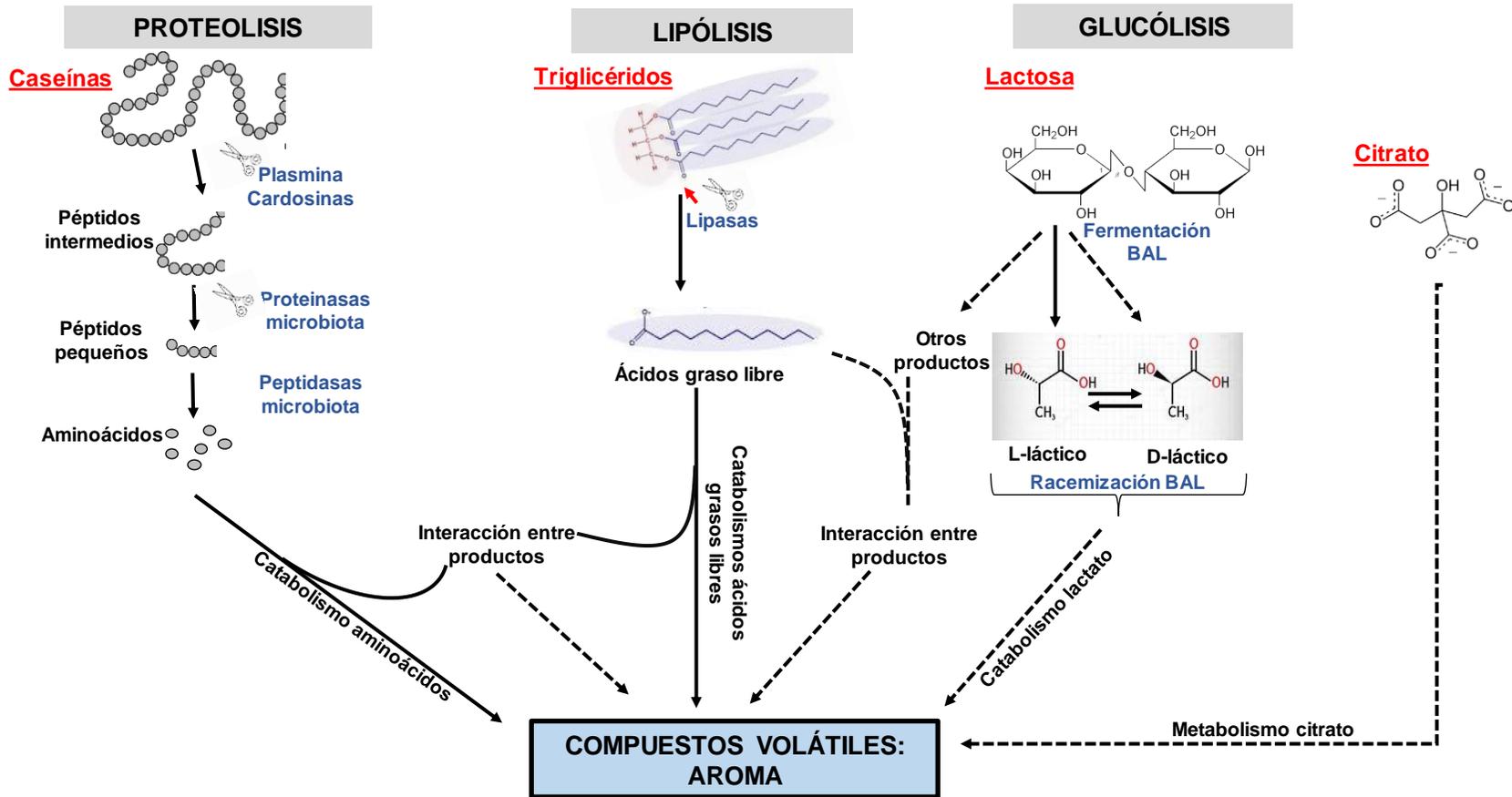


Figura 1.11. Esquema general de los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración de quesos extremeños DOP de pasta blanda (Adaptado de McSweeny, 2017).

La **hidrólisis de la lactosa** puede producirse por diferentes rutas bioquímicas dependiendo la cepa de BAL. El ácido láctico es producido preferentemente por las BAL a partir de lactosa, mientras que el ácido acético puede producirse a partir de lactosa o citrato principalmente por *Leuconostoc* spp., o de aminoácidos por los lactobacilos (Fox et al., 1990).

En el queso tipo “Torta”, al ser de leche cruda, las **BAL** van a proceder principalmente de la leche y en menor medida del coagulante vegetal y de las superficies de la industria (Ordiales et al., 2013a; Bokulich y Mills, 2013). En estos quesos la microbiota endógena de BAL metaboliza rápidamente la lactosa, aunque al no añadirse cultivo iniciador, la intensidad y duración de este proceso va a estar condicionado en gran medida por la concentración inicial de BAL. Posteriormente la actividad de las BAL es reducida durante la maduración, producto del agotamiento de la lactosa, la consecuente bajada del pH por el ácido láctico y la difusión de la sal al interior de queso (McSweeney, 2017).

El **pH del queso** tiene una gran influencia en la absorción de sal. La incorporación de sal en el queso durante el salado en salmuera es mayor a menor pH (Guinee & Sutherland, 2011). Sin embargo, la asimilación de lactosa en quesos artesanales de pasta blanda sin aplicación de cultivo iniciador es más lenta que en quesos como el cheddar donde se aplican cultivos iniciadores y se produce en pocas horas. Macedo y Malcata (1997a) mostraron en queso “Serra da Estrela” que la lactosa no se metaboliza casi completamente hasta la tercera semana de maduración, lo que conlleva un descenso más lento del pH. Por lo tanto, la influencia del pH en la asimilación de sal es mínima en quesos como en este tipo de quesos de pasta blanda. Por otro lado, la concentración de sal en el queso tiene una gran importancia en el proceso de acidificación. La sal en el queso limita la acción de las BAL. Sin embargo, en los quesos extremeños DOP de pasta blanda, el salado se produce una vez moldeado y prensado el queso por vía seca o vía húmeda en salmuera. Bajo estas condiciones la difusión de la sal es más lenta, que, si se aplica la sal directamente en la leche o cuajada. En la “Torta” salada después del prensado vía húmeda la difusión completa de la sal hasta el interior del queso tarda aproximadamente 15 días (Tabla et al., 2015), lo cual, permite el descenso del pH hasta valores de aproximadamente 5 antes de que la sal inhiba la acción de las BAL.

La producción de **ácido láctico** y consecuente descenso del pH va a influir en varios factores del procesado del queso y en última instancia en la composición y calidad del queso. La disminución del pH de la cuajada va a inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y el desarrollo de bacterias no deseables que pueden causar alteración en el producto (Kongo & Malcata, 2016). Además, la acidificación va a favorecer la retención del coagulante, lo que unido a la pérdida de estabilidad de la micela de caseína por su desmineralización debido a la disolución del fosfato de calcio coloidal favorece la acción del coagulante, la retracción de los coágulos o granos formados y la formación de la cuajada (Fox et al., 1990; Bansal et al., 2007). Por otra parte, la intensidad de la acidificación influye sobre el grado de desmineralización de la micela de caseína y su susceptibilidad, lo que condiciona al proceso de proteólisis durante la maduración (Watkinson et al., 2001; Lee et al., 2005).

Todas estas modificaciones tienen una gran influencia en las características físicas de la cuajada o gel formado y en consecuencia en el sabor y las propiedades reológicas del queso final.

Por otro lado, el **ácido láctico producido por el metabolismo de la lactosa por las bacterias ácido lácticas en el queso puede ser metabolizado** por diferentes vías, dependiendo de la microbiota del queso, a diferentes compuestos con implicaciones en las propiedades sensoriales del queso (Figura 1.12).

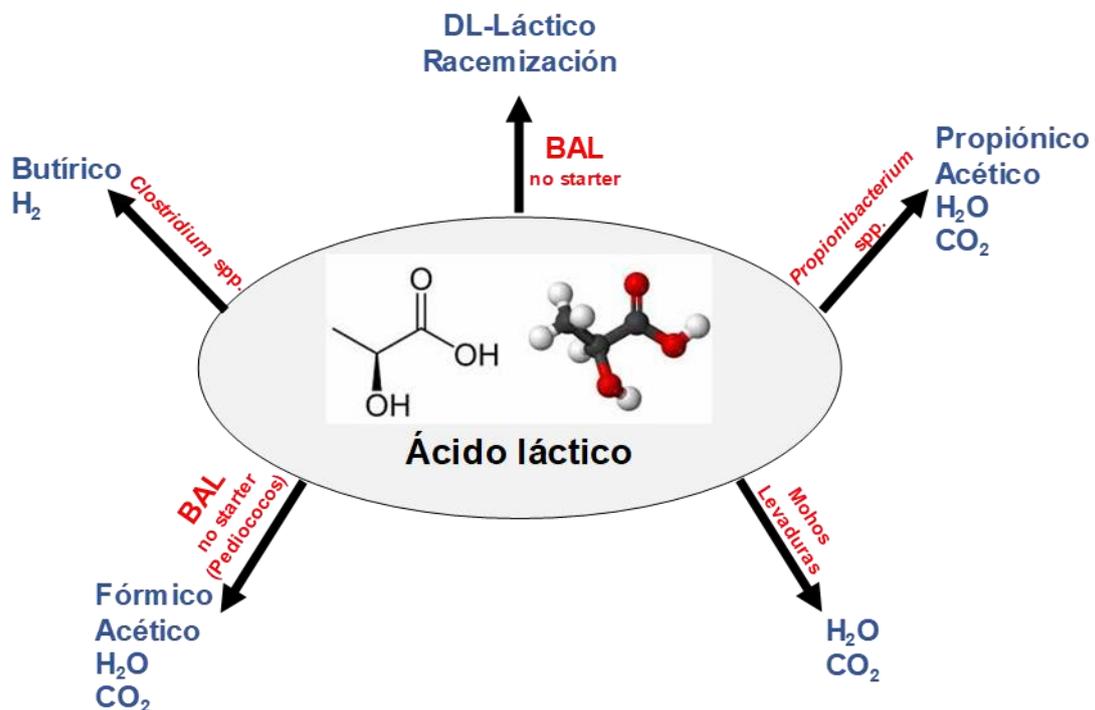


Figura 1.12. Vías metabólicas generales del metabolismo del ácido láctico en el queso (Adaptado de McSweeney, 2004).

El **lactato** está predominantemente en forma de L-lactato, pero también dependiendo de las BAL implicadas en la maduración del queso puede encontrarse cierta cantidad del isómero D-lactato. Además, el D-Lactato se puede formar a partir del L-lactato por racemización debido a la actividad de determinadas BAL. Este proceso es más rápido en quesos de leche cruda que en los de leche pasteurizada (Mcsweeney et al, 2017). Esta reacción no tiene ninguna implicación en el aroma, pero el D-lactato cálcico es menos soluble que el L-lactato cálcico y puede formar pequeños cristales blancos indeseables, especialmente en las superficies de corte (Dybing et al., 1988). El lactato puede ser oxidado por determinadas BAL a acético, fórmico, etanol y CO₂ (Fox et al., 2000). Sin embargo, esta reacción va a depender de las BAL presentes y de la disponibilidad de O₂, lo que limita esta reacción (McSweeney, 2004). La presencia de bacterias propiónicas puede transformar el lactato a

propiónico, acético y CO₂. El acético y propiónico tienen implicaciones en el aroma del queso (Delgado et al., 2009, 2010b; Ordiales et al., 2013a), mientras que el CO₂ daría lugar a presencia de ojos en el queso. El metabolismo anaeróbico del lactato por el *Clostridium tyrobutyricum*, principalmente en quesos curados o semicurados, a butirato y H₂ da lugar a un defecto conocido como hinchazón tardía, que hace que aparezcan grietas en el queso durante la maduración y el desarrollo de aromas extraños (Fox et al. 1990; McSweeney et al., 2017). Por último, en la superficie de los quesos, los mohos y levaduras metabolizan oxidativamente el lactato a CO₂ y O₂ aumentando el pH de la superficie del queso (Pouillet et al., 1991), lo que es especialmente importante en el procesado de quesos madurados con mohos en la superficie como el Camembert o Brie (McSweeney et al., 2017).

La leche contiene además una baja concentración de **cittrato**, aproximadamente, 8 mM, y la mayor parte de este, debido a su solubilidad, se pierde en el suero durante la elaboración del queso. Sin embargo, su concentración en la cuajada es tres veces superior que en el suero (Fryer et al., 1970). El metabolismo del citrato del queso por BAL citrato positivas tiene relevancia en el aroma del queso, incluidos quesos de leche cruda de oveja de pasta blanda (Macedo & Malcata, 1997a; Partidario et al., 1998; Carbonell et al., 2002; Ordiales et al., 2013a), ya que el citrato puede metabolizarse a acetaldehído, etanol, acetato, diacetilo, acetoína y CO₂ (McSweeney & Sousa, 2000) (Figura 1.13). Estos procesos ocurren principalmente a pH 5-5,5, por lo que tiene lugar al final de la maduración. La producción de CO₂ contribuye a la formación de los ojos característicos en los quesos holandeses, pero en otros quesos es causa de una textura abierta indeseable o presencia de ojos (Fox et al., 1990; McSweeney, 2004).

2.2.2.2.- Lipolisis

Los quesos en general, entre ellos los quesos extremeños DOP de pasta blanda, se elaboran con leche entera. La grasa de la leche en el queso es un componente esencial para el desarrollo del aroma, así como de las características reológicas, contribuyendo por tanto de forma importante en la calidad global del producto final (McSweeney & Sousa, 2000). Los principales lípidos de la leche son los **triacilglicéridos**, que suponen más del 98 % del total de los lípidos (Gunstone et al., 1994). La grasa en la leche se encuentra en glóbulos grasos que durante el proceso de cuajado son casi totalmente incorporados a la red de caseínas. Las interacciones entre los glóbulos de grasa y las proteínas influyen en la estructura de la cuajada y en el rendimiento quesero (Martini et al., 2008). Además, la utilización de coagulante vegetal (*Cynara cardunculus* L.) en comparación con coagulante animal ha mostrado una mayor capacidad para capturar componentes grasos en la cuajada. Este mayor contenido en grasa puede contribuir en parte a la textura más fina y mayor untuosidad descrita para los quesos producidos con coagulante vegetal (Sanjuan, et al., 2002).

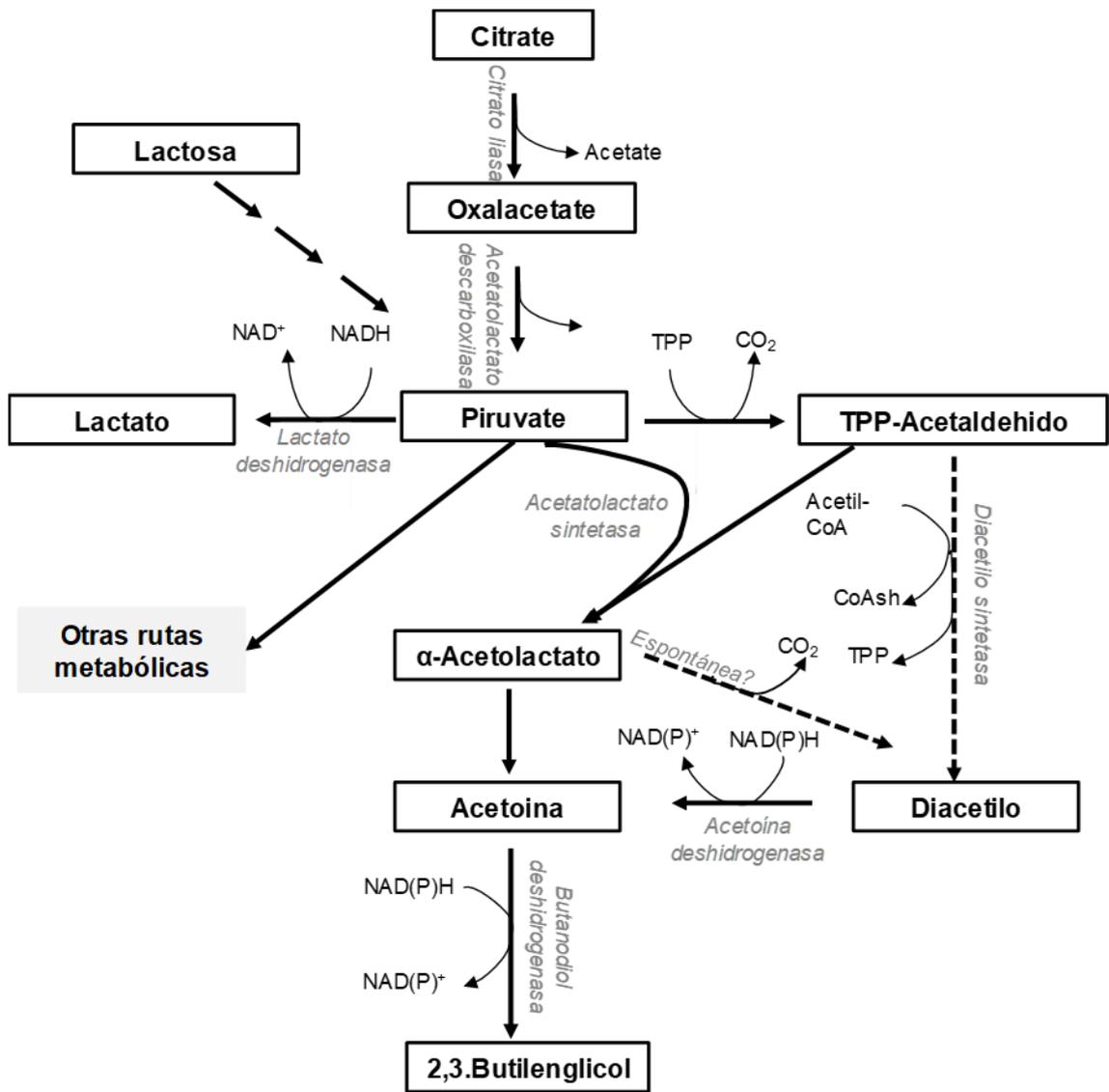


Figura 1.13. Vías metabólicas generales del metabolismo del citrato en el queso (Adaptado de McSweeney et al., 2017).

Durante la maduración de los quesos los lípidos van a sufrir una serie de transformaciones bioquímicas conocidas en su conjunto como lipólisis (Figura 1.14). Estos procesos pueden consistir en hidrólisis enzimática u **oxidación química de los lípidos**. Los procesos de oxidación son más limitados debido al bajo potencial redox del queso y a la presencia de agentes antioxidantes naturales, como la vitamina E. Así, la contribución de esta vía de degradación del aroma del queso no es destacable (Fox & McSweeney, 1998; McSweeney & Sousa 2000). Sin embargo, la **hidrólisis enzimática** (lipasas) de los triglicéridos durante la maduración, ácidos grasos libres y glicerol, monoglicéridos o diglicéridos es fundamental en el desarrollo del aroma de los quesos (McSweeney & Sousa, 2000). Especialmente los ácidos grasos cadena corta y medianos son los que contribuyen mayormente al aroma del queso, mientras que los de cadena larga (>14 átomos de C) lo hacen en menor medida (Molimard & Spinnler, 1996; McSweeney & Sousa, 2000). Además, debido a su carácter hidrofóbicos, los

lípidos son excelentes portadores de compuestos aromáticos, y también de precursores de numerosos de estos compuestos (Thierry et al., 2017).

La lipólisis es desarrollada por **dos tipos de enzimas, esterasas y lipasas**. Los triglicéridos en emulsión en la leche pueden inicialmente ser hidrolizados por lipasas. Sin embargo, los mono- y diglicéridos generados podrían ser hidrolizados por algunas esterasas. La mayoría de las enzimas lipolíticas son específicas para los ácidos grasos esterificados en las posiciones sn-1 o sn-3 del triglicérido. Inicialmente, los triglicéridos se hidrolizan a 1,2- y 2,3-diglicéridos y más tarde a 2-monoglicéridos. El ácido butírico y otros ácidos grasos de cadena corta y media se encuentran principalmente en la posición sn-3 en los lípidos de la leche, y por lo tanto son los liberados principalmente por las enzimas lipolíticas (MacGibbon & Taylor, 2006). Estas enzimas responsables de los procesos bioquímicos implicados en la lipólisis pueden tener su origen en la leche, el coagulante, los microorganismos presentes durante la maduración o lipasas exógenas añadidas intencionadamente en la elaboración del queso (McSweeney, 2004).

La leche contiene una potente lipoprotein-lipasa (LPL) que está bien caracterizada (Olivecrona & Bengtsson-Olivecrona, 1991; Olivecrona et al., 2003) y varias esterasas (Deeth & Fitzgerald, 1976). La LPL tiene una actividad óptima a 37°C y pH 7 y se inactiva a 78°C durante 10 segundos (Driessen, 1989; Olivecrona et al., 2003). La membrana de los glóbulos grasos impide la acción de LPL, pero si estos son dañados en los tratamientos previos de la leche la LPL puede desarrollar una importante actividad lipolítica (Thierry et al. 2017). Es una enzima con baja especificidad por el ácido graso, pero en cambio sí tiene especificidad por su posición. La LPL libera ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-3 de los mono, di y triglicéridos y de la posición sn-1 de los glicerofosfolípidos (Olivecrona et al., 2003), por lo que libera principalmente ácidos grasos de cadena corta y media e incluso, con una baja actividad, puede tener un efecto significativo en el sabor y al aroma del queso (Olivecrona et al., 2003; Deeth, 2006). La LPL está asociada fundamentalmente a las micelas de caseína y, por tanto, es retenida en el queso. Su importancia en la lipólisis es mayor en los quesos de leche cruda y en menor medida en los de leche pasteurizada, porque, aunque es relativamente estable a la temperatura su actividad se ve afectada por el tratamiento térmico de la leche (McSweeney & Sousa 2000; Deeth, 2006).

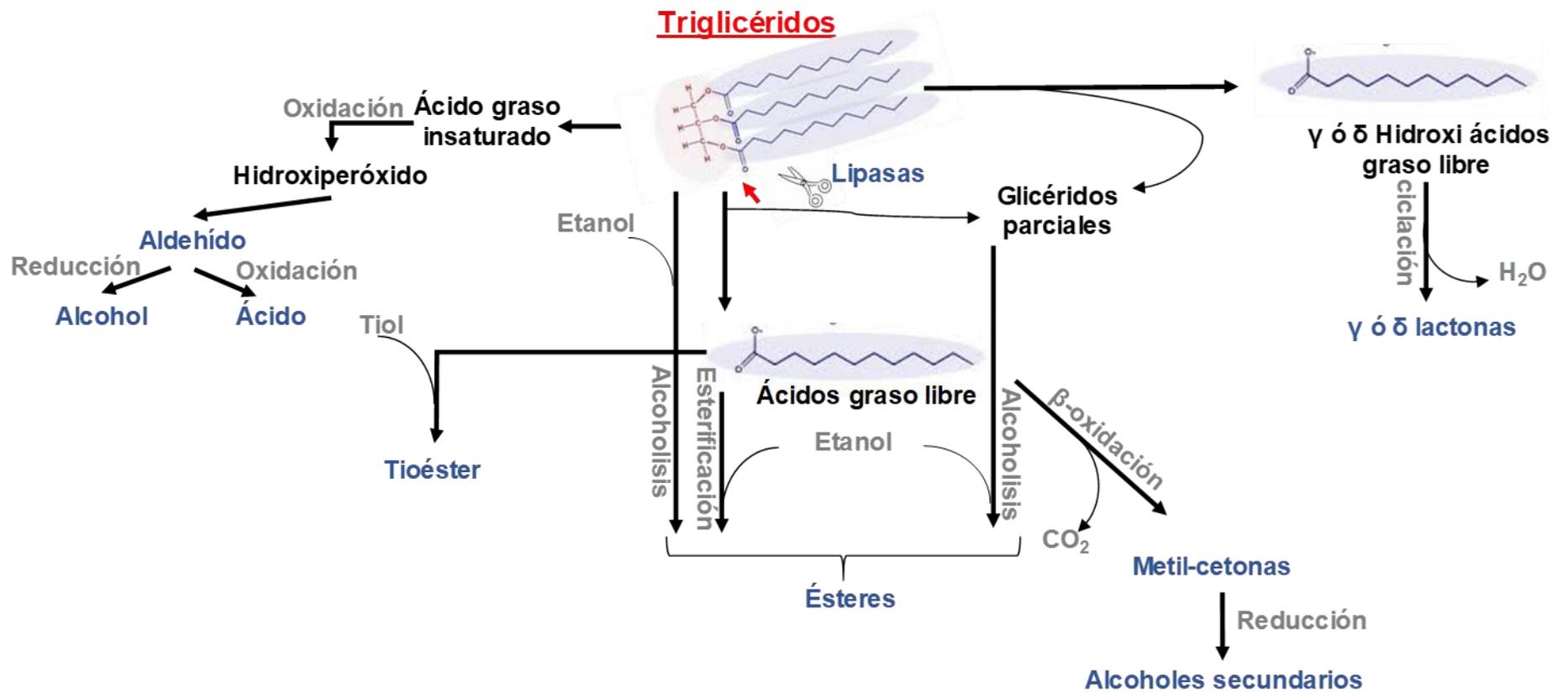


Figura 1.14. Rutas metabólicas generales del catabolismo de los ácidos grasos en el queso (Adaptado de Thierry et al. 2017).

Respecto al **coagulante**, aunque su función principal es sobre las proteínas, la infusión de *Cynara cardunculus* L. utilizada en la elaboración de quesos de pasta blanda como la “Torta del Casar” y “Queso de La Serena”, ha mostrado cierta mejora en la lipólisis en los quesos donde es aplicado, lo cual aumenta con la maduración. Esto sugiere una **ligera actividad lipasa** en el extracto que puede ser debida a la actividad lipolítica inherente de las enzimas proteolíticas presentes (Agboola et al., 2009).

En los quesos de leche cruda como los quesos extremeños DOP de pasta blanda, **la microbiota natural** tiene una gran importancia en los procesos de lipólisis durante la maduración. Las BAL son el grupo predominante en este tipo de quesos tradicionales durante la maduración (Montel et al., 2014; Fernández del Pozo, 1988a; Ordiales et al., 2013b). Diferentes especies de BAL, *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp., han mostrado **actividad esterasa** (Yvon, 2006; Thierry et al., 2017). Sin embargo, la **actividad lipasa es en general débil**, especialmente en los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Stepaniak, 2004). Entre las BAL, los enterococos son el grupo más destacado por su actividad lipolítica (Tsakalidou et al., 1994), los cuales se encuentran en un elevado número en quesos de leche cruda como la “Torta” (Ordiales et al., 2013a, b). Esto conlleva que a pesar de que este grupo no destaca por su capacidad lipolítica y que hay diferencias a nivel de especie y cepas, su contribución a este proceso es importante (Collins et al., 2003). Dentro de la **microbiota secundaria**, las *Pseudomonas* spp. se encuentran en elevado número en la leche cruda (Ercolini et al., 2009) y aunque su número desciende durante la maduración presentan una elevada actividad lipolítica y las enzimas liberadas por su autólisis hace que puedan contribuir a este proceso durante la maduración (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007; Decimo et al., 2014). Las enterobacterias, y entre ellas *Hafnia alvei*, asociada a estos quesos, despliegan baja actividad lipolítica (Macedo & Malcata, 1997b). Entre las levaduras, algunas especies identificadas en la “Torta” y quesos similares, como *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces* spp., (Merchán et al., 2020; Gonçalves et al., 2017) han mostrado una importante actividad lipolítica (Boutrou & Guéguen 2005; Atanassova et al., 2016; Centeno et al., 2017). Otros microorganismos con relevante actividad lipolíticas en otros quesos son las propionibacterias, por ejemplo *P. freudenreichii*, en queso emmental y suizos (Dupuis et al., 1993; Dherbécourt et al., 2010)., *Brevibacterium linens* en quesos de corteza lavada como el Limburguer (Thierry et al., 2017) y mohos del género *Penicillium* spp. en quesos madurados con mohos como Camembert o azules (McSweeney & Sousa, 2000).

La lipólisis es un fenómeno que ocurre en todos los quesos, sin embargo, la intensidad es variable dependiendo la variedad del queso (McSweeney, 2004). La cantidad de **ácidos grasos libres (FFA)** en el queso es utilizado como índice del grado de hidrólisis de los triglicéridos, aunque otras transformaciones pueden también estar implicadas en la generación de FFA en el queso, como la hidrólisis de ciertos aminoácidos o la oxidación de aldehídos, ésteres y cetonas (Urbach, 1993; Molimard & Spinnler, 1996). En la “Torta” y quesos similares, la evolución de la lipólisis durante la maduración ha sido estudiada por Fernández-García et al. (2006) en “Queso de La Serena”, por Delgado et al. (2009) en “Torta

del Casar”, y en el queso “Serra da Estrela” portugués por Macedo & Malcata (1996a), Partidario et al. (1998), Carochó et al. (2015). En todos estos estudios se observó un incremento de los FFA durante la maduración resultado de la actividad lipolítica de las lipasas de la leche y de la actividad microbiana. En el queso de la “Serra da Estrela” el incremento fue mayor en las primeras etapas de maduración (Macedo & Malcata, 1996a; Partidario et al., 1998), mientras que en la “Torta del Casar” la dinámica fue creciente en toda la maduración especialmente en los ácidos grasos de cadena corta (SFCA) (Delgado et al., 2009). Al final de la maduración en el queso “Serra da Estrela” y “La Serena”, los ácidos grasos libres mayoritarios fueron de **cadena larga**, C16:0 y C18:1, los cuales son mayoritarios en la grasa de la leche (Fernández-García et al., 2006; Macedo & Malcata, 1996a). Sin embargo, Delgado et al. (2009) en la “Torta del Casar” mostró que los más abundantes fueron los **ácidos grasos de cadena corta**, C4:0 y C5:0, y además el índice de SFCA/FFA fue superior al “Queso de La Serena” con igual periodo de maduración. Los SFCA tienen una gran implicación en el aroma del queso (Collins et al., 2003), por lo que van a estar implicados en el aroma característico de la “Torta del Casar”. El incremento de los FFA durante la maduración de estos quesos mediante procesos de lipólisis, tienen una gran implicación en su aroma, ya que a partir de ellos derivan compuestos como metilcetonas, lactonas, ésteres, alcanos y alcoholes secundarios, con un elevado potencial aromático y sávido (McSweeney & Sousa, 2000; McSweeney, 2004).

2.2.2.3.- Proteólisis

La proteólisis es el proceso bioquímico más complejo e importante que ocurre durante la maduración, con un gran impacto en las características sensoriales del producto final (Figura 1.15). En este proceso las caseínas, por acción de una amplia gama de enzimas (**proteasas y peptidasas**) de distinto origen, son degradadas a productos primarios (polipéptidos) y posteriormente a productos secundarios como péptidos de medio y pequeño tamaño, y finalmente a aminoácidos libres (Ardö, 2017).

La hidrólisis de la matriz proteica durante la proteólisis contribuye al desarrollo de la **textura** mediante la disminución de la actividad del agua consecuencia de la mayor absorción de moléculas de agua por los nuevos grupos carboxilo y amino liberados como resultado de la hidrólisis de los enlaces peptídicos. La proteólisis también es responsable de un aumento del pH debido a la producción de NH₃ por la desaminación de aminoácidos libres, lo cual facilita la liberación de compuestos sápidos durante la masticación (Fox & McSweeney, 1996). Además, los productos finales de la proteólisis, como péptidos pequeños y aminoácidos, tienen una contribución directa en la generación del **aroma y el sabor**. Muchos aminoácidos tienen gustos característicos y contribuyen al aroma del queso, por ejemplo, el ácido glutámico es el principal contribuyente al sabor umami (Andersen et al., 2010). Otros aminoácidos pueden ser dulces (serina, glicina, alanina, prolina, treonina), ácidos (histidina, ácido glutámico, ácido aspártico) o amargos (arginina, metionina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina, triptófano). También se pueden generar sabores

indeseables, especialmente amargor, principalmente debido a la generación de péptidos que contienen una mayoría de aminoácidos de cadena lateral no polar y son muy hidrófobos (Roudot-Algaron, 1996; McSweeney, 2017).

La aceleración de la proteólisis no incrementa necesariamente el desarrollo del sabor, por lo que la producción de aminoácidos no es el paso que limita la generación del aroma del queso. Los aminoácidos libres son el sustrato de una serie de reacciones complejas, que junto con la reacción de los aminoácidos con otros compuestos generan una amplia gama de sabores y compuestos aromáticos, como amoniaco, aldehídos, fenoles, indol y alcoholes, con un papel crucial en el aroma del queso (Sousa et al., 2001; McSweeney, 2017). En el catabolismo de los aminoácidos, en primer lugar, se producen reacciones de descarboxilación, desaminación, transaminación, desulfuración e hidrólisis de la cadena lateral de los aminoácidos. Posteriormente, en segundo lugar, se da la conversión de los compuestos resultantes de las primeras transformaciones, así como de aminoácidos, en aldehídos, fundamentalmente por la acción de las desaminasas sobre las aminas. Finalmente tiene lugar la reducción de los aldehídos a alcoholes, o su oxidación a ácidos. En el caso de los aminoácidos azufrados, pueden experimentar una extensa conversión y dar lugar a la formación de diversos compuestos, como metanotiol y otros derivados azufrados (Curtin & McSweeney, 2004).

La extensión y velocidad de la proteólisis durante la maduración del queso va a ser variable dependiendo del tipo de queso. En consecuencia, la concentración de aminoácidos libres se incrementa durante la progresión de la proteólisis y su concentración final es variable en función de la variedad de queso, por lo que es un parámetro comúnmente aplicado como índice de maduración de los quesos (Tavaria & Malcata, 2003a; Almeida & Simões, 2018). Las **enzimas proteolíticas y peptinolíticas** implicadas en este proceso son varias y proceden tanto de la **leche** (plasmina y en menor medida la catepsina D y otras proteinasas de las células somáticas), del **agente coagulante**, de los **cultivos iniciadores** si son utilizados y de la **microbiota endógena** del queso, o incluso de enzimas proteolíticas exógenas añadidas intencionadamente en el proceso de elaboración para acelerar la maduración y acentuar el aroma (Sousa et al., 2001). La importancia relativa de cada una de estas enzimas en la proteólisis durante la maduración depende de la variedad de queso y su proceso de elaboración ya que hay múltiples factores a considerar que influyen en este proceso como son la composición química (especialmente contenido de sal y humedad), el pH y en conjunto todos aquellos factores que condicionan la accesibilidad de los diversos sitios de escisión de las caseínas (Wilkinson & Kilcawley, 2005).

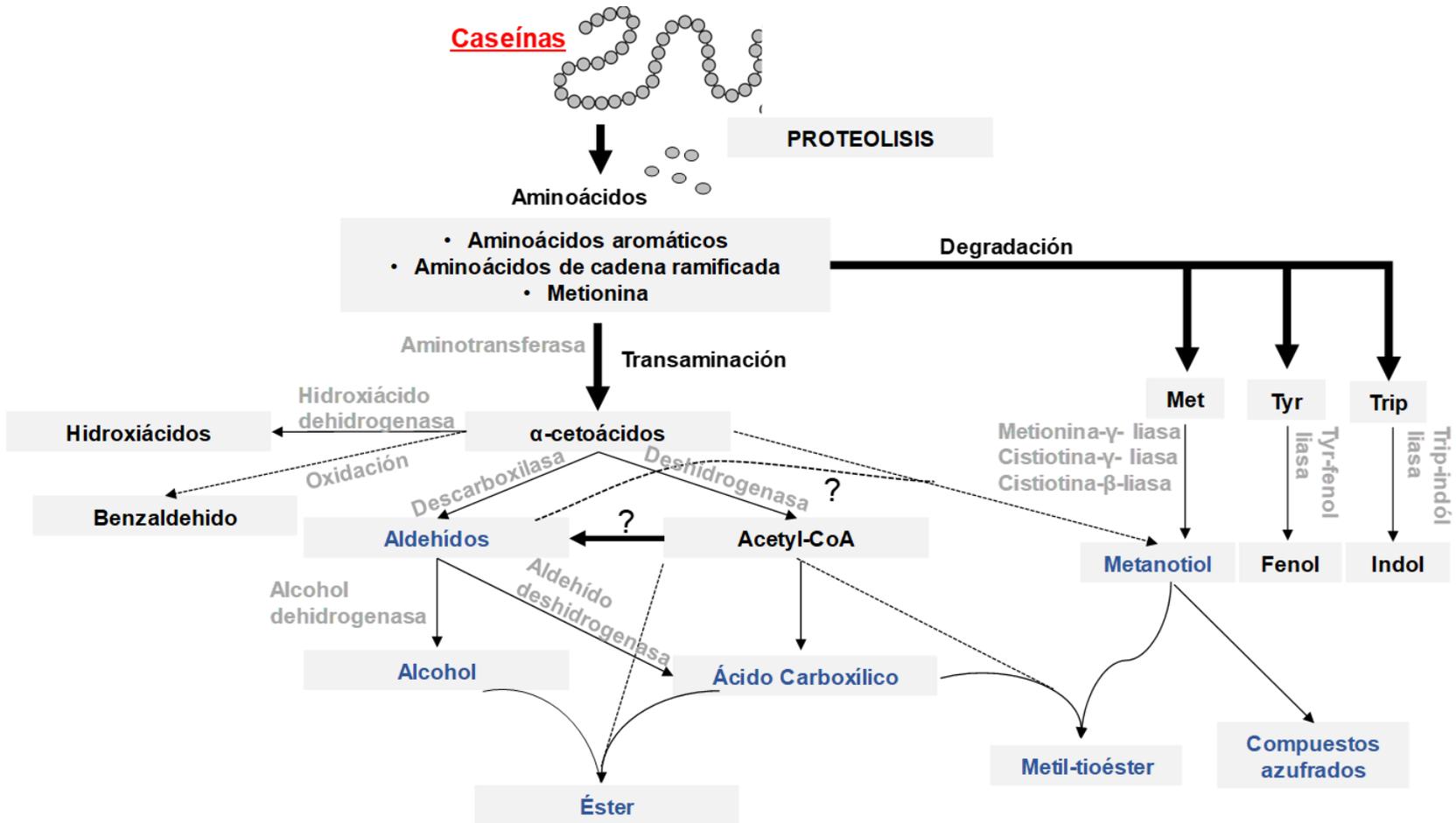


Figura 1.15. Rutas metabólicas generales del catabolismo de los aminoácidos en el queso (Adaptado de Curtin & McSweeny et al., 2004).

Cada una de las enzimas implicadas en la proteólisis tiene una actividad específica, pero la complementariedad entre ellas hace que todas en su conjunto proporcionen un mayor efecto que cada una individualmente (Pereira et al., 2008). En general, en muchas variedades de quesos, la hidrólisis inicial de las caseínas es provocada por el coagulante y en menor medida por plasmina, lo que resulta en la formación de péptidos grandes, insolubles en agua, y medianos, solubles en agua, que posteriormente por la acción de las proteasas del coagulante y por enzimas del cultivo iniciador, si es utilizado, o la microbiota natural del queso en los elaborados con leche cruda son degradados a péptidos menores y aminoácidos (Sousa et al., 2001).

Los quesos de pasta blanda elaborados a partir de leche cruda y coagulante vegetal como la “Torta del Casar” y el “Queso de La serena” presentan unas características de aroma y textura derivados de una intensa proteólisis durante su maduración (Delgado et al., 2010a; Ordiales et al., 2013c). En su elaboración, se utiliza coagulante vegetal procedente de la infusión de las flores del cardo *Cynara cardunculus* L. En general la aplicación de los coagulantes vegetales en la industria quesera es limitada debido a su alta actividad proteolítica que puede ocasionar sabores amargos no deseados y potenciados por un deficiente manejo del coagulante, como realizar infusiones en agua caliente, con exceso de cloro, o unas malas condiciones ambientales de conservación. El tipo de leche y su composición va a tener una gran influencia en el aroma de los quesos elaborados con coagulante vegetal. Su uso está extendido principalmente en el área mediterránea en la elaboración de quesos tradicionales de leche de oveja y cabra, en los cuales no se genera un sabor excesivamente amargo (Almeida & Simões, 2018). Sin embargo, su aplicación en queso de leche de vaca puede ocasionar un amargor excesivo por la presencia de péptidos hidrofóbicos (Barbosa et al., 1981). En el caso de la leche de oveja la estructura de las caseínas es menos sensible que en la de vaca a la formación de estos péptidos por la actividad proteolítica del coagulante (Pelissier & Mnachon, 1976).

La actividad proteolítica del coagulante obtenido del cardo *Cynara cardunculus* L. es debido a la presencia de proteasas aspárticas. Las más abundantes y mejor caracterizadas son la cardosina A y cardosina B, las cuales en términos de actividad y especificidad son similares a la quimosina y pepsina del coagulante animal, respectivamente (Sousa et al., 2001). Además, otras cuatro cardosinas (E, F, G y H) han sido descritas (Ben Amira et al., 2017). Las cardosinas despliegan una mayor actividad proteolítica frente a las caseínas que la quimosina (Macedo et al., 1996b; Sousa & Malcata 2002). Diferentes estudios en quesos comparando la actividad del coagulante vegetal y animal han mostrado un mayor contenido de nitrógeno soluble al inicio de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal, producto de la mayor hidrólisis de las caseínas por el coagulante vegetal, dando lugar a un producto final con un mejor aroma (Tejada & Fernandez-Salguero 2003; Tejada et al. 2007; Agboola et al., 2004; Galán et al., 2008; Jacob et al., 2011). De este modo, en la elaboración de la “Torta” y quesos similares, el coagulante vegetal residual que queda en la matriz del queso, despliega un elevado nivel de hidrólisis de las caseínas al inicio de la

maduración. En la etapas finales de la maduración, los péptidos que quedan libres son hidrolizados en la proteólisis secundaria por la microbiota endógena y, por lo tanto, ejerciendo un papel determinante en la concentración de péptidos menores y/o aminoácidos libres, lo que permite la obtención de quesos con unas características únicas debido a la obtención de una textura más blanda y cremosa, así como un aroma intenso, ligeramente picante y amargo, propiedades muy apreciadas por los consumidores (Roa et al., 1999; Tavaría et al., 2003a; Delgado et al., 2010a,b; Ordiales et al., 2013c; Almeida & Simões, 2018).

2.3.- COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD

En los últimos 25 años diversos estudios científicos han abordado el análisis del proceso de maduración de quesos procedentes de la DOP “Torta del Casar” y “Queso de la Serena” de pasta blanda. Estos trabajos, entre otros aspectos, han descrito los parámetros fisicoquímicos, composición química y características sensoriales de estos productos tan singulares. En la Tabla 1.4 se presentan los datos relativos a las características fisicoquímicas y composición química del producto final en los estudios realizados hasta la actualidad.

En general, los datos obtenidos presentan diferencias tanto entre las distintas DOP como entre los diferentes estudios para un mismo tipo de queso. Los procesos de elaboración y las industrias han evolucionado mucho en las últimas décadas, influyendo en gran medida en las características del producto final. Además, otros factores como la composición de la leche, la temporalidad, las técnicas analíticas utilizadas, entre otros, dan lugar a una cierta variabilidad en los parámetros fisicoquímicos y composición química del producto final.

Los **parámetros fisicoquímicos** de pH, actividad de agua (a_w) y humedad, son bastante homogéneos en quesos de ambas DOP. Los estudios muestran valores de pH de aproximadamente 5,5, excepto en el estudio de Garde et al. (2007) que detectó en “Queso de La Serena” un pH excesivamente bajo de 5,06 y fuera del rango exigido por el pliego de condiciones de la DOP. La Humedad está en valores próximos al 40%, cumpliendo así el porcentaje mínimo de extracto seco del 50% exigido en los pliegos de condiciones de ambas DOP. En relación con la actividad de agua, aunque solo un estudio refleja su valor, normalmente la actividad de agua de este tipo de quesos es elevada y está en el producto final en valores en el rango de 0,94-0,96.

Tabla 1.4. Características fisicoquímicas y composición química de quesos extremeños de pasta blanda elaborados a partir de leche cruda de oveja con coagulante vegetal.

Parámetros	Torta del Casar		Queso de La Serena	
	Valores	Referencias	Valores	Referencias
pH	5,37-5,65	Delgado et al., 2009, 2015; Ordiales et al., 2013a, b	5,06-5,42	Garde et al., 2007; Roa et al., 1999
Actividad de agua (aw)	0,94	Ordiales et al., 2013b, c	-	
Humedad %	40,84-43,33	Delgado et al., 2009, 2015; Ordiales et al., 2013a, b	39,79-42,63	Marsilla, 1979; Roa et al., 1999; Freitas & Malcata, 2000
NaCl (% del ES)	3,32	Ruiz et al., 1984	3,54-5	Marsilla, 1979; Roa et al., 1999; Freitas & Malcata, 2000
Cenizas (% del ES)	7,64	Ruiz et al., 1984	8,7	Marsilla, 1979
Grasa (% del ES)	47,91-57,33	Ruiz et al., 1984; Delgado et al., 2009	53,30-54,44	Marsilla, 1979; Roa et al., 1999; Freitas & Malcata, 2000
Proteína (% del ES)	29,74-41,46	Ruiz et al., 1984; Delgado et al., 2009; Ordiales et al. 2013c	37,5-41,50	Marsilla, 1979; Roa et al., 1999; Freitas & Malcata, 2000
NS (% del NT)	20,92 42,28	Delgado et al., 2010a Delgado et al., 2015	32,9-38,80	Freitas & Malcata, 2000
NNP (% del NT)	6,99 22,38	Delgado et al., 2010a Delgado et al. 2015	12,70-14,55	Freitas & Malcata, 2000
Aminoácidos libres (mg/gramo de queso)	2,82 1,89	Delgado et al., 2010a Delgado et al., 2015	3,7	Garde et al., 2007
N proteico (% del NT)	92,53	Delgado et al., 2010a	89,68	Fernández-Salguero et al., 1978
N caseínas (% del NT)	77,03	Delgado et al., 2010a	61,85	Fernández-Salguero et al., 1978
N polipéptidos (% del NT)	38,73	Delgado et al., 2010a	31,84	Fernández-Salguero et al., 1978
% degradación α 1-caseína	54,41	Delgado et al., 2010a	84,9; 44,8; 81,4; 81,6	Garde et al., 2007 Roa et al., 1999; Fernández Del Pozo et al., 1988b; Medina et al., 1991
% degradación β -caseína	57,36	Delgado et al., 2010a	77,57; 41,8; 50,5; 77	Garde et al., 2007; Roa et al., 1999; Fernández Del Pozo et al., 1988b; Medina et al., 1991
Ácidos grasos libres FFA (mg FFA/kg queso)	2935	Delgado et al., 2009	2884,25	Fernández-García et al., 2006
Ratio SCFA/FFA	0,41	Delgado et al., 2009	0,15	Fernández-García et al., 2006
Ratio MCFA/FFA	0,09	Delgado et al., 2009	0,21	Fernández-García et al., 2006
Ratio LCFA/FFA	0,5	Delgado et al., 2009	0,64	Fernández-García et al., 2006

La **composición química** muestra valores similares de concentración de sal y minerales en extracto seco. El “Queso de La Serena” presenta un valor medio superior de minerales, probablemente debido al hecho de utilizar leche exclusivamente del tronco Merino, con un elevado contenido de extracto seco (Caballero de la calle et al., 2001). El contenido en sal de los quesos de la “Torta del Casar” se encuentra dentro de los valores exigidos por el Reglamento de su DOP, mientras el Reglamento de la DOP “Queso de La Serena” no especifica límites de sal para los quesos que ampara. En relación con el contenido en grasa y proteínas los estudios realizados muestran una gran variabilidad, probablemente debido a la composición química de la leche utilizada en la elaboración del queso. Este tipo de quesos presentan un elevado contenido en grasa, con valores en general superiores al 50% en extracto seco exigido por el reglamento de ambas DOPs. En relación con al contenido de proteínas, excepto Delgado et al. (2009), todos los estudios muestran valores próximos al 40% en extracto seco, superiores al 35% especificado en el pliego de condiciones de la DOP “Queso de la Serena”. Las mayores diferencias se observan en los parámetros que reflejan los procesos de proteólisis y lipólisis que ocurren durante la maduración, y con gran influencia en el aroma y textura del producto final. Esta variabilidad entre estudios es consecuencia de la falta de estandarización en diversas etapas del proceso de elaboración, que pone de manifiesto una de las principales problemáticas de este tipo de quesos, que es la heterogeneidad del producto final.

En general, en todos los estudios, los parámetros relacionados con el efecto de la proteólisis sobre las proteínas del queso muestran que durante la maduración de los quesos de pasta blanda extremeños con DOP, ocurre una **intensa proteólisis**. Este fenómeno ha sido estudiado más intensamente en el “Queso de La Serena” (Fernández Del Pozo et al., 1988b; Medina et al., 1991; Roa et al., 1999; Garde et al., 2007). En la “Torta del Casar” Delgado et al. (2009; 2015) a los 60 días de maduración encontró claras diferencias en las diferentes fracciones de nitrógeno, mientras que los valores aportados por Ordiales et al. (2013c; 2014) son difícilmente comparables al expresarse en diferentes unidades. En relación con la degradación de las caseínas, aunque existen diferencias entre estudios en el porcentaje de degradación final y en la evolución de la degradación, hay que destacar que todos muestran una intensa degradación de las caseínas en el producto final, al igual que ocurre en quesos de similares características en Portugal (Macedo & Malcata 1997c; Roseiro et al., 2003) y superior a otros quesos de oveja con diferentes características de textura. La proteólisis en los quesos de pasta blanda extremeños es una de sus principales características y está directamente implicada en una de las singularidades de estos quesos, que es su textura cremosa y untuosa, en ocasiones casi líquida. Delgado et al. (2010a) y Ordiales et al. (2014) en “Torta del Casar” y Fernández Del Pozo et al. (1988b) y Medina et al. (1991) en “Queso de La Serena” demostraron en sus estudios que existe una fuerte correlación entre la degradación de las caseínas en la “Torta” y sus características de textura.

La fracción lipídica también sufre importantes modificaciones durante la maduración de los quesos extremeños DOP de pasta blanda mediante la **lipólisis**. El contenido final de

ácidos grasos libres es muy similar en quesos de ambas DOP, sin embargo, Delgado et al. (2009) mostró un ratio mayor de ácidos grasos de cadena corta, los cuales tienen una implicación mayor en el aroma debido a su menor umbral de percepción y a que cada uno de ellos proporciona una nota de sabor característica (MsSweeney & Sousa, 2000; Collins et al., 2003).

Otro factor de elevada importancia en la elección de un determinado queso por los consumidores es su aroma. El **perfil de compuestos volátiles** es un reflejo del olor y aroma del producto. La formación del aroma del queso es el resultado de complejas reacciones consecuencia de los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la maduración que originan en el producto final un conjunto de compuestos químicos volátiles y no volátiles que determinan un perfil aromático único (Fox & Wallace, 1997; Plutowska & Wardencki, 2007; Delgado et al., 2010b). El perfil de compuestos volátiles de los quesos de pasta blanda extremeños con DOP ha sido descrito en el “Queso de La Serena” por Carbonell et al. (2002) y en la “Torta del Casar” por Delgado et al. (2010b) y Ordiales et al. (2013a). Estos estudios mostraron que este tipo de quesos presentan un perfil aromático complejo producto de complejas reacciones de degradación de los azúcares, principalmente lactosa, de los aminoácidos, especialmente valina, leucina, isoleucina y treonina, y de los lípidos vinculado a los ácidos grasos libres producto de los procesos de lipólisis. Carbonell et al. (2002) en “Queso de La Serena” mostró que tanto la temporada como la industria tienen una fuerte influencia en el perfil aromático, en el cual destacaban la fracción de los alcoholes y los ésteres. Además, destacó la presencia de una amplia diversidad de terpenos, especialmente en quesos de primavera, los cuales presentaban mayor abundancia de compuestos y fueron mejor valorados. En general, los quesos mejor valorados presentaban mayor contenido de ésteres, aldehídos de cadena larga y ácidos carboxílicos y menor contenido de 2-butanoa, 3-methyl-1-butanol y compuestos azufrados. A pesar de ser quesos similares, Delgado et al. (2010b) mostró claras diferencias en el perfil aromático de la “Torta del Casar” con respecto al “Queso de La Serena”, probablemente debido en parte a las diferentes metodologías utilizadas en la extracción de los compuestos volátiles. En la “Torta del Casar” los principales grupos de volátiles a los 60 días de maduración eran los ácidos carboxílicos seguidos de los ésteres, contrariamente al “Queso de la Serena” donde predominaban los alcoholes y ésteres y los ácidos carboxílicos tenían menor importancia. Igualmente, Ordiales et al. (2013a) en “Torta del Casar” encontró que el principal grupo de compuestos volátiles eran los ácidos carboxílicos. Sin embargo, en segundo lugar, destacaban los alcoholes con escasa importancia de los ésteres. La mayor importancia en el aroma de la “Torta del Casar” de los ácidos acético y propiónico originados por la actividad microbiana y de ácidos carboxílicos originados por la degradación de aminoácidos (ácidos 2-metilpropanoico y 3-metilbutanoico) en detrimento de otros ácidos originados en la lipólisis, es una característica única que distingue el aroma de este queso de otros (Delgado et al., 2010b). En general, los análisis sensoriales califican tanto al “Queso de La Serena” como a la “Torta del Casar” como quesos

de textura cremosa o untuosa y de un aroma intenso y ligeramente amargo (Freitas et al., 2000; Delgado et al., 2010a; Ordiales et al., 2013a).

2.4.- DEFECTOS Y ALTERACIONES

El origen de los defectos en el queso puede ser muy diverso, pudiendo estar relacionados tanto con las características de las materias primas, leche y coagulante vegetal, como con las distintas etapas de fabricación (Hassan et al., 2013). Las características microbiológicas y fisicoquímicas iniciales de la leche cruda tales como la carga y el tipo de microbiota, pH, potencial de óxido-reducción, contenido en caseína y grasa, dimensión de las micelas, polimorfismo genético y contenido en calcio, así como los tratamientos tecnológicos previos de la leche, tienen gran influencia sobre las diferentes fases de la elaboración del queso y, por tanto, sobre su calidad final (Mahaut et al., 2003). Cambios en las características microbiológicas de las materias primas y/o un procesamiento incorrecto, en particular en los quesos de leche cruda, pueden dar lugar tanto a la pérdida de atributos organolépticos deseables como a la presencia de defectos (Pirisi et al., 2007). De acuerdo con el código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos (CAC / RCP 57-2004), la leche cruda se define como la leche que no se ha calentado más allá de 40 °C o se ha sometido a un tratamiento que tenga un efecto equivalente. La calidad de la leche cruda recibida en la quesería depende de varios factores: salud del animal, alimento suministrado, condiciones y procedimientos de ordeño, limpieza de equipos, control de temperatura, duración del almacenamiento intermedio y condiciones apropiadas para el transporte. El incumplimiento de estos factores pone en peligro la seguridad alimentaria e inevitablemente conduce a la pérdida de la calidad del producto, que puede manifestarse en forma de defectos en el queso (Bachmann et al., 2011). En muchos casos, tanto el factor humano como la variación estacional en la producción de leches supone también una riqueza de aromas y tipos de texturas que deben ser conservadas pero que, en otros casos, desembocan en alteraciones y defectos sensoriales del producto final (Bárcenas et al. 1998, 2001; Issanchou et al., 1997).

2.4.1.- Asociados a la composición de la leche

En el caso de los quesos artesanales, el impacto de las variaciones estacionales y los diferentes tipos de alimentación del ganado en la producción y características de leche fueron estudiadas por Nájera et al. (2009). En muestras de nueve lotes comerciales de leche cruda de oveja asociados a **diferentes alimentaciones** (ratios de concentrado: forraje y tiempos de pastoreo), pudieron observar su influencia en el contenido en proteína, grasa y calcio en función del tipo de lactancia (temprana y tardía). Estos cambios fueron responsables de las variaciones en las propiedades de coagulación del cuajo y textura de la cuajada, que afectan en última instancia las propiedades reológicas y sensoriales del queso. Recientemente, Fogueiro et al. (2020) en queso "Serra da Estrela" estudió la influencia de la **variación estacional** de la leche en el ratio de grasa/proteína y en las características del queso. Los resultados obtenidos muestran que el momento de la temporada de ordeño tiene

una gran influencia en la composición química del queso y en sus características de textura y color. Además, el empleo de forma adecuada del coagulante vegetal en base a las características de la leche puede ser una herramienta útil para ajustar las propiedades sensoriales del producto final y mejorar la homogeneidad del producto a lo largo del año.

De esta forma, los cambios en el contenido de grasa de la leche de oveja como consecuencia del pasto fresco ingerido por los rumiantes en primavera pueden afectar a la estructura y el tamaño de los glóbulos de grasa (Walstra et al., 2006; Lopez et al., 2007), y la resistencia mecánica de la pasta de queso podría reducirse y producir grietas durante la maduración del queso (McSweeney, 2007). El aumento del contenido de grasa también podría impedir un drenaje homogéneo de suero (Kindstedt, 2005) y, en consecuencia, un drenaje inadecuado podría dar como resultado una coloración irregular de la pasta de queso.

2.4.2.- Asociados a aspectos tecnológicos

En cuanto a problemas asociados a las diferentes etapas del proceso de elaboración, en **la coagulación** de la leche cruda de oveja en los quesos de pasta blanda extremeños con DOP, se utiliza como coagulante la infusión de las flores secas del cardo *Cynara cardunculus* L. En Extremadura hay una única empresa con registro sanitario para la recolección del medio natural y posterior secado de las flores. El coagulante utilizado puede generar defectos en los quesos (Pirisi et al., 2007), como sucede en este tipo de quesos con el coagulante vegetal obtenido del cardo. Sin embargo, la preparación y aplicación del coagulante vegetal en la elaboración de estos quesos cremosos es un **proceso no estandarizado** en la actualidad. Las actividades de coagulación y la implicación en la proteólisis del coagulante tienen un impacto importante tanto en los parámetros fisicoquímicos en las etapas iniciales, como en la textura y las propiedades sensoriales del producto final. Los estudios científicos sobre las propiedades tecnológicas de este coagulante han demostrado que la variabilidad en las poblaciones naturales de *Cynara cardunculus* L. cosechadas, incluso en ocasiones mezcladas con otras partes de la planta, unido al estado de maduración de la flor, tiempo de secado, humedad final y el proceso de preparación del coagulante tienen una gran influencia en el proceso de coagulación de la leche, proceso de maduración y en las características sensoriales finales del queso (Sousa & Malcata, 2002; Ordiales et al., 2012; Ordiales et al., 2013c; Ordiales et al., 2014; Correia et al., 2016; Guiné et al., 2016; Fogueiro et al., 2020). Por otro lado, **la falta de estandarización del coagulante vegetal** conlleva además una deficiente calidad microbiológica que es inoculada al queso, siendo otro factor potencial de variabilidad en la calidad final del producto (Ordiales et al., 2013a).

Posteriormente, las etapas de **corte de la cuajada y desuerado** también presentan gran influencia en la calidad de los quesos finales y pueden ser por tanto un origen de defectos (Kindstedt, 2005; McSweeney, 2007). Una **retención excesiva de suero** puede deberse a una baja temperatura en la prensa, una actividad insuficiente de las bacterias del ácido láctico o un prensado débil de la cuajada de queso (Kindstedt, 2005). En el caso de los

quesos de pasta blanda como la “Torta del Casar” y el “Queso de La Serena”, las temperaturas de cuajado son inferiores a lo normal, lo que puede provocar cuajadas blandas con masas deficientemente desueradas que originan elevado polvo de queso y por tanto menor rendimiento quesero. Una cuajada deficientemente desuerada en este tipo de quesos presentará una mayor fermentabilidad, y por ende problemas de maduración caracterizados por una excesiva expulsión de suero.

En la actualidad, en la elaboración de este tipo de quesos tan singulares, el comienzo del corte de la cuajada y un desuerado y endurecimiento del grano idóneo, **se basa en criterios subjetivos**, puesto que es el maestro quesero quien lo decide y realiza. El objetivo es lograr, mediante el agitado y aumento de la temperatura de la masa en caso necesario, la expulsión del suero de manera adecuada, que debe presentar un color amarillo y transparente.

Dado que el proceso de fabricación de este tipo de quesos se caracteriza por un escaso tiempo de **prensado**, el desuerado constituye una de las etapas más importantes, al permitir definir el grado de humedad de la masa al moldeo y su posterior desarrollo. Resulta fundamental, por tanto, disponer de una materia prima con una óptima aptitud al cuajado y realizar un adecuado corte de la cuajada y sinéresis, que permitan una correcto desuerado y formación del grano.

Los quesos con un alto contenido acuoso presentan elevadas concentraciones de suero y lactosa y, por lo tanto, las bacterias del ácido láctico pueden producir una gran cantidad de ácido láctico y, en consecuencia, la acidez del queso será alta (Kindstedt, 2005). McSweeney (2007) señaló que **una excesiva humedad de la pasta** del queso, ocasionada por un insuficiente prensado, puede dar lugar a pastas demasiado blancas junto a otros defectos como una textura blanda y un sabor excesivamente ácido. De esta forma, una excesiva humedad por un deficiente trabajo de batido en cuba o escaso desuerado de la masa al moldeo en el proceso de elaboración de quesos de pasta blanda como la “Torta del Casar” y “Queso de La Serena”, puede originar una rápida fermentación y acidificación de la misma, con probabilidad de hincharse al inicio del período de maduración, además de conducir a quesos con una textura final de la crema inadecuada, mientras que una baja humedad en la masa, presentará tortas menos cremosas, aún con una buena proteólisis, por lo que el desuerado de la cuajada debe ser el idóneo (González, 2009).

Durante la etapa de **moldeo, prensado y salado** de los quesos, puede aparecer un defecto en los quesos caracterizado por el **desarrollo mecánico de ojos** en su interior, cuyo origen se debe también a un drenaje excesivamente intenso de la cuajada en el corte, que podría conferir una consistencia friable a la pasta, originando grietas tanto en el interior como en la corteza (Marra et al., 1998), o por un insuficiente o rápido prensado (Ortiz, 2005). En los quesos de pasta blanda tipo como la “Torta del Casar” y “Queso de La Serena”, la aparición de ojos mecánicos en la masa genera una textura granular y aspecto mixto de ojos

y grietas irregulares producto de la falta de unión de la pasta (Figura 1.16). Este defecto se origina cuando se produce una eliminación de parte del suero en la cuba antes de lo debido en la elaboración de este tipo de quesos, propiciando la inclusión de aire en la masa que evita una cohesión eficiente de la misma (González, 2001).

Durante el proceso de elaboración de quesos también se pueden originar defectos por cambios en los procesos bioquímicos que ocurren en **la maduración** (Engel et al., 2001; Boyazoglu & Morand-Fehr 2001; Broadbent et al., 2002). En estos procesos tienen una gran implicación los microorganismos cuya repercusión en los defectos será abordada en el siguiente apartado. De esta forma, la maduración influye en el desarrollo de las características sensoriales de los quesos, debido a su efecto sobre su composición química, como la pérdida de humedad, actividad enzimática para la degradación de la lactosa residual o lipólisis de la grasa, la cual provoca un aumento de la cantidad total de ácidos grasos libres y la proteólisis de caseína, que conduce a la producción de aminoácidos y precursores de sabor (Virto et al., 2003). En la etapa de maduración de quesos, también se producen **defectos relacionados con las condiciones de humedad y temperatura** (Kindstedt, 2005). La aparición de **coloraciones en la corteza** puede deberse a una contaminación ambiental por mohos y levaduras durante la maduración, particularmente cuando la temperatura es excesivamente alta en la cámara de maduración (Mahaut et al., 2003).

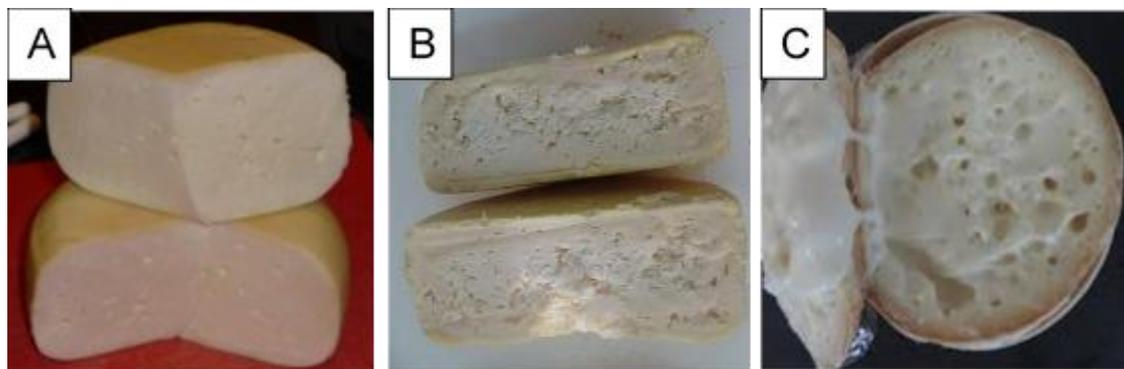


Figura 1.16. Ojos mecánicos en la pasta en queso Gouda (A), tipo “Torta” durante el proceso de maduración (B) y tipo “Torta” finalizada la maduración (C).

En quesos de pasta blanda extremeños con DOP, el nivel de ácidos grasos libres también aumenta significativamente durante la maduración. En cambio, los procesos oxidativos en la fracción de proteínas y lípidos no afectan de forma relevante a las características de calidad de la “Torta” (Delgado et al., 2009). Sin embargo, la proteólisis que se lleva a cabo durante la maduración de estos quesos influye de forma determinante en su textura suave y unttable, la cual se lleva a cabo a temperaturas bajas entre 3-6°C y humedades relativas elevadas entre 90-95%, condiciones que favorecen una proteólisis poco intensa en los primeros 30 días de maduración y mayor entre los 30-60 días de maduración (Delgado et

al., 2010a). **Variaciones en la temperatura** durante la maduración influyen directamente en los procesos de proteólisis tanto en su intensidad como en su dinámica (Feeney et al., 2001; Sihufe et al., 2010) afectando a las características sensoriales de textura y aroma del queso. Cualquier interpretación errónea por parte de los operadores del estado de la evolución del queso en la cámara de maduración, o inadecuadas condiciones ambientales, pueden provocar numerosos defectos que afectarán a la calidad de este. De este modo, **velocidades excesivas de aire** en la cámara de maduración, motiva que este tipo de queso tan frágil se agriete y permita la penetración en su interior de contaminaciones no deseables.

Asimismo, un **secado y cortezado** de los quesos en la primera fase de la maduración, provocará que el queso no madure adecuadamente al retener suero en su interior, cuya acidificación evitará la obtención de la textura cremosa buscada. En estas condiciones, se origina un queso caracterizado por poseer un interior ácido y en ocasiones, de textura poco untuosa. La renovación frecuente de aire en las cámaras de maduración también es un factor importante, puesto que en la fase final de maduración puede acumularse un exceso de NH_3 que favorece la degradación de grasas en las cortezas de los quesos y que aparezcan aromas rancios.

Por otro lado, este tipo de quesos de pasta blanda como la “Torta del Casar” y “Queso de La Serena” que presenten de cuajadas blandas y baja fermentabilidad es aconsejable condiciones de maduración de temperatura alta en la cámara para favorecer la expulsión del suero y que remelen pronto. Por el contrario, si el desuerado se produce después, la formación de la corteza puede favorecer la aparición de mohos en la superficie, arrugando la corteza y dando mal aspecto al queso (González, 2009). En general, para evitar el desarrollo de mohos que estropeen la corteza, en los primeros 10 días de maduración se aplica antifúngico, principalmente natamicina, sin adherentes para no impedir el desuerado del queso y acidificación del interior que influiría negativamente en la maduración. Al final de la maduración, antes de la comercialización, se aplica un antifúngico a mayor concentración con adherente, para darle rigidez también a la corteza y evitar su rotura y salida de la pasta.

2.4.3.- Asociados a las condiciones higiénicas y microbiológicas

Uno de los principales problemas asociados con los quesos de **leche cruda** es la presencia de microorganismos indeseables durante los procesos de fabricación y maduración. El uso de leche cruda, la ausencia de cualquier proceso térmico de estandarización, la variación en las condiciones de higiene que prevalecen en las granjas, junto con diferentes protocolos de ordeño y manipulación, conducen a una variabilidad extensa e impredecible en la microbiota de la leche y, por lo tanto, en la del queso elaborado con leche cruda durante la maduración (Pereira et al., 2010a). Aunque las BAL son una parte importante de la microbiota de la leche cruda (*Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp.), **microorganismos indeseables** como enterobacterias, coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. o incluso **patógenos** como *Listeria*

monocytogenes, *Salmonella* spp. y *E. coli* pueden estar presentes, aumentando el potencial de riesgo para la salud pública (Pereira et al., 2010a).

Por otro lado, las **leches con baja bacteriología**, como son aquellas que presentan restos de calostros, especialmente de BAL, también representan un problema a la hora de elaborar quesos de pasta blanda como la “Torta del Casar” y el “Queso de La Serena”, puesto que fermentan de forma más lenta y los quesos evolucionan de manera deficiente, pudiendo presentar acidificación retardada o postacidificación, con una ligera caída de pH, en lugar de remontar, que es lo que se espera para conseguir una cremosidad de la pasta adecuada para este tipo de quesos de pasta blanda. Con frecuencia, esta baja bacteriología en la leche puede estar caracterizada por microorganismos que no sean tecnológicamente adecuados, abundando por tanto microorganismos productores de gas y proteolíticos.

El **factor humano** en el proceso de elaboración del queso afecta también a la calidad del queso. Caridi et al. (2003), pusieron de manifiesto la necesidad de aumentar la calidad higiénica del queso artesanal de oveja Pecorino del Poro durante todo el proceso productivo (ordeño, almacenamiento de leche, fabricación de queso) al presentar altos niveles de enterococos, coliformes y *E. coli*, los cuales no son solo debidos a la contaminación de la leche, sino también a su **temperatura de almacenamiento** antes de la fabricación, que genera una lenta producción de ácido durante la elaboración del queso que afecta a los parámetros de coagulación del coagulante, la textura de la cuajada y las variables de composición brutas. Antes del proceso de elaboración, la leche cruda empleada en este tipo de quesos puede ser almacenada en frío (entre 2-6 °C) durante largos períodos (hasta 48-72 h), favoreciendo la proliferación de microorganismos psicrótrofos en la leche como las *Pseudomonas* spp., que afectan al cuajado de la leche y que generan pigmentaciones en la superficie de los quesos (del Olmo et al., 2018; Figura 1.17A). Estos microorganismos presentan una actividad proteolítica tal, que son capaces de alterar también la consistencia de los quesos en general, dando como resultado una pasta que se agrieta con más facilidad después del prensado (Fonseca et al., 2012; Malacarne et al., 2013). Además, consecuencia de su potencial proteolítico pueden ocasionar aromas excesivamente amargos (Lemieux & Simard, 1991).

Así mismo, el **proceso de maduración** es un factor esencial determinante de la calidad final y posterior venta (Boyazoglu & Morand-Fehr, 2001) ya que los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración influyen de forma decisiva en el desarrollo de las propiedades sensoriales de los quesos. Los cambios debidos a la pérdida de humedad y el desarrollo de los procesos de glucólisis, lipólisis y proteólisis determinarán la textura, sabor y aroma del queso final (Virto et al., 2003). En estos procesos tienen una gran implicación los microorganismos, que, como resultado de esta fuente de variabilidad en la elaboración del queso, se pueden esperar importantes cambios en las características de los mismos, y también en las frecuencias de aparición de defectos. Así, esta gran heterogeneidad puede tener una influencia negativa en los parámetros de calidad del queso, incluido el bajo

rendimiento quesero, así como la falta de homogeneidad entre lotes de factores sensoriales relevantes, como los parámetros de textura (Tunick, 2000). Ordiales et al., (2013a) concluyeron que un crecimiento incontrolado de **BAL heterofermentativas** tiene un efecto negativo en el sabor de este tipo de quesos. El desarrollo excesivo de BAL heterofermentativas, como *Leuconostoc* spp., además de producir aromas inadecuados puede ocasionar una excesiva producción de gas que ocasione hinchazón en el queso (O'Sullivan et al., 2013) (Figura 1.17B).

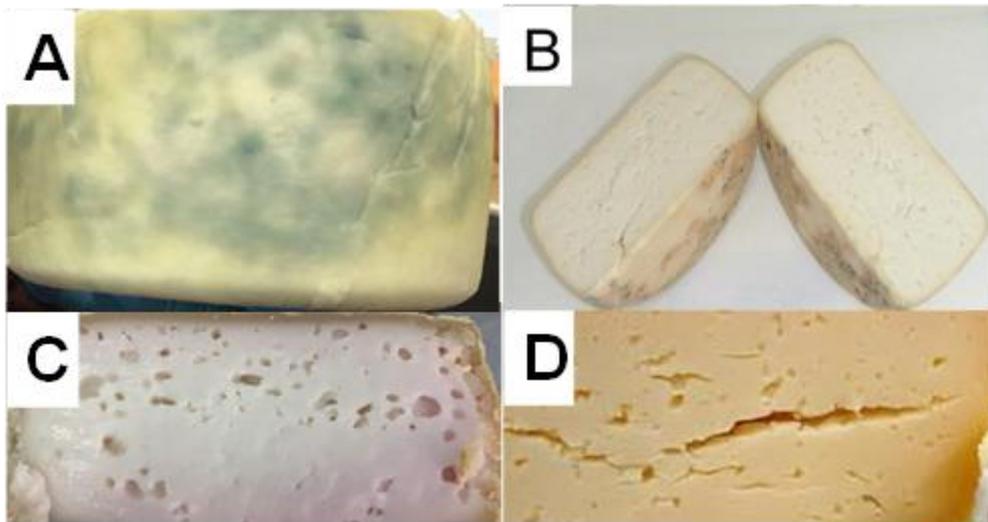


Figura 1.17. Pigmentación azul causada por *Ps. Fluorescens* (A). Hinchazón temprana en queso tipo “Torta” (B). Ojos en la pasta por producción de gas por coliformes (C). Grietas en queso de pasta dura por hinchazón tardía por *Clostridium* spp. (D).

2.4.3.1- Hinchazón temprana

Dentro de la microbiota secundaria, las enterobacterias pueden revelar contaminaciones fecales y son indicadores de malas prácticas de higiene durante la obtención de la leche y el procesado de ésta y sus derivados (Muñez et al., 1985; Verdier-Metz et al., 2009). Los representantes de este grupo microbiano presentan una importante maquinaria enzimática compuesta por enzimas proteolíticas y lipolíticas que modifican las propiedades organolépticas de los quesos durante la maduración (Santos et al., 1996; Morales et al., 2003; Chaves-López et al., 2006; Irlinger et al., 2012), pero también consecuencia de ella, producen aminas biógenas (Montel et al., 2014) y ciertas enterobacterias pueden producir gas (Sheehan, 2011; Tabla et al., 2016). En este sentido, la capacidad de producción de gas de muchas especies de enterobacterias y coliformes puede conducir a una hinchazón temprana en el queso. Cuando las condiciones son favorables, la producción de CO₂ o H₂ dentro del queso se manifiesta por la aparición de ojos y gases en el envase (Guggisberg et al., 2015; Tabla et al., 2016) (Figura 1.17C). Los ojos del queso son

característicos en algunas variedades, generalmente producidos por cultivos iniciadores, como las bacterias del ácido propiónico o las bacterias del ácido láctico heterofermentativo. Sin embargo, los agujeros de gas se consideran un defecto en muchos otros quesos, especialmente cuando son producidos por coliformes, levaduras o clostridios (Fox et al., 2000; Sheehan, 2007; Fröhlich-Wyder et al., 2019).

En cambio, la hinchazón temprana ocurre cuando aparecen agujeros de gas no deseados durante el moldeo, la salazón o incluso la primera semana de maduración del queso, y generalmente es causado por coliformes o levaduras, necesiéndose una población mínima para que ocurra (Martley & Crow, 1996) (Figura 1.17B). La hinchazón temprana ocurre generalmente **22±48 h después del cuajado** y el resultado visible es la presencia de **numerosos agujeros, generalmente pequeños**, dentro de la masa de cuajada o masa del queso. En la mayoría de los casos, el problema no es aparente hasta que se cortan los bloques de queso, aunque en algunos casos, la formación intensa de gas puede causar una deformación del queso e hinchazón significativa, lo que resulta en un queso esponjoso. El defecto es causado por la multiplicación de microorganismos de la leche durante la fabricación de queso, siendo más frecuente en quesos elaborados con leche cruda de mala calidad bacteriológica y amplificándose cuando la temperatura ambiente es alta y no existen instalaciones de enfriamiento para bajar la temperatura de salas de drenaje y salazón.

Los coliformes son generalmente responsables de la hinchazón temprana, en particular *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter* spp., *Escherichia coli* y *Klebsiella aerogenes*, que fermentan la lactosa y, además del ácido, produce CO₂ y H₂ (Lück & Dunkeld, 1981; Bintsis & Papademas, 2002; Tabla et al., 2016). Al ser el H₂ muy poco soluble en fase acuosa, se favorece la hinchazón, la cual se caracteriza por la aparición de agujeros muy numerosos y pequeños (1-2 mm) dentro de la masa de queso. Cuando los agujeros pequeños están acompañados por los más grandes (3-6 cm), **las levaduras** están generalmente también involucradas, aunque por sí solas no suelen causar gases prematuros y, en los casos en que lo hacen, el defecto no es grave (Fröhlich-Wyder et al., 2019). Entre estas levaduras, se incluye *Kluyveromyces lactis*, *Dekkera anomala* y *Torulospira delbrueckii*. Sin embargo, la presencia de coliformes y levaduras en la leche no necesariamente conduce a este defecto en el queso, puesto que es necesario que el número inicial de microorganismos asociados con este el defecto sea relativamente grande (> 10⁵ ± 10⁶ ufc/mL de leche) y que la acidificación por el cultivo iniciador (en caso de llevarlo) sea muy lenta o insuficiente para suprimir su crecimiento (Alichanidis, 2007).

2.4.3.2- Hinchazón tardía

El defecto más estudiado en la literatura científica en quesos duros y semiduros es la hinchazón tardía (Figura 1.17D). Este defecto está principalmente causado por la contaminación de la leche y posterior crecimiento de bacterias del género ***Clostridium***, que producen gran cantidad de gas hidrógeno y dióxido de carbono, y de ácidos grasos volátiles

como butírico y propiónico (Gómez-Torres et al., 2015). Como consecuencia, los quesos con este defecto, además de presentar una apariencia hinchada, tienen defectos en el interior de la pasta con presencia de ojos anormales (grandes cavernas y grietas en la pasta, así como en la corteza en casos severos), y defectos de aroma (rancidez) (Le Bourhis et al., 2007; Garde et al., 2012; Feligini et al., 2014; Gómez-Torres et al., 2015; Zabaleta et al., 2016). Feligini et al. (2014), a partir de leche cruda y cuajada de queso Grana Padano y basándose en un conjunto de cebadores específico para múltiples especies, consiguieron mostrar simultáneamente huellas digitales distintivas para el diagnóstico de *Clostridium tyrobutyricum*, generalmente considerado el principal responsable de la hinchazón tardía en quesos, y de otras especies hasta ahora asociadas con el defecto. En queso Manchego, Garde et al. (2012) investigaron los recuentos de esporas de *Clostridium*, azúcares y ácidos orgánicos con diferentes grados de defectos de hinchazón tardía. Los quesos con este defecto mostraron recuentos de esporas significativamente más altos, niveles más bajos de lactosa, galactosa, ácido cítrico y láctico, y niveles más altos de ácidos acético y butírico que los quesos sin este tipo de defectos. En quesos experimentales, Le Bourhis et al. (2007) estudiaron los efectos de la hinchazón tardía en queso tipo Emmental mediante la inoculación en condiciones experimentales de esporas de *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* en la leche lográndose la predicción del nivel de este tipo de defecto en las primeras etapas de maduración, y la comprensión del origen del defecto, del mismo modo que Gómez-Torres et al. (2015) realizaron en quesos tipo Manchego.

3.- CONTROL DE CALIDAD EN EL PROCESO DE ELABORACION DEL QUESO

En la industria del queso, algunos procesos de fabricación como la sinéresis y la maduración aún dependen del control empírico (Everard et al., 2007). Por lo tanto, la evaluación de los parámetros de procesado, incluido el período de maduración, el rendimiento del queso o la cuajada, se convierten en un desafío en la gestión de la producción de queso (Subramanian et al., 2011; Margolies & Barbano, 2018). De entre los diferentes métodos que existen para la evaluación de dichos parámetros de procesado en la elaboración del queso, éstos se pueden clasificar, en función de la intensidad del daño que causan en la cuajada, en métodos destructivos o no destructivos (Castillo et al., 2001).

En las últimas décadas, se han desarrollado métodos rápidos y no destructivos para evaluar los atributos de calidad del queso, monitoreo del proceso de producción, determinación de su calidad, origen geográfico o su adulteración, a través de técnicas de imagen como la visión computerizada, la espectroscopía de infrarrojo cercano, la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier, espectroscopía Raman, imágenes hiperespectrales y otras técnicas como los ultrasonidos (Lei et al., 2019), que a diferencia de los métodos convencionales, adquieren datos sin contacto con las muestras, proporcionando mediciones no destructivas (Wu & Sun, 2013).

3.1- CONTROL DE LA ETAPA DE CUAJADO DE LA LECHE

El proceso por el que la leche se transforma en cuajada transcurre en cuatro etapas, en las que se produce la coagulación de la leche, sinéresis o expulsión de suero, moldeado y salado. Estos pasos, permiten al maestro quesero controlar la composición del queso, la cual tiene una gran influencia en la maduración y calidad de este.

La primera etapa de coagulación de la leche transcurre inducida por la acción enzimática del coagulante, en la que se produce una modificación de las micelas de caseína a través de su hidrólisis limitada, seguida de la agregación de micelas inducida por el calcio (Fox & McSweeney, 1998). De esta forma, enzimas específicas en el coagulante actúan sobre las caseínas de la leche, fragmentando parcialmente estas moléculas. Este fenómeno provoca un cambio en la carga superficial de la micela, aumenta su hidrofobicidad y promueve su agregación (Koc & Ozer, 2008), que es responsable de un aumento en la viscosidad de la leche. Estas características son importantes en la fabricación de queso porque determinan el **punto de corte de la cuajada** (Fox et al., 2000).

El análisis de las diferentes etapas en la formación de redes macromoleculares es de gran importancia, ya que la comprensión de la estructura y las propiedades de los geles requiere la comprensión de su proceso de organización (Nassar et al., 2001). Por lo tanto, la cuajada de queso es un gel a base de proteínas en el que las micelas de caseína hidrolizadas

forman una red continua que contiene glóbulos grasos. La coagulación de la leche inducida por el coagulante se ve influenciada por varios factores, como el pH, la concentración de calcio, el contenido de proteínas, la concentración de enzimas y los tratamientos de procesamiento (por ejemplo, almacenamiento en frío, tratamiento térmico, tratamiento a alta presión y ultrafiltración ... etc.) (Gunasekaran & Ay, 1996; Daviau et al., 2000). En esta etapa, el **tiempo de coagulación** se define como el tiempo transcurrido desde la adición del coagulante hasta que se forman las primeras agregaciones visibles en una capa de leche. A partir de ese momento, las agregaciones continúan creciendo hasta extenderse a todo el volumen de leche contenido en la cuba. En estas condiciones, la firmeza del gel continúa aumentando, definiéndose el tiempo de corte como el tiempo que transcurre desde la adición del coagulante hasta que el gel tenga la firmeza necesaria para comenzar a cortarlo. Este parámetro tiene una gran importancia práctica, ya que marca el momento apropiado para iniciar el siguiente paso en el proceso de elaboración del queso.

Por tanto, la **gelificación de la leche** es un paso importante en el proceso de elaboración del queso; determinar el **final de la etapa de coagulación (tiempo de corte)** afecta significativamente el rendimiento del proceso de producción de queso. Los geles de leche coagulados con coagulante o ácido son bastante estables en condiciones de reposo, pero si se cortan o se rompen, se produce una gran sinéresis y expulsan el suero (Bennett & Johnston, 2004). Por lo tanto, controlar la firmeza en el momento del corte puede ser importante para controlar el rendimiento del queso y el contenido de humedad. Si la cuajada se corta cuando el coágulo es **demasiado blando**, la pérdida de grasa y finos de cuajada en el suero disminuye drásticamente el rendimiento del queso. Si la cuajada es **demasiado firme**, la sinéresis se retrasa, lo que resulta en un queso de alta humedad, que puede requerir una etapa de maduración más larga (Benedito et al., 2002).

Tradicionalmente, la cuajada se corta después de un tiempo predeterminado desde la adición de la enzima o según el criterio del operador basado en la evaluación empírica de la firmeza y la apariencia visual de las propiedades del gel. **Cortar el coágulo después de un tiempo prefijado** es cuestionable, ya que las variaciones en las propiedades de la leche y las condiciones de procesamiento afectan la firmeza de la cuajada y la microestructura del gel, modificando el tiempo de corte óptimo. Varios autores han señalado las desventajas de una selección inadecuada del tiempo de corte (Hori, 1985; Payne et al., 1993a, b; Passos et al., 1999; Fagan et al., 2007a). La estimación en tiempo real del tiempo de corte de la cuajada es esencial para la fabricación de queso, ya que ejerce un impacto sustancial tanto en el rendimiento como en la calidad del queso (Bakkali et al., 2001).

Sin embargo, realizar **el corte en base a la evaluación subjetiva del maestro quesero** puede constituir una práctica adecuada y aceptable, si el maestro tiene suficiente experiencia y la realiza adecuadamente (Hori, 1985), como sucede en los quesos de pasta blanda de tipo blanda del tipo "Torta del Casar" y "Queso de La Serena". Ésta se basa, principalmente, en la evaluación empírica y por tanto subjetiva de las propiedades reológicas del coágulo como la

rigidez, textura y elasticidad mediante observación visual y táctil. Las pruebas que constituyen más frecuentemente el criterio de decisión visual en cualquier tipo de queso se basan en comprobar que la cuajada se separa fácil y limpiamente de la pared de la cuba al presionarla con la palma de la mano, con los dedos o con un cuchillo o espátula de acero inoxidable. También sirve como referencia observar que, al marcar la palma de la mano sobre la superficie del coágulo, ésta se unta de suero, pero sin que se observen restos de cuajada adheridos a la piel. Otros maestros queseros optan por introducir con trayectoria inclinada un cuchillo o espátula de acero inoxidable en la cuajada, y si al realizar un movimiento de palanca ascendente, el coágulo se fractura limpiamente, como si fuese de “porcelana”, se observa que los lados que limitan el corte son lisos y que en el suero expelido y recogido en el interior del corte es amarillo, con pocos finos y transparente, entonces la cuajada está lista para ser cortada. Por último, el empleo de una varilla de acero inoxidable también es un método que se emplea para determinar el tiempo de corte, que consiste en introducir y dejar descender verticalmente la varilla hasta que se detiene y no se balancea hacia los lados.

El interés por la selección óptima del tiempo de corte ha motivado a numerosos investigadores para **el estudio y desarrollo de equipos que pretenden determinar, de forma objetiva, este parámetro**, basándose la mayoría de los métodos en la monitorización de la coagulación y del aumento de la dureza de la cuajada, puesto que pretenden reproducir el método visual. Atendiendo a la importancia del momento óptimo de corte de la cuajada, se necesita una metodología que permita evaluar el tiempo de corte en tiempo real para estandarizar el rendimiento del queso y sus características físicas y sensoriales (Koc & Ozer, 2008).

3.2-CONTROL DE ETAPA DE MADURACIÓN DEL QUESO

El proceso de maduración se caracteriza por los cambios bioquímicos, microbiológicos, estructurales, físicos y sensoriales que ocurren durante el almacenamiento posterior a la fabricación, transformando la cuajada fresca en un queso con las características deseadas. Este proceso tiene un efecto importante en la calidad de la mayoría de las variedades de queso, siendo un proceso crítico para la mayoría de los quesos cuajados con coagulante (Fox et al., 1996; McSweeney, 2004). Los **cambios químicos y físicos** que ocurren durante la maduración hacen que el queso fresco pierda su textura dura y se vuelva blando, lo que depende del grado de proteólisis y la duración y temperatura de maduración (Fox et al., 2004; Kulmyrzaev et al., 2005). En los quesos fabricados con coagulante vegetal de *Cynara cardunculus* L., como la “Torta”, desarrollan una proteólisis intensa, dando lugar a una estructura más homogénea, lo que aumenta la cremosidad y el ablandamiento del queso (Delgado et al., 2010a).

Estos cambios químicos y físicos están asociados a su vez, con modificaciones relacionadas **con el pH, la hidratación de proteínas, la fusión de grasas y la hinchazón de la matriz de caseína**, dependiendo de la variedad de queso (Everett & Auty, 2008), los cuales

están influenciados significativamente por las condiciones de almacenamiento y la magnitud de los efectos depende del proceso de fabricación utilizado (por ejemplo, distribución de sal, nivel de retención de coagulante), composición (por ejemplo, pH, niveles de Ca^{2+}) y microbiología.

La **humedad de la cámara** es esencial para controlar en el queso el nivel de secado de la superficie, pérdida de humedad, crecimiento de la microbiota superficial, desarrollo de una corteza correcta y los cambios de textura y sabor (Spinnler & Gripon, 2004; Hélias et al., 2007). El grado de maduración juega un papel crucial en la calidad organoléptica del queso, puesto que los cambios complejos que se producen durante este proceso sobre su composición química influyen en el desarrollo de las propiedades sensoriales del queso (Weimer et al., 1999). En el caso de quesos de pasta blanda elaborados con leche cruda y cuajo vegetal como la “Torta del Casar” y “Queso de La Serena”, la proteólisis es la ruta de maduración más importante para la formación del aroma y textura característico (Fernández del Pozo et al., 1988b; Delgado 2010a, 2010b; Ordiales et al., 2013a, 2014). Por lo tanto, la calidad del queso se puede evaluar determinando el grado de maduración y sus compuestos de sabor asociados (Forde & Fitzgerald, 2000). Sin embargo, generalmente se encuentra un alto grado de variación en los procesos biológicos y las matrices, como los quesos, que no pueden abordarse fácilmente con los métodos tradicionales. En las queserías, **los maestros queseros utilizan normalmente parámetros físicoquímicos tradicionales y observaciones táctiles y visuales para evaluar el estado de maduración de los quesos. Las técnicas instrumentales y los paneles sensoriales** pueden ser costosos y requieren personal capacitado que garantice sistemas más innovadores y de detección rápida para el monitoreo de la maduración y la evaluación de la calidad del queso, como son la espectroscopía infrarroja (IR), nariz electrónica y técnicas ópticas (Ampuero & Bosset, 2003; González-Martín et al., 2011). En la Tabla 1.5, se presentan aplicaciones de técnicas no destructivas para la evaluación de la calidad de quesos entre 2004 y 2020.

3.3. MÉTODOLÓGÍAS NO DESTRUCTIVAS PARA EL CONTROL DEL PROCESO DE ELABORACION DE QUESOS

En la Tabla 1.5, se presentan aplicaciones de técnicas no destructivas para la evaluación de la calidad de quesos entre 2004 y 2020.

Tabla 1.5. Aplicaciones de técnicas no destructivas para la evaluación de la calidad de quesos (2004 y 2020).

Técnica no destructiva¹	Alicación en control de calidad	Referencias
Visión artificial queso Ragusano, Emmental, y Cheddar	Detección de formación de ojos	Caccamo et al. (2004)
Visión artificial queso fundido	Capacidad de fusión	Everard et al. (2005)
Visión artificial queso	Parámetros de proceso	Everard et al. (2007)
Visión artificial queso fundido	Análisis composicional: ingredientes.	Jeliński et al. (2007)
Visión artificial queso tipo Gouda	Detección de formación de ojos	Lee et al. (2012)
Tomografía computerizada queso tipo Tilsit-semiduro	Detección de formación de ojos	Guggisberg et al. (2013)
Tomografía computerizada Emmental duro	Detección de formación de ojos	Schuetz et al. (2013)
Tomografía computerizada queso semiduro	Detección de formación de ojos	Huc et al (2014)
Tomografía computerizada tipo suizo	Detección de formación de ojos	Guggisberg et al. (2015); Schuetz et al. (2016)
Rayos X queso semiduro	Detección de formación de ojos	Kraggerud et al. (2009)
Rayos X queso tipo Tilsit-semiduro	Detección de formación de ojos	Guggisberg et al. (2013)
Rayos X queso tipo Emmental duro	Detección de formación de ojos	Schuetz et al. (2013)
NIR tipo Cheddar	Maduración y sensorial	Downey et al. (2005)
NIR tipo Emmental	Análisis composicional: químico	Karoui et al. (2006a, b)
NIR queso blando	Maduración y composición	Karoui et al. (2006c),
NIR cuajada de queso homogenizada y no homogenizada	Composición	Sultaneh & Rohm (2007)
NIR queso	Composición	González-Martín et al. (2008)
NIR queso fresco y liofilizado	Composición	Lucas et al. (2008)
NIR queso fundido	Composición	Pi et al. (2009)
NIR queso Zamorano duro	Textura	Revilla et al. (2009)
NIR queso	Sensorial	González-Martín et al. (2011)
NIR queso Zamorano duro	Composición	Oca et al. (2012)
NIR queso Edam	Composición	Mlček et al. (2013)
NIR queso duro	Composición	González-Martín et al. (2014)
NIR Norvegia cheese (Semi-hard)	Sensorial	Kraggerud et al. (2014)
NIR queso Riccota	Composición	Madalozzo et al. (2015)
NIR queso Cheddar	Composición	Zhao et al. (2015)
Transformada de Fourier- NIR (FT-NIR) queso Parmigiano Reggiano duro	Clasificación DOP	Cevoli et al. (2013)
Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) queso duro	Clasificación zona geográfica	Karoui et al. (2005)
FTIR queso blando	Reología	Kulmyrzaev et al. (2005)
FTIR queso blando	Composición	Karoui et al. (2006c)

Técnica no destructiva¹	Alicación en control de calidad	Referencias
FTIR queso suizo	Composición	Rodriguez-Saona et al. (2006)
FTIR queso tipo Camembert blando	Composición y maduración	Martín-del-Campo et al. (2007a, b)
FTIR queso fundido	Textura, capacidad de fusión y sensorial	Fagan et al. (2007b)
FTIR queso Cheddar	Maduración y sensorial	Fagan et al. (2007c, d)
FTIR queso suizo	Composición	Koca et al. (2007)
FTIR queso blando	Clasificación de la leche y el suero	Kulmyrzaev & Dufour (2010)
FTIR queso Pecorino (semiduro)	Clasificación zona geográfica	Lerma-García, et al. (2010)
FTIR queso Raclette (semiduro) y queso Comté duro	Capacidad de fusión	Boubellouta & Dufour (2012)
FTIR queso Emmental	Clasificación de marca	Botosoa & Karoui (2013)
FTIR queso Parmigiano Reggiano (duro)	Clasificación DOP	Cevoli et al. (2013)
FTIR queso	Parámetros de procesos	Ferragina et al (2013)
FTIR queso Norvegia (semiduro)	Composición y sensorial	Kraggerud et al. (2014)
FTIR queso Cheddar	Composición	Zhao et al. (2015)
FTIR tipo Cantal	Estructura molecular	Louidiyi & Aït-Kaddour (2018)
FTIR tipo Cantal	Parámetros de procesos	Louidiyi et al. (2018)
NIR +FTIR queso blando	Composición	Karoui et al. (2006c)
HSI queso semiduro	Composición, textura y clasificación de enzima	Darnay et al (2017)
HSI queso fresco	Composición	Barreto et al. (2018)
HSI queso tipo suizo semiduro	Textura	Vásquez et al. (2018)
HSI queso fresco	Composición	Barreto et al. (2018)
HSI queso tipo suizo semiduro	Textura	Vásquez et al. (2018)
Ultrasonido Cheddar	Maduración (Textura)	Benedito et al. (2000a)
Ultrasonido Mahón	Maduración; Defecto	Benedito et al. (2001)
Ultrasonido Manchego	Maduración (Textura)	Benedito et al. (2006)
Ultrasonido Torta del Casar	Coagulación	Jiménez et al. (2017)
Ultrasonido queso	Coagulación	Derra et al (2018)
Ultrasonido queso Finnish Emmental tipo suizo (Swiss- type)	Detección de ojos y fractura	Eskelinen et al. (2007)
Ultrasonido queso Manchego	Fractura	Conde et al. (2008)
Acústico queso Manchego	Fractura	
Ultrasonido queso	Detección de ojo y fractura	Nassar et al. (2010)
Tap-tep acústico queso	Detección de ojo y fractura	
Ultrasonido queso Finnish Enmental tipo suizo	Detección de ojos y fractura	Eskelinen et al. (2007)
Ultrasonido tipo Manchego	Fractura	Conde et al. (2008)
Acústico tipo Manchego	Fractura	

¹ NIR: Espectroscopía de infrarrojo cercano; HSI: Imagen hiperespectral

4- APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS

El ultrasonido se define generalmente como un sonido con una frecuencia superior a la que puede responder el oído humano, alrededor de 20 kHz, mientras que una **onda ultrasónica**, se define como una oscilación mecánica de presión que viaja a través de un medio que transmite energía de un punto a otro (Mota et al., 2011). Las ondas ultrasónicas necesitan un medio elástico para propagarse, por lo que pasan a través de todas las sustancias, incluidos los sólidos, líquidos y gases que poseen propiedades elásticas (Capote & de Castro, 2007). En general, las ondas ultrasónicas se propagan en sólidos más rápido que los líquidos y gases con menor cantidad de atenuación. En líquidos y gases, las ondas ultrasónicas que se propagan sólo pueden ser de carácter **longitudinal**, mientras que en los sólidos pueden propagarse también las **transversales** (Andrews, 2011). El ultrasonido se emplea en diversos sectores industriales, incluidos el químico, el de bioprocesados, el procesamiento de alimentos, el farmacéutico y el médico (Chemat et al., 2011; Awad et al., 2012).

Dentro de la **industria alimentaria**, la inspección ultrasónica de baja energía se usa frecuentemente como una técnica analítica no destructiva y no invasiva para el aseguramiento de la calidad, el monitoreo y el control del procesado.

Desde el punto de vista de la aplicación, el ultrasonido se puede clasificar de una forma amplia en **ultrasonidos de baja intensidad** ($<1 \text{ W/cm}^2$) y **alta intensidad** ($10\text{--}1000 \text{ W/cm}^2$).

El **ultrasonido de baja frecuencia** (inferior a 2 MHz), al emplear niveles de potencia muy bajos, no produce ninguna alteración en el material por el que pasa la onda o mínimas alteraciones físicas y químicas como pueden ser vibraciones a escala molecular, induciendo efectos temporales no destructivos en el medio (Povey, 1989; McClements, 1995). En este caso, son las propiedades de las ondas sonoras las que cambian cuando transitan el medio según su composición, textura, propiedades físicas y elasticidad (Cho, 2010). Por lo tanto, el uso de ultrasonidos de baja intensidad puede emplearse para el análisis de alimentos y el control de calidad sin afectar al producto.

El **transductor ultrasónico** es el dispositivo encargado de transformar la energía eléctrica en energía sonora que se transmitirá al medio. Las moléculas de ese medio, a medida que van siendo alcanzadas por la onda ultrasónica, transmiten el movimiento a las moléculas adyacentes antes de regresar a su posición original (Capote et al., 2007). Este fenómeno hace alternar los ciclos de compresión y descompresión dependiendo de las propiedades del material, lo que cambia las características de la onda ultrasónica, como la longitud de onda, la velocidad, la amplitud, la presión, la frecuencia y el período (Awad et al., 2012). Los **parámetros que se miden en la mayoría de las investigaciones son la velocidad ultrasónica, el coeficiente de atenuación y la impedancia acústica** (McClements, 1995).

La **velocidad de propagación** en un medio de cualquier onda mecánica en general, y de las ultrasónicas en particular, depende de los parámetros elásticos y de la densidad del citado medio. Por lo tanto, las mediciones de velocidad ultrasónica pueden proporcionar información sobre estas propiedades (McClements, 1995). Además, como se cita en la literatura, en muchas aplicaciones se ha utilizado la velocidad ultrasónica como variable sensible (Mulet et al., 1999; Nassar et al., 2004; Singh et al., 2004; Benedito et al., 2006; Alexander & Corredig, 2007; Wang et al., 2007; Lopez et al., 2009; Telis-Romero et al., 2011)

Cualquier factor que convierte la energía acústica en otros tipos de energía o atenúa las ondas de ultrasonido durante la propagación por el medio, se denomina "**factor de atenuación**" (Coupland et al., 2003). Las causas más importantes de atenuación son la adsorción y la dispersión. La atenuación está relacionada con la viscosidad, la compresibilidad y los efectos de dispersión y adsorción del material. Su valoración puede por ello aportar información sobre las propiedades fisicoquímicas de los materiales alimentarios, incluida la concentración, la viscosidad, la relajación molecular y la microestructura (Awad et al., 2012).

4.1.- TÉCNICAS DE INSPECCIÓN NO DESTRUCTIVA CON ULTRASONIDOS

En bibliografía se puede encontrar información sobre el uso de los ultrasonidos para mejorar la calidad de los alimentos (Şengül et al., 2011; Marchesini et al., 2012; Nguyen et al., 2012; Richard et al., 2012; Juliano et al., 2013; Pingret, et al., 2013), mejorar la eficiencia de los procesos (Lin et al., 2007; Zisu et al., 2010; Shanmugam et al., 2012), simplificar la manipulación y la medición (Juliano et al., 2013; Kobayashi et al., 2006) y lograr un método no destructivo que permita detectar, caracterizar y monitorizar procesos, frente a otros métodos comunes (Gan et al., 2006; Gülseren et al., 2010). La monitorización no destructiva permite detectar los riesgos asociados a la fabricación, almacenamiento y la distribución de productos alimentarios, proporcionando un control rápido en línea para resolver o reducir estos riesgos en puntos específicos de las fases del proceso. (Chemat et al., 2011; Aernouts et al., 2011). Todo ello permite además obtener resultados de alta calidad evitando el desperdicio de las muestras y reduciendo por tanto los costes generales de producción. Además, si el monitoreo es sin contacto y no destructivo, puede eliminar manipulaciones y pérdidas de tiempo. Por lo tanto, la inspección ultrasónica puede ser ideal en la producción y procesamiento de alimentos. Las técnicas de inspección no destructiva con ultrasonidos pueden clasificarse en dos métodos principales: técnica pulso-eco y técnicas de transmisión.

4.1.1.- Técnica de pulso-eco

En este método, la onda ultrasónica se transmite al material y se recibe la señal de eco, donde un **solo transductor actúa como transmisor y receptor**.

Un generador de pulsos produce un pulso eléctrico en una frecuencia apropiada para el transductor con el que se está trabajando. El transductor ultrasónico convierte el pulso

eléctrico en una señal acústica que pasa a través del material y después de reflejarse la onda en cualquier discontinuidad de la muestra, regresa y es detectado por el transductor que convierte la señal acústica recibida en un pulso eléctrico nuevamente. La diferencia de tiempo de las señales emisora y receptora se puede calcular en la pantalla de un osciloscopio. La señal recibida recibe el nombre de A-scan, esto es, una representación bidimensional de la amplitud de oscilación frente al tiempo. Dicho A-scan característico de una inspección determinada permite, entre otros, calcular la velocidad ultrasónica, el coeficiente de atenuación y la impedancia acústica de las ondas sonoras.

La técnica de pulso-eco se usa en las investigaciones principalmente porque se puede automatizar fácilmente, es simple de operar y medir rápidamente (McClements, 1995).

4.1.2.- Técnica de transmisión

En este método, **un transmisor ultrasónico propaga ondas acústicas** en el material de muestra que en parte se reflejan y en parte pasan al otro lado de la muestra. Posteriormente, **el receptor ultrasónico detecta las señales transmitidas** y envía estas señales al osciloscopio para su monitoreo.

Los transductores se colocan mutuamente en dos lados enfrentados de la muestra (Capote et al., 2007). Tanto el transmisor como el receptor están conectados al osciloscopio que permite una monitorización y medida del tiempo de vuelo mediante el A-scan correspondiente (Awad et al., 2012).

El tiempo de vuelo del pulso puede medirse con precisión. Por lo tanto, la técnica de transmisión se utiliza para aplicaciones en las que se requieren mediciones de alta precisión (McClements, 1995), como la medición de propiedades acústicas sin contacto con la muestra (Pallav et al., 2009), la evaluación de la calidad microbiológica (Elvira et al., 2006), la caracterización de partículas coloidales (Gülseren et al., 2010), la reología de mediciones de geles (Buckin et al., 2001), o simplemente, en aquellas muestras cuya inspección en modo pulso-eco sea impracticable por razones geométricas o de atenuación de la muestra.

4.2.- APLICACIÓN EN EL SECTOR LÁCTEO

Las técnicas de ultrasonidos se han utilizado en muchas investigaciones sobre la leche y sus derivados (Chouliara et al., 2010; Juliano et al., 2014; Leong et al., 2014; Liu et al., 2014; Porova et al., 2014; Torkamani et al., 2014). En la industria láctea existen muchos estudios en los que se han utilizado técnicas basadas en ultrasonido para el monitoreo de procesos y control de calidad (Nassar et al., 2001; Hæggström & Luukkala, 2001; Nassar et al., 2004; Elvira et al., 2005; Lehmann, et al., 2005; Dalglish et al., 2005; Gan et al., 2006; Alexander & Corredig, 2007; Lopez et al., 2009; Pallav et al., 2009; Gülseren et al., 2010; Richard et al., 2012) y también para detectar cambios fisicoquímicos en los productos lácteos (Gan et al.,

2006; Elvira et al., 2006). Estos han demostrado la capacidad de los ultrasonidos para la identificación de diferentes propiedades de los productos lácteos (Meyer et al., 2006; Chandrapala et al., 2012; Narsaiah et al., 2012). Las investigaciones han involucrado la detección e identificación de cuerpos extraños (Graves et al., 1998; Hæggström et al., 2001; Pallav et al., 2009), mediciones reológicas (Buckin & Kudryashov, 2001), caracterización y monitoreo de reacciones microbiológicas y enzimáticas (Elvira et al., 2010), monitoreo de cambios de propiedades estructurales (Cho & Irudayaraj, 2003; Lopez et al., 2009; Nassar et al., 2010; Richard et al., 2012), monitoreo y caracterización de alimentos (Benedito et al., 2001; Ogasawara et al., 2006), monitoreo y detección de incrustaciones (Lohr et al., 2003; Wallhäußer et al., 2014) y determinación del contenido de grasa sólida (Singh et al., 2004).

4.2.1.- Características de la leche

Elvira et al., (2006, 2010) detectaron el crecimiento de microorganismos en la leche UHT mediante el uso de un sistema ultrasónico de ocho canales a una frecuencia de 800 kHz, revelando que la **contaminación microbiana** induce cambios en los parámetros de propagación ultrasónica que se detectan mediante el procesamiento de la señal y el análisis de la amplitud y el tiempo de vuelo de la onda. Después de adquirir datos del controlador de temperatura y humedad y recibir señales acústicas, un software calcula el algoritmo FFT, la amplitud y el retraso de las ondas. Finalmente, el análisis de los datos recopilados es capaz de permitir la detección de contaminación o cambios en las propiedades del material.

El ultrasonido de alta resolución tiene una gran sensibilidad que puede identificar los cambios que ocurren en las partículas más pequeñas. De esta forma, se ha usado una técnica ultrasónica no invasiva y no disruptiva para la comprensión fundamental del comportamiento de agregación de los sistemas lácteos capaces de usar en tiempo real el monitoreo de los procesos lácteos (Alexander et al., 2007). Gülseren et al., (2010) utilizaron una frecuencia ultrasónica que oscila entre 3 y 99,5 MHz para sondear las **propiedades coloidales** de la leche descremada. Según sus informes, la espectroscopía electroacústica controla de forma eficaz la acidificación y el calentamiento de la leche descremada, siendo las frecuencias más altas las que proporcionan una buena sensibilidad para el monitoreo y el control de calidad, pero aumentan considerablemente la atenuación en las ondas transmitidas.

4.2.2.- Coagulación de la leche y corte de la cuajada

En cuanto a la aplicación de los ultrasonidos para la monitorización de los procesos de fabricación de quesos, determinar el tiempo de corte (final del proceso de coagulación) en la fabricación de queso es crítico (Corredig et al., 2004). El proceso de coagulación de la leche es uno de los procesos en los que los diferentes parámetros de los ultrasonidos se pueden medir con alta precisión. La razón es que las propiedades reológicas de la leche cambian considerablemente a través de este proceso, alcanzándose al final un coágulo semisólido

viscoelástico (Nassar et al., 2004, 2010). Gracias a estas propiedades, han sido diferentes autores los que han atribuido a los dispositivos de detección ultrasónica potencial para la monitorización de la coagulación de la leche, al proporcionar mediciones no destructivas y rápidas (Bamberger et al., 1999; O'Callaghan et al., 1999; Klandar et al., 2007), siendo los parámetros más utilizados en las mediciones la velocidad y la atenuación ultrasónicas (Wang et al., 2007). Estas monitorizaciones han consistido en la realización de experimentos en soluciones de caseína (Wang et al., 2007), leche reconstituida (Ay & Gunasekaran, 1994; Bakkali et al., 2001; Nassar et al., 2001, 2004) y leche entera (de Espinosa et al., 2002; Koc & Ozer, 2008).

En concreto, Ay & Gunasekaran (1994) estudiaron **la atenuación** durante el proceso de coagulación de la leche, observando que disminuía con el tiempo. Distinguieron dos etapas, una primera con una tasa decreciente más alta y una segunda con una tasa decreciente más baja, lo que les permitió definir el tiempo de coagulación como el tiempo entre la adición de coagulante y la transición entre estas dos etapas. Para la determinación del punto de corte, Gunasekaran & Ay (1996) propusieron una metodología en la que midieron la atenuación y la velocidad durante la coagulación, descartándose finalmente la medición de velocidad al mostrarse fluctuaciones significativas. Koc & Ozer (2008), definiendo el tiempo de coagulación del mismo modo que Ay & Gunasekaran (1994), propusieron el cálculo del punto de corte en función del tiempo de coagulación, monitoreando la atenuación a escala de laboratorio trabajando en modo pulso-eco. En este caso, realizaron las experiencias en una planta procesadora de leche, tomando una muestra del tanque de coagulación después de la adición del coagulante y verterlo en la celda de medición ultrasónica. Benedito et al. (2002) observaron una disminución en la atenuación durante el proceso de coagulación. Estos resultados coincidieron con los reportados por Gunasekaran & Ay (1996) pero difirieron con los obtenidos por Benguigui et al., (1994) y Dwyer et al., (2005) quienes encontraron un aumento en la atenuación durante la coagulación.

Por el contrario, Bakkali et al. (2001) concluyeron que las mediciones de atenuación no eran una técnica apropiada para el monitoreo de la coagulación, ya que era difícil detectar un punto de coagulación y el método no era además sensible a los cambios de temperatura o a la concentración del coagulante. Sin embargo, encontraron variaciones significativas en la **velocidad ultrasónica** durante la coagulación en dos etapas, la primera con una tasa de variación más alta que la segunda. De manera similar a Ay & Gunasekaran (1994), definieron el tiempo de coagulación como el momento en que tuvo lugar la transición entre dichas etapas. En contraste a las mediciones de la atenuación, encontraron diferencias significativas al modificar las condiciones de coagulación (concentración y temperatura del coagulante), concluyendo que las mediciones de velocidad ultrasónica eran apropiadas para el monitoreo de la coagulación. Por otra parte, Wang et al. (2007) encontraron que medir la velocidad ultrasónica era muy sensible a la hidrólisis enzimática por el coagulante y el siguiente proceso

de agregación, observando un aumento en la velocidad ultrasónica con la fase de coagulación.

Nassar et al. (2001) utilizaron mediciones de **tiempo de vuelo** para monitorear el proceso de coagulación, encontrando diferentes comportamientos al trabajar **a diferentes temperaturas ambientales**. En todos los ensayos observaron una etapa de retraso después de la adición del coagulante, encontrando una disminución en el tiempo de vuelo durante la coagulación para temperaturas más altas, mientras que, para temperaturas más bajas, encontraron un aumento seguido de una disminución en el tiempo de vuelo después de la etapa de retraso. Atribuyeron estos cambios a diferentes etapas durante el proceso de coagulación y relacionaron los cambios en el tiempo de vuelo con los cambios en la temperatura del medio. Aplicando estas técnicas, Nassar et al. (2004) estudió la sensibilidad a las condiciones de coagulación (temperatura, pH, concentración de leche en polvo), mientras que Passos et al. (1999) monitorearon el proceso de coagulación a través de cambios en la conductividad del medio.

Taifi et al. (2006) midieron la **velocidad y la amplitud de los pulsos** de ultrasonidos en dos frecuencias de 5 MHz y 50 MHz concluyendo que el cambio en la velocidad era un buen indicador de la firmeza del gel de leche y la aparición de sinéresis. Además, se mostró un gran aumento de la atenuación como un factor adecuado para la caracterización de la sinéresis.

Budelli et al. (2014) emplearon la **técnica de la elastografía por ondas transversales supersónicas**, “Supersonic Shear Wave Imaging” (SSI) para estudiar la idoneidad y sensibilidad de la técnica para controlar la coagulación enzimática de la leche, utilizándose un prototipo de dispositivo de ultrasonido clínico comercial que funcionaba en una frecuencia central de 8 MHz. Los autores declararon que la técnica, a diferencia de las técnicas anteriores que emplean ondas longitudinales, tiene la capacidad de proporcionar información sobre las propiedades estructurales y de composición del coágulo utilizando la evolución de la velocidad de la onda transversal, puesto que este tipo de ondas no se propagan en líquidos y su velocidad de propagación depende de las características viscoelásticas del medio, por lo que pueden ser usadas desde el principio de la coagulación para monitorizar la evolución de la firmeza del coágulo (Budelli et al., 2014).

Koc et al. (2008) emplearon la **técnica ultrasónica de pulso-eco a una frecuencia central** de 1 MHz para determinar el tiempo óptimo de coagulación y mostraron que el coeficiente de atenuación ultrasónica cambió con el tiempo de coagulación (Koc et al., 2008). Igualmente, Derra et al. (2018) mostraron la idoneidad de esta técnica para monitorizar la coagulación después de la adición del coagulante. Sin embargo, Gan et al., (2006) emplearon los transductores a una frecuencia central de 500 kHz para monitorear el proceso de coagulación.

4.2.3.- Detección de cuerpos extraños

En la industria alimentaria, los cuerpos extraños se conocen como cualquier tipo de objeto no deseado existente en los productos finales, incluso si se originaron a partir de los materiales alimentarios iniciales (Graves et al., 1998). La mayoría de los contaminantes encontrados en los productos alimenticios consisten en metal (32%), plagas (21%), plástico (10%) y vidrio (9%) (FSA, 2012). La presencia de cuerpos extraños en los productos alimenticios se puede minimizar, pero los fabricantes deben detectar y eliminar esta contaminación antes de la comercialización para evitar cualquier daño potencial a los consumidores y mantener su confianza (Zhao et al., 2003; Bermúdez-Aguirre et al., 2011).

Por lo tanto, la necesidad de un método de inspección no destructivo, rápido y altamente sensible, con resistencia a entornos industriales hostiles, hace que el ultrasonido sea una técnica propicia para identificar cuerpos extraños (Hæggström & Luukkala, 2001). En este sentido, el desarrollo de sistemas de inspección por ultrasonidos y su potencial para detectar cuerpos extraños es relevante (Zhang et al., 2001; Zhao et al, 2003, 2007, 2009; Basir et al., 2006; Ho et al., 2007; Yang et al. 2007).

Las técnicas ultrasónicas de baja intensidad pueden descubrir cuerpos extraños en muchos productos lácteos como la leche, el queso y el yogur (Chandrapala et al., 2012). Pallav et al. (2009) detectaron cuerpos extraños y aditivos en el queso mediante la aplicación de técnicas ultrasónicas en las líneas de producción mediante el empleo de un par de transductores en modo transmisión sin contacto con la muestra. Por otro lado, también se han detectado e identificado cuerpos extraños en diferentes tipos de quesos (Hæggström et al., 2001) mediante la medición de la reflexión del ultrasonido a una frecuencia de 5 MHz, estando constituidos estos cuerpos extraños por huesos, madera, plástico, acero, piedra y vidrio con tamaños comprendidos entre los 1 a 14 mm de diámetro. En este estudio se llegó a la conclusión de que la discriminación de cuerpos extraños en muestras homogéneas era más fácil que las muestras no homogéneas (Hæggström et al., 2001).

Leemans & Destain (2009) enterraron un objeto cilíndrico que tenía un diámetro de 3 mm en muestras de queso y utilizaron el modo ultrasónico pulso-eco para detectar cuerpos extraños. Se emitieron ondas ultrasónicas de frecuencia 0,35 MHz con intervalos de 0,1 s entre disparos. El principio de su trabajo se basaba en medir el tiempo de vuelo de las señales transmitidas y de los ecos. Encontraron el objeto extraño en el 90% de las pruebas y no informaron ningún efecto significativo de la temperatura y la madurez del queso sobre la técnica de detección, (Leemans & Destain, 2009), por lo que puede ser una técnica no destructiva muy útil en este sentido.

4.2.4.- Determinación de las propiedades de textura.

Los parámetros de los ultrasonidos como la **velocidad de onda** y la **atenuación** están relacionados con las propiedades de textura y composición de los productos lácteos (Benedito et al., 2001). La relación entre la propagación de las ondas ultrasónicas y las propiedades texturales y microestructurales del producto puede establecerse empíricamente (mediante una curva de calibración que relaciona la propiedad deseada con los parámetros de los ultrasonidos) o teóricamente (describiendo la propagación ultrasónica mediante ecuaciones) (Tamime, 2008). Para el análisis de la muestra, se pueden medir la velocidad de onda, la atenuación y la distancia en función de la posición del transductor (Falcone et al., 2006; Zhu et al., 2009). Una ventaja importante del ultrasonido analítico es la propagación en materiales opacos y de alta concentración, así como el análisis de alimentos heterogéneos (Dalglish et al., 2005; Falcone et al., 2006).

El ultrasonido analítico se ha utilizado para caracterizar productos lácteos en aplicaciones tales como la medición de la variación en el contenido de **grasa** (Singh et al., 2004), análisis de **proteínas** totales (Bogomolov et al., 2012), **determinación del tamaño de partículas** (Meyer et al., 2006), **separación de fases macroscópica** (Sharafbafi et al., 2015), detección de **aditivos químicos** (Mohanan et al., 2002) y **evaluación de la calidad** (Benedito et al., 2006). Además, la espectroscopía ultrasónica se puede utilizar para estudiar la agregación y desnaturalización de proteínas a escala industrial (Povey, 2013a, b).

Cho & Irudayaraj (2003) investigaron la viabilidad de la aplicación de ultrasonidos sin contacto para la **determinación del espesor y las propiedades mecánicas** de diferentes variedades de queso. La frecuencia elegida fue de 1 MHz y se evaluaron la velocidad del ultrasonido y la respuesta integrada de la señal transmitida. Los valores de viscosidad evaluados por ultrasonido para muestras de queso coincidieron con los valores de viscosidad medidos usando una máquina Instron con un coeficiente de correlación R^2 de 0,99 y el error estándar de estimación de 0,089 mm. Observaron que la velocidad ultrasónica aumentó gradualmente junto con el crecimiento del módulo de Young. Por otro lado, el coeficiente de atenuación de la onda tiene una alta correlación con las propiedades mecánicas de los quesos. Eskelinen et al. (2007) estudiaron la calidad estructural del queso suizo utilizando una configuración ultrasónica de pulso-eco a 1 MHz para detectar **grietas, ojos y defectos** de las muestras de queso. Los autores concluyeron que el ultrasonido pudo monitorear la estructura de gas sólido del queso durante el proceso de maduración.

Benedito et al. (2006) observaron que la textura del queso manchego difiere significativamente de los quesos Cheddar y Mahón. Los resultados mostraron que **el número y el tamaño de los poros** del queso determinan la atenuación de las ondas ultrasónicas. La relación entre las propiedades de textura y el grado de maduración se evaluó midiendo la compresión uniaxial y las pruebas de punción, que revelaron una relación lineal directa. También observaron que la velocidad ultrasónica aumentaba linealmente durante el proceso

de maduración. La velocidad ultrasónica se correlacionó bien con las propiedades de textura y se correlacionó mejor con la compresión que con los parámetros de punción.

En relación con la composición química del queso, Telis-Romero et al., (2011) evaluaron el **contenido de grasa y humedad** del queso fresco midiendo la velocidad ultrasónica y utilizando modelos semi empíricos. Debido al mayor contenido de agua del queso fresco en comparación con el queso curado, la velocidad ultrasónica en las mezclas de queso fue menor que la encontrada en los quesos frescos. Cuanto menor es el contenido de grasa, menor es la velocidad ultrasónica en el queso y las mezclas de queso. Al estandarizar las condiciones del proceso y las herramientas ultrasónicas, la determinación de la composición física se puede atribuir a la composición o a la textura del producto, estando ambas relacionadas con la homogeneidad y la calidad del producto.

En los quesos tipo “Torta” la textura untuosa y cremosa es una de sus singularidades, muy apreciada por los consumidores y objeto de pérdida de confianza en el producto por parte del consumidor si la textura del producto final no es la deseada. En base a los resultados previos en la evaluación de la textura y defectos asociados a ella en otros tipos de quesos, los ultrasonidos podría ser una herramienta no destructiva con un gran potencial en el control de calidad de las propiedades de este queso. Por lo tanto, en el presente trabajo se ha estudiado la aplicación de diversos **parámetros de los ultrasonidos como la velocidad, frecuencia y atenuación** en la detección no destructiva de las propiedades de textura durante la maduración y en el producto final mediante su correlación con parámetros fisicoquímicos, de composición y sensoriales.

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

El trabajo presentado se encuadra en las líneas de investigación sobre ensayos no destructivos mediante ultrasonidos del grupo de Radiaciones no Ionizantes y de Inspección Ultrasónica integrado en el **Instituto Universitario de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos (IProCar)** y sobre calidad de productos lácteos del grupo de Calidad y Microbiología de los Alimentos dentro del **Instituto Universitario de Investigación de Recursos (INURA)** de la Universidad de Extremadura. El objetivo general de este trabajo es la aplicación de técnicas basadas en ultrasonidos de baja frecuencia para el control del procesado y de la calidad de quesos de leche cruda de oveja de pasta blanda de Extremadura. Para su consecución se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1.- **Análisis** de las propiedades acústicas de la leche de oveja durante su coagulación mediante diferentes **métodos de inspección ultrasónica** y su utilidad a nivel industrial en la monitorización de los cambios en las **propiedades físico-mecánicas de la leche durante el cuajado** y para la estimación del tiempo de corte de la cuajada.

2.- Evaluar la **viabilidad de los ultrasonidos** como herramienta de control de calidad durante la maduración de queso de leche cruda de oveja de pasta blanda, relacionando los parámetros de los ultrasonidos con las características fisicoquímicas y de textura de los quesos y estudiando su potencial para **discriminar entre quesos estándar y defectuosos** durante todo el proceso de elaboración del queso.

3.- Valorar la **utilidad de diferentes parámetros de los ultrasonidos** relacionados con la velocidad, FFT y atenuación para el **control de calidad de quesos** de leche cruda de oveja de pasta blanda, asociándolos a las características fisicoquímicas microbianas, texturales y sensoriales de los mismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL

3.1.1.- Reactivos químicos y medios de cultivo

Todos los **reactivos químicos** utilizados para el desarrollo de este trabajo fueron de calidad reactiva y pertenecientes a las casas comerciales **PANREAC-APPLICHEM, MERCK, THERMO FISHER SCIENTIFIC y SCHARLAB.**

Los **medios de cultivo** y productos utilizados en las pruebas microbiológicas fueron adquiridos y preparados como recomendaban los distintos fabricantes pertenecientes a las casas comerciales **CONDALAB Y OXOID y CONDALAB.**

3.1.2.- Material biológico

Para la monitorización del **proceso de cuajado de la leche y elaboración de quesos** con diferentes defectos, se utilizó **leche cruda de oveja** procedente de una industria quesera local (**Hnos. Pajuelo SAT**) con explotación ganadera ovina propia, inscritas en los correspondientes registros de Industrias Queseras y Ganaderías del Consejo Regulador de la DOP Torta del Casar respectivamente.

Como **agente coagulante** en la elaboración se utilizó la flor del cardo *Cynara cardunculus* L. cedido por la quesería Hnos. Pajuelo SAT de la D.O.P Torta del Casar.

Para la formación de ojos en el queso (**Hinchazón temprana**) por microorganismos se utilizaron microorganismos potencialmente productores de gas de la colección del grupo de investigación Calidad y Microbiología de los Alimentos (**CAMIALI**) de la Universidad de Extremadura. Concretamente, se utilizaron tres cepas de las especies ***Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Kluyveromyces lactis*.**

Los quesos utilizados para llevar a cabo el estudio de la aplicación de ultrasonidos en el control de calidad del producto final procedían de **seis industrias**, tres acogidas a la **D.O.P Torta del Casar** y otras tres a la **DOP Queso de La Serena**. En la Figura 3.1 se muestra las tres zonas geográficas con Denominación de Origen Protegidas de queso existentes en Extremadura, señalándose en dos de ellas, la ubicación de las 6 queserías participantes en el estudio y que presentan en común la elaboración de quesos de pasta blanda con coagulante vegetal y leche cruda de oveja.

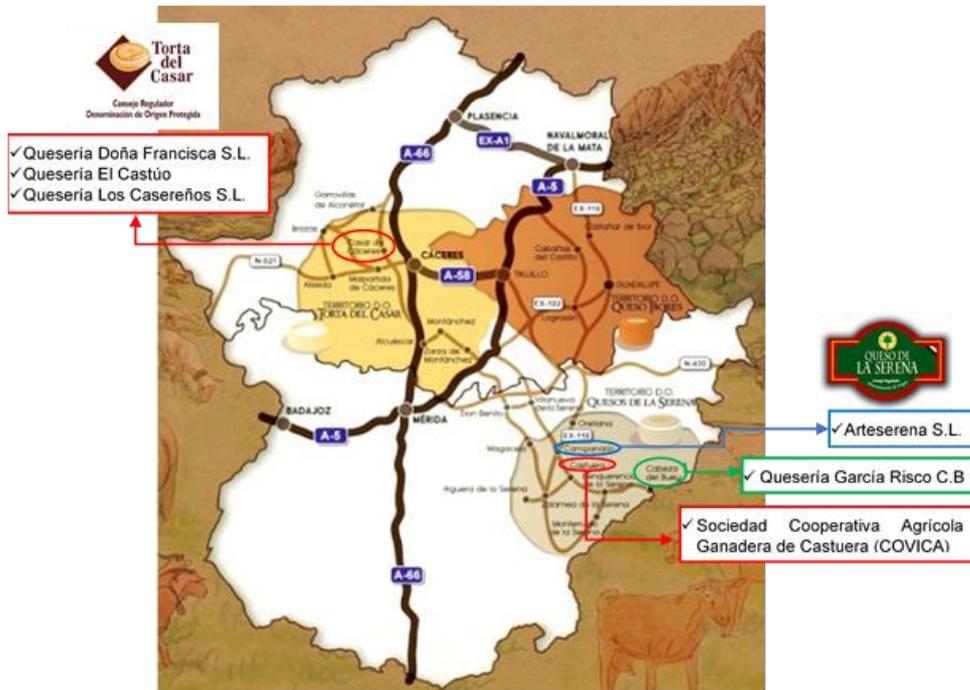


Figura 3.1. Procedencia de los quesos con DOP Torta del Casar y DOP Queso de La Serena

3.1.3.- Equipamiento

3.1.3.1.- Equipos para el proceso de cuajado de la leche y elaboración de quesos

Para llevar a cabo la elaboración de quesos, se utilizó el equipamiento de la **planta piloto de lácteos** del Centro Tecnológico Nacional Agroalimentario (CTAEX) (Figura 3.2).

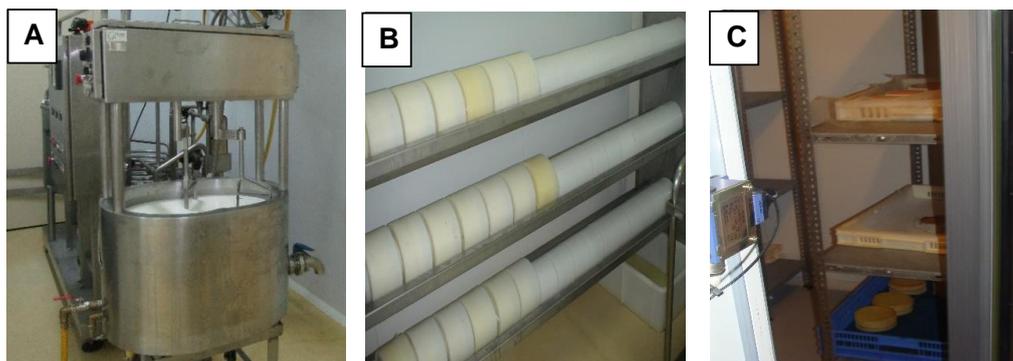


Figura 3.2. Equipamiento planta piloto de lácteos del CTAEX: (A) Cuba de acero inoxidable, (B) prensa neumática, y (C) estantería con quesos en cámara de maduración.

El cuajado, corte, batido, desuerado y prepresado de la leche cruda de oveja, se realizó en una **cuba de acero inoxidable** al baño maría mecanizada, de unos 100 L de capacidad con dos ejes, uno en sentido horario y otro en sentido antihorario, y de tipo bicircular con camisa de vapor, así como liras de agitación con cuchillas, palas y chapas de desuerado y prepresado (Pierre Guerin Ibérica, S.A.U., Burgos) (Figura 3.2A).

Los quesos se prensaron mediante una **prensa neumática** de 2 metros y 3 alturas Modelo PHC-2M-3A-3P (Pierre Guerin Ibérica, S.A.U., Burgos) (Figura 3.2B), mientras que la maduración se realizó en un mini **secadero** compacto con ventilación, rango de funcionamiento comprendido entre los +5°C y +20°C y Humedad Relativa regulable entre 60-95% (Santos Refrigeración Industrial, S. L., Badajoz) (Figura 3.2C).

Los **moldes y baños** para la salmuera utilizados para dar forma y salar los quesos, respectivamente, fueron proporcionados por la quesería participante en el estudio (Hermanos Pajuelo S.A.T., Almoharín, Cáceres).

3.1.3.2.- Equipos de ultrasonidos

Para la inspección ultrasónica de los distintos tipos de muestras se utilizaron tres pares diferentes de **transductores** (Figura 3.3).

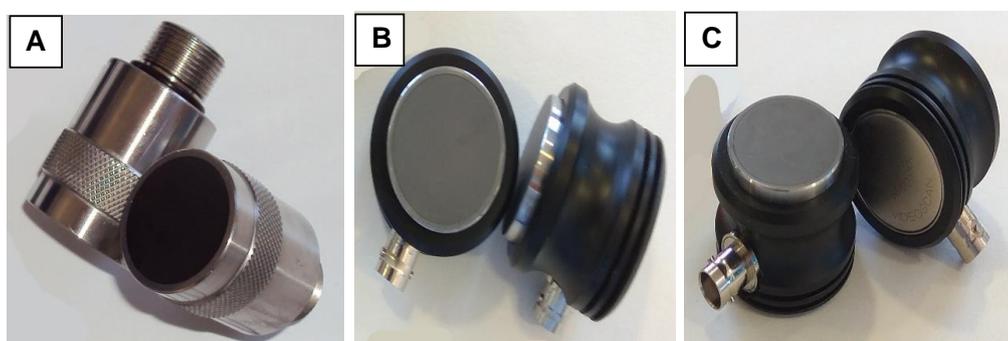


Figura 3.3. Transductores utilizados: (A) Transductores de inmersión V318-SU, (B) transductores de contacto V150-RB, y (C) transductores de contacto V151-RB.

Las principales **características de los diferentes transductores** utilizados se muestran en la Tabla 3.1, incluidas la longitud de onda (λ), la longitud de campo cercano (N) y el ángulo de dispersión del haz (φ). La región de campo cercano o zona de Fresnel es aquella región justamente enfrente del transductor emisor donde no son despreciables los efectos de interferencia y superposición de ondas. Al acabar esta región comienza la zona de campo lejano o de Fraunhofer, en la cual se puede prácticamente asegurar que la pérdida de amplitud de la señal es debida exclusivamente a fenómenos de atenuación de la onda. Por su parte, el ángulo de dispersión representa el ángulo sólido de emisión del haz ultrasónico correspondiente al lóbulo principal. Para la determinación de λ , N y φ , se han empleado las expresiones mostradas en las ecuaciones 1, 2 y 3 (Kinsler et al, 2000):

$$\lambda = \frac{v}{f} \quad (1)$$

$$N = \frac{D^2}{4\lambda} \quad (2)$$

$$\text{sen } \varphi = 1.22 \frac{\lambda}{D} \quad (3)$$

donde v denota la velocidad de propagación de la onda ultrasónica en el medio, tomándose unos valores de 1490 m/s para la leche (transductor V318) y 750 m/s para el queso (transductores V150 y V151), con la consideración de que dicha velocidad corresponde a la de las ondas transversales en el caso del queso.

Tabla 3.1. Características de los transductores utilizados.

Transductores	Inmersión	Contacto	
	V318-SU	V150-RB	V151-RB
D (Diámetro) (mm)	19	25	25
f (Frecuencia nominal) (kHz)	500	250	500
λ (longitud de onda)	2,98	3	1,5
Ancho de banda a -6 dB (%)	62	92	101
N (Longitud campo cercano) (mm)	30,29	52,08	104,17
ϕ (Ángulo de dispersión) (°)	11,03	8,42	4,2

Para asegurar el perfecto enfrentamiento de los transductores se utilizaron **estructuras metálicas** desarrolladas para este fin, tanto para los transductores de inmersión V318-SU (Figura 3.4A), como para los transductores de contacto V150-RB y V151-RB (Figura 3.4B).

La generación y recepción de las ondas ultrasónicas emitidas y captadas por los transductores fue llevada a cabo con dos modelos diferentes de pulser-receiver (Olympus Pulser-Receiver Panametrics-NDT) (Figura 3.5).

En concreto, la emisión y recepción de señales de ultrasonido con los transductores V318-SU y V151-RB se llevó a cabo mediante el emisor-receptor Modelo 5077PR (Figura 3.5B), caracterizado por suministrar una sección de impulsos de hasta 400 V y un rango de repetición de impulsos desde 20 Hz hasta 5 kHz. El tiempo de subida del pulso suele ser inferior a 10 ns. La respuesta de la señal se optimiza con filtros de paso alto y bajo de dos posiciones (out ó 1 MHz, y completo ó 10 MHz, respectivamente) y pasos de atenuación y ganancia de 1 dB desde 0 hasta 49 dB.

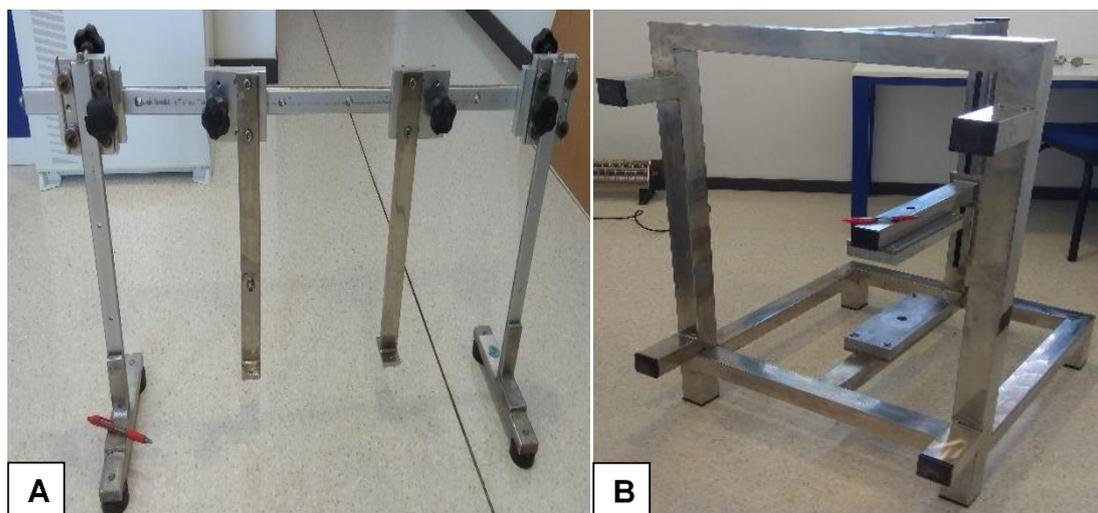


Figura 3.4. Estructuras metálicas para la alineación de los transductores: (A) Estructura metálica para alineación de transductores V318-SU, y (B) estructura metálica para alineación de transductores V150-RB y V151-RB.

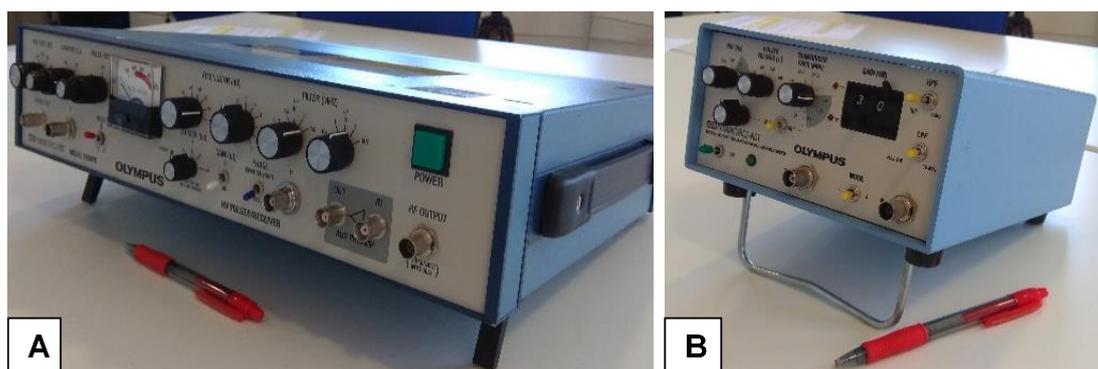


Figura 3.5. Emisores-receptores Panametrics (A) modelo 5058PR y (B) modelo 5077PR.

Por otro lado, para la emisión y recepción de las señales ultrasónicas con el transductor V150-RB, se utilizó el modelo emisor-receptor 5058PR (Figura 3.5A), caracterizado por poder trabajar en los modos pulso-eco y transmisión, proporcionando un pulso cuadrado de disparo de hasta 900 voltios, con un selector de frecuencia de repetición seleccionable entre 20 Hz y 2 kHz. Posee una ganancia de 40 ó 60 dB, disponibles desde el preamplificador auxiliar interno, y una atenuación seleccionable entre 0 y 80 dB con ajustes de sensibilidad de 1 dB. La respuesta de la señal se optimiza con hasta 4 filtros de paso alto y bajo conmutables.

Para la adquisición y digitalización de las señales de los ensayos realizados tanto en leche como durante la maduración de quesos, se utilizó un **osciloscopio** Tektronix TM TDS1012B Wilsonville, OR (Figura 3.6A), con un ancho de banda de 100 MHz, una frecuencia de muestreo de 1GSa/s y una longitud de registro de 2500 puntos.

En cambio, para el control de la calidad de los quesos finales, los pulser-receiver se conectaron a un osciloscopio InfiniiVision DSO-X 3032A de KEYSIGHT (Figura 3.6B), con un ancho de banda de 350MHz, una frecuencia de muestreo de 4 GSa/s y una longitud de registro de 10000 puntos, que almacenaba los datos (formato .csv) de las señales mostradas para su posterior procesamiento y análisis.

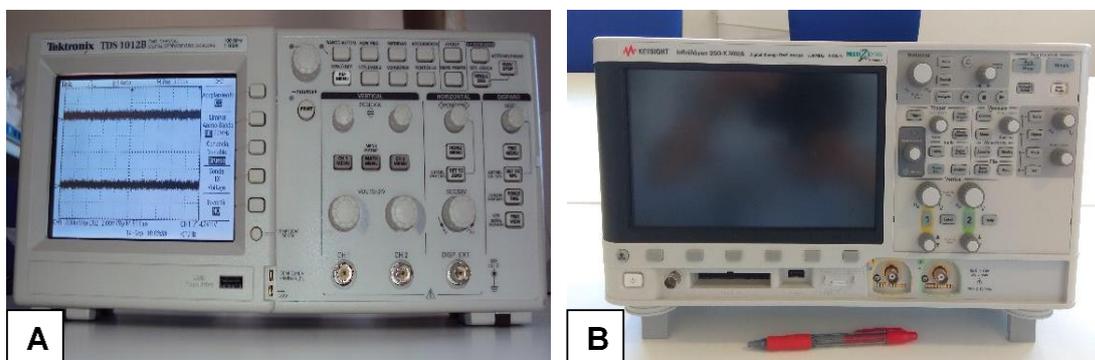


Figura 3.6. (A) Osciloscopio Tektronix TM TDS1012B, y (B) Osciloscopio InfiniiVision DSO-X 3032A de KEYSIGHT.

Tanto para la monitorización de la leche como de los quesos, se utilizó un **ordenador portátil** para el almacenamiento de los datos de las señales mostradas en el osciloscopio.

Para el procesamiento y análisis de las señales almacenadas con el osciloscopio Tektronix se utilizó el paquete de **software Tektronix OpenChoice TDSPCS1**.

3.1.3.3.- Conservación y análisis de las muestras

Las muestras y reactivos que debían ser conservados a temperaturas de refrigeración o congelación se almacenaron en **frigoríficos LIEBHERR mod. LKv 3910** y **congeladores LIEBHERR mod LGex 3410**.

El agua destilada utilizada para la preparación de medios de cultivo y las diferentes determinaciones fue proporcionada por un **sistema de purificación de agua** de la casa comercial Millipore modelo Milli-Q® Direct.

Las frecuentes pesadas realizadas en el desarrollo de este estudio se realizaron en **balanzas** de precisión de la marca comercial COBOS, serie JT mod. JT 3000D precisión 0,1 g, serie CB Complet mod. AJ-420CEN con precisión de 0,01 g y serie AUX COBOS mod. AUX 220D con precisión de 0,001 g.

Para la medición de la altura y diámetro de los quesos se utilizó un **calibre digital RS PRO** de 150mm y precisión 0,03 mm.

Para la medición del pH se utilizó un **pH metro** de electrodo combinado, de la marca CRISON, modelo Basic20 (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

Las centrifugaciones necesarias se realizaron en una **centrifuga refrigerada** de la casa comercial EPPENDORF mod. 5424R. Para la determinación de la grasa se utilizó una **centrifuga Gerber** de la casa comercial Ortoalresa.

Para la preparación de medios de cultivo se utilizaron **agitadores magnéticos** con calefacción de SELECTA, mod. AGIMATIC-N. Los medios de cultivo fueron esterilizados posteriormente, al igual que los materiales de laboratorio y las soluciones en un **autoclave** de SELECTA mod. PRESOCLAVE II 80 a una temperatura de 121°C y 103 kPa de presión durante 16 minutos.

Las condiciones de esterilidad durante el reparto de los medios de cultivo y la siembra en placa Petri se mantuvieron mediante uso de **mecheros Bunsen** de la casa comercial JP Selecta.

Para el homogenizado de las muestras de queso en el análisis microbiano se utilizó el **Stomacher**, Mod. LAB BLENDER 400.

Para la manipulación de líquidos en las diluciones seriadas y medida de volúmenes se utilizaron las **pipetas automáticas** ajustables de 1-10 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL de la marca EPPENDORF. Para agitar y diluir las diferentes soluciones o preparaciones en tubos de ensayo y tubos de centrifuga se utilizaron **agitadores de tubos** HEIDOLPH, Mod. Reax-top.

Las incubaciones de los medios de cultivo sembrados se realizaron en **estufas** de cultivo de 80L de la casa comercial SELECTA.

El recuento de las colonias que se obtuvieron de las siembras de los quesos se realizó en un **contador automático** marca JP SELECTA mod. DIGITAL S.

El recuento de las enterobacterias y levaduras para la preparación del líofilo de los microorganismos utilizados en los quesos con defecto por hinchazón temprana se realizó en **cámara de Neubauer** utilizando un **microscopio óptico** marca comercial Leica mod. DM2000 LED.

Para realizar la digestión de las muestras de proteínas totales se utilizó un digestor de la casa comercial selecta mod. MACRO y la etapa de destilación se realizó en un **destilador Kjeldahl** de la misma casa comercial mod. Pro-Nitro S. El contenido en cenizas se determinó empleando un **horno mufla** de la casa comercial SELECTA modelo SELECT-HORN a 550°C.

En la Figura 3.7 se puede observar el **texturómetro** utilizado para las mediciones de la textura de los quesos, modelo TA.XTA2i (Stable Micro Systems, Godalming, UK) equipado con

celdas de carga de 5 y 30 kg. El equipo disponía de una **sonda esférica de acero inoxidable** (P / 1S) para medida de la firmeza de los quesos (Figura 3.7A), y un accesorio TTC Spreadability Rig (HDP / SR) (Texture Technologies Corp., Hamilton, MA) para la **sonda con capacidad de extender la pasta** del queso (Figura 3.7B). Para el cálculo de los valores obtenidos con el texturómetro, se utilizó el **software Exponent versión 5.0.4.0** (Stable Micro System).

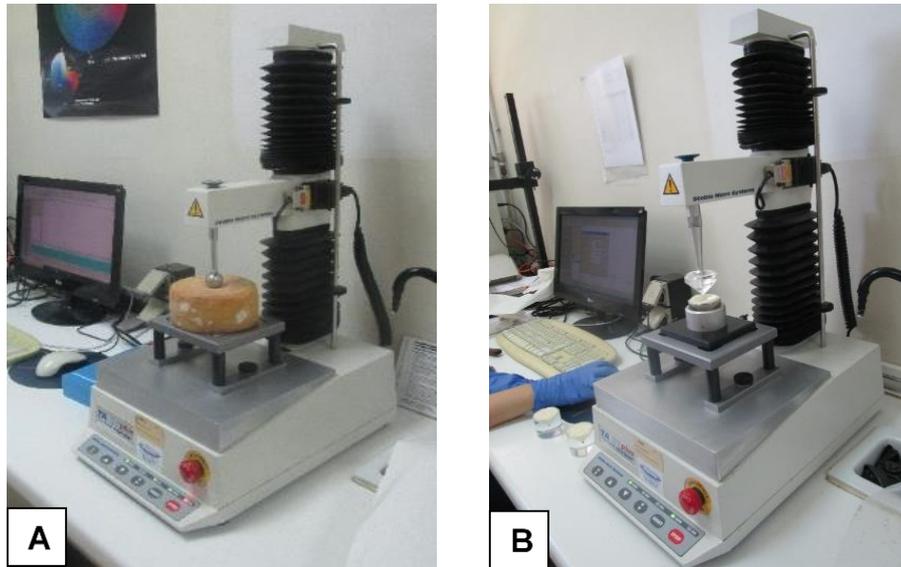


Figura 3.7. (A) Texturómetro modelo TA.XTA2i con sonda esférica de acero inoxidable (P / 1S) para medida de la firmeza de los quesos, y (B) con accesorio TTC Spreadability Rig (HDP / SR) para la sonda con capacidad de extender la pasta del queso.

El análisis sensorial de los quesos se realizó en una **sala de análisis sensorial** acondicionada y con cabinas equipadas con luz blanca.

Además, se utilizó diverso **material de plástico y vidrio** de uso general de laboratorio.

En el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el **programa SPSS versiones 15.0 y 21.0** para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

3.2.- MÉTODOS

3.2.1.-Determinación de los parámetros de ultrasonidos en medio líquido durante la etapa de coagulación de la leche

Las determinaciones ultrasónicas se realizaron mediante **técnicas ultrasónicas de inmersión en modo pulso-eco (PE)**. Para reducir el riesgo de la introducción de errores por parte del operador durante las inspecciones, los transductores de inmersión se montaron en la estructura de metal diseñada para este fin (Figura 3.4A), asegurando así su alineación perfecta, actuando uno de los transductores como un espejo para reflejar las ondas de ultrasonido emitidas por el otro. De este modo, la configuración del equipo para la inspección ultrasónica de las muestras de leche durante la coagulación se muestra en la Figura 3.8 y se compuso del emisor-receptor de señales de ultrasonidos que, transmitidas por los transductores piezoeléctricos y conectado al osciloscopio para adquirir y digitalizar las señales, transfirió los datos de las señales captadas a una computadora portátil donde se almacenaron bajo el control del paquete de software Tektronix OpenChoice TDSPCS1 para su posterior procesamiento y análisis.

Considerando las características de los transductores modelo V318-SU (Tabla 3.1), hay que destacar que, en el presente estudio, la separación entre transductores fue de 3,03 a 3,08 cm para garantizar así la consistencia de las medidas en sentido de que éstas fueron tomadas en campo lejano.

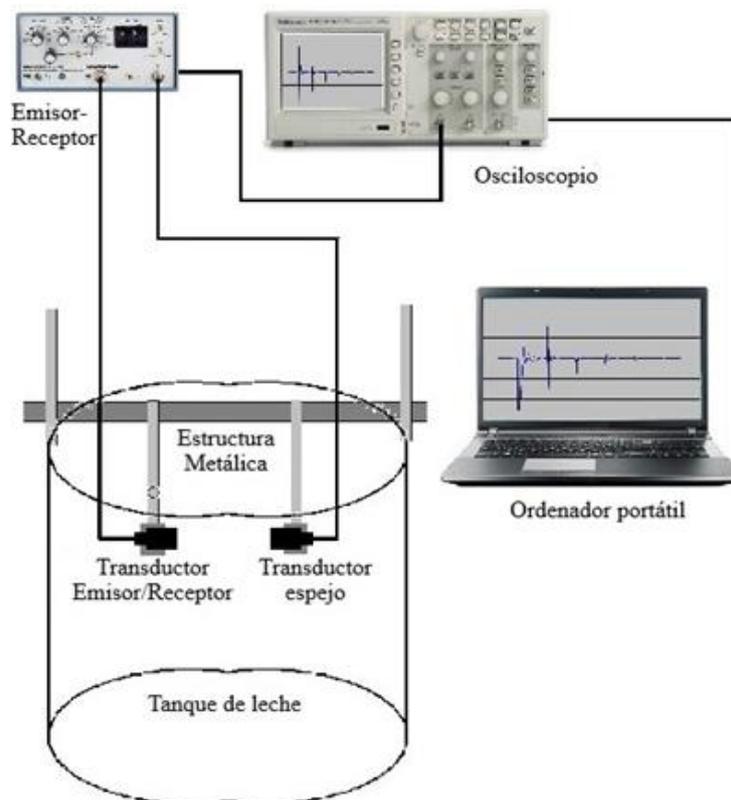


Figura 3.8. Diseño del montaje de los transductores en la estructura metálica y esquema de la configuración utilizada para las mediciones de parámetros ultrasónicos en medio líquido durante la etapa de coagulación.

Los **parámetros de ultrasonidos determinados** fueron:

- Velocidad de pulso ultrasónico UPV (o tiempo de vuelo, TOF)
- Diversos percentiles de la señal recibida en los periodogramas de frecuencia acumulada de la FFT
- Atenuación (α)

La determinación de la **UPV** de las ondas propagándose en las muestras de leche cruda y durante la coagulación se llevó a cabo a través de la señal adquirida por el osciloscopio, denominada A-scan. Un A-scan no es más que la representación de la variación de la amplitud de la señal recibida a lo largo del tiempo. La Figura 3.9 muestra un A-Scan típico obtenido en el osciloscopio, en la que i ecos consecutivos fueron causados por las reflexiones de la señal entre los transductores enfrentados.

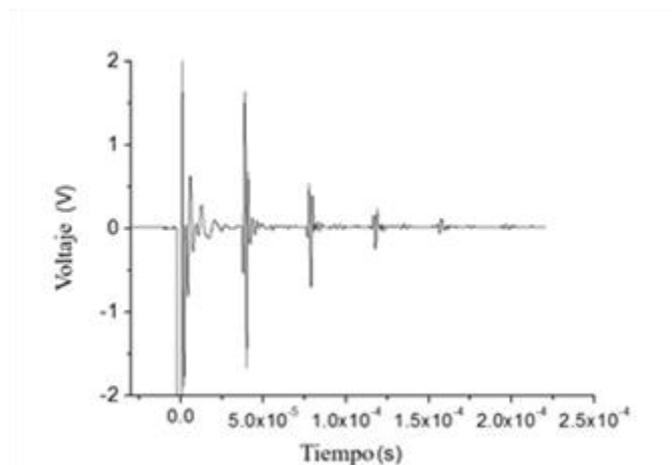


Figura 3.9. Ejemplo de un A-scan típico recibido por el transductor Panametrics V318 con los ecos de la señal de ultrasonido después del pulso de disparo.

En la actualidad, existen dispositivos de procesamiento que calculan rápidamente la FFT de las señales, como en el caso del presente estudio. A modo de ejemplo, la Figura 3.10 muestra la FFT obtenida del A-scan de la Figura 3.9.

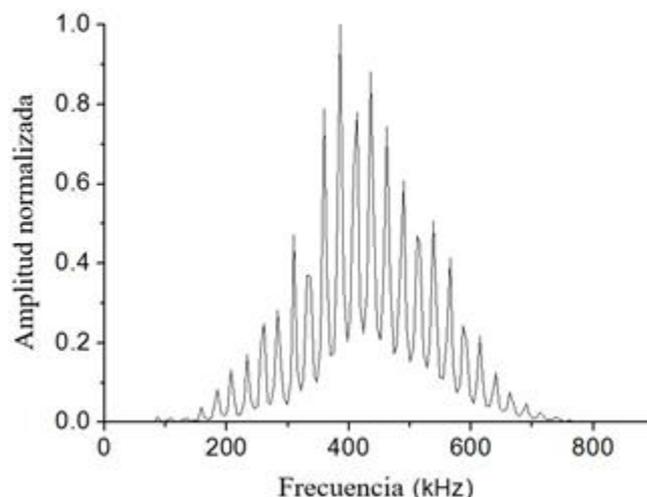


Figura 3.10. FFT de las señales recibidas en la inspección mostrada en la Figura 3.9.

La FFT generada se usa para derivar propiedades adicionales de la señal obtenida. Así, la influencia de una excitación periódica (aquí ecos múltiples) se manifiesta en forma de máximos equidistantes en el espectro.

El tiempo de vuelo (TOF) entre las reflexiones asociadas a estos ecos se obtiene a partir de las distancias de los máximos mediante el método denominado **cepstrum**, que permite volver al dominio del tiempo y así determinar directamente la duración del período (Gudra & Opielinski, 2004). Como se ve en el ejemplo de la Figura 3.11, que muestra el cepstrum creado a partir de la FFT de la Figura 3.10, se lee el período t directamente desde el primer máximo. Obviamente, para tiempos de vuelo equivalentes a $2t$, $3t$, . . . , nt , también deben aparecer otros máximos en el cepstrum. Estos sirven para confirmar la idoneidad del valor asignado a t . A modo de ejemplo, la Figura 3.11 muestra sólo los máximos correspondientes a t y $2t$ porque el intervalo de tiempo seleccionado originalmente en la adquisición del A-scan no permite que el rango en el dominio del tiempo se extienda para mostrar más máximos. Estudios más recientes apoyan la idoneidad de utilizar este método de cálculo de la velocidad de las ondas sonoras frente al cálculo tradicional a partir de los tiempos obtenidos para los ecos consecutivos en el A-scan del receptor (Rufo et al., 2014), o incluso más simplemente, a partir del instante de llegada del primer eco (Avanesians & Momayez, 2015). Esto se debe a que los errores involucrados en un análisis del cepstrum son más pequeños. En el presente estudio en particular, los errores en la determinación de la UPV a partir del cepstrum fueron inferiores al 0,4%.

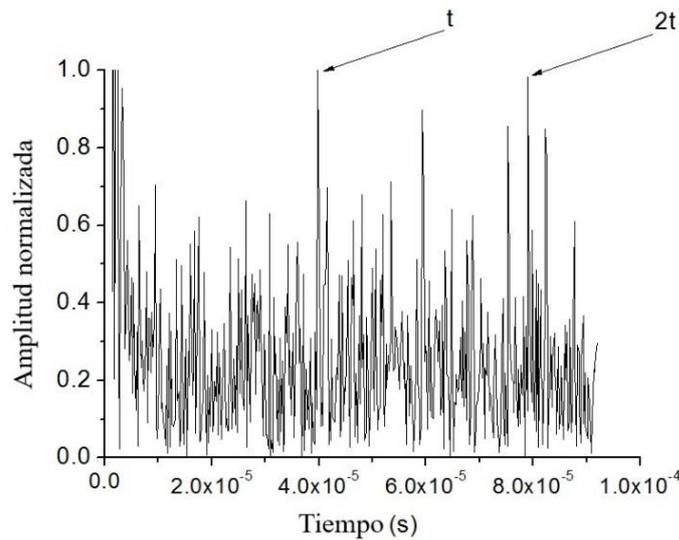


Figura 3.11. Cepstrum correspondiente a la FFT mostrada en la Figura 3.10. Se muestran los momentos t y $2t$ correspondientes a las excitaciones periódicas.

Dado que los transductores están separados por una distancia conocida d , los métodos de evaluación espectral proporcionan una medida de la UPV a partir de la ecuación 4.

$$UPV = \frac{2d}{TOF} \quad (4)$$

Otros parámetros considerados en este estudio fueron los relacionados con la **FFT de las señales A-scan**. Es importante señalar que, en lugar de considerar la frecuencia nominal de los transductores, es más preciso tomar las frecuencias reales de propagación de ondas dentro de las muestras de leche, es decir, utilizar la FFT. En primer lugar, tomando como ejemplo la Figura 3.10, se puede observar que las distribuciones de frecuencia no se acercan en absoluto a la Gaussiana, de modo que el valor de la mayor amplitud de la FFT no es a priori un valor significativo con el que caracterizar la muestra de leche a inspeccionar. Y, en segundo lugar, aunque el transductor tiene una frecuencia central de 500 kHz y un ancho de banda a -6 dB del 61,93%, la FFT obtenida no tiene una amplitud máxima en esa frecuencia, sino en otras claramente inferiores. Es por ello que, para facilitar el posterior análisis de correlación entre la FFT y el resto de los parámetros, también se obtuvieron los periodogramas de frecuencias acumuladas, mostrando los percentiles 25, 50, 75 y 99 de las frecuencias de las señales recibidas. Así, y a modo de ejemplo, si el percentil 75 de la frecuencia acumulada está en x Hz para una inspección en particular, esto significa que el 75% de las señales recibidas tenían frecuencias por debajo de x Hz. De esta forma, la Figura 3.12 muestra el periodograma de frecuencia acumulada creado a partir de la FFT de la Figura 3.10. Así, de cada A-scan y los subsiguientes FFT y periodograma de frecuencia, se obtienen los valores de la frecuencia

central y los diferentes percentiles de las señales recibidas (<FFT>, <FFT₂₅>, <FFT₅₀>, <FFT₇₅> y <FFT₉₉>).

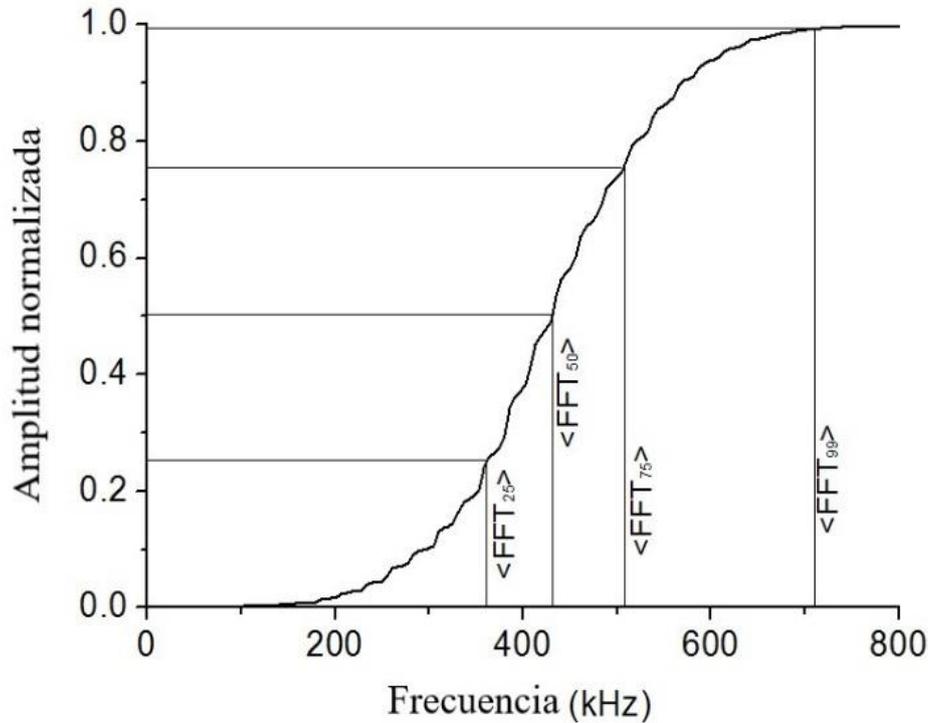


Figura 3.12. Periodograma de la frecuencia acumulada de la FFT mostrada en la Figura 3.10. Se indican los percentiles de las frecuencias 25%, 50%, 75% y 99%.

Otro parámetro considerado fue la **atenuación del pulso ultrasónico**, que representa la medida de la pérdida de energía progresiva que sufren las señales a medida que se propagan a través del material. Esta pérdida se debe principalmente a dos mecanismos: absorción de energía (sobre todo, efectos termoelásticos) y dispersión (múltiples reflexiones en las discontinuidades del material) (Cerrillo et al., 2014). La atenuación generalmente se mide a partir de los ecos observados en el A-scan que se originan a partir de reflexiones en el material. Por lo tanto, el coeficiente de atenuación α (en neper/m) se calculó a partir de la expresión mostrada en la ecuación 5:

$$\alpha = \frac{1}{s} \ln \left(\frac{A_i}{A_j} \right) \quad (5)$$

donde A_i y A_j son las amplitudes (pico a pico) de los ecos i y j , respectivamente, y s representa la distancia recorrida por la onda de ultrasonido entre ellos. Se consideraron tres de cuatro ecos y se determinó α a partir de la pendiente de la gráfica de $\ln(A_i/A_j)$ frente a s (Jiménez et al., 2010; Koc & Ozer, 2008).

3.2.2.- Determinación de parámetros ultrasónicos en queso durante la etapa de maduración y producto final

Los quesos (quesos en proceso de maduración con defectos y producto final comercial) se inspeccionaron a una temperatura de 5°C mediante ultrasonidos empleando técnicas de contacto en modo transmisión, en las que, para reducir el riesgo de la introducción de errores por parte del operador durante las inspecciones, los transductores se montaron en una estructura de metal de diseño personalizado que aseguraba su alineación perfecta al enfrentarse (Figura 3.13).

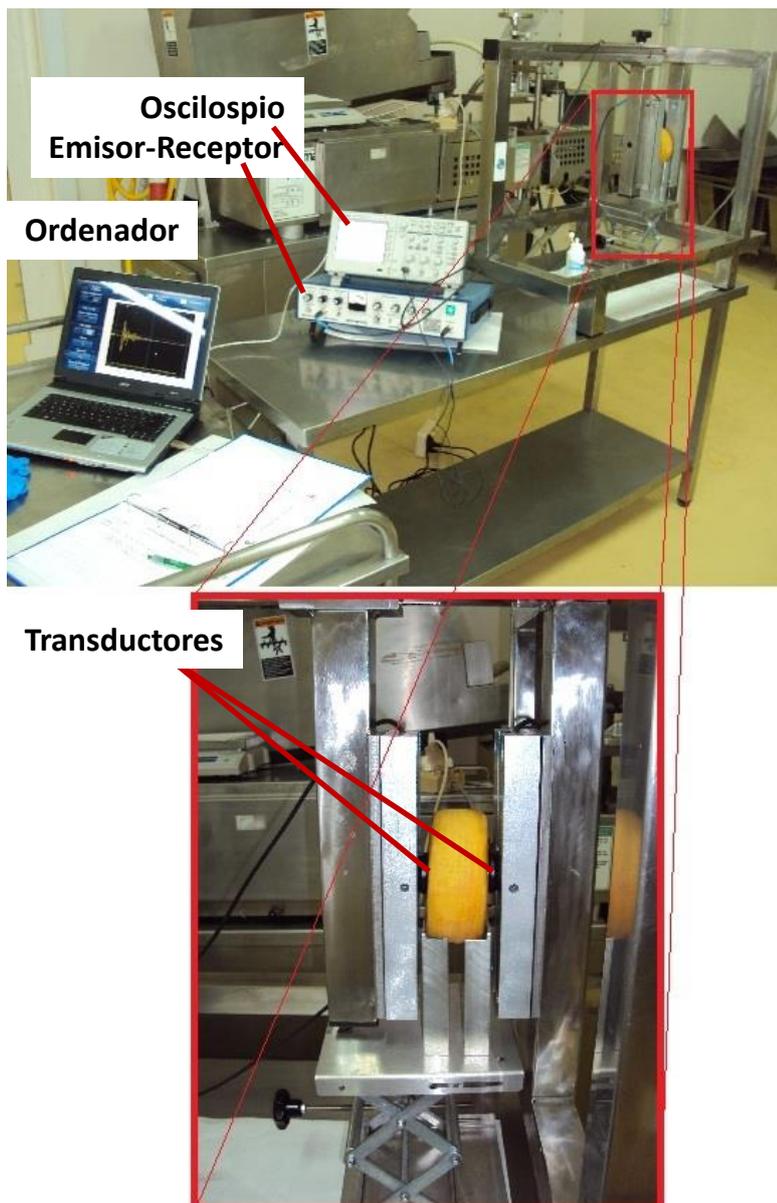


Figura 3.13. Estructura metálica diseñada para garantizar la alineación de los transductores cara a cara en el queso y configuración utilizada para la inspección por ultrasonido de los quesos.

Los valores de **velocidad transversal (UPV_s)** obtenidos con los respectivos transductores se calcularon en base al lapso de tiempo desde la emisión de la señal hasta su recepción (TOF_s). A partir de la distancia conocida (d) se determinó la velocidad: $UPV_s=d/TOF_s$.

Además, los transductores de ondas transversales generan también ondas longitudinales a partir del denominado modo conversión en la interfase de separación emisor-Torta. Estas ondas longitudinales son también captadas por el transductor receptor. Por lo tanto, también se obtuvieron valores de **velocidad longitudinal (UPVL)** de estas ondas longitudinales. La Figura 3.14 muestra un A-scan típico obtenido con uno de los transductores de ondas transversales.

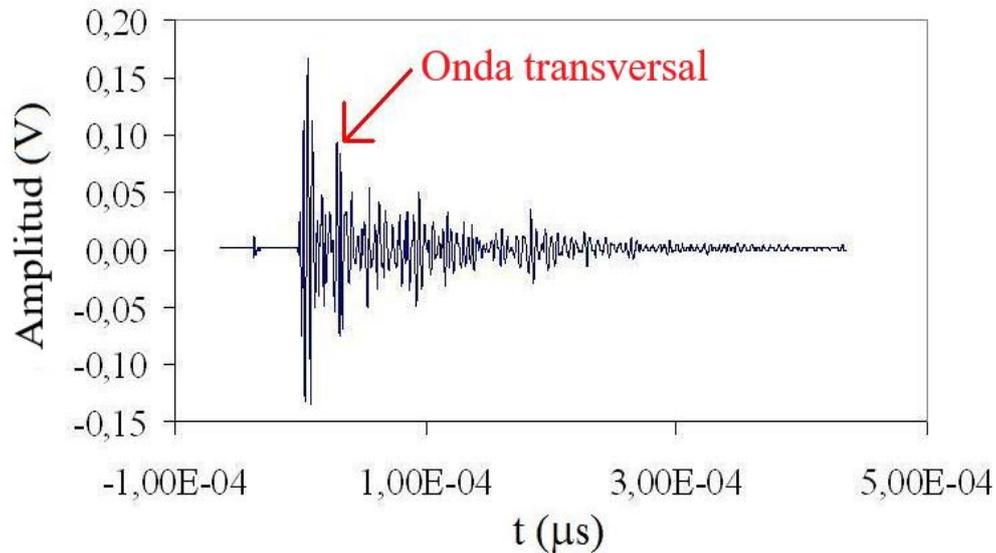


Figura 3.14. A-scan típico (amplitud vs. tiempo, t) obtenido con uno de los transductores de onda transversal.

A partir de UPV_t , UPV_s , y las densidades aparentes o pesos específicos (ρ) de cada muestra, se calcularon las **constantes elásticas mostradas** en la Tabla 3.2 para cada pieza de queso, según las expresiones establecidas por la American Society for Testing and Materials (2008) en el protocolo ASTM D2845- 08.

A partir de las señales recibidas en los periodogramas de frecuencia acumulada de la FFT, se obtuvieron las **frecuencias de la transformada rápida de Fourier (FFT)** correspondientes a los percentiles 25, 50, 75 y 99 (indicados respectivamente como FFT25, FFT50, FFT75 y FFT99) cuyos procedimientos de obtención, se han descrito con anterioridad en el apartado 3.2.1.

Tabla 3.2. Parámetros ultrasónicos relacionados con la velocidad.

Parámetros	Ecuaciones	
UPV_S^1	d/TOF_S	d : distancia entre transductores TOF _S : tiempo de vuelo de la onda transversal
UPV_L^2	d/TOF_L	TOF _L : tiempo de vuelo de la onda longitudinal
Módulo de Young (E):	$E = \frac{\rho \cdot UPV_S^2 \cdot (3UPV_L^2 - 4UPV_S^2)}{UPV_L^2 - UPV_S^2}$	ρ : peso específico
Módulo transversal o de corte (μ):	$\mu = \rho \cdot UPV_S^2$	
Módulo volumétrico (k):	$k = \frac{\rho \cdot (3UPV_L^2 - 4UPV_S^2)}{3}$	
Constante de Lamé (λ):	$\lambda = \rho \cdot (UPV_L^2 - 2UPV_S^2)$	
Coefficiente de Poisson (ν):	$\nu = \frac{(UPV_L^2 - 2UPV_S^2)}{2 \cdot (UPV_L^2 - UPV_S^2)}$	

¹Velocidad ultrasónica transversal.

²velocidad ultrasónica longitudinal.

En cambio, como no se aprecian los ecos en la señal recibida en las tortas, para la determinación de la **atenuación** (expresado como AT 10, AT 20, AT 30, AT 40, AT 50, AT 60, AT 70, AT 80 y AT 90), en lugar de llevarse a cabo el cálculo como Neper/m como en la leche, se midió en este caso como el tiempo necesario para recibir la energía (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90%, respectivamente, del total de energía recibida), expresado como múltiplo del TOF, siguiendo la metodología probada por otros investigadores cuando no se perciben los ecos en la señal (Cerrillo et al., 2014), que tienen también en cuenta el efecto combinado de la absorción y dispersión de la energía que sucede durante la transmisión de la señal en las muestras inspeccionadas.

En la Figura 3.15 se muestra un ejemplo de curva de atenuación obtenida a partir del A-Scan de una de las tortas medidas. Como se observa, la atenuación se mide desde el instante en que la señal llega al receptor ($t=1$) hasta su total atenuación, omitiendo así el pulso de disparo.

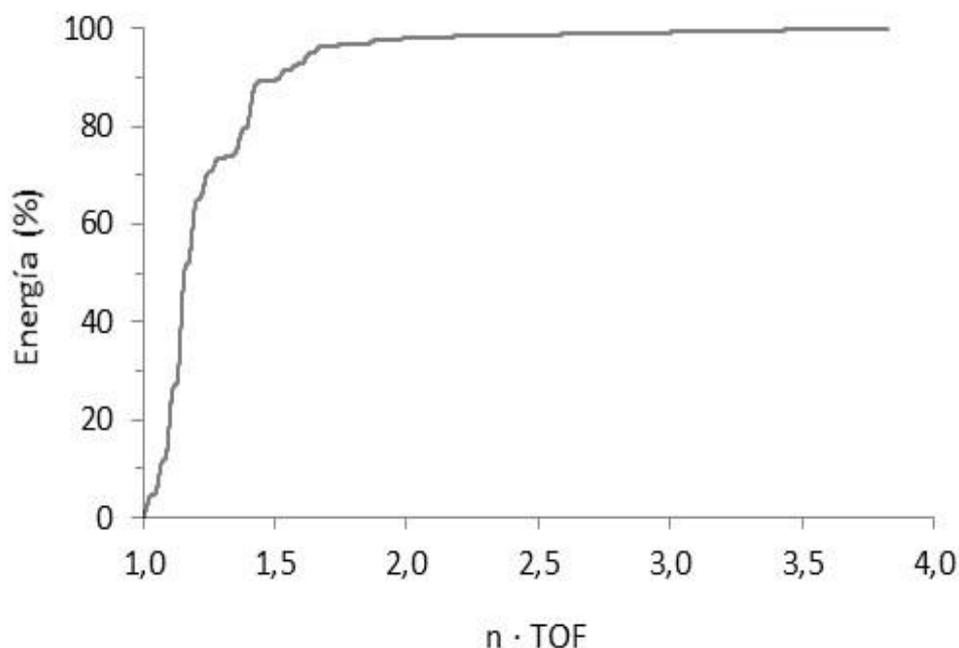


Figura 3.15. Curva de atenuación obtenida del A-Scan de una de las tortas medidas.

Ambos parámetros se determinaron a lo largo del centro de las caras opuestas de las muestras para cada una de las frecuencias de inspección seleccionadas.

3.2.3.- Elaboración de los quesos Torta del Casar

Con el objetivo de establecer los parámetros de ultrasonidos que pueden ser útiles para **discriminar los defectos** en la Torta del Casar durante la maduración, se elaboraron quesos con diferentes defectos que aparecen durante su maduración.

Los quesos fueron elaborados en **la planta piloto del CTAEX** utilizando leche cruda de oveja obtenida de la Entrefina.

A la llegada de la **leche** a la quesería piloto, se filtró y calentó en una cuba de acero inoxidable de unos 100 L de 28 a 30 °C, procediéndose a la coagulación mediante la agregación de 10 mL de extracto acuoso, obtenido de flores del cardo *Cynara cardunculus* L., por litro de leche. El coagulante fue preparado mediante la maceración de 50 g de flores secas de *Cynara cardunculus* L. en 1 L de agua durante 24 h a temperatura ambiente.

Una vez formada la **cuajada**, se rompió a una temperatura de 30 °C hasta alcanzar trozos del tamaño de un grano de arroz utilizando liras que disponen de unos finos hilos metálicos mediante agitación durante 10 minutos, seguido de 10 minutos de reposo y nuevamente 10 minutos de agitación mediante palas de acero inoxidable.

Una vez realizado el **desuerado**, la cuajada se transfirió a moldes adecuados con paños y se prensó durante 2 horas a una presión inicial de 2 kg/cm², que se incrementó en 0,5 kg/cm² cada 30 minutos. Una vez prensado, el queso se sumergió en salmuera (16% NaCl, p/v) durante 4 horas.

La **maduración** se llevó a cabo en cámaras a temperaturas controladas entre 5 y 7 °C y una humedad relativa superior al 90% durante 70 días.

Se realizaron **cuatro elaboraciones diferentes: Lote estándar (ST), Lote 1 de defecto de prensado (PD1), Lote 2 de defectos de textura (PD2) y Lote de defectos microbianos (MD)**. En cada una de las elaboraciones con defecto se introdujo una modificación específica durante el proceso de elaboración del queso que se detallan en el apartado de diseño experimental del **Capítulo II**.

3.2.4.-Determinación de parámetros fisicoquímicos en leche durante su coagulación y en queso

La **materia seca** fue determinada en leche y queso mediante deshidratación en estufa a 104°C hasta pesada constante siguiendo el método 5534: 2004 (ISO, 2004).

La **cantidad de grasa** en la leche se realizó mediante el método Gerber (ISO 2446:2008 (IDF 226: 2008a) y en queso mediante el método Van Gulik (3433: 2008 (ISO, 2008b)).

La cantidad de **proteína** en leche y queso se realizó mediante el método estándar 8968-1: 2014 (ISO, 2014).

El contenido de **cenizas** en queso se determinó mediante incineración en un horno mufla a 550 °C (AOAC International, 2000),

Las determinaciones del **pH** en leche y queso se realizaron mediante un pH-metro. En la leche la medición se realizó directamente hasta su estabilidad, mientras que en queso se realizó en un homogenizado de 2 g de queso en 20 mL de agua destilada.

La determinación del **contenido en NaCl** del queso mediante conductimetría (ISO, 2006a) en los servicios de apoyo a la investigación de la Universidad de Extremadura.

La cuantificación de la **lactosa en leche** se realizó gravimétricamente siguiendo la Norma Internacional FIL-IDF 28: 1967.

La determinación de **densidad en la leche** se realizó con lactodensímetro (AOAC 925.22, 1990). En el queso la densidad fue calculada determinando la altura y diámetro con un calibre asumiendo su geometría cilíndrica y el peso en una balanza de precisión.

La determinación de la **acidez total** en el queso fue realizada siguiendo el método descrito por Dugat-Bony et al. (2015). Para ello realizó una valoración ácido-base, utilizando KOH 0,025N como agente valorador hasta alcanzar un viraje de color, fenolftaleína al 1%, como indicador de pH, éste fue añadido con anterioridad a la muestra. Para la realización de la valoración ácido-base, se pesaron 2,5 gramos de muestra aproximadamente en un vaso de precipitado a los que se le añadió 50 mL de una mezcla etanol-etil éter (1:1) neutralizada y 3-4 gotas del indicador, fenolftaleína al 1%. Posteriormente, con la ayuda de una bureta que contenía la disolución de KOH 0,025N, se fue añadiendo dicha disolución gota a gota a la muestra que se encontraba en constante movimiento en un agitador magnético. La titulación se realizó hasta el viraje del color de la muestra. Cada muestra se realizó por triplicado. El resultado se expresó en mg KOH/100g de queso.

3.2.5.-Determinación de parámetros de textura en queso

La textura de los quesos (firmeza) durante la maduración y producto final se evaluó a través de un **análisis de compresión** (TCA). Para ello se utilizó un analizador de textura TA.XTplus, equipado con una célula de carga de 30 kg (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido) y una sonda esférica de acero inoxidable (P/1S). Para este fin, los quesos se retiraron del almacenamiento en frío a 5 °C, se colocaron debajo de la sonda, y se midieron en ambos lados (superior e inferior). Los parámetros de operación fueron los siguientes:

- Velocidad previa a la prueba, 3 mm/s
- Velocidad de prueba, 2,00 mm/s
- Velocidad posterior a la prueba, 10,00 mm/s
- Distancia, 10,0 mm
- Fuerza de disparo, 25 g.

A partir de los gráficos resultantes, se analizaron los valores de firmeza y pegajosidad del queso utilizando el software instalado Exponent versión 3.0.5.0 (<http://www.stablemicrosystems.com/>).

Además, se llevó a cabo un análisis de textura de la **untuosidad** con el mismo instrumento equipado con una célula de carga de 5 kg. El análisis se realizó después de aproximadamente 4 semanas de maduración, momento en el que la Torta del Casar había adquirido una apariencia cremosa, y en el producto final utilizando un accesorio TTC Spreadability Rig (HDP / SR) (Texture Technologies Corp., Hamilton, MA) para la sonda con capacidad de extender la pasta del queso. Las muestras se situaron rellenando el cono inferior mediante el uso de una espátula y se midieron a 20°C. Los parámetros de operación fueron los siguientes:

- Velocidad previa a la prueba, 3 mm / s
- Velocidad de prueba, 2,00 mm / s

- Velocidad posterior a la prueba, 10,00 mm / s
- Distancia, 10,0 mm
- Fuerza de disparo, 25 g.

A partir de los gráficos resultantes, la fuerza máxima (el punto en el que la sonda estaba en su profundidad máxima de penetración) se calculó utilizando el software instalado Exponent versión 3.0.5.0 y se describió como untuosidad.

3.2.6.-Determinación de parámetros microbiológicos en queso

El análisis microbiológico de los diferentes grupos microbianos de las muestras de queso con defectos durante la maduración y del producto final procedente de las industrias se realizó el mismo día en que se tomaron las muestras. El procedimiento para el análisis microbiológico de los diferentes quesos se realizó tomando de forma aséptica aproximadamente 10 gramos de queso que se diluyó con agua de peptona 0,1% (p/v) en una dilución 1:10 en una bolsa Stomacher. Tras homogeneizar la mezcla, se procedió a hacer diluciones decimales seriadas con agua de peptona 0,1% en tubos de 9 mL. Los tubos de las diluciones se homogeneizaron mediante agitación en Vortex. A continuación, se sembraron 0,1 mL de cada dilución en superficie de los siguientes medios de cultivo:

- Agar de recuento en placa (PCA, Condalab; 30 °C/24 h) para el recuento de **bacterias aerobias mesófilas (BAM)**.
- Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS; Condalab) acidificado a pH 5,6 con ácido acético (10%) para bacterias **ácido-lácticas mesófilas (BALM)** y **termófilas (BALT)** después de incubación a 30 °C y 42 °C durante 48 h, respectivamente. En los quesos con defectos solo se hizo recuento de MLAB.
- Slanetz y Bartley (SB, Condalab; 37°C/48 h) para **enterococos**.
- Agar Baird-Parker (BP, Condalab; 37°C/48 h) suplementado con telurito de potasio y emulsión de yema de huevo (Condalab) para **cocos Gram positivo catalasa positivo (CGPCP)**.
- Agar Rojo Violeta Bilis Glucosa (VRBG, Condalab; 30°C/24 h) para **enterobacterias**. Este grupo microbiano se evaluó en los quesos con defectos durante su maduración (Capítulo II) y en los quesos finales (Capítulo III).
- Agar Rojo Violeta Bilis Lactosa (VRBA, Condalab; 37°C / 24h) para **coliformes**.
- Agar cromogénico triptona bilis X-glucurónido (TBX, Condalab; 44°C/24 h) para ***Escherichia coli***.
- Agar Patata Dextrosa (PDA, Condalab; 25 °C/4 días) acidificado a pH 3,5 con una solución esterilizada de ácido tartárico (10%) para **levaduras** y **mohos**. El agar PDA acidificado fue utilizado en el recuento de los quesos finales de las industrias (Capítulo III). Por otro lado, en los quesos con defectos, el recuento de levaduras durante la maduración se realizó con agar oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura (Oxoid) a 25 °C durante 5 días (Capítulo II).

En los quesos con defectos solo se evaluaron las BALM, enterobacterias y levaduras, mientras que en los quesos finales de las industrias se analizaron todos los grupos microbianos.

Las placas de medios de cultivo que presentaban entre 30 y 300 colonias se utilizaron para el recuento de los diferentes microorganismos estudiados. El análisis microbiológico fue realizado por duplicado en tres quesos diferentes. Los resultados obtenidos se expresaron en logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramos de muestra (**log ufc/g**).

3.2.7.-Determinación de parámetros sensoriales en queso

Para evaluar la calidad sensorial de los quesos de pasta blanda procedentes de las industrias participantes en el estudio, se realizó un **análisis descriptivo** por un panel de veinte panelistas de acuerdo con los métodos estándar internacionales, los cuales fueron previamente seleccionados y capacitados bajo las normas de la Organización Internacional de Normalización (ISO, 2006b; UNE-ISO 4121: 2006) con muestras comerciales de queso de pasta blanda de leche cruda de oveja de ambas DOP.

Las sesiones de análisis sensorial se llevaron a cabo en una sala de cata acondicionada a 20-22°C, 60-70% de humedad relativa y cabinas equipadas con luz blanca (6000 K). La sala se encuentra situada en la planta piloto de la Escuela de Ingenierías Agrarias de Badajoz (Universidad de Extremadura - UEX).

Para llevar a cabo el análisis sensorial, los quesos se atemperaron previamente a temperatura ambiente, presentándose individualmente a cada panelista una porción de aproximadamente 10 g de cada queso en un plato de plástico para su degustación. Las muestras se codificaron con 3 dígitos y el orden de presentación fue aleatorio, suministrándose junto a éstas agua mineral y pan para la limpieza.

En cada sesión, solo se evaluaron tres muestras de queso diferentes. El análisis consistió en la evaluación de once atributos sensoriales relacionados con el color de la pasta y la corteza (de amarillo claro a amarillo oscuro), textura (firmeza y cremosidad), sabor (salado, ácido, amargo y astringente), sensación picante y sabor (intensidad, persistencia y rancidez). Fueron cuantitativos mediante una escala estructurada numérica de puntuación de 0 (baja intensidad) a 9 (alta intensidad). Se llevaron a cabo dos repeticiones de análisis sensorial en cada muestra, determinándose por parte del panelista la respuesta a cada atributo como el valor medio de sus puntuaciones.

Por último, además de la evaluación descriptiva descrita, un panel de 50 consumidores no entrenados evaluó las muestras para determinar la **aceptabilidad general**.

CAPÍTULO I

4. CAPÍTULO I: Contribuciones a la monitorización por ultrasonidos del proceso de cuajado de la leche

4.1. Diseño experimental

La monitorización del proceso de coagulación de la leche cruda de oveja durante la elaboración de queso tipo Torta del Casar se realizó con el objetivo de verificar a nivel industrial, la utilidad de los métodos de ultrasonidos para controlar los cambios en las propiedades físico-mecánicas durante la coagulación de la leche cruda de oveja con coagulante vegetal obtenido de la flor del cardo *Cynara cardunculus* L., incluida la estimación del tiempo de corte.

La determinación de los parámetros ultrasónicos se realizó en **4 muestras de leche** cruda de oveja de volúmenes comprendidos entre los 49 y 52 L (Tabla 4.1) y recolectadas de un centro de procesamiento de lácteos local (Hnos. Pajuelo SAT) en diferentes meses. Las muestras se usaron tanto para la caracterización de la leche cruda, como para el proceso de coagulación.

Para el **proceso de cuajado**, todos los experimentos se realizaron en un entorno del sector lácteo a escala industrial, basándose en el juicio subjetivo de un maestro quesero. Para ello, se siguió el procedimiento general de elaboración artesanal descrito en el Reglamento de la DOP “Torta del Casar” (Reglamento (CE) 1491/2003 de la Comisión Europea y modificado por el Reglamento de ejecución (U.E.) 2196/2015) (Figura 4.1). En particular, el proceso de cuajado se llevó a cabo en una cuba de acero inoxidable de unos 100 L de capacidad con dos ejes, uno en sentido horario y otro en sentido antihorario, y de tipo bicircular, de tal modo que cuando la leche alcanza los 28–32 °C se agregó coagulante vegetal. El coagulante fue obtenido mediante la infusión de los pistilos de las flores del cardo (*Cynara cardunculus* L.) en agua. Cuando la cuajada se formó (**tiempo de corte**), se rompió en trozos del tamaño de un grano de arroz utilizando finos hilos metálicos. El tiempo de corte de referencia fue estimado de **manera subjetiva** por el maestro quesero.

Las **inspecciones ultrasónicas** de cada una de las muestras de leche cruda comenzaron justo antes de la adición del coagulante vegetal y continuaron hasta el momento del corte de la cuajada. El número de inspecciones ultrasónicas llevadas a cabo por cada muestra de leche desde la adición del coagulante hasta el momento del corte se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Información sobre las muestras de leche usadas en el proceso de cuajado.

	Muestras de leche cruda de oveja ¹			
	M1	M2	M3	M4
Volumen (L)	49	49	52	50
Tiempo (min) ²	90	65	62	62
Nº de inspecciones ³	14	15	15	15

¹M1: Muestra de septiembre; M2: Muestra de noviembre; M3 Muestra de diciembre; M4: Muestra de enero.²Desde adición coagulante hasta corte. ³Inspecciones ultrasónicas desde adición coagulante hasta corte.



Figura 4.1. Diagrama de flujo del proceso de cuajado del queso utilizado en el estudio.

4.2. Análisis estadístico de los datos

Se determinaron los **estadísticos descriptivos** de los parámetros fisicoquímicos y de ultrasonidos de la leche; así como la relación entre los diferentes parámetros de ultrasonidos entre sí y con los parámetros fisicoquímicos de la leche durante el proceso de coagulación mediante el procedimiento de correlaciones bivariadas para el cálculo del coeficiente de **correlación de Pearson y su significancia**.

4.3. Parámetros fisicoquímicos y ultrasónicos de las muestras de leche cruda

Los **parámetros fisicoquímicos y ultrasónicos** de las muestras de leche cruda de oveja se muestran en la Tabla 4.2. Los parámetros de ultrasonido se midieron inmediatamente antes de la adición del coagulante vegetal. Aunque, en leche de oveja cruda no existen en la literatura datos con los que contrastar estos resultados, los resultados obtenidos son consistentes con los reportados para otros tipos de leche. En particular, Gunasekaran (1996) notifican valores de velocidad en leche desnatada que oscilan entre 1385 m/s a 1420 m/s y entre 19 Np/m a 25 Np/m a una frecuencia de inspección de 1 MHz. Taifi et al. (2006) mostraron valores de leche reconstituida de 1514 m/s y 20 Np/m con transductores de 5 MHz. Finalmente, Koc et al. (2008) reportaron valores de atenuación de la leche de vaca en el rango de 12-40 Np/m con un transductor de 1 MHz a temperaturas en el rango de 28-34 °C. Las **diferencias en los valores de estos parámetros de ultrasonido** pueden deberse a las **diferentes composiciones de las muestras de leche**. En este estudio, las **muestras de leche cruda** inspeccionadas se adquirieron en cuatro fechas que abarcan un período de 114 días. Del mismo modo, las temperaturas de inspección por ultrasonido fueron ligeramente diferentes debido a que los experimentos se llevaron a cabo en un entorno de la industria láctea, confiando en el **juicio subjetivo de un maestro quesero** para controlar el proceso de cuajado y el momento de corte de la cuajada. La evaluación de leches obtenidas en diferentes tiempos podría explicar porque no se observó un aumento en la velocidad de propagación de las ondas ultrasónicas con el aumento de temperatura, tal como ha sido indicado por diversos estudios previos en la literatura (Nassar et al., 2004; Elvira et al., 2006).

Con respecto a los **resultados de FFT**, las frecuencias de las ondas de ultrasonido que se propagan a través de las muestras de leche cruda fueron generalmente menores o iguales que la frecuencia nominal del transductor. La Figura 4.2 muestra los periodogramas de frecuencia acumulada correspondientes a las cuatro muestras de leche cruda. Como puede observarse, el 40% de los componentes frecuenciales en la inspección de la muestra M1 estaban por encima de 500 kHz, pero esta proporción cayó incluso por debajo del 20% para la muestra M2. **Para algunos percentiles entre el 45 y el 90 aproximadamente, las frecuencias acumuladas pueden diferir de una muestra a otra**. El coeficiente de correlación lineal entre los dos parámetros FFT_{75} y FFT_{50} fue superior a 0,99. Sin embargo, por debajo del percentil 45, las frecuencias acumuladas están más próximas entre sí y es difícil distinguir

claramente qué muestra de leche se ha inspeccionado. Por encima del percentil 90, la planitud de la curva indica que el error asociado con la frecuencia acumulada es mayor.

Tabla 4.2. Parámetros fisicoquímicos y de ultrasonidos en las muestras de leche estudiadas.

Parámetros	Muestras de leche			
	M1	M2	M3	M4
Parámetros fisicoquímicos				
Materia seca (%)	18,84	18,17	20,6	18,8
Densidad (kg/l)	1,03	1,03	1,03	1,02
Proteínas (%)	3,03	4,59	3,7	4,47
Grasa (%)	7,4	7,0	8,8	8,5
Lactosa (g/l)	41,96	40,18	17,04	21,43
Temperatura (°C)	32,0	31,2	31,1	33,6
pH	6,55	6,57	6,58	6,57
Parámetros de ultrasonidos¹				
UPV ¹ (m/s)	1514±5	1380±5	1449±5	1434±5
FFT (kHz)	446±5	417±6	433±5	434±5
FFT ₂₅ (kHz)	419±5	383±6	392±5	400±5
FFT ₅₀ (kHz)	479±5	428±6	458±5	445±5
FFT ₇₅ (kHz)	550±5	489±6	530±5	505±5
FFT ₉₉ (kHz)	1100±400	1010±240	1100±300	900±300
α (Np/m)	28,2±0,9	30,0±0,4	26,42±0,11	25,7±0,4

¹UPV: velocidad de propagación; FFT: frecuencia central de la Transformada de Fourier; FFT₂₅: frecuencia del percentil 25 de la Transformada de Fourier; FFT₅₀: frecuencia del percentil 50 de la Transformada de Fourier; FFT₇₅: frecuencia del percentil 75 de la Transformada de Fourier; FFT₉₉: frecuencia del percentil 99 de la Transformada de Fourier; α: atenuación

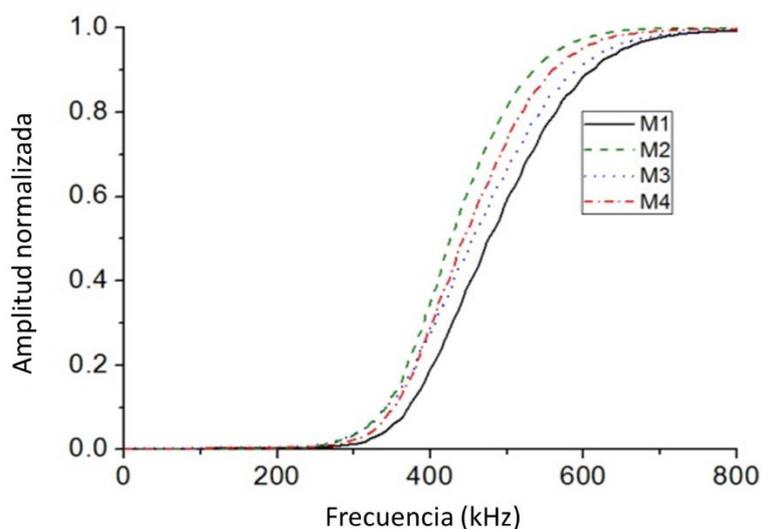


Figura 4.2. Periodograma de frecuencia acumulada correspondiente a las cuatro muestras de leche cruda.

Las muestras con las **velocidades más altas** coincidieron con aquellas con las **frecuencias de FFT más altas**, como es evidente en la gráfica definida por FFT_{50} y UPV (Figura 4.3). Entre las dos, existe una relación lineal estadísticamente significativa ($P < 0,05$) con una pendiente positiva.

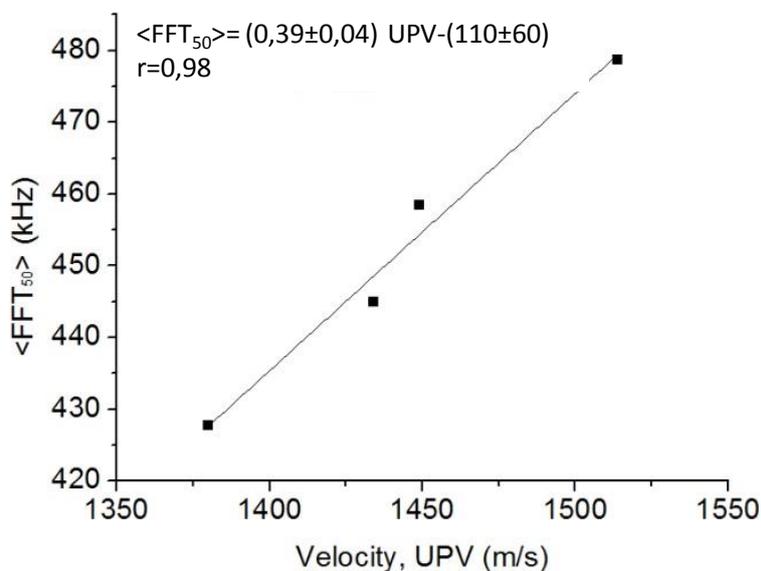


Figura 4.3. Regresión lineal entre la velocidad (UPV) y los valores de la FFT correspondientes al percentil 50 (FFT_{50}) para el conjunto de muestras de leche estudiadas.

4.4. Monitorización del proceso de coagulación

La **evolución del pH y la temperatura** de las muestras monitoreadas durante el cuajado no mostró **ninguna tendencia consistente**. Los dos parámetros variaron ligeramente durante todo el proceso. En particular, el pH varió entre 6,49 y 6,59 en todos los procesos de cuajado. Los rangos de temperatura en los que se realizaron los procesos fueron [32.0-33.1] °C, [31.2-32.0] °C, [31.1-34.5] °C y [33.5-35.2] °C para las muestras M1, M2, M3, y M4, respectivamente.

La Figura 4.4 muestra las **variaciones relativas en el TOF** (calculado con respecto al TOF inicial) de las ondas de ultrasonido durante el cuajado de las muestras de leche. De forma similar, la Figura 4.5 muestra la **evolución de la atenuación** de las ondas ultrasónicas durante el cuajado y la Figura 4.6 la **evolución de FFT_{75}** (el comportamiento de FFT_{50} fue muy similar). Como se observa en todos estos gráficos, los cambios en los parámetros de ultrasonido ocurren en dos pasos. En el **primero, se observa una rápida disminución inicial del TOF (que implica un aumento de la UPV), atenuación y frecuencia** de las ondas ultrasónicas transmitidas hasta alcanzar respectivas regiones de cierta estabilidad que, sin embargo, no pueden catalogarse como mínimos dados los errores asociados con las mediciones. La

segunda fase de aparente estabilidad permanece hasta el final del proceso de monitorización. Las **dos fases del proceso casi coinciden en el tiempo independientemente del parámetro que se esté analizando**. Estos cambios en los parámetros de ultrasonido deben interpretarse como un reflejo de un cambio en la resistencia mecánica de las muestras, en particular, con los dos pasos correspondientes a la **primera (enzimática)** y la **segunda (agregación)** de la cuajada de la leche (Bakkali et al., 2001), y la transición entre ellos puede identificarse como el tiempo de coagulación (Ay & Gunasekaran, 1994). Durante la hidrólisis enzimática, una enzima específica, la quimosina, transforma la leche líquida en un semisólido viscoelástico, el coágulo. La quimosina actúa sobre la κ -caseína de la leche, fragmentando parcialmente las moléculas. Esto conduce a un cambio en la carga superficial de las micelas de caseína (partículas coloidales que contienen muchas moléculas de proteína), aumentando su hidrofobicidad y favoreciendo su agregación (de Kruif & Holt, 2003). La agregación micelar es responsable del aumento de la viscosidad de la leche y, en consecuencia, también de la resistencia mecánica del medio.

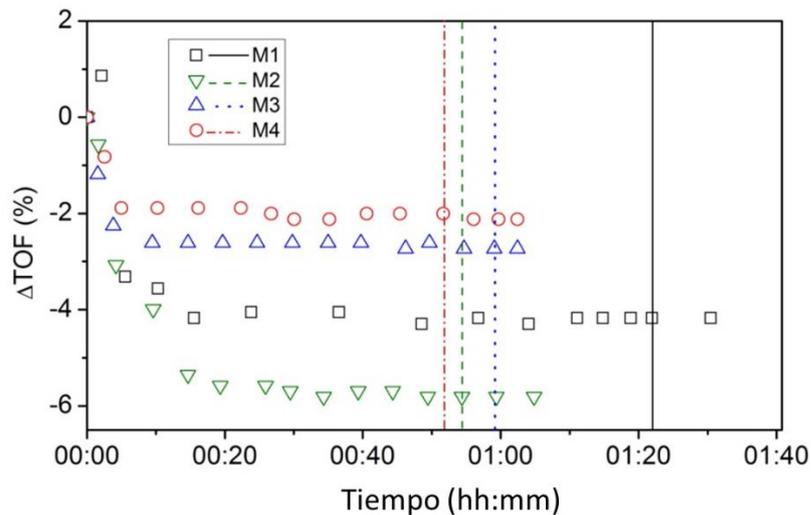


Figura 4.4. Cambios relativos del tiempo de vuelo (Δ TOF) de las ondas de ultrasonido durante el cuajado de las muestras de leche. Las líneas verticales indican el tiempo de corte indicado por el maestro quesero.

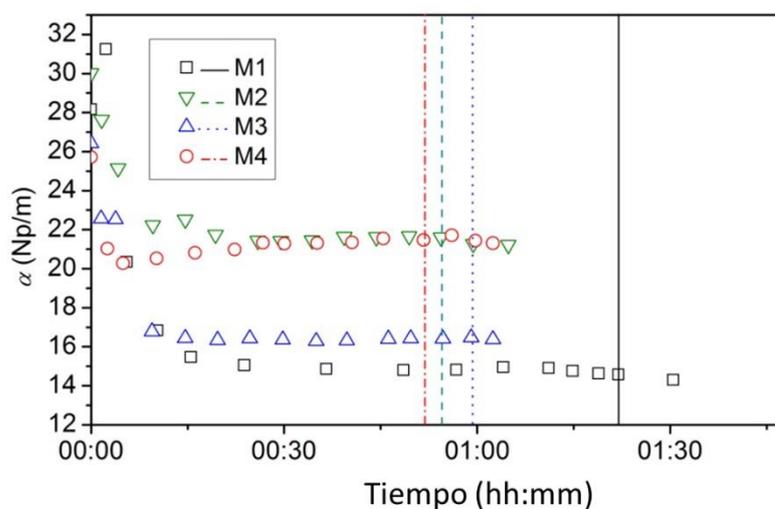


Fig. 4.5. Evolución de la atenuación ultrasónica (α) durante el cuajado de las muestras de leche. Las líneas verticales indican el tiempo de corte indicado por el quesoero.

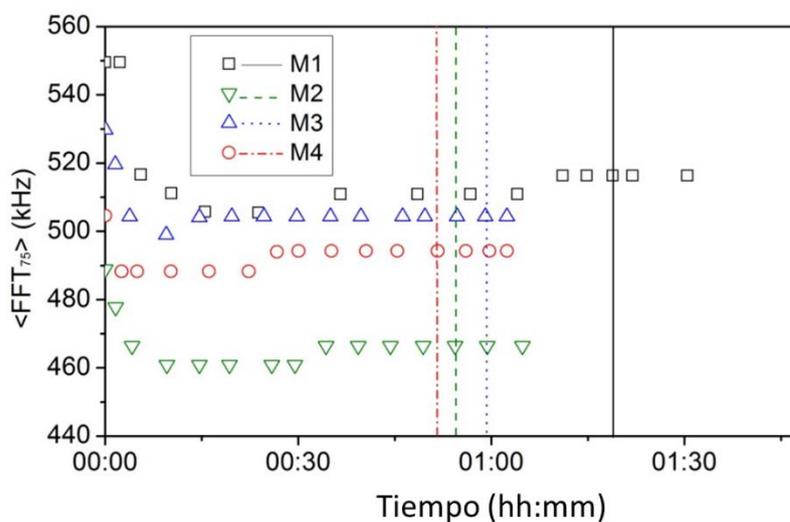


Figura 4.6. Evolución de los valores de la FFT correspondientes al percentil 75 (<FFT₇₅>) durante el cuajado de las muestras de leche. Las líneas verticales indican el tiempo de corte indicado por el maestro quesoero.

Varios estudios (Nassar et al., 2004; Taifi et al.,2006) han observado un comportamiento similar de la UPV durante el cuajado de muestras de leche desnatada reconstituida en condiciones controladas de concentración de leche en polvo, temperatura y pH de cuajado. Otros estudios indicaron el mismo comportamiento de atenuación de los ultrasonidos durante la coagulación de la leche desnatada reconstituida (Gunasekaran & Ay,

1996; Bakkali et al., 2001; Taifi et al., 2006) y la leche de vaca entera (Koc & Ozer, 2008) en condiciones controladas de concentración y temperatura del coagulante. Algunos de estos estudios establecen un algoritmo para la relación entre el tiempo de coagulación y el tiempo de corte (Kowalchuk & Olson, 1977; Gunasekaran & Ay, 1996). Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con estos trabajos en la relación clara entre el tiempo de coagulación y el tiempo de corte. Sin embargo, en este estudio la relación no se ajusta con gran precisión, ya que las muestras estudiadas procedían de diferentes fuentes y las condiciones de temperatura y pH no estaban totalmente controladas, sino que simulaban situaciones reales siguiendo las indicaciones del maestro quesero. No obstante, se puede deducir de los resultados que **el tiempo de corte es aproximadamente 6 veces el tiempo de coagulación**.

Hay que destacar que las **curvas de evolución de los parámetros de ultrasonido analizados difieren de una muestra a otra**, es decir, aunque la tendencia general del proceso de cuajado fue como se describió anteriormente para cada muestra, no hubo superposición general de las curvas. El hecho de que algunas curvas de un parámetro dado puedan distinguirse claramente entre diferentes leches puede deberse, como se indicó anteriormente, a que las muestras se tomaron en diferentes fechas.

Debemos hacer la salvedad de que si el parámetro de ultrasonido estudiado hubiera sido la de mayor amplitud de la FFT (FFT), no se habrían observado las dos etapas del proceso antes mencionadas. De manera similar, si el parámetro elegido hubiera sido FFT₂₅, habría habido un solapamiento general entre las curvas de las diferentes muestras. Por último, como se señaló anteriormente, los errores asociados con la determinación de FFT₉₉ fueron muy grandes. Por tanto, **las variables FFT, FFT₂₅ y FFT₉₉ no eran adecuadas para su inclusión en el análisis estadístico de los datos**.

El comportamiento similar mostrado por las variaciones relativas en el **tiempo de vuelo, la atenuación, FFT₇₅ y FFT₅₀ durante el cuajado** de las muestras se refleja en **correlaciones lineales positivas**, estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los mismos. Esto implica, por ejemplo, que la mencionada disminución de la atenuación (o aumento de la transmisión) durante el cuajado está más claramente marcada para los componentes de frecuencia más baja del espectro emitido por el transductor. Además, como era de esperar, las características ultrasónicas de la leche cruda afectan a las del proceso de cuajado. En la Figura 4.7 se presenta un ejemplo que muestra el resultado del análisis de regresión lineal de la atenuación medida en cada muestra de leche cruda frente a la variación relativa en el tiempo de vuelo medido en el tiempo de corte de los respectivos cuatro procesos de cuajado. Se observa que cuanto menor es el coeficiente de atenuación ultrasónica de la muestra de leche cruda, menor es la disminución relativa en el tiempo de vuelo de las ondas durante el cuajado.

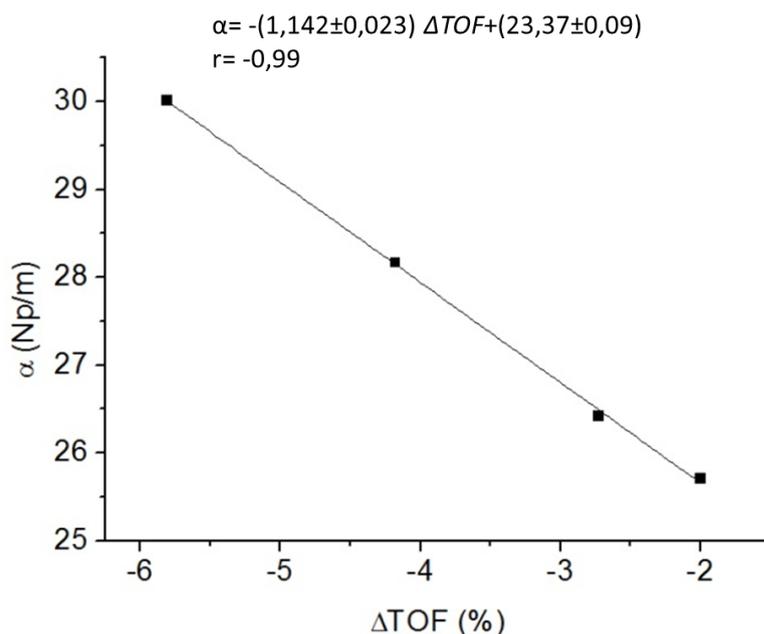


Figura 4.7. Regresión lineal entre la atenuación ultrasónica (α) de las muestras de leche cruda y los cambios relativos en el tiempo de vuelo (ΔTOF) de las ondas ultrasónicas medidas en los tiempos de corte correspondientes a sus respectivos procesos de cuajado.

4.5. Estudio de las correlaciones

Varios estudios han demostrado que la velocidad y la atenuación de los ultrasonidos en la leche durante el cuajado dependen de propiedades como el pH, la temperatura y las concentraciones de cloruro de calcio, leche en polvo y características del coagulante (Benguigui et al., 1994; Gunasekaran & Ay, 1996; Bakkali et al., 2001; Taifi et al., 2001; Nassar et al., 2004; Koc & Ozer, 2008). Estos parámetros no fueron considerados en este trabajo porque: (i) para pH y temperatura, las condiciones no eran las de un experimento de laboratorio, no estaban controladas, siguiendo los criterios establecidos por el maestro quesero a nivel industrial, (ii) las concentraciones de cloruro de calcio y leche en polvo no eran aplicables, ya que se utilizó leche cruda, y (iii) para la concentración del coagulante, este parámetro se mantuvo igual para las cuatro muestras. En esta subsección, describiremos los resultados del tratamiento estadístico mediante una ANOVA en el que se encontraron **correlaciones significativas** ($P < 0,05$), siendo de particular interés algunos parámetros que hasta ahora no habían sido considerados en otros estudios previos en leches.

Así, se observaron correlaciones negativas estadísticamente significativas **entre el contenido de proteína de las muestras de leche cruda con los valores de FFT_{50} ($r = -0,97$) y con FFT_{75} ($r = -0,98$)** (Figuras 4.8). Este resultado sugiere que un mayor contenido de proteínas favorece la transmisión de las frecuencias espectrales más bajas emitidas por el transductor frente a las frecuencias más altas. Por tanto, de alguna forma, la estructura micelar de las caseínas (la más abundante de las proteínas de la leche) que forma la

dispersión coloidal parece influir significativamente en una diferente atenuación de las frecuencias de ultrasonido durante la inspección de las muestras de leche. Otros estudios han llegado a la misma conclusión por otros medios, encontrando en particular que las partículas micelares de la leche reconstituida son la causa de la atenuación dependiente de la frecuencia medida por las ondas de ultrasonido que se propagan en ella (Griffin & Griffin, 1990; Benguigui et 1994). **El contenido de proteína de la leche también influye en la atenuación de los diferentes componentes de frecuencia** durante el cuajado, como se aprecia en la Figura 4.9 que representa las correlaciones del coeficiente de atenuación medido en el tiempo de corte y la variación en FFT_{50} desde el tiempo de corte al tiempo inicial del proceso de cuajado, ambos representados frente al contenido de proteína de las muestras de leche. En base al hecho de que la disminución de la atenuación durante el cuajado es más marcada para los componentes de frecuencias más bajas que para las frecuencias más altas, es evidente que las muestras de leche con mayor contenido de proteína serán aquellas en las que esta disminución de atenuación sea menor. La fuerte dependencia de la atenuación de la frecuencia se considera normal para las soluciones de proteínas (Cho et al., 1985), aunque hasta la fecha hay pocas evidencias sobre las propiedades acústicas de las micelas de caseína, especialmente cuando se agregan (Corredig et al., 2004). Por tanto, los resultados actuales pueden arrojar algo de luz sobre esta cuestión.

Finalmente, **no se encontraron relaciones** estadísticamente significativas, matemáticamente simples, entre los **parámetros de ultrasonidos y el contenido de materia seca, lactosa o grasa** de las muestras analizadas.

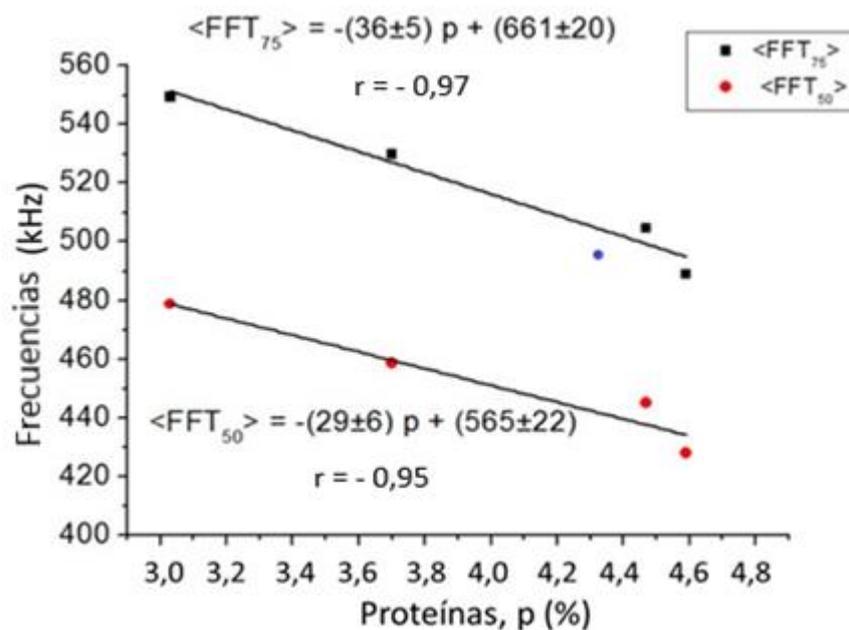


Figura 4.8. Regresiones lineales del contenido de proteína de las muestras de leche cruda con FFT_{50} y con FFT_{75} .

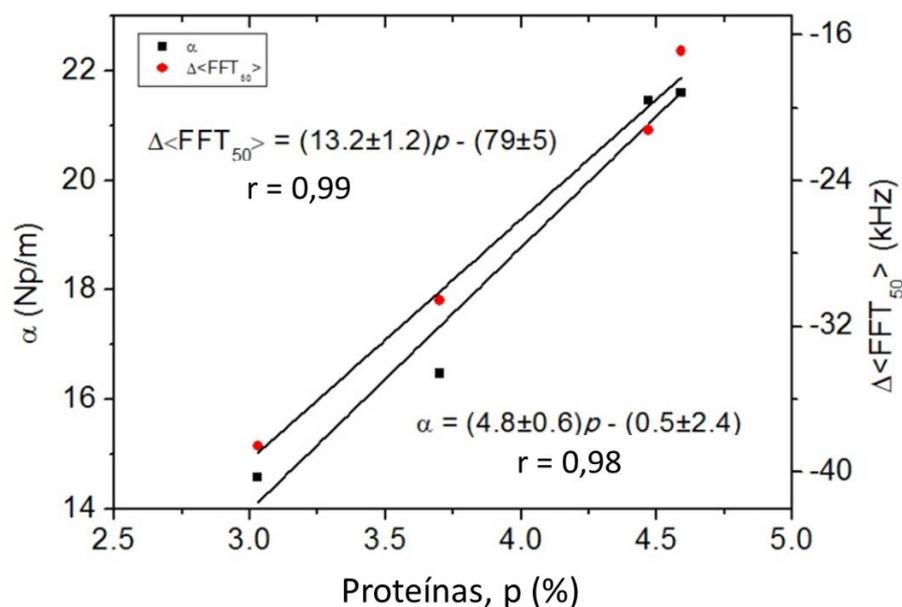


Figura 4.9. Regresiones lineales del contenido de proteína de las muestras de leche cruda con la atenuación ultrasónica (α) medida en el tiempo de corte, y con las variaciones en la FFT_{50} (ΔFFT_{50}) de las ondas ultrasónicas entre el tiempo de corte y los valores medidos en el tiempo inicial.

En resumen, para las muestras de leche cruda, los resultados de la UPV y la atenuación fueron consistentes con los valores de la literatura. Con respecto a las FFT, las frecuencias de las ondas ultrasónicas que se propagan a través de las muestras fueron generalmente menores o iguales a la frecuencia nominal del transductor. Además, se establecieron una serie de correlaciones entre los distintos parámetros de ultrasonidos analizados. En particular, el comportamiento de la FFT se correlacionó con el de la UPV, presentando las muestras de mayores velocidades de ultrasonido valores de FFT más elevados.

Para los procesos de cuajado, los cambios en los parámetros de ultrasonido ocurrieron en dos pasos que correspondían a la primera y segunda fases del cuajado de la leche - la fase enzimática y la de agregación. En un primer momento, hubo un aumento de la UPV, y disminuciones en la atenuación y frecuencia de las ondas ultrasónicas transmitidas, hasta alcanzar las respectivas regiones cierta estabilidad que se mantuvieron hasta el final del proceso de monitoreo. Estos resultados indicaron que el tiempo de corte es aproximadamente 6 veces el tiempo de cuajado. Además, se encontraron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre varios parámetros de ultrasonidos.

Las características ultrasónicas de la leche cruda influyeron en la evolución de las medidas de los parámetros de ultrasonido durante el proceso de cuajado. En particular, las muestras de leche cruda que tenían coeficientes de atenuación de ultrasonido más bajos

experimentaron una disminución relativa menor en el tiempo de vuelo de las ondas medido durante el cuajado.

Las correlaciones estadísticamente significativas encontradas entre los parámetros de ultrasonido y fisicoquímicos de las cuatro muestras añaden valor a la utilidad de esta técnica no destructiva. Es particularmente interesante por su novedad con respecto a la literatura existente sobre el tema las correlaciones observadas entre: (a) el contenido de proteína de la leche, tanto cruda como cuajada, y los componentes de frecuencia, y (b) el contenido de proteína y la atenuación de los componentes de frecuencia durante el proceso de cuajado. Estas nuevas correlaciones apoyan aún más el uso del ultrasonido como una técnica no destructiva para caracterizar la leche, ya que estas son propiedades que pueden contribuir directamente al conocimiento de las propiedades acústicas de las micelas de caseína, especialmente a medida que se agregan.

CAPÍTULO II

5. CAPÍTULO II: Aplicación de ultrasonidos para control de calidad del proceso de maduración de la Torta del Casar

5.1. Diseño experimental

Se realizaron **cuatro elaboraciones diferentes** en las que se obtuvieron cuatro lotes de queso Torta del Casar. En cada una de las elaboraciones se introdujo una modificación específica durante el procedimiento de elaboración del queso con el objetivo de generar diferentes defectos en la “Torta” (Figura 5.1). A continuación, se detallan las modificaciones realizadas:

- **Lote estándar (ST):** este queso fue elaborado siguiendo el procedimiento general de elaboración de la Torta del Casar.
- **Lote 1 de defectos de prensado (PD1):** para la preparación de defectos de ojos mecánicos en el interior del queso, se utilizó agua fría en lugar de agua caliente en la doble camisa de la cuba durante la etapa de agitación. Gracias a esta modificación durante el proceso de fabricación del queso, los granos se enfrían y provoca una unión ineficaz entre las diversas partes de la cuajada una vez llevado a cabo el desuerado y pre-prensado.
- **Lote 2 de defectos de prensado o de textura (PD2):** la cuajada se rompió en trozos del tamaño de un grano de arroz, como se indica en el procedimiento general de elaboración del queso, pero la cuba se fijó a 35 °C en lugar de 30 °C.
- **Lote de defectos microbianos (MD):** para lograr un queso con defectos de hinchazón temprana se agregó 3,61 g de inóculo liofilizado a 96 L de leche templada a 30 °C antes de la coagulación. El inóculo comprendía microorganismos proteolíticos y potencialmente productores de gas: *Escherichia coli* ($2,07 \times 10^{10}$ ufc/g), *Enterobacter aerogenes* ($3,2 \times 10^{10}$ ufc/g) y *Kluyveromyces lactis* ($1,19 \times 10^{10}$ ufc/g).

En primer lugar, para preparar el inculo liofilizado las bacterias (*Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*) se revitalizaron en caldo cerebro corazón (BHI) a 37 °C durante 24 horas y la levadura (*Kluyveromyces lactis*) en caldo de extracto de levadura de peptona y dextrosa (YPD) a 25°C en agitación a 150 rpm. Posteriormente, los caldos de cultivos con los correspondientes microorganismos se pasaron a matraces de caldo nutritivo suplementado con crioprotectores para prevenir modificaciones de las propiedades físicas de la membrana celular (Ko et al., 1994). El suplemento para el caldo de cultivo se componía de NaCl al 5% y manitol al 10%. Seguidamente, se incubaron a 37 °C durante 48 horas en aerobiosis las enterobacterias y las levaduras a 25 °C en agitación a 150 rpm durante 72 h.

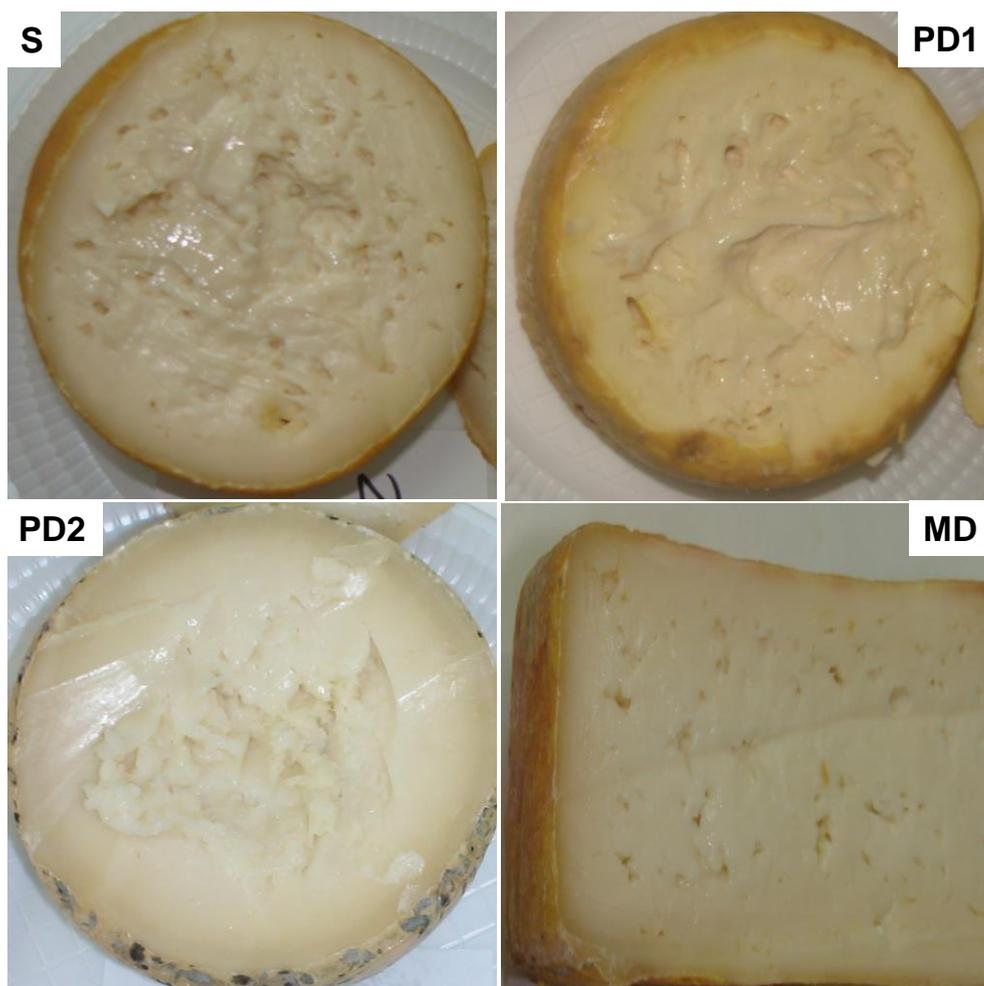


Figura 5.1. Detalle del centro de los quesos de los cuatro lotes de “Torta del Casar” al final del periodo de maduración: Lote estándar (S), Lote con defectos de prensado (PD1), Lote con defectos de prensado 2 o textura (PD2), y Lote con defectos microbianos (MD).

El crecimiento de los microorganismos fue controlado cada 24 horas mediante cámaras de Neubauer y observación al microscopio. Los microorganismos permanecieron en el caldo de cultivo suplementado con los crioprotectores hasta conseguir una carga aproximada de 10^{12} ufc/mL. Una vez conseguida la concentración adecuada, el contenido de los matraces se trasvasó a tubos de centrifuga estériles y se centrifugaron a 4000 g durante 10 min. A continuación, se eliminó el líquido sobrenadante y el pellet fue lavado con sacarosa al 2,5%. Posteriormente se homogenizó con sacarosa al 2,5% y se congeló en finas capas en un baño metálico con 2-isopropanol y nieve carbónica. Una vez congelado, se procedió a su liofilización.

Las células liofilizadas se almacenaron en bolsas opacas a vacío y temperatura de -80 °C hasta su utilización. Previamente a la utilización de los liofilizados el número de células viables fueron determinados mediante análisis microbiológico. Para ello, se hicieron diluciones decimales sembradas en placas de agar BHI y posterior incubación durante 24 h a

37 °C en aerobiosis para los liofilizados de enterobacterias y agar YPD a 25 °C durante 48 h para la levadura.

La elaboración de los cuatro lotes permitió obtener **un total de 30 a 32 unidades por cada lote**, con aproximadamente 950 g de peso inicial (diámetro: 13 cm; altura: 7 cm). Todos los quesos fueron madurados tal y como se ha descrito anteriormente. Durante la maduración se eligieron al azar tres quesos de cada lote para su análisis después de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas de maduración.

En la Tabla 5.1 se presenta la distribución de muestras tanto para las determinaciones fisicoquímicas, microbiológicas y ultrasónicas durante la maduración de 70 días de los cuatro lotes elaborados.

5.2. Análisis estadístico de los datos

Se determinaron los **estadísticos descriptivos** de los parámetros ultrasónicos de todas las muestras y se estudió la evolución durante las semanas de maduración de los parámetros fisicoquímicos, microbianos y de textura de los lotes de queso, utilizando **ANOVA de una vía** y test de comparaciones múltiples **HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey**. Este test permitió observar diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las medias de las muestras. La eficiencia de los parámetros ultrasónicos seleccionados como marcadores para el control de los parámetros fisicoquímicos y de textura de muestras de queso se evaluó mediante **coeficientes de correlación de Pearson**. Para la clasificación de lotes de queso según su defecto durante su maduración, se aplicó el método de **análisis discriminante lineal (ADL)** a los datos ultrasónicos. Las variables discriminantes para cada intervalo de maduración evaluado (2-4, 4-6, 6-8 y 8-10 semanas) se identificaron mediante un algoritmo escalonado basado en el **método lambda de Wilks**. Los resultados del modelo ADL de clasificación con el mejor rendimiento han sido representados gráficamente proyectando los grupos de quesos en el espacio definido por las **funciones discriminantes (FD)**.

Tabla 5.1. Número de muestras totales inspeccionadas a lo largo del periodo de maduración de los diferentes lotes de queso.

Lotes de queso ¹	Lotes de queso ¹								Total	
	ST		PD2		PD1		MD		125	
Nº de quesos (muestras)	32		30		31		32		125	
Tipo de análisis ²	IU	AFM	IU	AFM	IU	AFM	IU	AFM	IU	AFM
Muestreo semanal										
Semana 0	32	3	30	3	31	3	32	3	125	12
Semana 2	29	3	27	3	28	3	29	3	113	12
Semana 4	26	3	24	3	25	3	26	3	101	12
Semana 6	23	3	21	3	22	3	23	3	89	12
Semana 8	20	3	18	3	19	3	20	3	77	12
Semana 10	18	3	16	3	17	3	18	3	69	12
Total muestras	148	18	136	18	142	18	148	18	574	72

¹Quesos estándar (ST); Quesos con defectos de prensado 2 o textura (PD2); Quesos con defectos de prensado (PD1); Quesos con defectos microbiológicos (MD).

²Inspección ultrasónica (IU); Análisis fisicoquímicos y microbiológicos AFM.

5.3. Parámetros fisicoquímicos y de textura de los quesos

En general, dentro de los **parámetros fisicoquímicos**, la materia seca, proteína y grasa totales aumentaron durante el proceso de maduración, con rangos de 45,1 a 59,6, 11,7 a 19,3 y 23 a 33,6 %, respectivamente, sin que se observaran diferencias entre los lotes estudiados al final de la maduración (Tabla 5.2). De la misma forma, los resultados de cenizas, pH y densidad no mostraron diferencias relevantes entre los lotes estudiados. Los valores de cenizas oscilaron entre 2,06 % (semana 0, lote PD1) y 3,17 % (semana 10, lote PD2), mientras que en el caso de los valores de pH se observa un descenso significativo durante la maduración en todos los lotes de 6,55-6,73 a 5,24-5,49. En el caso de la densidad, esta osciló entre 951 y 1011 g/cm³ en producto final (Tabla 5.2). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente por otros autores para Torta del Casar y para otros quesos de pasta blanda parecidos (Roa et al., 1999; Sanjuán et al., 2002; Ordiales et al., 2013a).

Por el contrario, los **datos de textura** fueron más variables entre lotes. La firmeza del lote estándar (ST) aumentó significativamente hasta el final de la maduración, mientras que para el lote PD1, esta tendencia no fue evidente. En el lote MD, la firmeza máxima de los quesos se produjo a la semana 6 después de la maduración observándose una disminución hasta el final de la maduración. En el caso el lote PD2, este parámetro fue particularmente alto durante la maduración. Delgado et al. (2010a) mostraron una reducción de la dureza del queso durante la maduración de la Torta del Casar, característica de este tipo de queso. En este estudio, y a diferencia del nuestro, los quesos se abrieron previamente eliminando toda la corteza superior para evaluar la textura de la pasta del queso. Los datos sobre los otros parámetros de textura medidos revelaron valores más altos de untuosidad y pegajosidad en el lote MD en la semana 10. El efecto de la población microbiana sobre las propiedades reológicas de este tipo de queso ha sido descrito por Pereira et al. (2010a). La relación entre los parámetros texturales y proteolíticos se ha atribuido a la degradación de la matriz de caseínas, disminuyendo la dureza y consistencia de la Torta del Casar y aumentando su adhesividad durante la maduración (Delgado et al., 2010a). Por el contrario, el lote PD1 junto con el ST mostraron los valores más bajos de untuosidad y pegajosidad.

Tabla 5.2. Parámetros fisicoquímicos y de textura de los lotes de queso de “Torta del Casar” durante el proceso de maduración^{1,2}.

Lote	Parámetros fisicoquímicos ³						Parámetros de textura ⁴		
	MS (%)	PB (%)	Grasa (%)	Ash (%)	pH	Densidad (g/cm ³)	Firm. (g)	Unt. (g)	Peg. (g)
<i>Estándar (ST)</i>									
0	45,1 ^{D;b}	12,5 ^C	23,0 ^D	2,22	6,69 ^A	1074 ^{A;a}	853 ^{C;b}	---	---
2	46,2 ^{D;c}	16,1 ^{B;a}	24,1 ^{D;c}	2,21	5,17 ^{B;b}	1051 ^{AB;a}	878 ^{C;b}	---	---
4	48,7 ^{C;b}	16,2 ^{B;ab}	27,7 ^{C;c}	2,27	4,73 ^{B;b}	1000 ^B	787 ^{C;c}	1918	-1736
6	53,5 ^{B;c}	17,2 ^{AB;a}	30,3 ^{B;b}	2,37	5,03 ^B	1047 ^{AB;a}	1387 ^{B;c}	1652 ^C	-1543 ^a
8	54,3 ^{B;c}	18,3 ^{AB;a}	30,9 ^{B;b}	2,33	5,18 ^B	939 ^{C;b}	1608 ^{B;b}	1597	-1731 ^a
10	58,1 ^A	19,3 ^A	33,3 ^{A;ab}	2,51	5,24 ^B	951 ^{C;b}	2252 ^{A;a}	1626 ^b	-1632 ^a
<i>Defecto de prensado 1 (PD1)</i>									
0	48,0 ^{D;a}	11,7 ^C	24,0 ^D	2,06	6,55 ^A	1022 ^b	823 ^{C;b}	---	---
2	51,8 ^{C;b}	13,0 ^{B;b}	28,0 ^{C;b}	2,21	5,99 ^{B;a}	1019 ^{ab}	791 ^{C;b}	---	---
4	54,9 ^{B;ab}	17,9 ^{A;a}	30,3 ^{B;b}	2,39	5,55 ^{B;a}	972	1551 ^{B;b}	---	---
6	55,4 ^{B;b}	16,2 ^{A;ab}	29,5 ^{BC;b}	2,37	5,54 ^B	979 ^b	2277 ^{A;b}	2818	-1755 ^a
8	57,7 ^{A;b}	17,0 ^{A;a}	32,5 ^{A;ab}	2,40	4,80 ^C	985 ^{ab}	1612 ^{B;b}	1892 ^{bc}	-2085 ^{ab}
10	57,6 ^A	18,0 ^A	33,6 ^{A;a}	2,31	5,49 ^C	982 ^{ab}	1690 ^{B;b}	1812 ^b	-1917 ^{ab}
<i>Defecto de prensado 2 o textura (PD2)</i>									
0	48,3 ^{E;a}	10,8 ^C	23,3 ^C	2,49	6,68 ^A	1013 ^b	4242 ^{A;a}	---	---
2	52,9 ^{D;ab}	13,2 ^{BC;b}	24,2 ^{C;c}	3,02	5,37 ^{B;b}	1028 ^{ab}	4040 ^{A;a}	---	---
4	57,1 ^{C;a}	14,9 ^{B;b}	29,0 ^{B;bc}	3,10	5,04 ^{B;ab}	1006	3658 ^{B;a}	---	---
6	59,6 ^{B;a}	15,7 ^{AB;ab}	31,2 ^{A;b}	3,31	5,04 ^B	1008 ^{ab}	3600 ^{B;a}	8169 ^{A;a}	-5586 ^{B;b}
8	63,2 ^{A;a}	10,7 ^{C;b}	31,7 ^{A;ab}	3,30	4,97 ^B	987 ^{ab}	4291 ^{A;a}	2281 ^B	-2117 ^{A;ab}
10	59,0 ^B	17,8 ^A	31,7 ^{A;b}	3,17	5,24 ^B	1011 ^{ab}	3728 ^{B;c}	3173 ^{AB;a}	-2521 ^{A;b}
<i>Población microbiana anómala (MD)</i>									
0	46,2 ^{D;b}	11,7 ^D	24,6 ^D	2,34	6,73 ^A	1011 ^b	1090 ^{A;b}	---	---
2	53,6 ^{C;a}	13,7 ^{C;b}	30,9 ^{C;a}	2,44	5,50 ^{B;b}	997 ^b	774 ^{B;b}	---	---
4	54,8 ^{BC;ab}	15,7 ^{BC;ab}	32,2 ^{BC;a}	2,18	5,50 ^{B;a}	970	923 ^{AB;c}	---	---
6	55,1 ^{BC;bc}	14,6 ^{C;b}	34,6 ^{A;a}	2,61	5,48 ^B	990 ^b	857 ^{AB;d}	1895 ^{B;ab}	-2060 ^{A;a}
8	55,3 ^{B;c}	18,4 ^{A;a}	33,0 ^{AB;a}	2,42	5,40 ^B	999 ^a	862 ^{AB;c}	2336 ^B	-2631 ^{A;b}
10	58,4 ^{A;}	17,5 ^{AB}	33,0 ^{AB;ab}	2,72	5,47 ^B	1001 ^a	1073 ^{A;c}	3477 ^{A;a}	-3755 ^{B;c}

¹Para cada columna, los valores medios del mismo lote sin letras mayúsculas comunes son significativamente diferentes durante el proceso de maduración (p <0.05).

² Para cada columna, los valores medios de la misma semana de procesado sin letras minúsculas comunes son significativamente diferentes entre lotes (p <0.05).

³MS: Materia seca; PB: Proteína bruta.

⁴ Firm.: Firmeza; Unt.: Untuosidad; Peg.: pegajosidad.

5.4. Evolución de la población microbiana durante la maduración del queso

Los recuentos medios de BAL durante la maduración fueron superiores a 8 log ufc/g para todos los lotes sin diferencias significativas (Figura 5.2). En el caso de los recuentos de levadura, estos fueron constantes hasta la semana 6 de maduración, con la mayoría de los valores oscilando de 4 log ufc/g (PD2) a 6 log ufc/g (MD y PD1). Al final de la maduración, 3 lotes mostraron una disminución notable del recuento de levaduras, con valores cercanos a 4 log ufc/g en el lote MD y 3 log ufc/g en los lotes ST y PD2. Una evolución similar se observó para la población de *Enterobacteriaceae*, con recuentos estables alrededor de 8 ufc/g en todos los lotes durante las primeras 4 semanas de maduración y una disminución progresiva en el segundo período (Figura 5.2). Sin embargo, los lotes ST y PD2 mostraron una disminución más pronunciada de este grupo microbiano en relación con el lote PD1. Los recuentos de BAL, levadura y enterobacterias encontrados en este estudio son similares a los reportados previamente en este tipo de queso (Pintado et al., 2010; Ordiales et al., 2013a, b). Las BAL son el grupo microbiano predominante en Torta del Casar (Mas Mayoral et al., 1991), en el que pueden alcanzar recuentos viables de 8-9 log ufc/g en el momento del consumo (Ordiales et al., 2013a, b). Además, la presencia de recuentos elevados de *Enterobacteriaceae* no es inusual en este tipo de quesos (Alegría et al., 2009; Gonçalves et al., 2018). Estos altos niveles de microorganismos durante la maduración sugieren una contribución relevante de sus actividades enzimáticas en el desarrollo de las características sensoriales de queso Torta del Casar, incluida su textura.

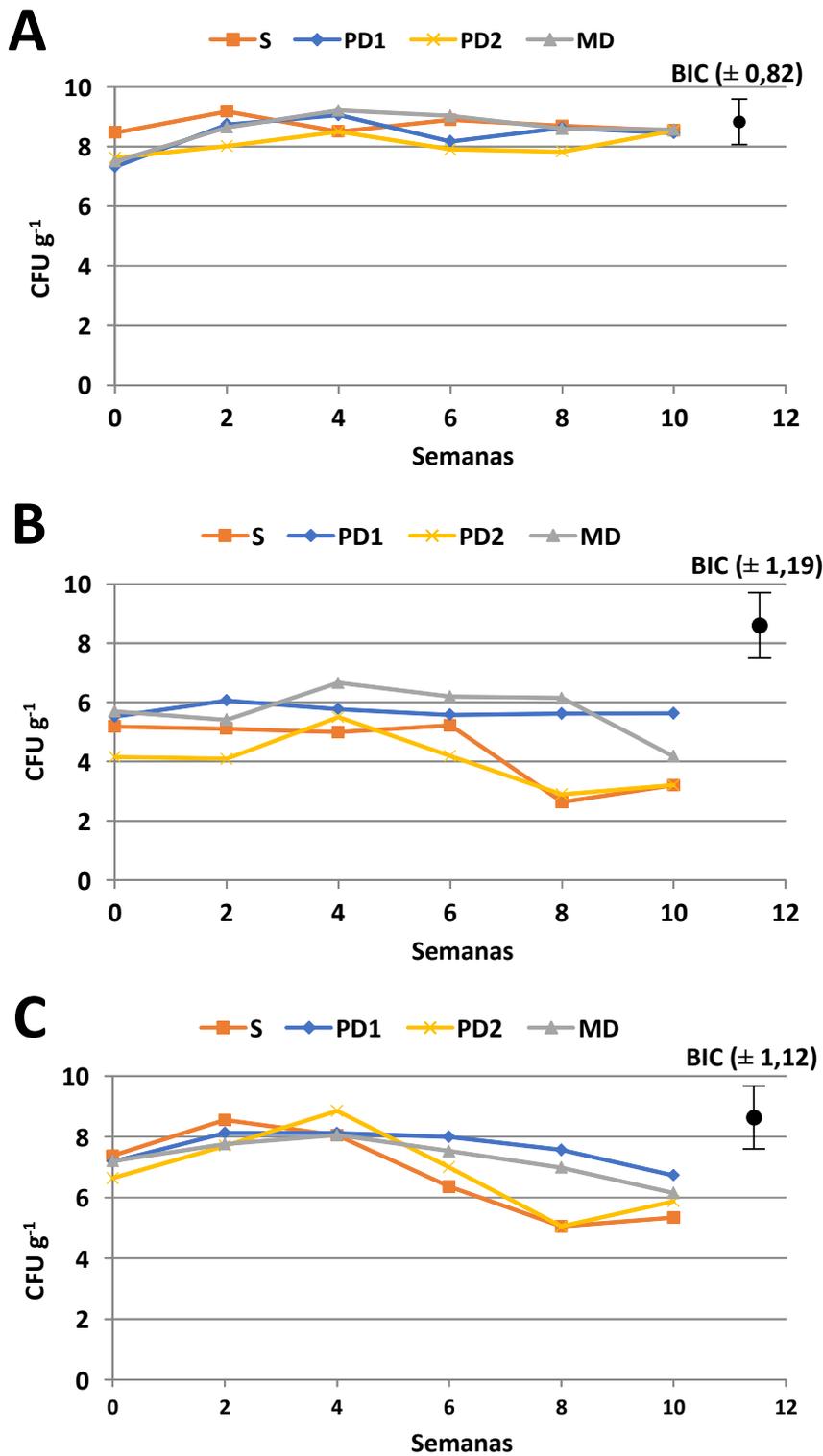


Figura 5.2. Evolución de los recuentos de (A) bacterias ácido lácticas, (B) levaduras y (C) enterobacterias durante la maduración de los lotes de quesos estándar (ST), defecto de prensado 1 (PD1), defecto de prensado 2 o textura (PD2) y defectos microbianos (MD). BIC = barra del intervalo de confianza utilizando la prueba post-hoc de comparación de medias Tukey.

5.5. Parámetros de los ultrasonidos

La evaluación de las propiedades de los alimentos mediante ultrasonidos, incluyendo diferentes tipos de quesos, se realiza principalmente mediante del análisis de la velocidad ultrasónica como la más fiable y simple de las medidas (Benedito et al., 1998; Gallo et al., 2018). Benedito et al. (2000a) describieron un aumento de **la velocidad ultrasónica** durante la maduración del queso Cheddar (de textura firme) que oscilan desde 1.657 hasta 1.677 m/s a 12 °C y de 1.684 a 1.693 m/s a 5 °C (transductores de 1 MHz, 1,9 cm de diámetro de cristal; modelo A314S-SU, Panametrics NDT). Estos valores son más constantes que los encontrados en este estudio para Torta del Casar, un queso de textura más variable y cremosa, con rangos de 1.144 a 1.723 y 1.246 a 1.547 m/s para transductores V150 y V151, respectivamente (Tabla 5.3). Además de la velocidad, se estudiaron en este trabajo varios parámetros relacionados con esta, la frecuencia, y la atenuación. Además de la velocidad longitudinal (VL) y velocidad transversal (VT) y la relación entre ellas (VT/VL), se calcularon las constantes elásticas a partir de las mediciones de velocidad ultrasónica. A partir de estos parámetros, VL mostró la desviación estándar relativa (DER) más baja (3,71-5,18%), mientras que las constantes de Lamé (λ) y coeficiente de Poisson (ν) presentaron los coeficientes de variación más altos (40,37-48,47 y 30,37–38,08%, respectivamente). En todos los casos, el nivel de dispersión de los parámetros relacionados con la velocidad fue mayor con el transductor V150 que con el V151. Por el contrario, los valores de DER de **la frecuencia** de mayor amplitud y las frecuencias FFT correspondientes a los percentiles 25, 50, 75 y 99 de las señales recibidas fueron mayores para el transductor V151 que para V150, principalmente para la frecuencia de mayor amplitud, mostrando más del 40% de la variabilidad (Tabla 5.3).

En cuanto a los parámetros relacionados con **la atenuación**, los datos de dispersión fueron ligeramente superiores con el transductor V150 que, con el V151, con AT 60 mostrando los coeficientes de variación más altos para ambos transductores (35,6 y 31,2%, respectivamente). La alta variabilidad encontrada para algunos parámetros de los ultrasonidos podría significar una buena respuesta de estos a los cambios y variaciones en los parámetros fisicoquímicos y de textura asociado con los defectos del queso o el proceso de maduración.

Tabla 5.3. Estadísticos descriptivos de los parámetros de los ultrasonidos medidos con los transductores “V150” y “V151” en los quesos durante su procesado.

Parámetros de los ultrasonidos	Transductor V150					Transductor V151				
	Media	DE ¹	DER ¹	Min ²	Max ²	Media	DE	DER	Min	Max
<i>Parámetros relacionados con la velocidad</i>										
VL (m/s)	1496	77	5,18	1144	1723	1434	53	3,71	1246	1547
VT (m/s)	833	132	15,83	533	1202	797	93	11,70	605	1079
VT/VL	0,56	0,08	14,55	0,36	0,76	0,56	0,07	11,70	0,43	0,74
Módulo de Young (E)	1,74E+09	3,93E+08	22,56	8,01E+08	2,53E+09	1,61E+09	2,62E+08	16,22	9,80E+08	2,31E+09
Coefficiente de Poisson (ν)	0,26	0,10	38,08	0,006	0,423	0,27	0,082	30,37	0,0167	0,388
Módulo volumétrico (k)	1,32E+09	3,06E+08	23,22	7,03E+08	2,11E+09	1,20E+09	2,55E+08	21,21	5,11E+08	1,69E+09
Módulo de corte (μ)	7,12E+08	2,23E+08	31,36	2,83E+08	1,60E+09	6,48E+08	1,51E+08	23,27	3,54E+08	1,10E+09
Constante de Lamé (λ)	8,48E+08	4,11E+08	48,47	1,22E+07	1,83E+09	7,87E+08	3,18E+08	40,37	3,24E+07	1,40E+09
<i>Frecuencias</i>										
Frecuencia de mayor amplitud (Hz)	278.404	39.596	14,22	180.201	371.000	284.901	114.252	40,10	138.952	625.860
FFT ₂₅	246.563	23.415	9,50	180.472	305.940	262.719	56.438	21,48	175.834	461.402
FFT ₅₀	283.546	22.298	7,86	185.100	352.147	352.947	85.409	24,20	204.267	578.995
FFT ₇₅	318.158	22.021	6,92	261.453	401.160	470.989	86.125	18,29	290.513	663.735
FFT ₉₉	517.473	52.070	10,06	347.222	633.528	758.842	59.168	7,80	637.765	1.068.455
<i>Atenuaciones</i>										
AT 10	1,4	0,3	23,2	1,1	2,8	1,4	0,3	19,8	1,0	2,2
AT 20	1,6	0,5	28,9	1,1	3,2	1,6	0,4	25,9	1,1	3,1
AT 30	1,8	0,6	31,6	1,1	3,3	1,8	0,5	27,9	1,1	3,2
AT 40	2,0	0,7	33,8	1,1	3,8	2,0	0,6	30,8	1,1	3,4
AT 50	2,2	0,8	35,5	1,2	4,2	2,3	0,7	31,1	1,1	4,2
AT 60	2,5	0,9	35,6	1,2	4,5	2,6	0,8	31,2	1,1	4,7
AT 70	2,8	1,0	35,2	1,2	5,1	3,0	0,9	30,6	1,4	6,0
AT 80	3,3	1,1	33,5	1,3	6,2	3,5	1,0	28,6	1,7	6,1
AT 90	4,2	1,3	31,6	1,6	7,6	4,4	1,2	27,3	2,4	7,7

¹DE: desviación estándar; DER: desviación estándar relativa expresada como porcentaje.

²Min (mínimo); Max (máximo).

5.6. Relación entre las propiedades fisicoquímicas y de textura de la Torta del Casar con los parámetros de los ultrasonidos durante su proceso de maduración.

Para establecer la relación entre las propiedades fisicoquímicas y de textura de la Torta del Casar con los parámetros de los ultrasonidos durante su proceso de maduración se analizaron las correlaciones de dichos parámetros obtenidos utilizando ambos transductores V150 y V151 con las propiedades fisicoquímicas y de textura de las muestras de los diferentes lotes de Torta del Casar estudiados durante su maduración (Tabla 5.4). Los resultados mostraron que el transductor V150 presentó un mejor rendimiento para los objetivos del trabajo que el transductor V151. Utilizando el transductor V150, los parámetros de los ultrasonidos presentaron una fuerte correlación ($P < 0,01$) con varios parámetros fisicoquímicos y de textura. Los valores de la mayoría de los parámetros relacionados con **la velocidad y las constantes elásticas** se correlacionaron negativamente (positivo en el caso del Coeficiente de Poisson ν) con la **cantidad de grasa en ES** de las muestras de queso durante la maduración; particularmente para VT, E y μ (Tabla 5.4). Esta **correlación inversa** entre el contenido de grasa de los alimentos y las velocidades de ultrasonido (VL y VT) es un fenómeno bien conocido. De hecho, estos parámetros se han utilizado para predecir el porcentaje de grasa en los productos cárnicos, pescado y diferentes tipos de queso (Park et al., 1994; Simal et al., 2003; Shannon et al., 2004; Telis-Romero et al., 2011).

El **contenido de grasa en ES** de Torta del Casar fue también el parámetro fisicoquímico más relevante para explicar el comportamiento de **la atenuación**. Los valores de AT 70 fueron los que mostraron una correlación más alta con la grasa en ES (Tabla 5.4). Esto indica que cuando aumenta la grasa en el ES se requiere un tiempo mayor para recibir un determinado porcentaje de energía (es decir, la atenuación disminuye). Considerando que los quesos son menos atenuantes cuando el valor de AT 70 es mayor, este resultado sugiere que los quesos más atenuantes son aquellos con una menor proporción de grasa en ES. En productos heterogéneos, como carnes y pescado, el coeficiente de atenuación se asocia principalmente con el fenómeno de la dispersión (Buckin et al., 2002). En estos casos, la atenuación es mucho más sensible a cambios en la estructura del tejido que a cambios en la composición de estos alimentos, lo que limita su uso en el análisis composicional de los mismos (Sigfusson et al., 2001; Awad et al., 2012). En quesos semiduros y duros, como el queso manchego, el número y tamaño de los agujeros de un queso en particular puede enmascarar los posibles cambios en la atenuación durante la maduración (Benedito et al., 2001, 2006). Sin embargo, la atenuación se ha propuesto como un indicador útil para detectar grasa intramuscular (marmoleo) en trozos de carne homogéneos, como el músculo *longissimus* (Park et al., 1994).

Tabla 5.4. Parámetros fisicoquímicos y de textura correlacionados significativamente ($p < 0.01$) con parámetros de los ultrasonidos durante el procesamiento de “Torta del Casar”.

Parámetros de los ultrasonidos	Transductor V150						Transductor V151					
	Parámetros fisicoquímicos ¹				Textura ²		Parámetros fisicoquímicos ¹				Textura ²	
	G	G ES	Cen	Dens.	Firm.	Unt.	G	G ES	Cen	Dens.	Firm.	Unt.
<i>Parámetros relacionados con la velocidad</i>												
VL (m/s)	-0,426	0,592			0,500						0,439	
VT (m/s)	-0,582					0,533						
VT/VL	-0,452											
Módulo de Young (E)	-0,565	0,389				0,532						
Coefficiente de Poisson (ν)	0,400					-0,511					-0,535	
Módulo volumétrico (k)				0,342					0,307			
Módulo de corte (μ)	-0,532					0,556					0,530	
Constante de Lamé (λ)				0,227								
<i>Frecuencias</i>												
FFT ₉₉ (Hz)						-0,519						
<i>Atenuaciones</i>												
AT 10		0,379		-0,240	-0,374				0,429			
AT 20		0,488		-0,203	-0,408							
AT 30		0,552		-0,202	-0,441				0,420			
AT 40	0,369	0,592		-0,209	-0,467							
AT 50		0,607		-0,228	-0,505				0,420			
AT 60		0,612		-0,235	-0,512				0,426			
AT 70		0,613		-0,211	-0,519							
AT 80		0,587		-0,201	-0,528							
AT 90		0,579			-0,592					-0,446		

¹ G: grasa; G ES: Grasa en extracto seco; Cen: Cenizas; Dens: densidad.

²Firm.: firmeza; Unt.: untuosidad.

En este estudio, la Torta del Casar es un queso de tipo blando con una pasta relativamente homogénea, por lo tanto, se puede considerar que tanto al fenómeno de la dispersión, como el de absorción de energía por las micelas de caseína y de los glóbulos de grasa, pueden contribuir notablemente a la atenuación. El coeficiente de atenuación debido a la dispersión juega el mismo papel que el coeficiente de absorción intrínseco en quesos con una débil concentración de oquedades (Nassar et al., 2010).

Por otro lado, se observó una fuerte **correlación negativa entre la densidad y tanto la grasa total como la grasa en ES** de los quesos estudiados ($P < 0,01$). Esto puede explicar, al menos en parte, los valores más bajos de la atenuación ultrasónica para muestras de queso más densas, mientras que k y λ mostraron una correlación positiva con la densidad de los quesos (Tabla 5.4). No obstante, como se mencionó anteriormente, se han observado correlaciones entre las señales acústicas y la densidad de alimentos porosos (Awad et al., 2012), como la Torta del Casar. En cuanto al contenido de **cenizas**, constituidas principalmente por sales de cloruro y calcio, **se correlacionó con VL y E** (Tabla 5.4). Estos resultados corroboran los obtenidos por Dukhin et al. (2005), quien describió los parámetros de ultrasonido relacionados con la velocidad del sonido, como los mejores para investigar los efectos en una escala molecular, mientras que la atenuación los consideró más adecuados para caracterizar los efectos relacionados con la heterogeneidad y composición de fases del particular sistema de los productos lácteos, que contienen estructuras como micelas de caseína y glóbulos grasos.

Entre las propiedades de textura de la "Torta", **la firmeza se correlacionó positivamente con la VL**, mientras que los **coeficientes de atenuación mostraron una intensa correlación** negativa con este parámetro de textura, especialmente en el caso de AT90 (Tabla 4). Nuevamente, este resultado indica una mayor firmeza de las muestras de Torta del Casar con más atenuación de los ultrasonidos y, en consecuencia, con mayores velocidades de propagación. Benedito et al. (2000b) describió la firmeza como el parámetro de textura que mejor se correlaciona con la velocidad ultrasónica durante la maduración de los quesos. En general, con la maduración del queso aumenta la firmeza, aumentando así la velocidad ultrasónica, mientras que el coeficiente de atenuación puede mostrar una variabilidad relativamente alta debido a porosidades o agujeros en las muestras de queso (Benedito et al., 2002). Sin embargo, en otros alimentos con estructura de gel y textura porosa, como el tofu, se ha utilizado la atenuación ultrasónica como una alternativa al análisis textural o reológico en la caracterización de su estructura de gel (Ting et al., 2009). Por el contrario, los resultados obtenidos para la untuosidad parecen indicar que solo los parámetros de los ultrasonidos relacionados con la velocidad y la frecuencia sería adecuados para determinar esta propiedad en la Torta del Casar. Los **valores de untuosidad mostraron una fuerte correlación positiva con los valores de VT, E y μ , además de una correlación negativa con v y FFT_{99} .**

Estos resultados evidencian el potencial de estos parámetros de los ultrasonidos como herramientas para el desarrollo de modelos discriminativos basados en su relación con algunos parámetros fisicoquímicos (principalmente grasa en ES y densidad) y propiedades de textura (firmeza y untuosidad) de la Torta del Casar durante su maduración.

5.7. Discriminación de los defectos del queso tipo “Torta” por parámetros de los ultrasonidos durante la maduración

Los modelos de **análisis discriminante lineal (ADL)** se desarrollaron utilizando los parámetros de los ultrasonidos determinados durante las semanas 2, 4, 6, 8 y 10 de maduración y analizados a diferentes periodos del proceso de maduración de los quesos (2-4, 4-6, 6-8 y 8-10 semanas). Se utilizó la **validación cruzada *Leave-more-out*** con cuatro grupos de cancelación para probar la capacidad predictiva de los modelos de ADL con respecto a los lotes en cada uno de los periodos estudiados. Los resultados de los modelos de ADL se resumen en la Tabla 5.5, que muestra las variables ultrasónicas seleccionadas por el método de inclusión por pasos para cada periodo de maduración de los quesos. Estas variables están ordenadas según la importancia en el modelo reflejándose el número (y porcentaje) de casos clasificados correctamente tanto en la calibración como en la predicción del modelo.

Los resultados obtenidos confirman el papel de algunos parámetros relacionados con la atenuación y la velocidad como herramientas útiles para la discriminación de los tipos de defectos en los quesos estudiados, además de revelar el potencial de discriminación de la FFT_{75} . En cuanto a los parámetros de atenuación, **AT 90 y AT 10** se encuentran entre las variables discriminantes del queso en el **periodo de 2–4 semanas** de procesado. En contraste, para los intervalos de **4 a 6 y 6 a 8 semanas** de procesado, **AT 50** aparece como la variable con más potencial discriminante, seguida de FFT_{75} (Tabla 5.5). Los parámetros, **VL, VT, k, v y E** también fueron incluidos en los modelos discriminantes con un peso comparativamente alto en el modelo ADL del último período del procesado (**8-10 semanas**).

En concreto, los porcentajes del **total de muestras externas al modelo bien clasificadas (clases predichas) aumentaron del 70,1% al 80,0%** a lo largo de los períodos de procesado analizados (de 2–4 semanas a 8–10 semanas). En general, las predicciones correctas fueron relativamente más bajas, **entre 0 y 65%, para las muestras de queso del lote MD** debido principalmente a la clasificación errónea de estas muestras de queso con las del lote PD1 en los últimos períodos de elaboración (6–8 y 8–10 semanas; Tablas 5.6 y 5.7). Por tanto, parece existir una gran similitud entre los defectos PD1 (ojos mecánicos) y MD (hinchazón temprana) en el queso tipo “Torta” atendiendo a los parámetros de ultrasonidos y que se refleja en parámetros de textura cuando el producto se encuentra en la etapa final de elaboración. En consecuencia, **cuando los modelos ADL incluyeron ambos defectos en el mismo grupo (PD1+DM), los porcentajes del total de muestras externas bien clasificadas**

(clases predichas) fueron superiores al 90% para los periodos 6–8 y 8–10 semanas de procesado (Tabla 5.8).

Tabla 5.5. Eficiencia en la calibración y predicción del ADL en la clasificación de los defectos estudiados en las muestras de queso “Torta del Casar” durante su procesado.

Maduración (semanas)	Variable seleccionada	Recuento	Lote de queso				Total
			S	PD1	PD2	MD	
2–4	AT 90	n	20	18	23	16	77
	VL (m/s)	Clases calculadas					
	AT 10	clases ¹	14	12	18	10	54
		% ²	70,0	66,7	78,3	62,5	70,1
		Clases predichas					
		clases	14	10	18	12	54
		%	70,0	66,7	78,3	62,5	70,1
4–6	AT 50	n	16	14	16	11	57
	VT (m/s)	Clases calculadas					
	FFT ₇₅ (Hz)	clases	7	11	14	9	41
		%	43,8	78,6	87,5	81,8	71,9
		Clases predichas					
		clases	9	7	14	11	41
		%	56,3	78,6	87,5	63,6	71,9
6–8	AT 50	n	12	9	11	8	40
	FFT ₇₅ (Hz)	Clases calculadas					
	Módulo de volumen (<i>k</i>)	clases	10	9	11	6	36
	Coefficiente de Poisson (ν)	%	83,3	100	100	75,0	90,0
		Clases predichas					
		clases	10	7	11	3	31
		%	83,3	77,8	100	37,5	77,5
8–10	Módulo de Young (<i>E</i>)	n	8	5	8	4	25
	VT (m/s)	Clases calculadas					
	Coefficiente de Poisson (ν)	clases	8	5	8	2	23
	AT 40	%	100	100,0	100	50	92,0
		Clases predichas					
		clases	8	5	7	0	20
		%	100	100	87,5	0,0	80,0

¹Número de casos correctamente clasificados.

²Porcentaje de casos correctamente clasificados.

Tabla 5.6. Predicción de la pertenencia a los grupos estudiados de las muestras de queso con un periodo de maduración de 6 a 8 semanas en base al modelo ADL realizado.

		Grupo predicho para cada muestra				Total
	Lote	PD1	PD2	S	MD	
Clases calculadas						
Recuento ¹	PD1	1	0	1	6	8
	PD2	0	11	0	0	11
	S	0	0	10	2	12
	DM	9	0	0	0	9
% ²	PD1	12,5	0	12,5	75	100
	PD2	0	100	0	0	100
	S	0	0	83,3	16,7	100
	DM	100	0	0	0	100
Clases predichas						
Recuento ¹	PD1	3	1	1	3	8
	PD2	0	11	0	0	11
	S	0	0	10	2	12
	DM	7	0	0	2	9
% ²	PD1	37,5	12,5	12,5	37,5	100
	PD2	0	100	0	0	100
	S	0	0	83,3	16,7	100
	DM	77,8	0	0	22,2	100

¹Número de casos clasificados en cada grupo.

²Porcentaje de casos clasificados en cada grupo.

Tabla 5.7. Predicción de la pertenencia a los grupos estudiados de las muestras de queso con un periodo de maduración de 8 a 10 semanas en base al modelo ADL realizado.

	Batch	Predicted membership group				Total
		PD1	PD2	S	DM	
Clases calculadas						
Recuento ¹	PD1	1	1	0	2	4
	PD2	0	8	0	0	8
	S	0	0	8	0	8
	DM	5	0	0	0	5
% ²	PD1	25	25	0	50	100
	PD2	0	100	0	0	100
	S	0	0	100	0	100
	DM	100	0	0	0	100
Clases predichas						
Recuento ¹	PD1	3	1	0	0	4
	PD2	0	7	0	1	8
	S	0	0	8	0	8
	DM	5	0	0	0	5
% ²	PD1	75	25	0	0	100
	PD2	0	87,5	0	12,5	100
	S	0	0	100	0	100
	DM	100	0	0	0	100

¹Número de casos clasificados en cada grupo.

²Porcentaje de casos clasificados en cada grupo.

La Figura 5.3 representa las muestras de queso maduras durante los periodos de 6-8 y 8-10 semanas proyectadas en el plano definido por los factores discriminantes (FD). El modelo ADL basado en los datos de los ultrasonidos de muestras del periodo de 6-8 semanas de maduración permitió diferenciar de manera clara los tres grupos. **Los valores de AT 50 y FFT₇₅ tuvieron un papel relevante en la diferenciación de muestras pertenecientes a los lotes PD1+MD y PD2, mientras que k y ν fueron los mejores parámetros discriminantes para la diferenciación de muestras del lote estándar (S).** En muestras de queso pertenecientes al periodo de 8 a 10 semanas de maduración, las tres clases de queso establecidas también se ubicaron claramente en distintas regiones del plano definido por los FD. En particular, las muestras de queso del lote S estaban bien separadas de los lotes con defectos mediante el FD1, mientras que FD2 separó las muestras de PD1+MD de las muestras de PD2 en base a los valores de ν , AT 40, E y VT.

Table 5.8. Eficiencia en la calibración y predicción del modelo ADL aplicado para la clasificación de las muestras de queso "Torta del Casar" después de 6-8 y 8-10 semanas de procesado considerando los lotes PD1 y MD un único grupo de muestras.

Maduración (semanas)	Variable seleccionada	Recuento	Lote de queso			Total
			S	PD2	PD1+MD	
6–8	FFT ₇₅ (Hz)	n	12	12	17	41
	AT 50	Clases calculadas				
	Ratio de Poisson (ν)	Clase ¹	11	12	15	37
	Módulo de volumen (k)	% ²	91,7	100,0	88,2	92,7
		Clases predichas				
		clase	10	12	15	37
		%	83,3	100,0	88,2	90,2
8–10	VT (m/s)	n	8	8	9	25
	AT 40	Clases calculadas				
	Módulo de Young (E)	clase	8	8	8	24
	Ratio de Poisson (ν)	%	100,0	100,0	88,9	96,0
		Clases predichas				
		clase	8	8	8	24
		%	100,0	100,0	88,9	96,0

¹Número de casos correctamente clasificados.

²Porcentaje de casos correctamente clasificados.

Estos resultados dejan patente la utilidad de los parámetros de ultrasonido para el control de calidad del queso de pasta blanda como la "Torta del Casar" durante su maduración, confirmando la alta correlación entre varios parámetros de los ultrasonidos y las propiedades fisicoquímicas y texturales del producto final de queso. Estos a su vez, permiten la discriminación de quesos defectuosos durante la maduración validando la capacidad de la inspección ultrasónica para el control no destructivo y *on-line* del proceso de elaboración del queso blando. Durante los intervalos de 6 a 8 y 8 a 10 semanas de maduración, las muestras de queso incluidas en los lotes de PD1 y DM diferían del control en los valores de atenuación (principalmente para AT 40 y AT 50). Por el contrario, la discriminación de los quesos con el defecto PD2 (presión excesiva o defectos de textura) se basó principalmente en diferentes valores de algunos parámetros de ultrasonido relacionados con la velocidad, como ν , k , E y VT .

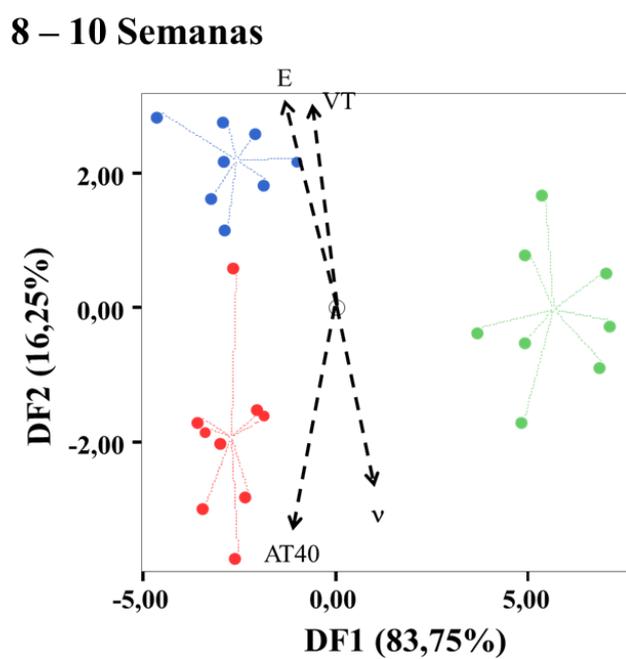
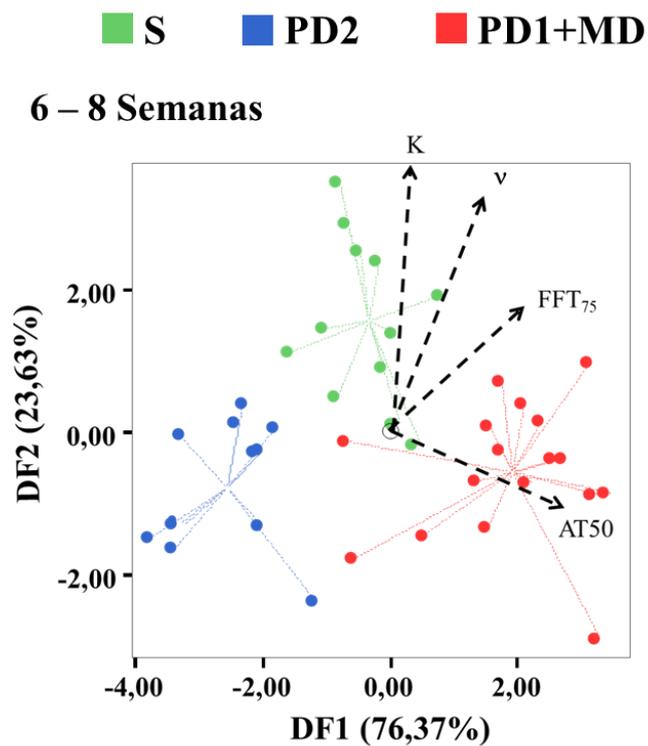


Figura 5.3. Muestras de queso agrupadas en lotes S, PD2 y PD1+DM y cargas de las variables proyectadas en planos definidos por los factores discriminantes (DF) DF1 y DF2 para muestras a las semanas 6–8 y 8–10 de maduración.

CAPÍTULO III

6. CAPÍTULO III: Los ultrasonidos como herramienta para el control de calidad de los quesos de pasta blanda de leche cruda de oveja

6.1. Diseño experimental

Para llevar a cabo este capítulo se muestrearon **quesos de pasta blanda de leche cruda de oveja (DOP Torta del Casar y DOP Queso de la Serena)** de aproximadamente 700 gr y de dimensiones de 11 cm (diámetro) y 5,5 cm (altura) al final del proceso de maduración (60 días). Se obtuvieron de seis queserías diferentes, tres de la DOP “**Torta del Casar**”. (Lote Casar) y tres de la DOP “**Queso de La Serena**” (Lote Serena), en dos estaciones del año distintas, **invierno** y **primavera**. Se recogieron al azar seis quesos por industria en cada estación y se transportaron refrigerados (<5 °C) a las instalaciones de la Escuela Politécnica de la Universidad de Extremadura (UEX; Cáceres) para su inspección ultrasónica. Posteriormente, las muestras fueron transportadas a la Escuela de Ingenierías Agrarias de la UEX (Badajoz) para todas las demás determinaciones. Todas las muestras de queso se almacenaron en condiciones de refrigeración (<5 °C) hasta su procesado y análisis en menos de 72 h.

Cada determinación se realizó por duplicado para cada muestra de queso (n=72), distribuyéndose las muestras en función de su procedencia, según se muestra en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Número de muestras totales para la inspección por ultrasonidos, análisis fisicoquímicos y microbiológicos en el producto final.

Tipo de Queso	DOP	
	Torta del Casar	Queso de La Serena
<i>Queserías</i>		
Doña Francisca	12	-
Los Castúos	12	-
Los Casareños	12	-
Arteserena	-	12
Coop. Ganadera de Castuera	-	12
García Risco	-	12
<i>Estaciones del año</i>		
Primavera	18	18
Invierno	18	18
Total muestras¹	36	36

¹Inspección ultrasónica realizada con los dos transductores.

6.2. Análisis estadístico de datos

Se calcularon los **estadísticos descriptivos** de las determinaciones ultrasónicas, microbianas, fisicoquímicas, texturales y sensoriales estudiando las diferencias entre las muestras de las dos DOPs mediante análisis de varianza de una vía (**ANOVA**). La relación entre los parámetros ultrasónicos y los datos microbianos, fisicoquímicos, de textura y sensoriales de las muestras de queso se evaluó mediante los coeficientes de **correlación de Pearson (r)** y el **análisis de componentes principales (PCA)**. Finalmente, se aplicó un **análisis de regresión lineal multivariante (MLR)** a los datos utilizando un modelo de regresión *paso a paso* para explorar la capacidad de los parámetros ultrasónicos para predecir las variables estudiadas en los quesos.

6.3. Parámetros de ultrasonidos

Los resultados obtenidos para los parámetros de ultrasonido determinados en los lotes de queso se presentan en la Tabla 6.2. **La velocidad longitudinal ultrasónica (UPV_L) mostró valores medios de 1.571 y 1.611 m/s para los transductores V150-RB y V151-RB, respectivamente.** Este parámetro ultrasónico es la medida más fiable y simple para la evaluación de las propiedades de los alimentos, incluidos los diferentes tipos de queso (Benedito et al., 1998; Gallo et al., 2018).

Tabla 6.2. Estadísticos descriptivos de los parámetros de ultrasonido medidos con dos transductores diferentes en los quesos estudiados.

Parámetros	Transductor V150-RB					Transductor V151-RB				
	Media	DE ¹	%DER ²	Min ³	Max ³	Media	DE	%DER	Min	Max
<i>Parámetros relacionados con la velocidad</i>										
UPV _L (m/s)	1,571	95	6,06	1,101	1,731	1,611	65	4,02	1,316	1.703
UPV _s (m/s)	789	74	9,39	561	940	834	74	8,88	574	1.018
UPV _s /UPV _L (m/s)	0,502	0,032	6,36	0,430	0,610	0,518	0,039	7,61	0,420	0,610
Módulo de Young (E)	1,63E+09	3,09E+08	19,00	7,82E+08	2,36E+09	1,79E+09	3,09E+08	17,27	8,96E+08	2,54E+09
Coefficiente de Poisson (ν)	0,330	0,030	9,22	0,200	0,390	0,313	0,041	12,98	0,200	0,390
Módulo volumétrico (κ)	1,60E+09	2,35E+08	14,67	6,60E+08	2,03E+09	1,63E+09	2,18E+08	13,41	1,00E+09	1,97E+09
Módulo de corte (μ)	6,14E+08	1,27E+08	20,71	3,00E+08	9,17E+08	6,84E+08	1,34E+08	19,62	3,22E+08	1,06E+09
Constante de Lamé (λ)	1,19E+09	2,13E+08	17,85	4,60E+08	1,67E+09	1,17E+09	2,32E+08	19,80	5,10E+08	1,57E+09
<i>Frecuencias</i>										
HAF ⁴ (Hz)	274.666	46.009	16,75	125.219	420.787	341.683	137.617	40,28	164.703	604.222
FFT ₂₅ (Hz)	247.145	33.041	13,37	160.815	321.881	288.721	78.570	27,21	164.866	486.103
FFT ₅₀ (Hz)	283.882	27.224	9,59	226.368	357.645	388.151	94.559	24,36	224.336	580.465
FFT ₇₅ (Hz)	323.080	27.019	8,36	251.319	420.787	500.362	83.706	16,73	290.768	691.910
FFT ₉₉ (Hz)	514.269	60.324	11,73	380.305	630.755	754.806	64.038	8,48	603.658	913.680
<i>Atenuaciones</i>										
AT 10	1,41	0,31	21,91	1,06	2,19	1,29	0,23	17,97	1,04	2,14
AT 20	1,58	0,41	25,88	1,07	2,77	1,43	0,33	23,03	1,05	2,50
AT 30	1,74	0,48	27,89	1,10	3,07	1,56	0,40	25,59	1,05	2,79
AT 40	1,88	0,55	29,26	1,11	3,21	1,70	0,48	28,48	1,07	3,11
AT 50	2,06	0,62	30,20	1,12	3,36	1,87	0,56	30,13	1,08	3,37
AT 60	2,27	0,71	31,24	1,16	3,76	2,09	0,64	30,74	1,11	3,75
AT 70	2,56	0,86	33,48	1,19	4,28	2,36	0,76	32,17	1,14	4,24
AT 80	2,88	0,98	34,06	1,24	4,88	2,78	0,93	33,36	1,21	5,30
AT 90	3,64	1,21	33,12	1,30	6,14	3,51	1,12	31,90	1,51	6,59

¹DE: Desviación estándar.

²%DER: Desviación estandar relativa expresada como porcentaje.

³Min (mínimo); Max (máximo).

⁴HAF: Frecuencia de mayor amplitud

En general, los valores obtenidos en este estudio coincidieron en gran medida con los encontrados en otros trabajos para el queso de pasta blanda “Torta del Casar” (Crespo et al., 2020), pero fueron inferiores a los observados para el queso de textura firme. Para el queso manchego, los valores medios de la velocidad ultrasónica oscilaron entre 1,622 y 1,679 m/s a 8 °C, muy similares a los encontrados para el queso Cheddar madurado a 12 °C (1,677 m s⁻¹) con transductores de 1 MHz y una cerámica piezo eléctrica de 1,9 cm de diámetro (Benedito et al., 2000a, 2006). En el caso del queso de Mahón se observó una relación lineal entre la velocidad ultrasónica en el queso y el tiempo de maduración, atribuida a cambios en los parámetros texturales durante la maduración (Benedito et al., 2000b). También **se determinaron la velocidad ultrasónica transversal (UPV_s) y la relación de velocidades (UPV_s / UPV_l), y se calcularon las constantes elásticas** a partir de las mediciones de la velocidad ultrasónica. De estos parámetros, la UPV_l mostró la desviación estándar relativa más baja (DER; 4,02-6,06%), mientras que la constante de Lamé (λ) y el módulo de corte (μ) presentaron los coeficientes de variación más altos (17,85% - 19,80% y 19,62% - 20,71 %, respectivamente). En general, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Crespo et al. (2020) para “Torta del Casar” durante la maduración, donde el nivel de dispersión de los parámetros está relacionado con la mayor velocidad obtenida con el transductor V150-RB que con el transductor V151-RB. Estos autores también observaron que los valores de **% DER de las medidas de frecuencia fueron mayores para el transductor V151-RB** que para el transductor V150-RB, principalmente para la frecuencia de mayor amplitud, mostrando el 40,28% de la variabilidad en este estudio. En este sentido, también cabe señalar que para todos los parámetros de frecuencia (FFT₂₅, FFT₅₀, FFT₇₅ y FFT₉₉), los valores obtenidos con el transductor V151-RB fueron claramente superiores a los obtenidos con el V150-RB, precisamente por la menor frecuencia de este último. En cuanto a los **parámetros relacionados con la atenuación, se observaron valores ligeramente superiores en los obtenidos con los transductores V150-RB**, lo cual es lógico en el sentido de que valores más altos de estos parámetros de atenuación son indicativos de una menor atenuación de las ondas ultrasónicas (Crespo et al., 2020), que obviamente debe ocurrir con las ondas emitidas por el transductor de menor frecuencia, en nuestro estudio, el V150-RB. Además, los datos de dispersión variaron del 17,97% (AT 10 para el transductor V151-RB) al 34,06% (AT 80 para el transductor V150-RB). La alta variabilidad encontrada para algunos parámetros de ultrasonido puede estar relacionada con la variabilidad del conjunto de datos en los parámetros fisicoquímicos y de textura asociados con la calidad sensorial del queso.

6.4. Parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y de textura

6.4.1. Análisis microbiológicos

Los recuentos de **BAM y BALM fueron superiores a 8 log ufc/g** en ambos lotes, mostrando valores medios ligeramente superiores de recuentos de BALM ($p = 0,067$) en el lote de Serena que en el lote de Casar (Tabla 6.3). Se han descrito que las BALM son los grupos microbianos predominantes durante la maduración de los quesos de leche de oveja de pasta

blanda coagulados con coagulantes vegetales, como los quesos “Serra da Estrela”, “Serpa”, “Queso de La Serena” y “Torta del Casar” (Fernández Del Pozo et al., 1988a; Tavaría & Malcata, 1998; Ordiales et al., 2013a, b; Gonçalves et al., 2018), en las que alcanzan comúnmente recuentos viables de 8 log ufc/g en el producto final. **El resto de los grupos bacterianos estudiados oscilaron entre 4,9 log ufc/g de CGPCP en el lote de Serena y 6,4 log ufc/g de enterococos en el lote de Casar.** Este último grupo microbiano presentó ($p < 0,1$) recuentos más altos para el lote Casar, mientras que BALT, CGPCP y las enterobacterias no presentaron diferencias significativas. Estas poblaciones microbianas son comunes en los quesos elaborados con leche cruda (Freitas & Malcata, 2000). Las enterobacterias mostraron mayor variabilidad en el lote Casar con un valor de % DER de 28.5%, en contraste con BMA y BALM con valores de % DER menores al 5% para ambos lotes estudiados.

En cuanto a los recuentos de mohos y levaduras, los valores medios de los recuentos de levaduras fueron superiores a 3 log ufc/g en concordancia con los resultados reportados en otros trabajos (Ordiales et al. 2013a, b), con valores medios mayores ($p = 0,068$) en el lote de La Serena. En el caso de los mohos, los recuentos encontrados en la pasta de los quesos no fueron relevantes (Tabla 6.3).

6.4.2. Parámetros fisicoquímicos

Los valores de los parámetros fisicoquímicos para los lotes de queso se muestran en la Tabla 6.3. **No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en los valores de humedad, proteína bruta, grasa y sal** (calculada a partir de la concentración de cloruro) entre los quesos de las dos DOPs estudiadas, con rangos de 45,8%–46,7%, 21,1%–21,4%, 29,1%–29,4% y 2,1%–2,3%, respectivamente. En general, estos resultados fueron similares a los reportados para otros quesos blandos, entre ellos la “Torta del Casar” (Ordiales et al., 2014; Roa et al., 1999; Sanjuán et al., 2002). Sin embargo, se encontraron **diferencias significativas para los valores de pH** entre los lotes, probablemente debido a la actividad metabólica de BALM en este tipo de queso durante la maduración. De hecho, el valor de pH más bajo en el lote de Serena puede estar asociado con el mayor recuento de BALM encontrado en este lote. **La concentración de sal y la acidez mostraron la mayor variabilidad** en los parámetros fisicoquímicos, con rangos de DER de 33,4%–43,6% y 39,6%–39,8%, respectivamente. Por el contrario, el pH y la proteína total presentaron valores de DER iguales o menores al 5%.

Tabla 6.3. Parámetros microbianos, fisicoquímicos y de textura de los quesos estudiados.

Parámetros ¹	Torta del Casar					Queso de La Serena					P valores
	Media	DE	%DER	Max	Min	Media	DE	%DER	Max	Min	
<i>Parámetros microbiológicos (log ufc/g⁻¹)³</i>											
BAM	8,6	0,4	4,5	9,0	8,0	8,8	0,2	2,2	9,1	8,6	0,334
BALM	8,3	0,4	4,7	8,7	7,8	8,7	0,2	2,8	8,9	8,4	0,067
BALT	6,1	0,8	13,1	6,8	4,7	5,6	1,4	24,2	7,4	4,0	0,505
CGPCP	5,1	0,5	9,9	5,6	4,4	4,9	1,1	23,6	6,4	3,5	0,661
Enterococci	6,4	0,9	13,7	6,9	4,7	5,6	0,7	12,4	6,5	4,9	0,090
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,8	1,6	28,5	7,6	3,6	5,9	1,0	16,5	7,0	4,7	0,842
Coliformes totales	5,5	1,9	34,1	7,4	3,0	5,6	1,0	17,4	6,7	4,5	0,826
Levaduras	3,3	0,7	19,9	4,1	2,6	4,0	0,4	10,7	4,3	3,1	0,068
Mohos	0,06	0,14	245	0,33	0,00	0,07	0,16	245	0,40	0,00	0,901
<i>Parámetros fisico-químicos</i>											
Humedad (%)	46,7	3,5	7,6	50,4	40,3	45,8	2,1	4,6	49,3	43,6	0,627
Proteína bruta (%)	21,4	0,9	4,3	22,5	20,2	21,1	0,8	3,9	22,6	20,4	0,509
Proteína b. ES ² (%)	40,4	2,5	6,2	42,9	37,3	39,0	2,0	5,1	42,2	37,1	0,323
Grasa (%)	29,4	2,9	9,9	32,8	25,6	29,1	3,2	10,9	33,8	25,3	0,860
Grasa ES (%)	55,1	4,2	7,6	58,8	47,8	53,6	4,4	8,3	60,2	47,2	0,550
Sal (%)	2,3	1,0	43,6	4,4	1,5	2,1	0,7	33,4	3,5	1,5	0,715
pH	5,8	0,3	5,0	6,1	5,4	5,4	0,2	3,7	5,6	5,1	0,025
Acidez (mg KOH g ⁻¹)	12,8	5,1	39,6	18,1	5,6	8,1	3,2	39,8	12,1	3,2	0,088
<i>Análisis de compresión (TCA)</i>											
Firmeza (g)	3796	3120	82,2	9986	1670	3412	2209	65	7349	1121	0,811
Pegajosidad (g)	-39,8	39,4	-99,0	-4,8	-113	-28,7	25,6	-89,5	-3,7	-59,0	0,574
<i>Análisis de untuosidad (TSA)</i>											
Firmeza (g)	723	635	87,8	1593	73	805,8	317,3	39,4	1288	363	0,782
T. de cizalla (g·s)	0,028	0,023	81,7	0,070	0,008	0,022	0,011	52,0	0,041	0,008	0,549
Pegajosidad (g)	-449	395	-87,9	-50	-987	-606	318	-53	-193	-995	0,467
T. de adhesión (g·s)	-166	108	-65,0	-56	-320	-230	112	-49	-72	-383	0,337

¹DE: Desviación estandar; %DER desviación estándar relativa.

²ES: Extracto seco.

³BAM: Bacterias aerobias mesófilas; BALM: Bacterias ácido lácticas mesófilas; BALT: Bacterias ácido lácticas termófilas; CGPCP: cocos Gram-positivos catalase positivos.

6.4.3. Análisis de textura

La Tabla 6.3 también muestra las estadísticas descriptivas de los parámetros de TCA y TSA en los dos lotes. **Para el TCA**, los valores medios de firmeza y pegajosidad variaron de 3412 a 3796 g y de -39,8 a -28,7 g, respectivamente. La ausencia de diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los dos tipos de quesos se debió principalmente a la **gran variabilidad intra-lote** encontrada en estos parámetros (% DER superior a 65%). Los valores medios de los parámetros de TCA son similares a los observados para otros quesos coagulados con cardo caracterizados por una proteólisis extensa (Crespo et al., 2020). De igual forma, los resultados para los **parámetros TSA no mostraron diferencias entre los lotes estudiados**, y los rangos de valores observados fueron comparables a los reportados previamente para este tipo de queso (Delgado et al., 2010a). Nuevamente, la **heterogeneidad intra-lote** fue obvia, con una variabilidad de los parámetros de TSA claramente mayor para la Torta de Casar con valores de % DER superiores al 65%, mientras que para los Queso de La Serena de pasta blanda los valores alcanzados fueron inferiores al 52%. Esto pone de relieve la necesidad de una evaluación no destructiva de estos parámetros esenciales para la calidad de este tipo de queso.

6.5. Análisis sensorial

Los resultados para los **atributos descriptivos sensoriales** de los quesos y su correlación con la aceptación general se muestran en la Tabla 6.4. En cuanto a la variabilidad, los descriptores mostraron valores de **% DER similares para ambos lotes estudiados** excepto para los descriptores de aceptación, que mostraron una mayor dispersión en los Quesos de La Serena (datos no mostrados). Los valores de los atributos **aspecto corteza, amargo, picante, intensidad y persistencia** fueron mayores para las Tortas del Casar. A excepción del descriptor "amargo", todos ellos **se correlacionaron con la aceptación general junto con la cremosidad**. La relación entre cremosidad y aceptación general en el análisis sensorial se ha descrito ampliamente para quesos de pasta blanda, asociándose no solo con la actividad proteolítica del coagulante vegetal sino también con la población microbiana (Guiné et al., 2016; Tavaría & Malcata 2003b). Una alta actividad enzimática en este tipo de quesos también se ha relacionado con descriptores como amargo, picante, intensidad y persistencia (Ordiales et al., 2014). Sin embargo, con respecto al descriptor firmeza, las diferencias encontradas entre ambos lotes no fueron significativas ($p < 0,05$), y su variabilidad en este estudio (% DER 12.4-15.2) no se correlacionó significativamente con la aceptación general.

Table 6.4.- Atributos sensoriales descriptivos de los quesos y su correlación con la aceptación general.

Atributos sensoriales	Torta del Casar					Queso de la Serena					P value ²	Acep.Gen. ³	
	Media	DE ¹	%DER	Max	Min	Media	DE	%DER	Max	Min		Coef	Sig.
Apariencia (corteza)	7,63	0,49	6,5	8,2	7,0	5,34	1,84	34,4	8,0	3,2	0,014	0,612	**
Apariencia (pasta)	4,43	0,60	13,4	5,2	3,7	4,00	0,98	24,5	5,6	2,6	0,378	0,214	
Firmeza	4,20	0,52	12,4	5,1	3,6	4,15	0,63	15,2	5,1	3,3	0,899	-0,371	
Cremosidad	6,34	0,51	8,0	6,8	5,5	6,17	0,83	13,4	7,3	5,0	0,660	0,561	*
Salado	5,41	0,45	8,3	6,2	5,0	4,91	0,44	9,1	5,5	4,4	0,078	0,568	*
Amargo	4,27	0,45	10,6	4,9	3,7	3,61	0,36	10,0	4,0	3,0	0,019	0,485	
Picante	3,81	0,54	14,2	4,6	3,2	3,00	0,37	12,4	3,3	2,3	0,013	0,552	*
Ácido	4,70	0,45	9,5	5,4	4,2	4,36	0,55	12,6	5,2	3,7	0,278	0,338	
Astringente	3,99	0,44	11,2	4,8	3,7	3,52	0,30	8,4	3,9	3,2	0,058	0,445	
Rancio	2,50	0,37	15,0	2,8	1,9	2,17	0,32	14,6	2,7	1,9	0,129	0,203	
Intensidad	6,63	0,40	6,0	7,3	6,1	5,93	0,40	6,8	6,4	5,2	0,013	0,612	**
Persistencia	6,37	0,45	7,1	6,9	5,6	5,75	0,48	8,3	6,1	4,8	0,043	0,509	*

¹DE: Desviación estándar; %DER desviación estándar relativa.

²Fuente en negrita indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre lotes.

³Acep. Gen.: Aceptación general; Coef: Coeficiente de correlación de Pearson para cada atributo sensorial descriptivo; Sig: significancia (prueba de dos colas); *: Sig <0.05; **: Sig <0.01.

6.6. Relación de parámetros microbianos, fisicoquímicos, texturales y sensoriales con parámetros de ultrasonidos

Las correlaciones de los parámetros de ultrasonido obtenidos usando ambos transductores (V150-RB y V151-RB) con parámetros microbiológicos, fisicoquímicos, texturales y sensoriales evidenciaron que **el transductor V150-RB mostró un mejor comportamiento que el transductor V151-RB** (Tabla 6.5). Por lo tanto, los parámetros ultrasónicos obtenidos con el transductor V150-RB se utilizaron para el análisis de componentes principales (PCA) (Figura 6.1, 6.2).

Table.6.5. Correlaciones significativas (sig <0.05) entre parámetros microbianos, fisicoquímicos, texturales y sensoriales de quesos de pasta blanda con los parámetros de ultrasonidos obtenidos con los transductores estudiados.

Parámetros ultrasónicos	Transductor V150-RB				Transductor V151-RB			
	Micr. ¹	Fis ² .	Text ³	Sens ⁴ .	Micr. ¹	Fis ² .	Text ³	Sens ⁴ .
<i>Parámetros relacionados con la velocidad</i>								
UPV _L (m/s)				-1,-12	2			-1
UPV _S (m/s)				-1				-3⁵
UPV _S /UPV _L		-3		8				4
Módulo de Young's (E)				-1, -12				-3
Coefficiente de Poisson (ν)		3		1, -8				-4
Módulo volumétrico(κ)				-2, -12				
Módulo de corte (μ)				-1, -12				-3
Constante de Lamé's (λ)				-12				
<i>Frecuencias</i>								
HAF (Hz)		6		6, 7, 11, 12				9
FFT ₂₅ (Hz)	-8, 5							6, 7, 9, 13
FFT ₅₀ (Hz)	-8		1	8				
FFT ₇₅ (Hz)	-8		1	8				
FFT ₉₉ (Hz)				5, 7, 8, 13				
<i>Atenuaciones</i>								
AT 10				-1	-4			-1, 3
AT 20				-1	-4			-1, 3
AT 30				-1	-4			-1, 3
AT 40				-1	-4			-1, 3
AT 50					-4			-1, 3
AT 60					-4			-1
AT 70					-4			-1
AT 80					-4			-1
AT 90			-1		-4		-1	-1

¹Parámetros microbianos: BAM (1), BALM (2), BALT (3), CGPCP (4), Enterococos (5), *Enterobacteriaceae* (6), Coliformes totales (7), Levaduras (8), Mohos (9).

²Parámetros fisicoquímicos: Humedad (1), Proteína bruta (2), Proteína bruta ES (3), Grasa (4), Grasa ES (5), Sal (6), pH (7), Acidez (8).

³Parámetros de textura: TCA: Firmeza (1), Pegajosidad (2); TSA: Firmeza (3), Trabajo de cizallamiento (4), Pegajosidad (5), Trabajo de adherencia (6).

⁴Análisis sensorial: Aspecto (corteza) (1), Aspecto (pasta) (2), Firmeza (3), Cremosidad (4), Salado (5), Amargo (6), Picante (7), Ácido (8), Astringente (9), Rancio (10), Intensidad (11), Persistencia (12), Aceptación general (13).

⁵ Fuente en negrita: valor Sig <0.01.

El PCA de los parámetros microbianos, físicoquímicos, texturales, sensoriales y ultrasónicos mostró grandes diferencias entre las muestras de queso fabricadas en diferentes DOPs, permitiendo su discriminación en base al PC1 y PC2 (Figura 6.1). **PC1 representó el 29,84%** de la variabilidad del modelo y fue definido principalmente por la atenuación en el eje positivo y la mayoría de los parámetros relacionados con la velocidad a lo largo del eje negativo; sin embargo, también se definió por varios parámetros sensoriales y, en menor medida, por recuentos microbianos (BALM y BAM) (Figura 6.1A). Concretamente, los descriptores firmeza (Fir_s) y persistencia (Per) mostraron la correlación negativa más significativa con κ ($R = 0,671$ y $0,689$, respectivamente), mientras que para apariencia de corteza (Vis_c), el valor absoluto más alto del coeficiente de correlación fue con μ ($R = 0,734$) y E ($R = 0,715$). La “firmeza”, “rigidez” y “dureza” pueden relacionarse con κ , μ y E, respectivamente (Ludger & Teixeira, 2007). El módulo de cizalla (μ) se refiere a la deformación del queso cuando se aplica una fuerza paralela a su superficie; por lo tanto, los quesos con una corteza rígida y bien formada tendrían valores más bajos para este parámetro ultrasónico.

El PC2 y PC3 explicaron el 19,13% y el 16,60% de la varianza, respectivamente (Figura 6.2), pudiendo observar una cierta distribución de muestras según la temporada (Figura 6.2B). PC2 se definió por los parámetros de textura TSA (pegajosidad y trabajo de adhesión por el eje positivo; firmeza por el eje negativo), índice de acidez grasa, pH, descriptores sensoriales (rancio, astringente, picante y amargo) y en menor medida por ciertos grupos microbianos (CGPCP y enterobacterias) (Figura 6.2A). La contribución de estos grupos microbianos a la lipólisis y proteólisis puede explicar su relación con los parámetros antes mencionados. Se ha descrito la relación entre la actividad textural y proteolítica para este tipo de queso, observándose que la degradación de la matriz de caseína disminuye la dureza y consistencia de la “Torta del Casar” y aumenta su adhesividad durante la maduración (Delgado et al., 2010a). Los valores altos de pH en “Torta del Casar” se han asociado con el efecto tamponador que ejercen los productos de la hidrólisis de proteínas (Ordiales et al., 2014), que también contribuyen a la acumulación de péptidos amargos en el queso (Broadbent et al., 1998). Además, la actividad lipolítica en el queso conlleva la liberación ácidos grasos, algunos de ellos asociados con descriptores de picante y rancidez (Salles et al., 2002). Varios parámetros sensoriales, incluidos algunos de los mencionados anteriormente, presentaron los coeficientes de correlación más altos ($R > 0,683$) con el parámetro de frecuencia FFT99 y HAF, como son los descriptores salado, picante, índice de acidez de la grasa, intensidad y aceptación general (Figura 6.2A). Por lo tanto, los cambios estructurales en los quesos asociados con una mayor actividad proteolítica y lipolítica podrían explicar estas correlaciones. Con respecto a PC3, este fue definido por otros parámetros de frecuencia (FFT25, FFT50 y FFT75) y UPVS / UPVL en el eje positivo y principalmente por v en el eje negativo (Figura 6.2A). Este último parámetro de ultrasonido mostró los valores positivos más altos para el coeficiente de correlación ($R = 0,639$) con la proteína total ES, mientras que FFT75 presentó una correlación significativa ($R = 0,604$) para la firmeza del

parámetro de textura TCA. Este resultado sugiere que las muestras más rígidas favorecerían la transmisión de ondas ultrasónicas de mayor frecuencia. El resto de los parámetros fisicoquímicos no se asociaron claramente a ningún PC, y su variabilidad explicada se distribuyó entre los tres PC estudiados.

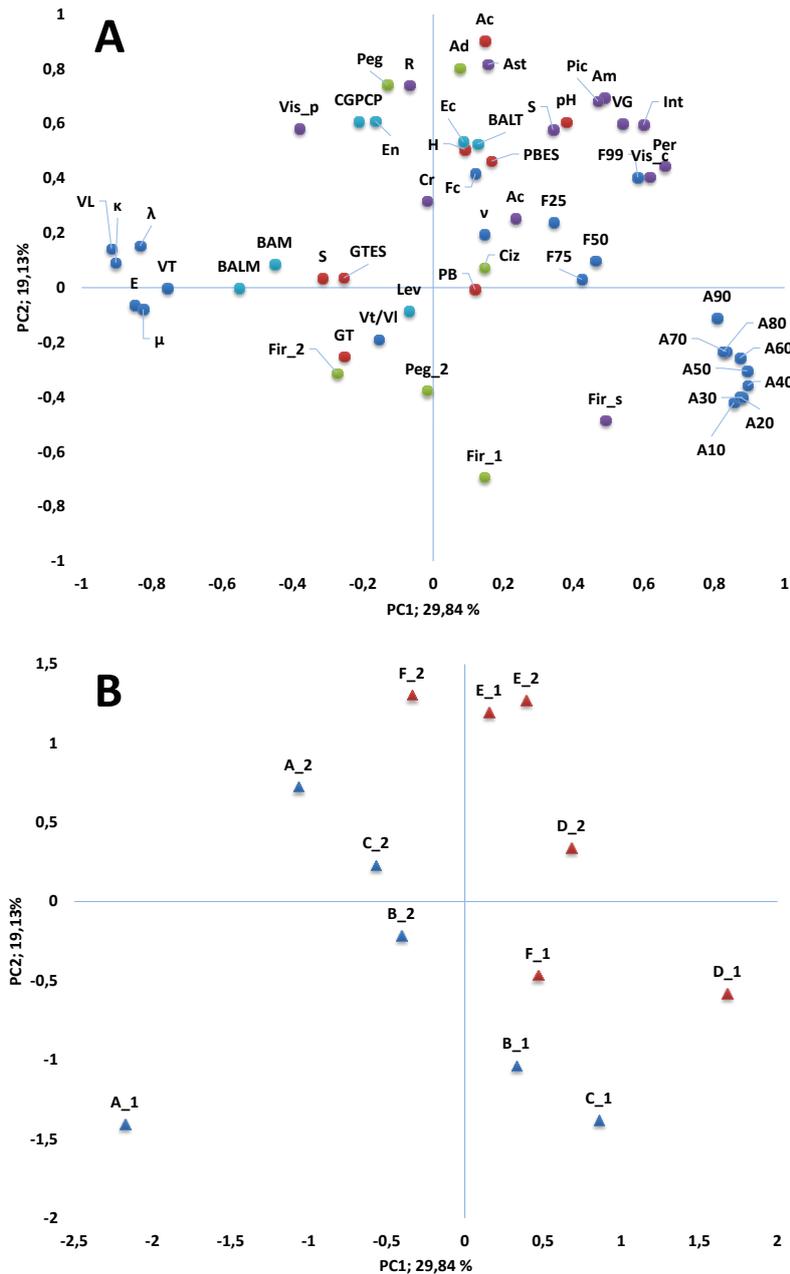


Figura 6.1. Gráficas de carga (A) y de puntuación (B) en los planos definidos por los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) del ACP de los atributos de calidad y parámetros de ultrasonido de los quesos de cuerpo blando “Torta del Casar” y “Queso de la Serena”. Parámetros microbianos (●): BAM; BALT; BALM; CGPCP; Enterococos (Ec); *Enterobacteriaceae* (En); Levaduras (Lev). Parámetros fisicoquímicos (●): Humedad (H); Proteína bruta (PB); Proteína bruta en ES (PBES); Grasa (GT); Grasa en ES (GTES); Sal (S) y Acidez (Ac). Parámetros reológicos (●): TSA Firmeza (Fir_1); TSA Trabajo de cizallamiento (Ciz); Pegajosidad TSA (Peg); TSA Trabajo de adhesión (Ad); Firmeza del TCA (Fir_2) y Pegajosidad del TCA (Peg). Parámetros sensoriales (●): Apariencia externa (Vis_c); Apariencia interna (Vis_p); Firmeza (Fir_s); Cremosidad (Cr); Salado (S); Amargo (Am); Picante (Pic); Ácido (Ac); Astringente (Ast); Rancio (R); Intensidad (Int); Persistencia (Per) y Aceptación General (VG). “Torta del Casar” (▲); “Queso de la Serena” (▲); temporada de invierno (_1); temporada de primavera (_2).

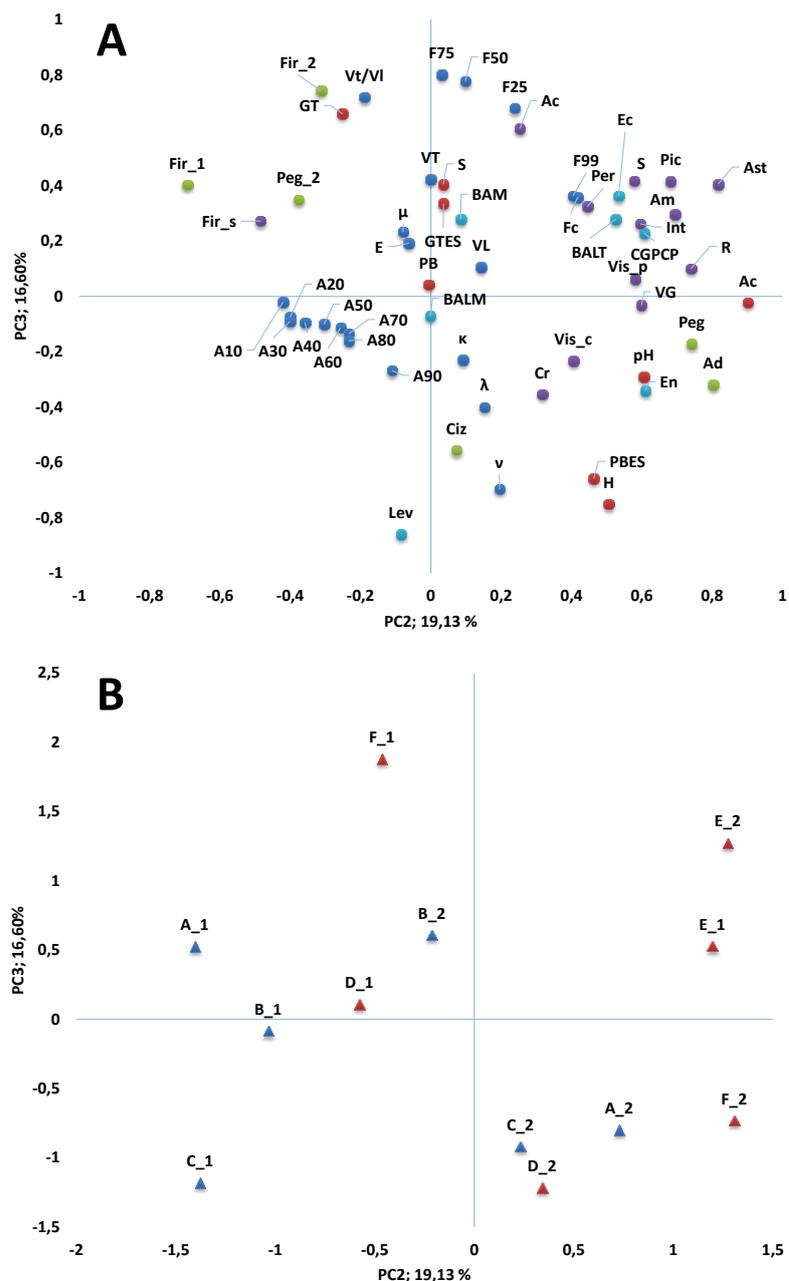


Figura 6.2. Gráficas de carga (A) y de puntuación (B) en los planos definido por los componentes principales 2 y 3 (PC2 y PC3) del ACP de los atributos de calidad y parámetros de ultrasonido de los quesos de pasta blando “Torta del Casar” y “Queso de La Serena”. Parámetros microbianos (●): BAM; BALT; BALM; CGPCP; Enterococos (Ec); *Enterobacteriaceae* (En); Levaduras (Lev). Parámetros fisicoquímicos (●): Humedad (H); Proteína bruta (PB); Proteína bruta en ES (PBES); Grasa (GT); Grasa en ES (GTES); Sal (S) y Acidez (Ac). Parámetros reológicos (●): TSA Firmeza (Fir_1); TSA Trabajo de cizallamiento (Ciz); Pegajosidad TSA (Peg); TSA Trabajo de adhesión (Ad); Firmeza del TCA (Fir_2) y Pegajosidad del TCA (Peg 2). Parámetros sensoriales (●): Apariencia externa (Vis_c); Apariencia interna (Vis_p); Firmeza (Fir_s); Cremosidad (Cr); Salado (S); Amargo (Am); Picante (Pic); Ácido (Ac); Astringente (Ast); Rancio (R); Intensidad (Int); Persistencia (Per) y Aceptación General (VG). “Torta del Casar” (▲); “Queso de La Serena” (▲); temporada de invierno (_1); temporada de primavera (_2).

Para predecir el comportamiento de los parámetros microbianos, fisicoquímicos, texturales y sensoriales de los quesos mediante los **parámetros ultrasónicos como variables predictoras, se utilizó el método de regresión lineal múltiple (RLM)** (Tabla 6.6). Los modelos predictivos para el parámetro **firmeza (TCA)** y del **descriptor sensorial “intensidad”** mostraron los coeficientes de correlación más altos ($r = 0,928$ y $0,918$, respectivamente), lo que indica que el 80,9% y el 78,5% de la variación en estas variables relevantes para la calidad de los quesos podría predecirse a partir de varios parámetros ultrasónicos secundarios, según el coeficiente de determinación ajustado (adj-R^2) de los modelos RLM (Tabla 6.6). Las variables explicativas para predecir el resultado de firmeza del TCA fueron FFT_{75} , FFT_{99} y AT60 , mientras que en el caso del descriptor sensorial intensidad fueron HAF , V_L y FFT_{99} , no mostrando colinealidad entre variables para ambos modelos ($\text{FIV} < 10$). Este último parámetro de ultrasonido también proporcionó el **modelo de regresión lineal simple** mejor ajustado a los valores de **aceptación general**. En base a los modelos de regresión obtenidos, la relación entre los parámetros de ultrasonido y la firmeza del TCA, la intensidad del descriptor sensorial y la aceptación general se muestra en la Figura 6.3. Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados, el papel de parámetros de ultrasonido hasta ahora secundarios en el control de calidad del queso, como FFT y atenuación, deben ser considerados. Los valores de atenuación ya demostraron ser una herramienta útil para discriminar quesos blandos con diferentes defectos (Crespo et al, 2020), mientras que los parámetros vinculados a la FFT y atenuación mostraron la mayor significación en sus correlaciones lineales con parámetros de textura para lomo de cerdo cocinado (González-Mohino et al., 2021).

Tabla 6.6. Indicadores estadísticos, coeficientes de los modelos RLM y su significación para los modelos RLM desarrollados para el parámetro firmeza TCA y el atributo sensorial “intensidad” utilizando la técnica de regresión escalonada.

	Variables respuesta							
	Firmeza (TCA)				Atributo sensorial “Intensidad”			
Resumen del modelo								
R	0,928				0,918			
R-cuadrado	0,861				0,843			
R-cu. (adj) ¹	0,809				0,785			
Std error	1130				0,24			
ANOVA								
Valores F	16,5				14,4			
Valores P	0,001				0,001			
Coeficientes								
		Variables explicativas				Variables explicativas		
Termino	(Intercepto)	F ₇₅	F ₉₉	AT 60	(Intercepto)	HAF	VL	F ₉₉
<i>Coef NE.²</i>								
B	-30198	0,18	-0,04	-1584	7,550	3,7E-06	-3,0E-03	4,3E-06
Std. Error	6452	0,029	0,012	639	2,476	7,7E-07	1,2E-03	1,8E-06
<i>Coef S.³</i>								
Beta		1,200	-0,686	-0,373		0,707	-0,363	0,361
t-value	-4,681	6,26	-3,283	-2,479	3,049	5,035	-2,380	2,369
P value	0,002	0,000	0,011	0,038	0,016	0,001	0,045	0,045
FIV ⁴		2,115	2,519	1,300		1,008	1,190	1,185

¹ R-cu (adj): R-cuadrado ajustada

² Coef. NE.: Coeficientes no estandarizados.

³ Coef. ES.: Coeficientes estandarizados

⁴ FIV: Factor de inflación de la varianza.

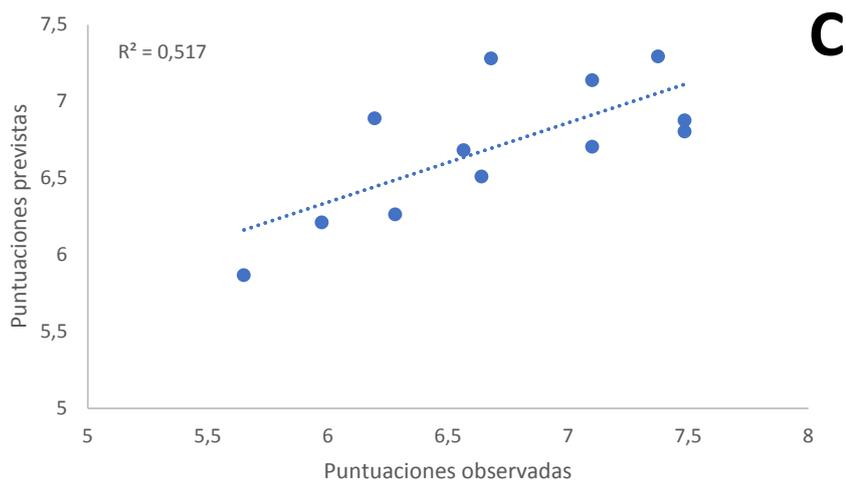
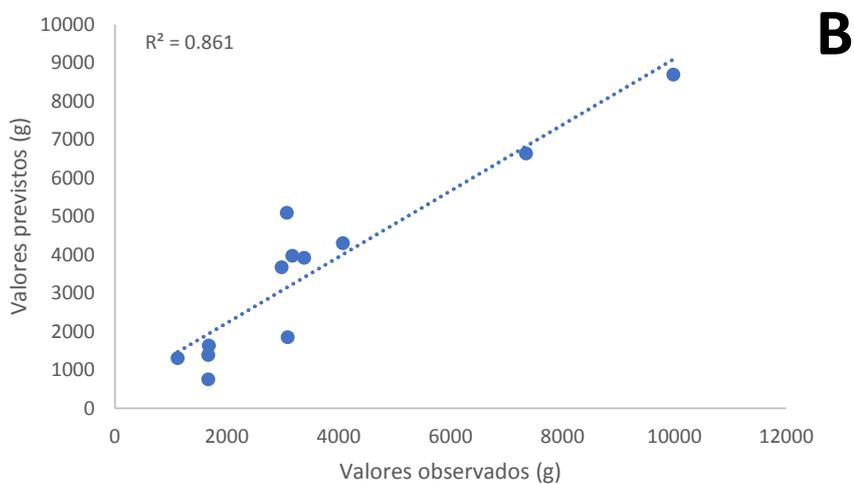
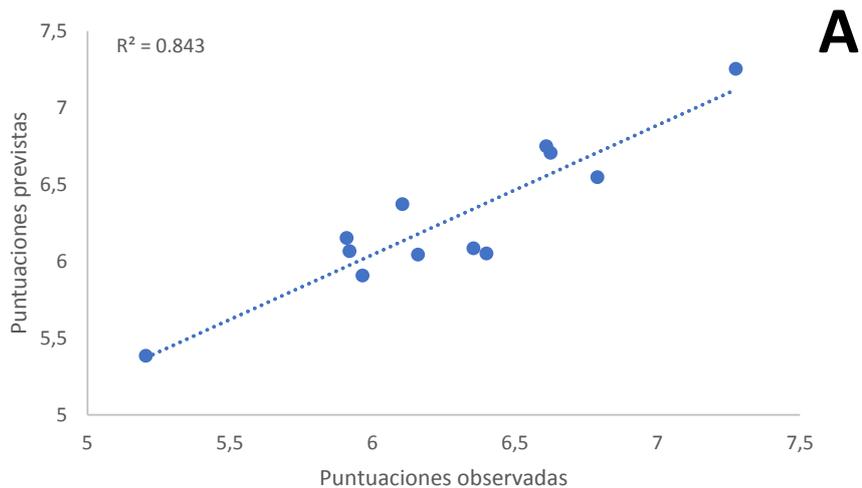


Figura 6.3. Comparación entre los valores del atributo sensorial “intensidad” (A) y la firmeza (TCA) observados y pronosticados (B) y para la regresión lineal múltiple (RLM) y aceptación general (C) para la regresión lineal simple (RLS).

En resumen, en este estudio queda patente la utilidad de los parámetros de ultrasonidos en el control de calidad de quesos de pasta blanda, confirmando la alta correlación entre varios parámetros de ultrasonidos y cambios en las propiedades fisicoquímicas, texturales y sensoriales de este producto, que están parcialmente asociados con la actividad microbiana. Hasta la fecha, en quesos de pasta blanda, como “Torta del Casar” y “Queso de La Serena”, este es el primer estudio de literatura que reporta el potencial predictivo de varios parámetros ultrasónicos secundarios para atributos de calidad relevantes de quesos y, a su vez, validar la capacidad en línea del ultrasonido para la evaluación no destructiva de la calidad del queso blando a nivel industrial.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

PRIMERA. La utilidad de los ultrasonidos en el control del proceso de cuajado de la leche cruda en la elaboración de quesos de pasta blanda con coagulante vegetal queda evidenciada en este estudio, observándose cambios en los parámetros de ultrasonidos asociados a los cambios correspondientes a las fases del cuajado. Ello permitió estimar el tiempo de corte de la cuajada en función del tiempo de cuajado.

SEGUNDA. Parámetros secundarios de ultrasonidos como es el caso de los componentes de frecuencia, no empleados usualmente en el control de calidad de los alimentos, han demostrado ser considerablemente útiles en la estimación de parámetros fisicoquímicos tan relevantes como el contenido de proteínas, tanto en la leche cruda como en la cuajada.

TERCERA. El estudio ultrasónico de los quesos, tanto durante su maduración como en producto final, pone de manifiesto el mejor desempeño de transductores de onda transversal con frecuencias de resonancia próximas a 250 kHz que aquellos otros a 500 kHz, para su uso en el control de calidad del queso de pasta blanda.

CUARTA. La utilidad de los parámetros de ultrasonidos en el control de calidad de quesos blandos durante el proceso de maduración y en producto final queda patente en la alta correlación entre varios parámetros de ultrasonidos y cambios en las propiedades fisicoquímicas, texturales y sensoriales de este producto. Ello permitió el desarrollo de modelos discriminantes para la detección precoz de defectos durante la maduración de los quesos y modelos predictivos para el control de calidad del producto final.

QUINTA. Valores de atenuación de los ultrasonidos (principalmente para AT 40 y AT 50) y parámetros de ultrasonido relacionados con la velocidad, como v , k , E y V_T han sido clave para el desarrollo de modelos discriminantes que permiten la diferenciación de quesos con texturas defectuosas durante la maduración, validando así la capacidad de los ultrasonidos para el control no destructivo y en línea del proceso de elaboración del queso de pasta blanda.

SEXTA. El uso de varios parámetros ultrasónicos secundarios permitió el desarrollo de modelos de regresión lineal múltiple (RLM) para la predicción de atributos de calidad relevantes de quesos, tanto reológicos como sensoriales y, a su vez, validar la capacidad de los ultrasonidos para la evaluación no destructiva de la calidad del queso de pasta blanda a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aernouts, B., Polshin, E., Saeys, W., & Lammertyn, J. (2011). Mid-infrared spectrometry of milk for dairy metabolomics: a comparison of two sampling techniques and effect of homogenization. *Analytica chimica acta*, 705(1-2), 88-97.
- Agboola, S., Chen, S., & Zhao, J. (2004). Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Le Lait*, 84(6), 567-578.
- Agboola, S. O., Chan, H. H., Zhao, J., & Rehman, A. (2009). Can the use of Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.) coagulant overcome the quality problems associated with cheese made from ultrafiltered milk?. *LWT-Food Science and Technology*, 42(8), 1352-1359.
- Alegría, Á., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., & Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 44-51.
- Alexander, M., & Corredig, M. (2007). Spectroscopic methods to determine in situ changes in dairy systems—ultrasonic and light scattering. *Le Lait*, 87(4-5), 435-442.
- Alichanidis, E. (2007). 165 What causes early and late gas blowing in white-brined cheeses?. *Cheese problems solved*, 332.
- Almeida, C. M., & Simões, I. (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4675-4686.
- Ampuero, S., & Bosset, J. O. (2003). The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 94(1), 1-12.
- Andersen, L. T., Ardö, Y., & Bredie, W. L. (2010). Study of taste-active compounds in the water-soluble extract of mature Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 20(8), 528-536.
- Andrews, D. R. (2011). *Fundamentals of ultrasonics*. Cambridge Ultrasonics.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2000). *Official methods of analysis of the AOAC (15th ed.)*. Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemists. Determinación de densidad con lactodensímetro (AOAC 925.22, 1990).
- Ardö, Y., McSweeney, P. L., Magboul, A. A., Upadhyay, V. K., & Fox, P. F. (2017). Biochemistry of cheese ripening: proteolysis. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (4th Edition)*, McSweeney, P. L., Fox, P. F., Cotter, P.D., Everett, D.W (Eds.). Academic Press, Elsevier, pp. 445-482.

- Arqués, J. L., Garde, S., Gaya, P., Medina, M., & Nuñez, M. (2006). Inactivation of microbial contaminants in raw milk La Serena cheese by high-pressure treatments. *Journal of dairy science*, 89(3), 888-891.
- ASTM International. (2008). ASTM D2845-08. Standard test method for laboratory determination of pulse velocities and ultrasonic elastic constants of rock (Withdrawn 2017). West Conshohocken, PA, USA: American Society for Testing and Materials.
- Atanassova, M. R., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I. C., Garabal, J. I., & Centeno, J. A. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiology*, 53, 172-181.
- Avanesians, P., & Momayez, M. (2015). Wave separation: Application for arrival time detection in ultrasonic signals. *Ultrasonics*, 55, 15-25.
- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.
- Ay, C., & Gunasekaran, S. (1994). Ultrasonic attenuation measurements for estimating milk coagulation time. *Transactions of the ASAE*, 37(3), 857-862.
- Bachmann, H. P., Fröhlich-Wyder, M. T., Jakob, E., Roth, E., Wechsler, D., Beuving, E., & Buchin, S. (2011). Raw Milk Cheeses. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. Mc Sweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed.), vol. 1, Academic Press, Elsevier Ltd, San Diego, pp. 652-660.
- Bakkali, F., Moudden, A., Faiz, B., Amghar, A., Maze, G., De Espinosa, F. M., & Akhnaq, M. (2001). Ultrasonic measurement of milk coagulation time. *Measurement Science and Technology*, 12(12), 2154.
- Bamberger, J. A., Leonard, J., & Greenwood, M. S. (1999). Ultrasonic measurements for on-line real-time food process monitoring. American Institute of Chemical Engineers.
- Bansal, N., Fox, P. F., & McSweeney, P. L. (2007). Factors affecting the retention of rennet in cheese curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9219-9225.
- Barbosa, M., Corradini, C., & Battistotti, B. (1981). Cheese-making experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from Cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* p. 203.
- Bárcenas, P., Pérez, F. J., Salmerón, J., & Albisu, M. (1998). Caracterización y control de calidad del queso DO Idiazabal: aplicaciones del análisis sensorial. *Ovina y Caprina*, 23, 191-194.

- Bárcenas, P., Elortondo, F. P., Salmerón, J., & Albisu, M. (2001). Sensory profile of ewe's milk cheeses. *Food Science and Technology International*, 7(4), 347-353.
- Barreto, A., Cruz-Tirado, J. P., Siche, R., & Quevedo, R. (2018). Determination of starch content in adulterated fresh cheese using hyperspectral imaging. *Food Bioscience*, 21, 14-19.
- Basir, O. A., Zhao, B., & Mittal, G. S. (2006). U.S. Patent No. 6,993,972. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Ben Amira, A., Besbes, S., Attia, H., & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, 76-93.
- Benedito, J., Sanjuan, N., Carcel, J. A., & Mulet, A. (1998). Ultrasonic determination of cheese maturity. In G. Trystram & C. Skjöldebrand (Eds.), *Automatic Control of Food and Biological Processes: Proceedings of the Internal Symposium ACoFoP IV* (pp. 44–61). Göteborg, Sweden.
- Benedito, J., Carcel, J. A., Sanjuan, N., & Mulet, A. (2000a). Use of ultrasound to assess Cheddar cheese characteristics. *Ultrasonics*, 38, 727–730.
- Benedito, J., Carcel, J., Clemente, G., & Mulet, A. (2000b). Cheese maturity assessment using ultrasonics. *Journal of Dairy Science*, 83(2), 248–254.
- Benedito, J., Carcel, J., Gisbert, M., & Mulet, A. (2001). Quality control of cheese maturation and defects using ultrasonics. *Journal of food science*, 66(1), 100-104.
- Benedito, J., Carcel, J. A., Gonzalez, R., & Mulet, A. (2002). Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes. *Ultrasonics*, 40, 19–23.
- Benedito, J., Simal, S., Clemente, G., & Mulet, A. (2006). Manchego cheese texture evaluation by ultrasonics and surface probes. *International Dairy Journal*, 16, 431–438.
- Benguigui, L., Emery, J., Durand, D., & Busnel, J. P. (1994). Ultrasonic study of milk clotting. *Le Lait*, 74(3), 197-206.
- Bennett, R. J., & Johnston, K. A. (2004). General aspects of cheese technology. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 2, pp. 23-XIII). Academic Press.

- Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Ultrasound applications in food processing. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 65-105). Springer, New York, NY.
- Bintsis, T., & Papademas, P. (2002). Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 113-120.
- Bogomolov, A., Dietrich, S., Boldrini, B., & Kessler, R. W. (2012). Quantitative determination of fat and total protein in milk based on visible light scatter. *Food Chemistry*, 134(1), 412-418.
- Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2013). Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(17), 5214-5223.
- Botoosa, E. P., & Karoui, R. (2013). Characterisation of Emmental cheeses within different brand products by combining infrared and fluorescence spectroscopies. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2365-2375.
- Boubellouta, T., & Dufour, É. (2012). Cheese-matrix characteristics during heating and cheese melting temperature prediction by synchronous fluorescence and mid-infrared spectroscopies. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 273-284.
- Boutrou, R., & Guéguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 1-20.
- Boyazoglu, J., & Morand-Fehr, P. (2001). Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality: A critical review. *Small Ruminant Research*, 40(1), 1-11.
- Broadbent J.R., Strickland M., Weimer B. C., Johnson M. E., & Steele J. L. (1998). Peptide Accumulation and Bitterness in Cheddar Cheese Made Using Single-Strain *Lactococcus lactis* Starters with Distinct Proteinase Specificities. *Journal of Dairy Science*, 81, 327–337.
- Broadbent, J. R., Barnes, M., Brennand, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M. E., & Steele, J. L. (2002). Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1778-1785.
- Buckin, V., & Kudryashov, E. (2001). Ultrasonic shear wave rheology of weak particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 89, 401-422.
- Buckin, V., Kudryashov, E., & O'Driscoll, B. (2002). High-resolution ultrasonic spectroscopy for material analysis. *American laboratory*, 34(5; SUPP), 28-31.

- Budelli, E., Bernal, M., Lema, P., Fink, M., Negreira, C., Tanter, M., & Gennisson, J. L. (2014). Use of shear wave elastography for monitoring enzymatic milk coagulation. *Journal of Food Engineering*, 136, 73-79.
- Burkhalter, G., 1981. *Catalogue of Cheeses*. International Dairy Federation, Brussels, Document 141.
- Caballero De La Calle, J.R.; Peña, J.C.; García del Río, F.D. (2001). Análisis cualitativo de la producción de leche en oveja Merina. XXVI Jornadas Científicas de la SEOC. Sevilla. 182-187.
- Caccamo, M., Melilli, C. M. B. D., Barbano, D. M., Portelli, G., Marino, G., & Licitra, G. (2004). Measurement of gas holes and mechanical openness in cheese by image analysis. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 739-748.
- Cáceres, P., Castillo, D., & Pizarro, M. (1997). Secondary flora of Casar de Cáceres cheese: characterization of Micrococcaceae. *International Dairy Journal*, 7(8-9), 531-536.
- Calasso, M., Ercolini, D., Mancini, L., Stellato, G., Minervini, F., Di Cagno, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2016). Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiology*, 54, 115–126.
- Capote, F. P., & De Castro, M. L. (2007). *Analytical applications of ultrasound*. Elsevier.
- Carbonell, M., Nuñez, M., & Fernández-García, E. (2002). Seasonal variation of volatile compounds in ewe raw milk La Serena cheese. *Le Lait*, 82(6), 699-711.
- Caridi, A., Micari, P., Caparra, P., Cufari, A., & Sarullo, V. (2003). Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13(2-3), 191-200.
- Carocho, M., Barreira, J. C. M., Antonio, A. L., Bento, A., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). The incorporation of plant materials in "Serra da Estrela" cheese improves antioxidant activity without changing the fatty acid profile and visual appearance. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(10), 1607–1614.
- Castillo, M. (2001). *Cutting time prediction in cheese making by backscatter of near infrared radiation*. PhD Diss. Univ. Murcia, Murcia, Spain.
- Centeno, J. A., Garabal, J. I., Docampo, F., Lorenzo, J. M., & Carballo, J. (2017). Recovering traditional raw-milk Tetilla cheese flavour and sensory attributes by using *Kocuria varians* and *Yarrowia lipolytica* adjunct cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 33-40.

- Cerrillo, C., Jiménez, A., Rufo, M., Paniagua, J., & Pachón, F. T. (2014). New contributions to granite characterization by ultrasonic testing. *Ultrasonics*, 54(1), 156-167.
- Cevoli, C., Gori, A., Nocetti, M., Cuiabus, L., Caboni, M. F., & Fabbri, A. (2013). FT-NIR and FT-MIR spectroscopy to discriminate competitors, non compliance and compliance grated Parmigiano Reggiano cheese. *Food Research International*, 52(1), 214-220.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing—Food quality assurance and food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 88-98.
- Chaves-López, C., De Angelis, M., Martuscelli, M., Serio, A., Paparella, A., & Suzzi, G. (2006). Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 353-360.
- Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Cho, K. C., Leung, W. P., Mok, H. Y., & Choy, C. L. (1985). Ultrasonic absorption in myoglobin and other globular proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 830(1), 36-44.
- Cho, B. K., & Irudayaraj, J. M. K. (2003). A noncontact ultrasound approach for mechanical property determination of cheeses. *Journal of Food Science*, 68, 2243–2247.
- Cho, B. K. (2010). Ultrasonic technology. In *Nondestructive evaluation of food quality* (pp. 213-234). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chouliara, E., Georgogianni, K. G., Kanellopoulou, N., & Kontominas, M. G. (2010). Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of raw, thermized and pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 20(5), 307-313.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., & Wilkinson, M.G., (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841–866.
- Conde, T., Mulet, A., Clemente, G., & Benedito, J. (2008). Detection of internal cracks in Manchego cheese using the acoustic impulse-response technique and ultrasounds. *Journal of Dairy Science*, 91(3), 918-927.
- Corredig, M., Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2004). The application of ultrasonic spectroscopy to the study of the gelation of milk components. *Food Research International*, 37(6), 557-565.

- Correia, P., Vitor, A., Tenreiro, M., Correia, A. C., Madanelo, J., & Guiné, R. (2016). Effect of different thistle flower ecotypes as milk-clotting in Serra da Estrela cheese. *Nutrition & Food Science*, 46(4), 458–475.
- Coupland, J. N., & Saggin, R. (2003). Ultrasonic sensors for the food industry. *Advances in Food and Nutrition Research*, 45, 101-166.
- Crespo, A., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Benito, M. J., Rufo, M., Paniagua, J. M., & Jiménez, A. (2020). Application of ultrasound for quality control of Torta del Casar cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 103(10), 8808-8821.
- Curtin, Á.C., McSweeney, P.L.H., 2004. Catabolism of amino acids in cheese during ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics, Microbiology: Volume 1: General Aspects*. third ed. Elsevier Applied Science, Amsterdam, pp. 436–454.
- Dagleish, D. G., Verespej, E., Alexander, M., & Corredig, M. (2005). The ultrasonic properties of skim milk related to the release of calcium from casein micelles during acidification. *International Dairy Journal*, 15(11), 1105-1112.
- Darnay, L., Králik, F., Oros, G., Koncz, Á., & Firtha, F. (2017). Monitoring the effect of transglutaminase in semi-hard cheese during ripening by hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*, 196, 123-129.
- Daviau, C., Pierre, A., Famelart, M. H., Goudédranche, H., Jacob, D., Garnier, M., & Maubois, J. L. (2000). Characterisation of whey drainage kinetics during soft cheese manufacture in relation with the physicochemical and technological factors, pH at renneting, casein concentration and ionic strength of milk. *Le Lait*, 80(4), 417-432.
- Davis, J.G., (1965). *Cheese. Volume 1: Basic Technology*. Churchill Livingstone, London.
- Decimo, M., Morandi, S., Silveti, T., & Brasca, M. (2014). Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of food science*, 79(10), 2081-2090.
- Deeth, H. C. (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, 16(6), 555-562.
- Deeth, H. C. & Fitzgerald, C. H. (1976). Lipolysis in dairy products: a review. *Australian Journal of Dairy Technology* June, 53-61.

- de Espinosa, F. M., Afdel, K., Elvira, L., Faiz, B., Resa, P., & Moudden, A. (2002, October). Simultaneous observation of milk coagulation by echography, ultrasonic propagation and thermography. In 2002 IEEE Ultrasonics Symposium, 2002. Proceedings. (Vol. 1, pp. 885-888). IEEE.
- De Kruif, C. G., & Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. In *Advanced dairy chemistry—1 proteins* (pp. 233-276). Springer, Boston, MA.
- del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2018). The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 86, 359-366.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Ladero, L., Cava, R., & Ramírez, R. (2009). Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (PDO 'Torta del Casar') during ripening. *International journal of food science & technology*, 44(9), 1721-1728.
- Delgado, F. J., Rodríguez-Pinilla, J., González-Crespo, J., Ramírez, R., & Roa, I. (2010a). Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International journal of food science & technology*, 45(3), 512-519.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., García-Parra, J., & Ramírez, R. (2010b). Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese PDO Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry*, 118(1), 182-189.
- Delgado, F. J., Rodríguez-Pinilla, J., Márquez, G., Roa, I., & Ramírez, R. (2015). Physicochemical, proteolysis and texture changes during the storage of a mature soft cheese treated by high-pressure hydrostatic. *European Food Research and Technology*, 240(6), 1167-1176.
- Derra, M., Bakkali, F., Amghar, A., & Sahsah, H. (2018). Estimation of coagulation time in cheese manufacture using an ultrasonic pulse-echo technique. *Journal of Food engineering*, 216, 65-71.
- Dherbécourt, J., Falentin, H., Jardin, J., Maillard, M. B., Baglinière, F., Barloy-Hubler, F., & Thierry, A. (2010). Identification of a secreted lipolytic esterase in *Propionibacterium freudenreichii*, a ripening process bacterium involved in Emmental cheese lipolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1181-1188.
- DOUE 2017/C 247/08. Solicitud de aprobación de una modificación de menor importancia que se hace pública de conformidad con el artículo 6, apartado 2, párrafo quinto, del Reglamento Delegado (UE) n.o 664/2014 de la Comisión por el que se completa el Reglamento (UE) n.o 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere al establecimiento de los símbolos de la Unión para las denominaciones de origen protegidas, las indicaciones geográficas protegidas y las especialidades tradicionales garantizadas y en lo que atañe a

- determinadas normas sobre la procedencia, ciertas normas de procedimiento y determinadas disposiciones transitorias adicionales (2017/C 247/08)
- Downey, G., Sheehan, E., Delahunty, C., O'Callaghan, D., Guinee, T., & Howard, V. (2005). Prediction of maturity and sensory attributes of Cheddar cheese using near-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 701-709.
- Driessen, F. M. (1989). Heat-induced changes in milk. *Bulletin of International Dairy Federation*, 238.
- Dukhin, A. S., Goetz, P. J., & Travers, B. (2005). Use of ultrasound for characterizing dairy products. *Journal of Dairy Science*, 88(4), 1320-1334.
- Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., ... & Bonnarne, P. (2015). Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. *PloS one*, 10(4), e0124360.
- Dupuis, C., Corre, C., & Boyaval, P., (1993). Lipase and esterase activities of *Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4004–4009.
- Dwyer, C., Donnelly, L., & Buckin, V. (2005). Ultrasonic analysis of rennet-induced pre-gelation and gelation processes in milk. *Journal of Dairy Research*, 72(3), 303-310.
- Dybing, S. T., Wiegand, J. A., Brudvig, S. A., Huang, E. A., & Chandan, R. C. (1988). Effect of processing variables on the formation of calcium lactate crystals on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 71(7), 1701-1710.
- Elvira, L., Sampedro, L., Matesanz, J., Gómez-Ullate, Y., Resa, P., Iglesias, J. R., ... & De Espinosa, F. M. (2005). Non-invasive and non-destructive ultrasonic technique for the detection of microbial contamination in packed UHT milk. *Food Research International*, 38(6), 631-638.
- Elvira, L., Sampedro, L., de Espinosa, F. M., Matesanz, J., Gómez-Ullate, Y., Resa, P., ... & Iglesias, J. R. (2006). Eight-channel ultrasonic device for non-invasive quality evaluation in packed milk. *Ultrasonics*, 45(1-4), 92-99.
- Elvira, L., Sierra, C., Galán, B., & Resa, P. (2010). Ultrasonic non invasive techniques for microbiological instrumentation. *Physics Procedia*, 3(1), 789-794.
- Engel, E., Nicklaus, S., Septier, C., Salles, C., & Le Quéré, J. L. (2001). Evolution of the taste of a bitter Camembert cheese during ripening: characterization of a matrix effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2930-2939.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., & Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26(2), 228-231.

- Eskelinen, J. J., Alavuotunki, A. P., Hæggström, E., & Alatossava, T. (2007). Preliminary study of ultrasonic structural quality control of Swiss-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4071-4077.
- Everard, C. D., O'Donnell, C. P., Fagan, C. C., Sheehan, E. M., Delahunty, C. M., & O'Callaghan, D. J. (2005). Correlation between process cheese meltability determined by sensory analysis, computer vision method and Olson and Price test. *International Journal of Food Properties*, 8(2), 267-275.
- Everard, C. D., O'callaghan, D. J., Fagan, C. C., O'donnell, C. P., Castillo, M., & Payne, F. A. (2007). Computer vision and color measurement techniques for inline monitoring of cheese curd syneresis. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3162-3170.
- Everett, D. W., & Auty, M. A. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18(7), 759-773.
- Fagan, C. C., Castillo, M., Payne, F. A., O'Donnell, C. P., & O'Callaghan, D. J. (2007a). Effect of cutting time, temperature, and calcium on curd moisture, whey fat losses, and curd yield by response surface methodology. *Journal of dairy science*, 90(10), 4499-4512.
- Fagan, C. C., Everard, C., O'donnell, C. P., Downey, G., Sheehan, E. M., Delahunty, C. M.,... Howard, V. (2007b). Prediction of processed cheese instrumental texture and meltability by mid-infrared spectroscopy coupled with chemometric tools. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1068–1077.
- Fagan, C. C., Everard, C., O'Donnell, C. P., Downey, G., Sheehan, E. M., Delahunty, C. M., et al. (2007c). Evaluating mid-infrared spectroscopy as a new technique for predicting sensory texture attributes of processed cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1122–1132.
- Fagan, C. C., O'donnell, C. P., O'callaghan, D. J., Downey, G., Sheehan, E. M., Delahunty, C. M., ... Howard, V. (2007d). Application of mid-infrared spectroscopy to the prediction of maturity and sensory texture attributes of cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 72(3), E130–E137.
- Falcone, P. M., Baiano, A., Conte, A., Mancini, L., Tromba, G., Zanini, F., & Del Nobile, M. A. (2006). Imaging techniques for the study of food microstructure: a review. *Advances in food and nutrition research*, 51, 205-263.
- Feeney, E. P., Fox, P. F., & Guinee, T. P. (2001). Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese: 1. Composition and proteolysis. *Le Lait*, 81(4), 463-474.
- Feligini, M., Brambati, E., Panelli, S., Ghitti, M., Sacchi, R., Capelli, E., & Bonacina, C. (2014). One-year investigation of *Clostridium* spp. occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Food Control*, 42, 71-77.

- Fernández Del Pozo, B., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A., & Nuñez, M. (1988a). Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 55(3), 449-455.
- Fernández Del Pozo, B. F., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A., & Nuñez, M. (1988b). Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 55(3), 457-464.
- Fernández-García, E., Carbonell, M., Calzada, J. & Nuñez, M. (2006). Seasonal variation of the free fatty acids contents of Spanish ovine milk cheeses protected by a designation of origin: a comparative study. *International Dairy Journal*, 16, 252–261.
- Fernández-Salguero, J., J. Barreto-Matos, and B. A. Marsilla. (1978). Principales componentes nitrogenados del queso de La Serena. *Archivos de Zootenia*, 27,365–373.
- Ferragina, A., Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., & Bittante, G. (2013). The use of Fourier-transform infrared spectroscopy to predict cheese yield and nutrient recovery or whey loss traits from unprocessed bovine milk samples. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7980-7990.
- Fogeiro, É., Barracosa, P., Oliveira, J., & Wessel, D. (2020). Influence of Cardoon Flower (*Cynara cardunculus* L.) and Flock Lactation Stage in PDO Serra da Estrela Cheese. *Foods*, 9(4), 386.
- Fonseca, C. R., Bordin, K., Neeff, D. V., & Oliveira, C. A. F. (2012). 2.2.(S2. 12) Growth of Psychrotrophic Bacteria in Raw Goat Milk and Correlations with Lipolytic and Proteolytic Activities. *Bulletin of the International Dairy Federation*, (1201), 16.
- Forde, A., & Fitzgerald, G. F. (2000). Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 484-489.
- Fox, P. F., Lucey, J. A., & Cogan, T. M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29(4), 237-253.
- Fox, P.F. (Ed.), 1993. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vols. 1 and 2, second ed. Chapman & Hall, London.
- Fox, P. F. & Mcsweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International* 12, 457-509.
- Fox, P. F., O'connor, T. P., McSweeney, P. L. H., Guinee, T. P., & O'brien, N. M. (1996). Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 39, pp. 163-328). Academic Press.

- Fox, P. F., & Wallace, J. M. (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45, 17-85.
- Fox, P.F., & McSweeney, P.L.H., (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic and Professional, London.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., & McSweeney, P.L.H., (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA., 363-379
- Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (Eds.). (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects*. Elsevier.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). Principal families of cheese. In *Fundamentals of cheese science (2nd Edition)*, Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Guinee, T.P., Cogan, T.M. (Eds). Springer, Boston, MA, pp. 27-69.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. (2017). Cheese: an overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (4th Edition)*, McSweeney, P. L., Fox, P. F., Cotter, P.D., Everett, D.W (Eds.). Academic Press, Elsevier, pp. 9-19.
- Freitas, A. C., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2000). Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks Revisión: Aspectos tecnológicos y sensoriales de quesos con denominación de origen elaborados en la Península Ibérica con leche de oveja y de cabra. *Food science and technology international*, 6(5), 351-370.
- Freitas, C., & Malcata, F. X. (2000). Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83(3), 584-602.
- Frétin, M., Martin, B., Rifa, E., Isabelle, V. M., Pomiès, D., Ferlay, A., Montel., M.C., & Delbès, C. (2018). Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- Fröhlich-Wyder, M. T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast*, 36(3), 129-141.
- Fryer, T. F., Sharpe, M. E., & Reiter, B. (1970). Utilization of milk citrate by lactic acid bacteria and 'blowing' of film-wrapped cheese. *Journal of Dairy Research*, 37(1), 17-28.
- FSA. (2012). Annual report of incidents 2012. Food Standards Agency report.
- Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the

- proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18(1), 93-98.
- Gallo, M., Ferrara, L., & Naviglio, D. (2018). Application of ultrasound in food science and technology: a perspective. *Foods*, 7, 164.
- Gan, T. H., Pallav, P., & Hutchins, D. A. (2006). Non-contact ultrasonic quality measurements of food products. *Journal of Food Engineering*, 77(2), 239-247.
- Garde, S., Arqués, J. L., Gaya, P., Medina, M., & Nuñez, M. (2007). Effect of high-pressure treatments on proteolysis and texture of ewes' raw milk La Serena cheese. *International Dairy Journal*, 17(12), 1424-1433.
- Garde, S., Ávila, M., Gaya, P., Arias, R., & Nuñez, M. (2012). Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *International Dairy Journal*, 25(2), 87-91.
- Gómez-Torres, N., Garde, S., Peirotén, Á., & Ávila, M. (2015). Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control*, 56, 186-194.
- Gonçalves Dos Santos, M. T. P., Benito, M. J., de Guía Córdoba, M., Alvarenga, N., & Ruiz-Moyano, S. (2017). Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and-independent DNA approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 262, 63-70.
- Gonçalves, M. T. P., Benito, M. J., Córdoba, M. D. G., Egas, C., Merchán, A. V., Galván, A. I., & Ruiz-Moyano, S. (2018). Bacterial communities in serpa cheese by culture dependent techniques, 16S rRNA gene sequencing and high-throughput sequencing analysis. *Journal of Food Science*, 83(5), 1333-1341.
- González, J. (2001). *Hojas Técnicas de Quesería*. Publicaciones de la Secretaría General Técnica de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Depósito Legal BA-594
- González, J. (2009). *Tecnología de elaboración de las Tortas*. Intaex, CICYTEX.
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Hierro, J. M., & González-Cabrera, J. M. (2008). Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in cheese. *Talanta*, 75(2), 351-355.
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., González-Pérez, C., Revilla, I., Vivar-Quintana, A., & Ortega, I. L. (2014). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 666-673.

- González-Martín, M. I., Severiano-Pérez, P., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., Hernández-Hierro, J. M., González-Pérez, C., & Lobos-Ortega, I. A. (2011). Prediction of sensory attributes of cheese by near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 127(1), 256-263.
- González-Mohino, A., Jiménez A., Rufo M., Paniagua J.M., Olegario LS, & Ventanas S. (2021). Correlation analysis between acoustic and sensory technique data for cooked pork loin samples. *LWT-Food Science and Technology*, 141, 110882.
- Graves, M., Smith, A., & Batchelor, B. (1998). Approaches to foreign body detection in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 9(1), 21-27.
- Griffin, W. G., & Griffin, M. C. (1990). The attenuation of ultrasound in aqueous suspensions of casein micelles from bovine milk. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 87(6), 2541-2550.
- Gudra, T., & Opielinski, K. J. (2004). Applying spectrum analysis and cepstrum analysis to examine the cavitation threshold in water and in salt solution. *Ultrasonics*, 42(1-9), 621-627.
- Guggisberg, D., Fröhlich-Wyder, M. T., Irmeler, S., Greco, M., Wechsler, D., & Schuetz, P. (2013). Eye formation in semi-hard cheese: X-ray computed tomography as a non-invasive tool for assessing the influence of adjunct lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology*, 93(2), 135-149.
- Guggisberg, D., Schuetz, P., Winkler, H., Amrein, R., Jakob, E., Fröhlich-Wyder, M. T., ... & Hofmann, J. (2015). Mechanism and control of the eye formation in cheese. *International Dairy Journal*, 47, 118-127.
- Guiné, R. P., Tenreiro, M. I., Correia, A. C., Correia, P. M., & Barracosa, P. (2016). Analysis of factors influencing the physical, chemical and sensorial properties of Serra da Estrela cheeses. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 643-657.
- Guinee, T.P. & Sutherland, B.J. (2011). Salting of Cheese. En *Encyclopedia of Dairy Science* (2° Edition) Ed. Elsevier Academic Press London, England, Vol. 1, 595-606.
- Gülseren, İ., Alexander, M., & Corredig, M. (2010). Probing the colloidal properties of skim milk using acoustic and electroacoustic spectroscopy. Effect of concentration, heating and acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(2), 493-500.
- Gunasekaran, S. (1996). Computer vision technology for food quality assurance. *Trends in Food Science & Technology*, 7(8), 245-256.
- Gunasekaran, S., & Ay, C. (1996). Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics. *Journal of Food Process Engineering*, 19(1), 63-73.

- Gunstone, F. D., Harwood, J. L. y Padley, F. B. (1994). Milk lipids. In *The lipid handbook* (2nd ed.) (pp. 195-197). London: Chapman & Hall.
- Hægström, E., & Luukkala, M. (2001). Ultrasound detection and identification of foreign bodies in food products. *Food Control*, 12(1), 37-45.
- Hantsis-Zacharov, E., & Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7162-7168.
- Hassan, F. A., Abd El-Gawad, M. A. M., & Enab, A. K. (2013). Flavour compounds in cheese. *Research on Precision Instrument and Machinery*, 2(2), 15-29.
- Hélias, A., Mirade, P. S., & Corrieu, G. (2007). Modeling of camembert-type cheese mass loss in a ripening chamber: Main biological and physical phenomena. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 5324-5333.
- Ho, K. S., Billson, D. R., & Hutchins, D. A. (2007). Inspection of drinks cans using non-contact electromagnetic acoustic transducers. *Journal of food engineering*, 80(2), 431-444.
- Hori, T. (1985). Objective measurements of the process of curd formation during rennet treatment of milks by the hot wire method. *Journal of Food Science*, 50(4), 911-917.
- Huc, D., Mariette, F., Challoy, S., Barreau, J., Moulin, G., & Michon, C. (2014). Multi-scale investigation of eyes in semi-hard cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 24, 106-112.
- Huffman, L.M., & Kristoffersen, T., (1984). Role of lactose in Cheddar cheese manufacture and ripening. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 19, 151–162.
- International Dairy Federation (IDF 1967). Determination of the lactose content of milk. Brussels, International Standard No. 28. IDF, 1967.
- International Organization for Standardization. (2004). Cheese and processed cheese—Determination of total solids content. (UNE-ISO Standard No. 5534:2004). ISO: Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization (2006a). Cheese and processed cheese products—Determination of chloride content—Potentiometric titration method. (UNE- ISO Standard No. 5943:2006). ISO: Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization (2006b). Sensory Analysis—Guidelines for the Use of Quantitative Response Scales. (UNE-ISO Standard No. 4121-2006). ISO: Geneva, Switzerland.

- International Organization for Standardization. (2008a). Milk — Determination of fat content (UNE-ISO Standard No. 2446:2008). ISO: Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization. (2008b). Cheese—determination of fat content—van gulik method (UNE-ISO Standard No. 3433:2008). ISO: Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization. (2014). Milk and milk products—Determination of nitrogen content—Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. Geneva, Switzerland: (UNE-ISO Standard No. 8968-1:2014). ISO: Geneva, Switzerland.
- Irlinger, F., Yung, S. A. Y. I., Sarthou, A. S., Delbès-Paus, C., Montel, M. C., Coton, E., Coton, M. & Helinck, S. (2012). Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 332-338.
- Issanchou, S., & Schlich, P. (1997). Sensory analysis: methodological aspects relevant to the study of cheese. *Le Lait*, 77(1), 5-12.
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33.
- Jeliński, T., Du, C. J., Sun, D. W., & Fornal, J. (2007). Inspection of the distribution and amount of ingredients in pasteurized cheese by computer vision. *Journal of food engineering*, 83(1), 3-9.
- Jiménez, A., Crespo, A., Piedehierro, J., Rufo, M.M., Guerrero, M.P., Paniagua, J.M., Riballo, M.J., Antolín, A., (2010) Preliminary study to assess ultrasonic characteristics of Torta del Casar — type cheese, on the CD-ROM: Sydney, August 23-27, Proceedings ICA 2010, 20th International Congress on Acoustics (ISBN 978-0-646-54052-8), paper 121.
- Jiménez, A., Rufo, M., Paniagua, J. M., Crespo, A. T., Guerrero, M. P., & Riballo, M. J. (2017). Contributions to ultrasound monitoring of the process of milk curdling. *Ultrasonics*, 76, 192-199.
- Juliano, P., Temmel, S., Rout, M., Swiergon, P., Mawson, R., & Knoerzer, K. (2013). Creaming enhancement in a liter scale ultrasonic reactor at selected transducer configurations and frequencies. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 52-62.
- Juliano, P., Torkamani, A. E., Leong, T., Kolb, V., Watkins, P., Ajlouni, S., & Singh, T. K. (2014). Lipid oxidation volatiles absent in milk after selected ultrasound processing. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(6), 2165-2175.

- Karoui, R., Bosset, J. O., Mazerolles, G., Kulmyrzaev, A., & Dufour, É. (2005). Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and L'Étivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: a preliminary investigation. *International Dairy Journal*, 15(3), 275-286.
- Karoui, R., Mouazen, A. M., Dufour, E., Pillonel, L., Schaller, E., Picque, D., ... & Bosset, J. O. (2006a). A comparison and joint use of NIR and MIR spectroscopic methods for the determination of some parameters in European Emmental cheese. *European Food Research and Technology*, 223(1), 44-50.
- Karoui, R., Mouazen, A. M., Dufour, É., Pillonel, L., Schaller, E., De Baerdemaeker, J., & Bosset, J. O. (2006b). Chemical characterisation of European Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. *International Dairy Journal*, 16(10), 1211-1217.
- Karoui, R., Mouazen, A. M., Dufour, É., Schoonheydt, R., & De Baerdemaeker, J. (2006c). A comparison and joint use of VIS-NIR and MIR spectroscopic methods for the determination of some chemical parameters in soft cheeses at external and central zones: A preliminary study. *European food research and technology*, 223(3), 363-371.
- Kindstedt, P. (2005). *American farmstead cheese: the complete guide to making and selling artisan cheeses*. Chelsea Green Publishing.
- Kinsler, L. E., Frey, A. R., Coppens, A. B., & Sanders, J. V. (2000). *Fundamentals of acoustics*. John Wiley & Sons.
- Klandar, A. H., Lagaude, A., & Chevalier-Lucia, D. (2007). Assessment of the rennet coagulation of skim milk: A comparison of methods. *International Dairy Journal*, 17(10), 1151-1160.
- Ko, R., Smith, L. T., & Smith, G. M. (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 426-431.
- Kobayashi, T., Tai, H., & Kato, S. (2006). Measurement method of particle concentration and acoustic properties in suspension using a focused ultrasonic impulse radiated from a plano-concave transducer. *Ultrasonics*, 44, 491-496.
- Koc, A. B., & Ozer, B. (2008). Nondestructive monitoring of renneted whole milk during cheese manufacturing. *Food Research International*, 41(7), 745-750.
- Koca, N. U. R. C. A. N., Rodriguez-Saona, L. E., Harper, W. J., & Alvarez, V. B. (2007). Application of Fourier transform infrared spectroscopy for monitoring short-chain free fatty acids in Swiss cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(8), 3596-3603.

- Kongo, J. M., & Malcata, F. X. (2016). Cheese: Chemistry and Microbiology. Encyclopedia of Food and Health, pp 735-740.
- Kowalchuk, A. W., & Olson, N. F. (1977). Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. *Journal of Dairy Science*, 60(8), 1256-1259.
- Kraggerud, H., Wold, J. P., Høy, M., & Abrahamsen, R. K. (2009). X-ray images for the control of eye formation in cheese. *International journal of dairy technology*, 62(2), 147-153.
- Kraggerud, H., Næs, T., & Abrahamsen, R. K. (2014). Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. *International Dairy Journal*, 34(1), 6-18.
- Kulmyrzaev, A., Dufour, E., Noël, Y., Hanafi, M., Karoui, R., Qannari, E. M., & Mazerolles, G. (2005). Investigation at the molecular level of soft cheese quality and ripening by infrared and fluorescence spectroscopies and chemometrics—relationships with rheology properties. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 669-678.
- Kulmyrzaev, A. A., & Dufour, E. (2010). Relations between spectral and physicochemical properties of cheese, milk, and whey examined using multidimensional analysis. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 247-256.
- Le Bourhis, A. G., Doré, J., Carlier, J. P., Chamba, J. F., Popoff, M. R., & Tholozan, J. L. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 154-163.
- Lee, K., Uegaki, K., Nishii, C., Nakamura, T., Kubota, A., Hirai, T., & Yamada, K. (2012). Computed tomographic evaluation of gas hole formation and structural quality in Gouda-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65(2), 232-236.
- Lee, M. R., Johnson, M. E., & Lucey, J. A. (2005). Impact of modifications in acid development on the insoluble calcium content and rheological properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3798-3809.
- Leemans, V., & Destain, M. F. (2009). Ultrasonic internal defect detection in cheese. *Journal of food engineering*, 90(3), 333-340.
- Lehmann, L., & Buckin, V. (2005). Determination of the heat stability profiles of concentrated milk and milk ingredients using high resolution ultrasonic spectroscopy. *Journal of dairy science*, 88(9), 3121-3129.

- Lei, T., & Sun, D. W. (2019). Developments of nondestructive techniques for evaluating quality attributes of cheeses: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 527-542.
- Lemieux, L., & Simard, R. E. (1991). Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Le Lait*, 71(6), 599-636.
- Lenoir J, Lambert G, Schmidt JL, Tourneur C. 1985. La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur* 41:23–50.
- Leong, T., Juliano, P., Johansson, L., Mawson, R., McArthur, S. L., & Manasseh, R. (2014). Temperature effects on the ultrasonic separation of fat from natural whole milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2092-2098.
- Lerma-García, M. J., Gori, A., Cerretani, L., Simó-Alfonso, E. F., & Caboni, M. F. (2010). Classification of Pecorino cheeses produced in Italy according to their ripening time and manufacturing technique using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4490-4496.
- Lin, S. X. Q., & Chen, X. D. (2007). A laboratory investigation of milk fouling under the influence of ultrasound. *Food and Bioproducts Processing*, 85(1), 57-62.
- Liu, Z., Juliano, P., Williams, R. P., Niere, J., & Augustin, M. A. (2014). Ultrasound improves the renneting properties of milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2131-2137.
- Lohr, K. R., & Rose, J. L. (2003). Ultrasonic guided wave and acoustic impact methods for pipe fouling detection. *Journal of Food Engineering*, 56(4), 315-324.
- Lopez, C., Camier, B., & Gassi, J. Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal*, 17(3), 235-247.
- Lopez, A. A., Corredig, M., & Alexander, M. (2009). Diffusing wave and ultrasonic spectroscopy of rennet-induced gelation of milk in the presence of high-methoxyl pectin. *Food Biophysics*, 4(4), 249-259.
- Loudiyi, M., & Ait-Kaddour, A. (2018). Delineation of salts, ripening and gentle heating effects on molecular structure of Cantal-type cheese by Mid-infrared spectroscopy. *Food Research International*, 105, 221-232.
- Loudiyi, M., Rutledge, D. N., & Ait-Kaddour, A. (2018). ComDim for explorative multi-block data analysis of Cantal-type cheeses: Effects of salts, gentle heating and ripening. *Food chemistry*, 264, 401-410.

- Lucas, A., Andueza, D., Ferlay, A., & Martin, B. (2008). Prediction of fatty acid composition of fresh and freeze-dried cheeses by visible–near-infrared reflectance spectroscopy. *International Dairy Journal*, 18(6), 595-604.
- Lück, H., & Dunkeld, M. (1981). *Enterobacteriaceae* in cheese. *South African journal of dairy technology= Suid-Afrikaanse tydskrif vir suiweltegnologie*.
- Ludger, O., & Teixeira A. A. (2007). *Food Physics. Physical Properties-Measurement and Applications*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg.
- Macedo, A. C., Malcata, F. X., & Hogg, T. A. (1995). Microbiological profile in Serra ewes' cheese during ripening. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(1), 1-11.
- Macedo, A. C., Costa, M. L., & Malcata, F. X. (1996a). Assessment of proteolysis and lipolysis in Serra cheese: Effects of axial cheese location, ripening time and lactation season. *Le Lait*, 76(4), 363–370.
- Macedo, I. Q., Faro, C. J., & Pires, E. M. (1996b). Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine α - and β -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 42-47.
- Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (1997a). Changes of lactose, lactic acid, and acetic acid contents in Serra cheese during ripening. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 204(6), 453-455.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X., (1997b). Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. *Z. Lebensm. Unters. Forsch* 205, 25–30.
- Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (1997c). Hydrolysis of α - and β -caseins during ripening of Serra cheese. *Food chemistry*, 58(1-2), 43-48.
- MacGibbon, A.K.H., Taylor, M.W., (2006). Composition and structure of bovine milk lipids. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry—2 Lipids*. third ed. Elsevier, New York, NY, pp. 1–42.
- Madalozzo, E. S., Sauer, E., & Nagata, N. (2015). Determination of fat, protein and moisture in ricotta cheese by near infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1649-1655.
- Mahaut, M., Jeantet, R., & Brulé, G. (2003). *Introducción a la tecnología quesera* (No. Q02-05). Acribia.

- Malacarne, M., Summer, A., Franceschi, P., Formaggioni, P., Pecorari, M., Panari, G., ... & Mariani, P. (2013). Effects of storage conditions on physico-chemical characteristics, salt equilibria, processing properties and microbial development of raw milk. *International Dairy Journal*, 29(1), 36-41.
- MAPA (2021a). Informe del Consumo Alimentario en España, 2020 © Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Secretaría General Técnica Centro de Publicaciones NIPO: 003191619 Distribución y venta.
- MAPA (2021b). EL SECTOR OVINO Y CAPRINO DE LECHE EN CIFRAS: Principales Indicadores Económicos” Datos 2020. Madrid, 2021.Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado: <https://cpage.mpr.gob.es/> NIPO: 003191441.
- MAPA (2021c). Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (E.T.G.) de Productos Agroalimentarios AÑO 2020. Subdirección General de Control de la Calidad Alimentaria y Laboratorios Agroalimentarios, Dirección General de la Industria Alimentaria (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Con la colaboración de los Consejos Reguladores de Denominaciones de Origen Protegidas e Indicaciones Geográficas Protegidas y entidades asimiladas.
- Marchesini, G., Balzan, S., Montemurro, F., Fasolato, L., Andrighetto, I., Segato, S., & Novelli, E. (2012). Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 391-397.
- Margolies, B. J., & Barbano, D. M. (2018). Determination of fat, protein, moisture, and salt content of Cheddar cheese using mid-infrared transmittance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 924-933.
- Marra, A. I., García, F. J. C., & Rodríguez, M. E. T. (1998). Alteraciones y defectos de los quesos. *Alimentación, equipos y tecnología*, 17(6), 67-78.
- Marsilla de Pascual, B. A. (1979). Principales componentes químicos y parámetros físicos del queso de La Serena. *Archivos de Zootecnia*, 28, 255-270.
- Martín-del-Campo, S. T., Picque, D., Cosío-Ramírez, R., & Corrieu, G. (2007a). Evaluation of chemical parameters in soft mold-ripened cheese during ripening by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 3018-3027.

- Martín-del-Campo, S. T., Picque, D., Cosío-Ramírez, R., & Corrieu, G. (2007b). Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses. *International Dairy Journal*, 17(7), 835-845.
- Martini, M., Scolozzi, C., Cecchi, F., Mele, M., & Salari, F. (2008). Relationship between morphometric characteristics of milk fat globules and the cheese making aptitude of sheep's milk. *Small Ruminant Research*, 74(1-3), 194-201.
- Martley, F. G., & Crow, V. L. (1996). Open texture in cheese: the contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *Journal of Dairy Research*, 63(3), 489-507.
- Mas Mayoral, M., González Crespo, J., & Nieto Villaseca, M. J. (1991). Casar cheese: production, physicochemical and microbiological characteristics. *Archivos de Zootecnia*, 40, 359-369.
- McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6(9), 293-299.
- McSweeney, P. L., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80(3), 293-324.
- McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International journal of dairy technology*, 57(2-3), 127-144.
- McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G., Fox, P.F., (2004). Diversity of cheese varieties: an overview. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics, Microbiology: Volume 2, Major Cheese Groups*. third ed. Elsevier Applied Science, Amsterdam, pp. 1–22.
- McSweeney, P. L. (Ed.). (2007). *Cheese problems solved*. Elsevier.
- McSweeney, P. L. (2017). Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (4th Edition)*, McSweeney, P. L., Fox, P. F., Cotter, P.D., Everett, D.W (Eds.). Academic Press, Elsevier, pp. 379-387.
- McSweeney, P. L., Fox, P. F., & Ciocia, F. (2017). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (4th Edition)*, McSweeney, P. L., Fox, P. F., Cotter, P.D., Everett, D.W (Eds.). Academic Press, Elsevier, pp. 411-421.
- Medina, M., & Nuñez, M. (2017). Cheeses from ewe and goat milk. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (4th Edition)*, McSweeney, P. L., Fox, P. F., Cotter, P.D., Everett, D.W (Eds.). Academic Press, Elsevier, pp. 1069-1091.

- Medina, M., Fernández Del Pozo, B., Rodríguez-Marin, M. A., Gaya, P., & Nuñez, M. (1991). Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of dairy research*, 58(3), 355-361.
- Merchán, A. V., Benito, M. J., Galván, A. I., & Ruiz-Moyano, S. (2020). Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese. *LWT*, 124, 109173.
- Meyer, S., Rajendram, V. S., & Povey, M. J. (2006). Characterization of reconstituted milk powder by ultrasound spectroscopy. *Journal of Food Quality*, 29(4), 405-418.
- Mlček, J., Šustová, K., Rop, O., Juríková, T., Humpolíček, P., & Balla, Š. (2013). Rapid assessment of selected free amino acids during Edam cheese ripening by near infrared spectroscopy. *Acta Veterinaria Brno*.
- Mohanam, S., Panicker, P. T., Iype, L., Laila, M., Domini, I., & Bindu, R. G. (2002). A new ultrasonic method to detect chemical additives in branded milk. *Pramana*, 59(3), 525-529.
- Molimard, P. & Spinnler, H.E. (1996). Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169–184.
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology*, 177, 136-154.
- Morales, P., Fernández-García, E., & Núñez, M. (2003). Caseinolysis in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. *Letters in Applied Microbiology*, 37(5), 410-414.
- Mota, J. P., Carvalho, J. L. C., Carvalho, S. S., & Barja, P. R. (2011). Acoustic waves: from microdevices to helioseismology. *InTech*, Rijeka, 287-302.
- Mulet, A., Bedito, J., Bon, J., & Rossello, C. (1999). Ultrasonic velocity in cheddar cheese as affected by temperature. *Journal of food science*, 64(6), 1038-1041.
- Muñoz, M., Gaya, P., & Medina, M. (1985). Influence of manufacturing and ripening conditions on the survival of *Enterobacteriaceae* in Manchego cheese. *Journal of Dairy Science*, 68(4), 794-800.
- Nájera, A. I., Barron, L. J., Ribeiro, P., Pelissier, F., Abilleira, E., Pérez-Elortondo, F. J., ... & Oregi, L. (2009). Seasonal changes in the technological and compositional quality of ewe's raw milks from commercial flocks under part-time grazing. *Journal of dairy research*, 76(3), 301-307.

- Narsaiah, K., & Jha, S. N. (2012). Nondestructive methods for quality evaluation of livestock products. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 342-348.
- Nassar, G., Nongaillard, B., & Noel, Y. (2001). Monitoring of milk gelation using a low-frequency ultrasonic technique. *Journal of Food Engineering*, 48(4), 351-359.
- Nassar, G., Nongaillard, B., & Noël, Y. (2004). Study by ultrasound of the impact of technological parameters changes in the milk gelation process. *Journal of food engineering*, 63(2), 229-236.
- Nassar, G., Lefbvre, F., Skaf, A., Carlier, J., Nongaillard, B., & Noël, Y. (2010). Ultrasonic and acoustic investigation of cheese matrix at the beginning and the end of ripening period. *Journal of Food Engineering*, 96(1), 1-13.
- Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K., & Zhou, W. (2012). Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. *Food Chemistry*, 130(4), 866-874.
- Noël Y. (2002). Vers une approche globale de la characterization des fromages. INRA-ENITAC Agriculture et produits alimentaires de montagne. Collection Actes 8, 85–89.
- Nudda, A., Bencini, R., Mijatovic, S., & Pulina, G. (2002). The yield and composition of milk in Sarda, Awassi, and Merino sheep milked unilaterally at different frequencies. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2879-2884.
- O Sullivan, D., Cotter, P., Giblin, L., Sheehan, J., & McSweeney, P. (2013). Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1.
- Oca, M. L., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., Gredilla, A. E., & Delgado, D. (2012). Prediction of Zamorano cheese quality by near-infrared spectroscopy assessing false non-compliance and false compliance at minimum permitted limits stated by designation of origin regulations. *Talanta*, 99, 558-565.
- O'Callaghan, D. J., O'Donnell, C. P., & Payne, F. A. (1999). A comparison of on-line techniques for determination of curd setting time using cheesemilks under different rates of coagulation. *Journal of Food engineering*, 41(1), 43-54.
- Ogasawara, H., Mizutani, K., Ohbuchi, T., & Nakamura, T. (2006). Acoustical experiment of yogurt fermentation process. *Ultrasonics*, 44, 727-730.
- Olivecrona, T., Bengtsson-Olivecrona, G., (1991). Indigenous enzymes in milk II. Lipase. Fox, P.F. (Ed.), *Food Enzymology*, Vol. 1, Elsevier Applied Science, London, pp. 62–78.

- Olivecrona, T., Vilaro, S., Olivecrona, G., (2003). Lipases in milk. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. third ed. Kluwer/Plenum Press, New York, NY, pp. 473–488.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., & de Guía Córdoba, M. (2012). Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making. *Food chemistry*, 133(1), 227-235.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., & de Guía Córdoba, M. (2013a). Role of the microbial population on the flavor of the soft-bodied cheese Torta del Casar. *Journal of dairy science*, 96(9), 5477-5486.
- Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Casquete, R., Serradilla, M. J., & Córdoba, M.G. (2013b). Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese “Torta del Casar” made without the addition of a starter. *Food control*, 33(2), 448-454.
- Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Fernández, M., Hernández, A., & de Guía Córdoba, M. (2013c). Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet for use in the elaboration of ‘Torta del Casar’ cheese. *Journal of dairy research*, 80(4), 429-438.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Fernández, M., Casquete, R., & de Guía Córdoba, M. (2014). Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological characteristics of ‘Torta del Casar’ cheese. *International journal of dairy technology*, 67(3), 402-409.
- Ordoñez, J.A., Cambero, I.M., Fernandez, L., Garcia, M.L., Garcia de Fernando, G., De la Hoz, L., and Selgas, M.D. (1998). *Tecnología de los alimentos*. Vol. II: Alimentos de origen animal. (Ed). Síntesis, S.A.Madrid-España, pp. 18- 45.
- Ortiz, M. A. (2005). *Problemática de los quesos de vaca, oveja, cabra y mezcla*. Manual práctico de quesería (168-173). Madrid, Spain: AMV.
- Ottogalli, G., (2001). *Atlante dei Formaggi*. Hoepli, Milan.
- Pallav, P., Hutchins, D. A., & Gan, T. (2009). Air-coupled ultrasonic evaluation of food materials. *Ultrasonics*, 49(2), 244-253.
- Pappa, E. C., Kandarakis, I., Anifantakis, E. M., & Zerfiridis, G. K. (2006). Influence of types of milk and culture on the manufacturing practices, composition and sensory characteristics of Teleme cheese during ripening. *Food Control*, 17(7), 570-581.

- Park, B., Whittaker, A. D., Miller, R. K., & Hale, D. S. (1994). Predicting intramuscular fat in beef longissimus muscle from speed of sound. *Journal of Animal Science*, 72(1), 109-116.
- Partidario, A. M., Barbosa, M., & Boas, L. V. (1998). Free fatty acids, triglycerides and volatile compounds in Serra da Estrela cheese—changes throughout ripening. *International Dairy Journal*, 8(10-11), 873-881.
- Passos, E. F., Monteiro, P. S., Oliveira, R. C., Martins, J. G. O., Alves, H. G., & Brandao, S. C. C. (1999). Predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production using a heated thermistor. *Journal of food science*, 64(5), 879-882.
- Payne, F. A., Hicks, C. L., & Shen, P. S. (1993a). Predicting optimal cutting time of coagulating milk using diffuse reflectance. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 48-61.
- Payne, F. A., Hicks, C. L., Madangopal, S., & Shearer, S. A. (1993b). Fiber optic sensor for predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production. *Transactions of the ASAE*, 36(3), 841-847.
- Pelissier, J. P., & Manchon, P. (1976). Comparative study of the bitter taste of enzymic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. *Journal of Food Science*, 41(2), 231-233.
- Pereira, C. I., Gomes, E. O., Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (2008). Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. *Food Chemistry*, 108(3), 862-868.
- Pereira, C. I., Graça, J. A., Ogando, N. S., Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (2010a). Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. *Food Microbiology*, 27(3), 339-346.
- Pereira, C. I., Neto, D. M., Capucho, J. C., Gião, M. S., Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (2010b). How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants. *Journal of dairy science*, 93(4), 1335-1344.
- Pi, F., Shinzawa, H., Ozaki, Y., & Han, D. (2009). Non-destructive determination of components in processed cheese slice wrapped with a polyethylene film using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *International Dairy Journal*, 19(10), 624-629.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food control*, 31(2), 593-606.
- Pintado, A. I., Tavares, T. G., Tavarina, F. K., & Malcata, F. X. (2010). Tradition versus modernism in cheesemaking technology: a Portuguese case study encompassing plant coagulant, non-bovine milks and adventitious microflora. *Australian journal of dairy technology*, 65(3), 128.

- Pirisi, A., Pinna, G., Addis, M., Piredda, G., Mauriello, R., De Pascale, S., ... & Chianese, L. (2007). Relationship between the enzymatic composition of lamb rennet paste and proteolytic, lipolytic pattern and texture of PDO Fiore Sardo ovine cheese. *International Dairy Journal*, 17(2), 143-156.
- Plutowska, B., & Wardencki, W. (2007). Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101, 845-872
- Porova, N., Botvinnikova, V., Krasulya, O., Cherepanov, P., & Potoroko, I. (2014). Effect of ultrasonic treatment on heavy metal decontamination in milk. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2107-2111.
- Poulet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., & Larriba, G. (1991). Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, 58(2), 231-238.
- Poulet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., & Larriba, G. (1993). Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. *Journal of Dairy Research*, 60(1), 123-127.
- Povey, M. J. W. (1989). Ultrasonics in food engineering Part II: Applications. *Journal of Food Engineering*, 9(1), 1-20.
- Povey, M. J. (2013a). Ultrasound particle sizing: A review. *Particuology*, 11(2), 135-147.
- Povey, M. J. W., Watson, N., & Parker, N. G. (2013b). Ultrasonic and acoustic microscopy: principles and applications to food microstructures. In *Food microstructures* (pp. 192-222). Woodhead Publishing.
- Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O., & Khan, M. I. (2016). Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(7), 1022.
- Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre (BOE 6 de octubre), por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos.
- Reglamento (CEE) nº 2081/92 del Consejo, de 14 de julio de 1992, relativo a la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen protegidas.
- Reglamento (CE) nº 1107/96 de la Comisión de 12 de junio de 1996 relativo al registro de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 17 del Reglamento (CEE) nº 2081/92 del Consejo.

- Reglamento (CE) N° 1491/2003 de la Comisión Europea, de 25 de agosto de 2003, sobre Inscripción de la DOP “Torta del Casar” en el Registro de Denominaciones de Origen Protegidas y de Indicaciones Geográficas Protegidas (D.O.U.E., L 214/6, de 6 de agosto de 2003). Modificado por el Reglamento de ejecución (UE) 2015/2196 de la comisión de 24 de noviembre de 2015.
- Reglamento (CE) n° 205/2005 de la Comisión del 4 de febrero de 2005 relativo al registro de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen con arreglo al procedimiento establecido por el Reglamento (CEE) n° 2400/96.
- Reglamento (CE) No 510/2006 DEL CONSEJO de 20 de marzo de 2006 sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios
- Reglamento (UE) No 1151/2012 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 21 de noviembre de 2012 sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios 343/1-343/29.
- Revilla, I., González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Vivar-Quintana, A., González-Pérez, C., & Lurueña-Martínez, M. A. (2009). Texture evaluation in cheeses by NIRS technology employing a fibre-optic probe. *Journal of food engineering*, 92(1), 24-28.
- Richard, B., Toubal, M., Le Page, J. F., Nassar, G., Radziszewski, E., Nongillard, B., ... & Delaplace, G. (2012). Ultrasound tests in a stirred vessel to evaluate the reconstitution ability of dairy powders. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 233-242.
- Roa, I., López, M. B., & Mendiola, F. J. (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*, 32(6), 413-419.
- Rodriguez-Saona, L. E., Koca, N. U. R. C. A. N., Harper, W. J., & Alvarez, V. B. (2006). Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of dairy science*, 89(5), 1407-1412.
- Roseiro, L. B., Wilbey, R. A., & Barbosa, M. (2003). Serpa Cheese: Technological, biochemical and microbiological characterisation of a PDO ewe's milk cheese coagulated with *Cynara cardunculus* L. *Le Lait*, 83(6), 469-481.
- Roudot-Algaron, F. (1996). Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines: exemple de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines. *Le lait*, 76(4), 313-348.
- Rufo, M.M., Jiménez, A., & Paniagua, J.M., (2014). Comparative study of different methods to assess ultrasonic velocities of waves in a liquid medium, on the CD-ROM: Prague, in: October 6–10, Conference Proceedings 11th ECNDT, 11th European Conference on NDT (ISBN 978-80-214-5018-9, available from www.ndt.net ISSN 1435-4934 vol. 19 No. 12), paper 284, 2014.

- Ruiz Iñiguez, J., Fernández-Salguero Carretero, J., Marcos, A., & Esteban, M. A. (1984). Principales parámetros que definen la composición química del queso Torta del Casar. *Archivos de Zootecnia*, 33, 301-312.
- Salles, C., Sommerer, N., Septier C., Issanchou, S., Chabanet, C., Garem, A., & Le Quéré J. L. (2002). Goat Cheese Flavor: Sensory Evaluation of Branched-Chain Fatty Acids and Small Peptides. *Journal of Food Science*, 67, 835–841.
- Sánchez-Juanes, F., Teixeira-Martín, V., González-Buitrago, J. M., Velázquez, E., & Flores-Félix, J. D. (2020). Identification of Species and Subspecies of Lactic Acid Bacteria Present in Spanish Cheeses Type “Torta” by MALDI-TOF MS and pheS gene Analyses. *Microorganisms*, 8(2), 301.
- Sanchez-Rey, R., Pouillet, B., Caceres, P., & Larriba, G. (1993). Microbiological quality and incidence of some pathogenic microorganisms in La Serena cheese throughout ripening. *Journal of food protection*, 56(10), 879-881.
- Sandine, W.E., & Elliker, P.R., (1970). Microbiologically induced flavours and fermented foods. Flavor in fermented dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 18, 557–562.
- Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M. A., Gómez, R., & Fernández-Salguero, J. (2002). Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry*, 78(3), 281-289.
- Santos, J. A., López-Díaz, T. M., Garcia-Fernández, M. C., García-López, M. L., & Otero, A. (1996). Characterization and extracellular activity of psychrotrophic bacteria isolated from Villalón cheese (fresh variety of Spanish sheep's milk cheese). *International Journal of Food Microbiology*, 33(2-3), 301-306.
- Schulz, M.E., (1952). Klassifizierung von Kasë. *Milchwissenschaft* 7, 292– 299.
- Scott, R., (1986). *Cheesemaking Practice*. Elsevier Applied Science, London.
- Schuetz, P., Guggisberg, D., Jerjen, I., Fröhlich-Wyder, M. T., Hofmann, J., Wechsler, D., ... & Bachmann, H. P. (2013). Quantitative comparison of the eye formation in cheese using radiography and computed tomography data. *International Dairy Journal*, 31(2), 150-155.
- Schuetz, P., Guggisberg, D., Fröhlich-Wyder, M. T., & Wechsler, D. (2016). Software comparison for the analysis of cheese eyes in X-ray computed tomography. *International Dairy Journal*, 63, 62-69.
- Şengül, M., Erkaya, T., Başlar, M., & Ertugay, M. F. (2011). Effect of photosonication treatment on inactivation of total and coliform bacteria in milk. *Food Control*, 22(11), 1803-1806.

- Shanmugam, A., Chandrapala, J., & Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 251-258.
- Shannon, R. A., Probert-Smith, P. J., Lines, J., & Mayia, F. (2004). Ultrasound velocity measurement to determine lipid content in salmon muscle; the effects of myosepta. *Food Research International*, 37(6), 611-620.
- Sharafbafi, N., Alexander, M., Tosh, S. M., & Corredig, M. (2015). Dynamics of phase separation in oat β -glucan/milk mixtures studied with ultrasonic and diffusing wave spectroscopy. *Food Biophysics*, 10(1), 66-75.
- Sheehan, J. J. (2007). What causes the development of gas during ripening?. *Cheese problems solved*, 131.
- Sheehan, J. J. (2011). Cheese avoidance of gas blowing. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd Edn., Ed. W. F. John. San Diego, CA: Academic Press, 661–666.
- Sigfusson, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2001). Ultrasonic characterization of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Research International*, 34(1), 15-23.
- Sihufe, G. A., Zorrilla, S. E., & Rubiolo, A. C. (2010). The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggianito Argentino cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 247-253.
- Simal, S., Benedito, J., Clemente, G., Femenia, A., & Rosselló, C. (2003). Ultrasonic determination of the composition of a meat-based product. *Journal of Food Engineering*, 58(3), 253-257.
- Singh, A. P., McClements, D. J., & Marangoni, A. G. (2004). Solid fat content determination by ultrasonic velocimetry. *Food Research International*, 37(6), 545-555.
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 327-345.
- Sousa, M. J., & Malcata, F. X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82(2), 151-170.
- Spinnler, H. E., & Gripon, J. C. (2004). Surface Mould-ripened Cheeses—Cheese. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Fox P., McSweeney P., Cogan T., Guinee T. (Eds), Academic Press, (Vol. 2, pp. 157-174).
- Stepaniak, L. (2004). Dairy enzymology. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 153-171.

- Subramanian, A., Alvarez, V. B., Harper, W. J., & Rodriguez-Saona, L. E. (2011). Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using Fourier-transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 21(6), 434-440.
- Sultaneh, A. L. I., & Rohm, H. (2007). Using near infrared spectroscopy for the determination of total solids and protein content in cheese curd. *International Journal of Dairy Technology*, 60(4), 241-244.
- Tabla, R., Gómez, A., Rebollo, J. E., & Roa, I. (2015). Salt influence on surface microorganisms and ripening of soft ewe cheese. *Journal of Dairy Research*, 82(2), 215-221.
- Tabla, R., Gómez, A., Simancas, A., Rebollo, J. E., Molina, F., & Roa, I. (2016). *Enterobacteriaceae* species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw ewe's milk cheese: Gas production capacity. *Small ruminant research*, 145, 123-129.
- Taifi, N., Bakkali, F., Faiz, B., Moudden, A., Maze, G., & Décultot, D. (2006). Characterization of the syneresis and the firmness of the milk gel using an ultrasonic technique. *Measurement Science and Technology*, 17(2), 281-287.
- Tamime, A. Y. (Ed.). (2008). *Structure of dairy products*. John Wiley & Sons.
- Tavaria, F. K., & Malcata, F. X. (1998). Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protegee region. *Journal of Food Protection*, 61(5), 601-607.
- Tavaria, F. K., Franco, I., Carballo, F. J., & Malcata, F. X. (2003a). Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 13(7), 537-545.
- Tavaria, F. K. & Malcata, F. X. (2003b) Enzymatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Portuguese cheese. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 236-243.
- Tejada, L., & Fernandez-Salguero, J. (2003). Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Italian Journal of Food Science*, 15(1), 125-132.
- Tejada, L., Gomez, R., & Fernandez-Salguero, J. (2007). Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *Journal of food quality*, 30(1), 91-103.
- Telis-Romero, J., Vázquez, H. A., Bon, J., & Bedito, J. (2011). Ultrasonic assessment of fresh cheese composition. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 137-146.

- Thierry, A., Collins, Y. F., Mukdsi, M. A., McSweeney, P. L., Wilkinson, M. G., & Spinnler, H. E. (2017). Lipolysis and metabolism of fatty acids in cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (4th Edition), McSweeney, P. L., Fox, P. F., Cotter, P.D., Everett, D.W (Eds.). Academic Press, Elsevier, pp. 423-444.
- Ting, C. H., Kuo, F. J., Lien, C. C., & Sheng, C. T. (2009). Use of ultrasound for characterising the gelation process in heat induced CaSO₄· 2H₂O tofu curd. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 101-107.
- Torkamani, A. E., Juliano, P., Ajlouni, S., & Singh, T. K. (2014). Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 951-957.
- Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabaraki, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., Kalantzopoulos, G., (1994). The combined use of whole cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 444–458.
- Tunick, M. H. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal of Dairy Science*, 83(8), 1892-1898.
- Urbach, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*, 3, 389–422.
- Vásquez, N., Magán, C., Oblitas, J., Chuquizuta, T., Avila-George, H., & Castro, W. (2018). Comparison between artificial neural network and partial least squares regression models for hardness modeling during the ripening process of Swiss-type cheese using spectral profiles. *Journal of Food Engineering*, 219, 8-15.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C., & Montel, M. C. (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk?. *Food Microbiology*, 26(3), 305-310.
- Virto, M., Chávarri, F., Bustamante, M. A., Barron, L. J. R., Aramburu, M., Vicente, M. S., ... & De Renobales, M. (2003). Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour. *International Dairy Journal*, 13(5), 391-399.
- Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R., & Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57, 80-90.
- Wallhäußer, E., Sayed, A., Nöbel, S., Hussein, M. A., Hinrichs, J., & Becker, T. (2014). Determination of cleaning end of dairy protein fouling using an online system combining ultrasonic and classification methods. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 506-515.

- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). Milk for liquid consumption. Dairy Science and Technology, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC, 421-445.
- Walter, H.E., & Hargrove, R.C., (1972). Cheeses of the World. Dover Publications, Inc., New York.
- Wang, Q., Bulca, S., & Kulozik, U. (2007). A comparison of low-intensity ultrasound and oscillating rheology to assess the renneting properties of casein solutions after UHT heat pre-treatment. International Dairy Journal, 17(1), 50-58.
- Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A., & White, N. (2001). Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. International Dairy Journal, 11(4-7), 455-464.
- Weimer, B., Seefeldt, K., & Dias, B. (1999). Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications, 247-261.
- Wilkinson, M. G., & Kilcawley, K. N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. International Dairy Journal, 15(6-9), 817-830.
- Wu, D., & Sun, D. W. (2013). Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review—Part I: Fundamentals. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 19, 1-14.
- Yang, P., Zhao, B., Basir, O. A., & Mittal, G. S. (2007). Measures of similarity and detection of miniature foreign bodies in packaged foods. Food research international, 40(6), 742-747.
- Yeluri Jonnala, B., McSweeney, P. L., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. Frontiers in Microbiology, 9, 1020.
- Yvon, M., (2006). Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. Australian Journal of Dairy Technology 61, 88–96.
- Zabaleta, L., Albisu, M., Ojeda, M., Gil, P. F., Etaio, I., Perez-Elortondo, F. J., de Renobales, M., & Barron, L. J. R. (2016). Occurrence of sensory defects in semi-hard ewe's raw milk cheeses. Dairy Science & Technology, 96(1), 53-65.
- Zhang, G. M., Hou, C. G., Wang, Y. W., & Zhang, S. Y. (2001). Optimal frequency-to-bandwidth ratio of wavelet in ultrasonic non-destructive evaluation. Ultrasonics, 39(1), 13-17.
- Zhao, B., Basir, O. A., & Mittal, G. S. (2003). Detection of metal, glass and plastic pieces in bottled beverages using ultrasound. Food Research International, 36(5), 513-521.

- Zhao, B., Basir, O. A., & Mittal, G. S. (2007). Hybrid of multi-signal processing methods for detection of small objects in containers filled with beverages using ultrasound. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 655-660.
- Zhao, B., Basir, O. A., & Mittal, G. S. (2009). Detection of occluded small objects in glass bottles filled with beverages via ultrasound center frequency tracing. *LWT-Food Science and Technology*, 42(1), 162-167.
- Zhao, M., Beattie, R. J., Fearon, A. M., O'Donnell, C. P., & Downey, G. (2015). Prediction of naturally-occurring, industrially-induced and total trans fatty acids in butter, dairy spreads and Cheddar cheese using vibrational spectroscopy and multivariate data analysis. *International Dairy Journal*, 51, 41-51.
- Zhu, L., Gamez, G., Chen, H., Chingin, K., & Zenobi, R. (2009). Rapid detection of melamine in untreated milk and wheat gluten by ultrasound-assisted extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS). *Chemical Communications*, (5), 559-561.
- Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1075-1081.

ANEXO



Contributions to ultrasound monitoring of the process of milk curdling



Antonio Jiménez^{a,*}, Montaña Rufo^a, Jesús M. Paniagua^a, Abel T. Crespo^b, M. Patricia Guerrero^b,
M. José Riballo^b

^a Department of Applied Physics, School of Technology, University of Extremadura, Avenida de la Universidad, s/n, 10003 Cáceres, Spain

^b Department of Food Technology, Centro Tecnológico Agroalimentario Extremadura (CTAEX), Apdo. Correos 435, 06080 Badajoz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2016

Received in revised form 24 November 2016

Accepted 9 January 2017

Available online 10 January 2017

Keywords:

Milk coagulation process monitoring

Nondestructive ultrasound

Fast Fourier Transform

A-scan

Protein content

Correlation study

ABSTRACT

Ultrasound evaluation permits the state of milk being curdled to be determined quickly and cheaply, thus satisfying the demands faced by today's dairy product producers. This paper describes the non-invasive ultrasonic method of *in situ* monitoring the changing physical properties of milk during the renneting process. The basic objectives of the study were, on the one hand, to confirm the usefulness of conventional non-destructive ultrasonic testing (time-of-flight and attenuation of the ultrasound waves) in monitoring the process in the case of ewe's milk, and, on the other, to include other ultrasound parameters which have not previously been considered in studies on this topic, in particular, parameters provided by the Fast Fourier Transform technique. The experimental study was carried out in a dairy industry environment on four 52-l samples of raw milk in which were immersed 500 kHz ultrasound transducers. Other physicochemical parameters of the raw milk (pH, dry matter, protein, Gerber fat test, and lactose) were measured, as also were the pH and temperature of the curdled samples simultaneously with the ultrasound tests. Another contribution of this study is the linear correlation analysis of the aforementioned ultrasound parameters and the physicochemical properties of the curdled milk.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coagulation is the first stage that milk undergoes for most products it is made into. In cheese manufacturing in particular, rennet coagulation is characterized by three phases: enzymatic hydrolysis, aggregation, and gelation. The coagulation (or curdling) time is considered to mark the endpoint of the enzymatic phase and the onset of the physicochemical phase, i.e., aggregation. Moreover, this coagulation time is often used as a reference to determine the time at which the curd is cut and the whey is drained (the cutting time). Since precise determination of the cutting time is essential in optimizing the process, there are several practical and instrumental methods available for this determination [1]. Nevertheless, the practical methods (evaluating the coagulum's firmness by hand, for instance) raise hygiene concerns, and most of the instrumental methods are destructive and significantly deform the sample, resulting in imprecise measurements.

Ultrasound inspection techniques have been used to monitor milk curdling processes for several decades [2], mainly because they are non-destructive, they can be implemented in-line, and they are easy to automate. They require a thorough understanding

of the propagation of ultrasound in the specimen to be analyzed because curdled milk is usually an acoustically complex medium, which often makes it hard to clearly establish the relationship between its elastic properties and the aggregation kinetics of the coagulum. Most of these techniques monitor either both the phase velocity (or time-of-flight) and the attenuation (or amplitude) [3–5], or only the attenuation [6–8]. Less commonly used have been techniques based on measuring the variation undergone by the frequency components of the ultrasound waves after passing through the specimen. Indeed, in milk they have been used for other purposes – evaluating fat content [9], determining the elastic constants [10], and estimating the variation in speed and attenuation at different frequencies [11–13]. The ultrasound inspection techniques usually employed are resonance [14,15], immersion or contact in transmission mode [16,17], and pulse-echo mode [18,19], although air-coupled systems have also been used recently [4,20]. All of these techniques of course employ longitudinal waves, but recent research aimed at identifying the onset of coagulation has used shear waves. These waves do not propagate in liquids and their velocity of propagation depends on the viscoelastic characteristics of the medium. That is why they can be used only from the beginning of coagulation to monitor the evolution of the coagulum firmness [21].

* Corresponding author.

E-mail address: ajimenez@unex.es (A. Jiménez).

The present study addresses the monitoring of the curdling of the milk in cheesemaking. It presents various contributions to current knowledge on the subject. From the point of view of acoustics, in addition to time-of-flight and attenuation, we apply the fast Fourier transform (FFT) technique to study the variation during the process of the frequency components of transmitted ultrasound waves, firstly because it makes more sense to take the real wave propagation frequencies inside the milk samples, i.e., to use the FFT, instead of considering the nominal frequency of the transducers, and secondly because the FFT let us obtain the 25th, 50th, 75th and 99th percentiles of the received signal in the cumulative frequency periodograms. From a food technology point of view, this is the first application of the cited monitoring technique on raw ewe's milk in a dairy industry environment, permitting an assessment of the suitability and sensitivity of the results by comparison with those reported in previous studies which were mostly conducted on reconstituted skimmed milk and/or in a laboratory environment. We also determine in parallel other physicochemical parameters of the milk (temperature, pH, dry matter, protein, Gerber fat test, and lactose), and establish their relationships with the systematically measured ultrasound parameters.

The interest of this study is twofold. First is the verification at an industry level of the utility of ultrasound methods used to monitor changes in physico-mechanical properties during the curdling of

ewe's milk, including the estimation of the cutting time. The implementation of this type of inspection technique makes more efficient use of resources than do the traditional destructive or practical methods. And second is the contribution to knowledge of the acoustic properties of milk during its coagulation.

2. Description of the material

The experiments were performed with raw ewe's milk collected from a local dairy processing centre (*Hnos. Pajuelo SAT*) on four separate days. Each sample contained 52 l. They were used for both the characterization of the raw milk and for the coagulation process.

For the curdling process, all experiments were performed in a dairy industry environment, relying on the subjective judgment of a skilled cheesemaker as operator. The farmhouse-type craft production procedure for making "Torta del Casar PDO", a type of soft cheese [22], was followed (Fig. 1). When the milk reaches 28–32 °C, vegetable rennet is added. This is a liquid obtained from the pistils of cardoon (*Cynara cardunculus*) flowers. When the curd has formed (cutting time), it is broken into pieces of about the size of a grain of rice using fine metallic threads. All processes were carried out in a 100-l stainless steel vat with two axes, one clockwise and one counterclockwise, and of bicircular type.

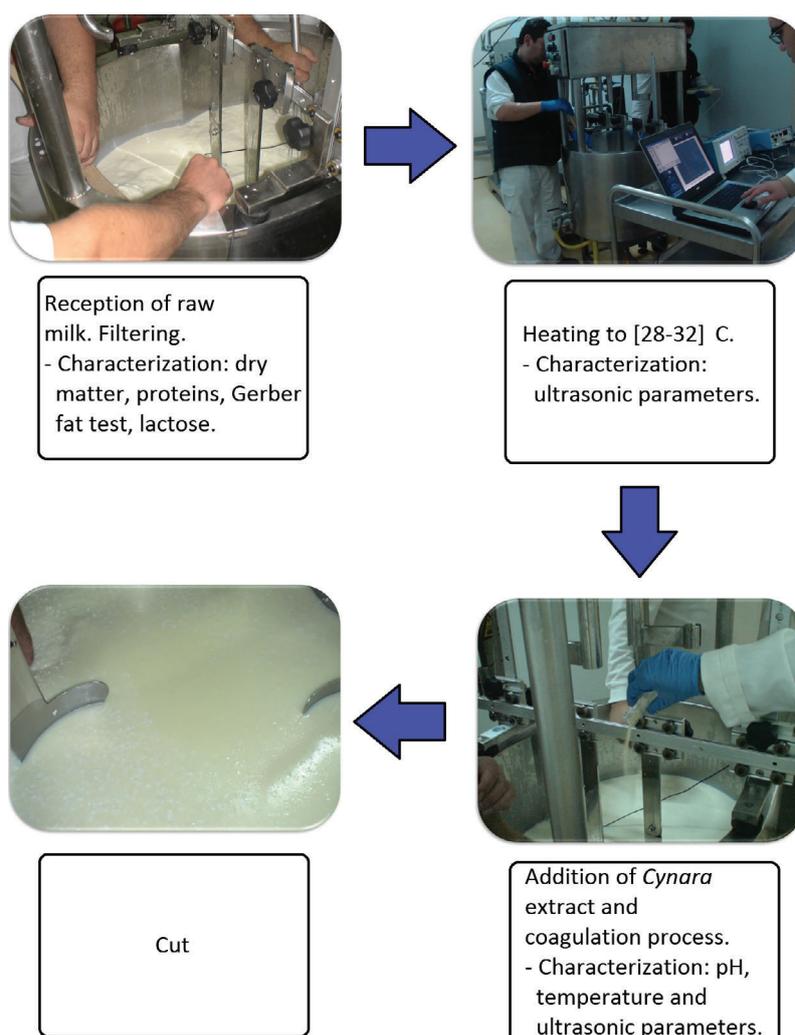


Fig. 1. Flowchart of the soft cheese-making process used in the study.

3. Methods

The non-ultrasound parameters of the four raw milk samples (dry matter, protein, density, Gerber fat test, and lactose) and of their curdling process (temperature and pH) were acquired in accordance with the Spanish norm [23]. In particular, the protein content was determined by Kjeldahl digestion, dry matter and lactose by gravimetry, fat content by the Gerber centrifuge method, and pH and temperature with a pH-meter and an electronic thermometer that had previously been calibrated.

With respect to the ultrasound parameters, the samples were inspected using immersion techniques in pulse-echo (PE) mode. Fig. 2 shows a schematic of the set-up used for the measurements. The immersion transducers were single-element longitudinal-wave transducers, whose wear surfaces are impedance matched to water. The transducers were mounted on a custom-designed metal structure that ensured their perfect face-to-face alignment, also reducing the risk of other errors being introduced by the operator. One of the transducers acted as a mirror which reflected the ultrasound waves. Whether this mode of inspection is used or that of through-transmission is irrelevant since they yield similar results [5]. The ultrasound signals were emitted and received using an Olympus Pulser-Receiver Panametrics-NDT Model 5077PR. The pulser section can deliver up to 400 V, and the range of pulse repetition rates is from 20 Hz to 5 kHz. The pulse rise time is typically less than 10 ns. The flexible receiver section provides a wide dynamic range from 1 to 59 dB gain with 1 dB sensitivity adjustments. Signal response is optimized by two-position high and low pass filters (out or 1 MHz, and out or 10 MHz, respectively), and 1 dB attenuation steps from 0 to 49 dB. For the acquisition and digitalization of the signals, the pulser-receiver was connected to a Tektronix TDS1012B oscilloscope which transferred the data of

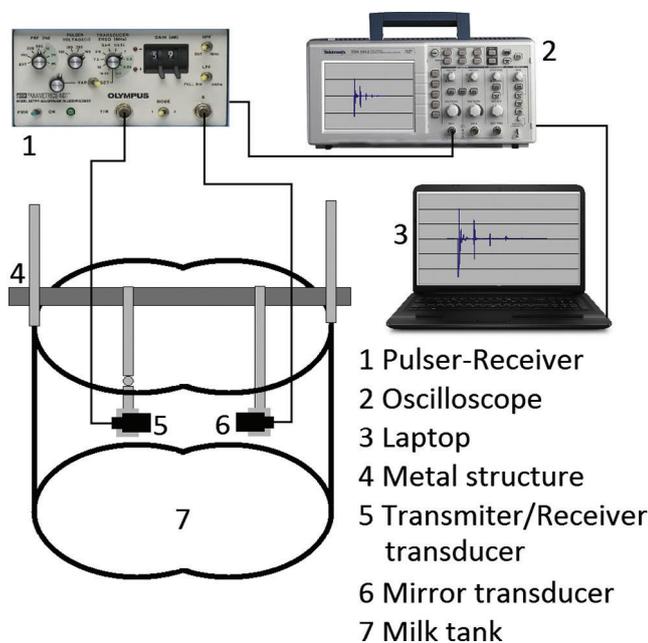


Fig. 2. Schematic of the set-up used for the measurements of the ultrasound parameters.

the displayed signals to a laptop computer, where they were stored under control of the Tektronix OpenChoice TDSPCS1 software package for subsequent processing and analysis. Olympus Panametrics-NDT Model V318-SU piezoelectric transducers were used to transmit the signals. Table 1 lists the main characteristics of these transducers, including the near-field zone and the beam-spread angle. The near-field is the region directly in front of the transducer where the sound field pressure varies widely. Because of these variations it can be difficult to accurately evaluate flaws using amplitude-based techniques in this zone. In the present work, the separation between transducers was from 3.03 to 3.08 cm, thus ensuring the consistency of the measurements. The beam-spread angle refers to the divergence of the sound beam as it travels through a medium (the solid angle which contains the main lobe of the beam in the far field). Since both values depend on the propagation medium, Table 1 provides approximate values for milk, considering a mean velocity of 1490 m/s for longitudinal waves. Once all the necessary equipment and devices were in place, the determinations of the various ultrasound parameters were performed.

3.1. Ultrasonic parameters

As described above, the ultrasound parameters determined were the longitudinal ultrasound pulse velocity UPV (or time-of-flight, TOF), various percentiles of the received signal in the FFT cumulative frequency periodograms, and the attenuation.

Fig. 3 shows a typical A-scan, in which i consecutive echoes were caused by reflections between the transducers facing each other. Among other things, this emitted-received signal acquired by the oscilloscope allowed one to determine the UPV within the raw milk samples and during their curdling. The calculation is based on the Fourier transform. This transform gives a frequency domain representation of the amplitude and phase of a continuous signal acquired in the time domain. Direct calculation of the Discrete Fourier Transform would be computationally very time intensive, but there are various algorithms that speed up the process. Among them is the FFT presented by Cooley & Tukey in 1965 [24]. Today, there are signal processing devices which rapidly

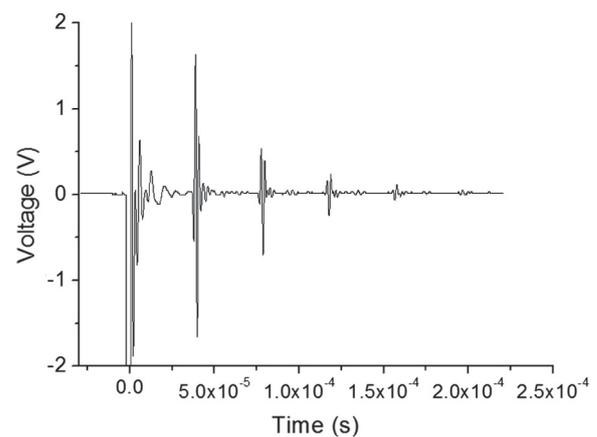


Fig. 3. Example of a typical A-scan received by the Panametrics V318 transducer. One observes the echoes of the ultrasound signal after the trigger pulse.

Table 1

Characteristics of the Panametrics V318 transducer used. The value UPV = 1490 m/s was taken for the calculation of N and φ .

Diameter (cm)	Central frequency (kHz)	-6 dB bandwidth (%)	N (near-field length) (cm)	φ (beam angle) ($^{\circ}$)
1.9	500	61.93	3.03	11.03

calculate the FFT, as was the case in the present study. The procedure used to calculate and plot the FFT identifies the frequency range covering the received ultrasound pulse signal and the central frequency (that of maximum amplitude). By way of example, Fig. 4 shows the FFT obtained from the A-scan of Fig. 3. This generated spectrum is used to derive additional properties of the object under investigation. The influence of a periodic excitation (here multiple echoes) shows up as maxima in the spectrum at multiples of the fundamental frequency, and thus as superpositions of the fundamental spectrum of the probe with an undulation in the form of equidistant maxima in the spectrum. The TOF between the reflections is obtained from the distances of the maxima. By means of the so-called cepstrum method, the spectrum can be smoothed and the length of the period determined directly. The cepstrum arises by a FFT of the logarithmized spectrum [25]. As one sees in the example of Fig. 5, which shows the cepstrum created from the FFT of Fig. 4, one reads the period t directly from the first maximum. Since the transducers are separated by a distance d , spectral evaluation methods provide a measurement of the UPV. In particular,

$$UPV = \frac{2d}{t} = \frac{d}{TOF} \quad (1)$$

Obviously, for times-of-flight equivalent to $2t, 3t, \dots, nt$, other maxima must also appear in the cepstrum. These serve to confirm the appropriateness of the value assigned to t . By way of example, Fig. 5 shows only the maxima corresponding to t and $2t$ because

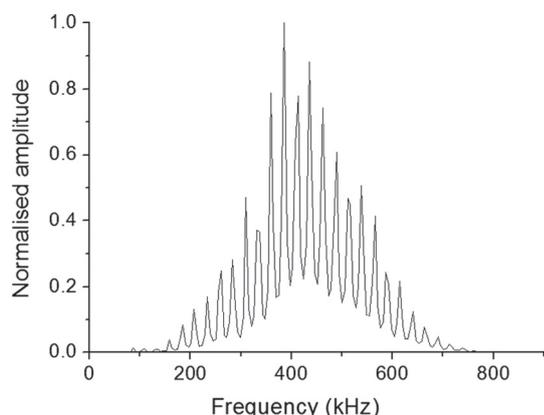


Fig. 4. FFT of the signals received in the inspection shown in Fig. 3.

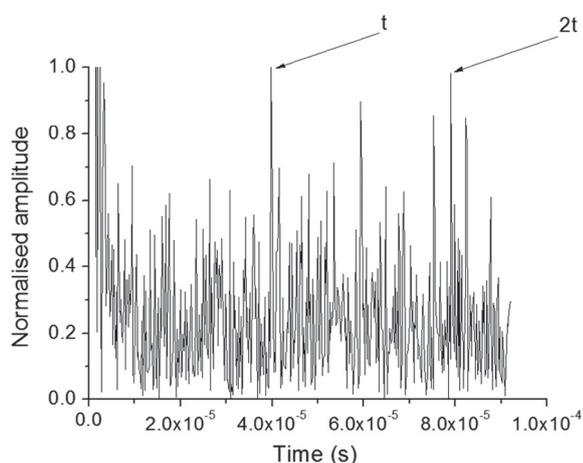


Fig. 5. Cepstrum corresponding to the FFT shown in Fig. 4. The t and $2t$ moments corresponding to the periodic excitations of the FFT are shown.

the time interval originally selected in the acquisition of the A-scan does not permit the range in the time domain to be extended to show more maxima.

Recent studies [26] support the suitability of using this method of calculating the speed of the sound waves as against the traditional computation from the times obtained for consecutive echoes in the receiver's A-scan, or even more simply, from the arrival time of the first echo [27]. This is because the errors involved in a cepstrum analysis are smaller. In the present study in particular, the errors in the cepstrum determination of the UPV were less than 0.4%.

Other parameters considered in this study were those related to the FFT of the A-scan signals. It is important to note that, instead of considering the nominal frequency of the transducers, it made more sense to take the real wave propagation frequencies inside the milk samples, i.e., to use the FFT. Firstly, taking as example Fig. 4, one can see that the frequency distributions are not at all close to Gaussian, so that the value of the largest amplitude of the FFT is not *a priori* a meaningful value with which to characterize the milk sample being inspected. And secondly, even though the transducer has a central frequency of 500 kHz and a -6 dB bandwidth of 61.93%, the FFT obtained does not have a maximum amplitude at that frequency, but at others that are clearly lower. That is why, in order to facilitate the subsequent correlation analysis between the FFT and the rest of the parameters, we also constructed the cumulative frequency periodograms, showing the 25th, 50th, 75th, and 99th percentiles of the frequencies of the received signals. i.e., if the 75th percentile of the cumulative frequency is at x Hz for a particular inspection, this means that 75% of the received signals had frequencies below x Hz. For example, Fig. 6 shows the cumulative frequency periodogram created from the FFT of Fig. 4. Thus, for each A-scan and subsequent FFT and frequency periodogram, the values of the central frequency and the different percentiles of the signals received were ($\langle FFT \rangle$, $\langle FFT_{25} \rangle$, $\langle FFT_{50} \rangle$, $\langle FFT_{75} \rangle$, and $\langle FFT_{99} \rangle$).

Another parameter considered was the ultrasound pulse attenuation. This is a measure of the progressive energy loss undergone by the signals as they propagate through the material. This loss is mainly due to two mechanisms: energy absorption (above all, thermoelastic effects) and scattering (reflection of the pulse front at discontinuities in the material) [28]. Attenuation is usually measured from the echoes observed on the A-scan which originate from reflections in the material. Thus, the attenuation coefficient α (in neper/m) was computed as:

$$\alpha = \frac{1}{s} \ln \left(\frac{A_i}{A_j} \right) \quad (2)$$

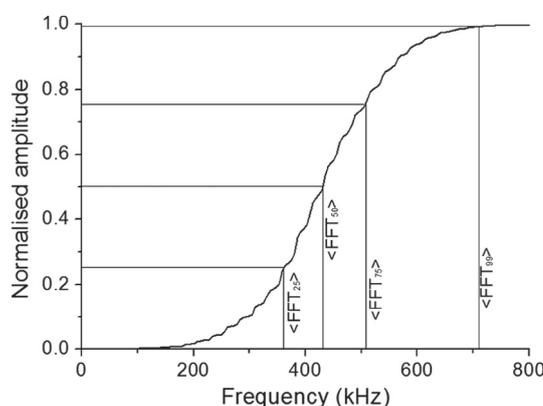


Fig. 6. Cumulative frequency periodogram corresponding to the FFT shown in Fig. 4. The 25th, 50th, 75th and 99th percentiles of the frequencies are expressly indicated.

where A_i and A_j are the (peak-to-peak) amplitudes of echoes i and j , respectively, and s represents the space covered by the ultrasound wave between them. Three of four echoes were considered, and α was determined from the slope of the plot of $\ln(A_i/A_j)$ vs. s [5,8].

4. Experimental results and discussions

4.1. Raw milk samples

The non-ultrasound parameters of the raw ewe's milk samples are listed in Table 2, and the ultrasound parameters in Table 3 together with the pH and temperature. The ultrasound parameters were measured immediately prior to the addition of the vegetable rennet. Although, as noted above, there are no literature values with which to contrast these ultrasound results, they are consistent with the values reported for other types of milk. In particular, Gunasekaran et al. [6] report skimmed milk values ranging from 1385 m/s to 1420 m/s and from 19 Np/m to 25 Np/m at an inspection frequency of 1 MHz. Taifi et al. [18] report reconstituted milk values of 1514 m/s and 20 Np/m with 5 MHz transducers. Finally, Koc et al. [8] report cow's milk attenuation values in the range 12–40 Np/m with a 1 MHz transducer at temperatures in the range 28–34 °C. The differences in these ultrasound parameters may be due to the different compositions of the samples. In the present work, the raw milk samples inspected were acquired on four dates covering a period of 114 days. Similarly, our ultrasound inspection temperatures were slightly different because the experiments were conducted in a dairy industry environment, relying on the subjective judgment of a skilled cheesemaker as operator. The different dates of the extraction of the milk samples are the reason why we observed no increase in the speed of ultrasound wave propagation with increasing temperature in the sense indicated by various studies in the literature [3,29].

With respect to the FFT results, the frequencies of the ultrasound waves propagating through the raw milk samples were generally less than or equal to the nominal frequency of the transducer. Fig. 7 shows the cumulative frequency periodograms corresponding to the four samples of raw milk. As can be seen, 40% of the frequency components of the inspection of Sample M1 were above 500 kHz, but this proportion fell to even below 20% for Sample M2. For some percentiles between the 45th and 90th approximately, the cumulative frequencies can differ from one sample to another. The linear correlation coefficient between the two parameters $\langle \text{FFT}_{75} \rangle$ and $\langle \text{FFT}_{50} \rangle$ was greater than 0.99. Beneath the 45th percentile however, the cumulative frequencies are closer to each other, and it is difficult to distinguish clearly which sample of milk has been inspected. Above the 90th percentile, the flatness of the curve means that the error associated with the cumulative frequency is greater.

Table 2

Non-ultrasound parameters of the raw ewe's milk samples.

Reference	Proteins (%)	Dry matter (%)	Density (kg/l)	Lactose (g/l)	Gerber fat test (%)
M1	3.03	18.84	1.03	41.96	7.4
M2	4.59	18.17	1.03	40.18	7.0
M3	3.70	20.60	1.03	17.04	8.8
M4	4.47	18.80	1.02	21.43	8.5

Table 3

Ultrasound parameters, temperature (T) and pH of the raw ewe's milk samples.

Ref.	UPV (m/s)	$\langle \text{FFT} \rangle$ (kHz)	$\langle \text{FFT}_{25} \rangle$ (kHz)	$\langle \text{FFT}_{50} \rangle$ (kHz)	$\langle \text{FFT}_{75} \rangle$ (kHz)	$\langle \text{FFT}_{99} \rangle$ (kHz)	α (Np/m)	T (°C)	pH
M1	1514 ± 5	446 ± 5	419 ± 5	479 ± 5	550 ± 5	1100 ± 400	28.2 ± 0.9	32.0	6.55
M2	1380 ± 5	417 ± 6	383 ± 6	428 ± 6	489 ± 6	1010 ± 240	30.0 ± 0.4	31.2	6.57
M3	1449 ± 5	433 ± 5	392 ± 5	458 ± 5	530 ± 5	1100 ± 300	26.42 ± 0.11	31.1	6.58
M4	1434 ± 5	434 ± 5	400 ± 5	445 ± 5	505 ± 5	900 ± 300	25.7 ± 0.4	33.6	6.57

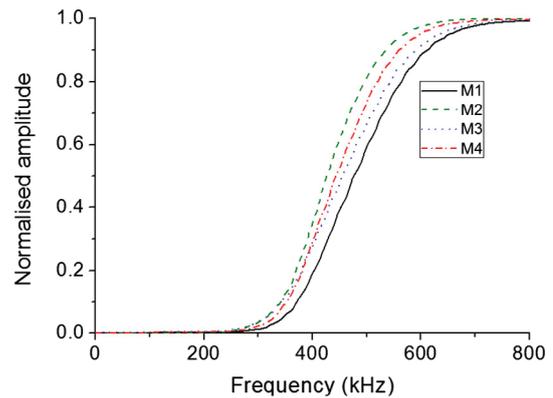


Fig. 7. Cumulative frequency periodogram corresponding to the four raw milk samples.

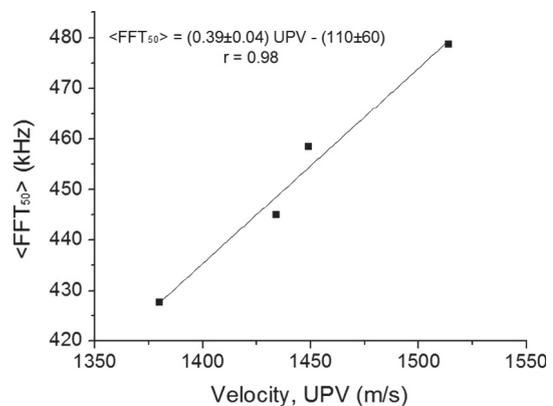


Fig. 8. Linear regression between the velocity (UPV) and values of the FFT corresponding to the 50th percentile ($\langle \text{FFT}_{50} \rangle$) for the set of milk samples studied.

The samples with the highest velocities were also those with highest FFT frequencies, as is evident in Fig. 8 which plots $\langle \text{FFT}_{50} \rangle$ against UPV. Between the two, there is a statistically significant linear relationship ($P < 0.05$) with a positive slope.

4.2. Coagulation processes

The evolution of the pH and temperature of the monitored samples during curdling did not show any consistent trend. The two parameters varied slightly during the entire process. In particular, the pH varied between 6.49 and 6.59 in all the curdling processes. The temperature ranges in which the processes were performed

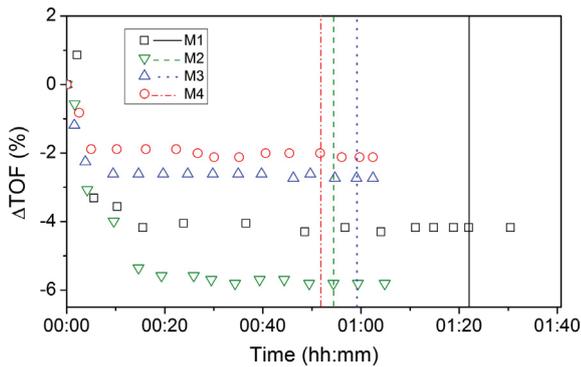


Fig. 9. Relative changes of the time-of-flight (Δ TOF) of the ultrasound waves during curdling of the milk samples. The vertical lines indicate the cutting time as indicated by the skilled cheesemaker.

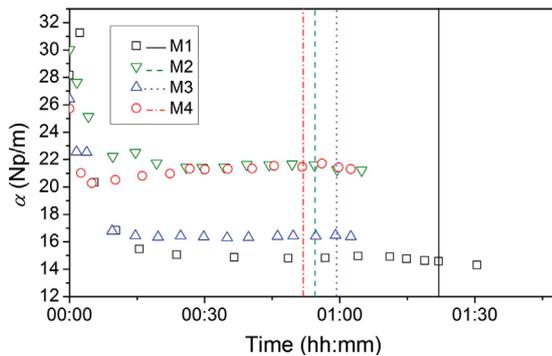


Fig. 10. Evolution of ultrasound attenuation (α) during the curdling of the milk samples. The vertical lines indicate the cutting time as indicated by the skilled cheesemaker.

were [32.0–33.1] °C, [31.2–32.0] °C, [31.1–34.5] °C, and [33.5–35.2] °C for Samples M1, M2, M3, and M4, respectively.

Fig. 9 shows the relative variations in the TOF (calculated relative to the initial TOF) of the ultrasound waves during the curdling of the samples. Similarly, Fig. 10 shows the evolution of the attenuation of the ultrasound waves during curdling, and Fig. 11 the evolution of $\langle \text{FFT}_{75} \rangle$ (the behavior of $\langle \text{FFT}_{50} \rangle$ is very similar). As one observes in all these plots, the changes in the ultrasound parameters occur in two steps. In the first, there is a rapid initial decrease in the TOF (which implies an increase in the UPV), attenuation, and frequency of the transmitted ultrasound waves down

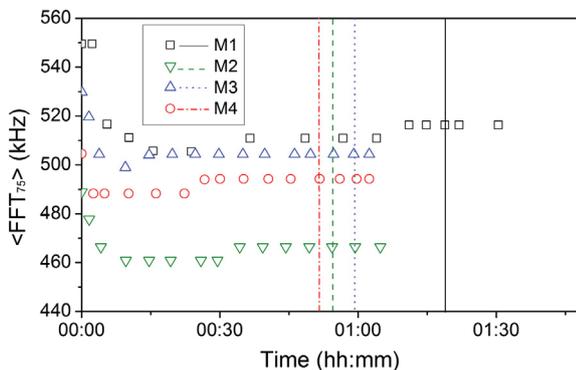


Fig. 11. Evolution of the values of the FFT corresponding to the 75th percentile ($\langle \text{FFT}_{75} \rangle$) during the curdling of the milk samples. The vertical lines indicate the cutting time as indicated by the skilled cheesemaker.

to respective regions of a certain stability which, nevertheless, cannot be categorized as minima given the errors associated with the measurements. This second phase of apparent stability remains until the end of the monitoring process. The two phases of the process almost coincide in time regardless of which parameter is being analyzed. These changes in the ultrasound parameters have to be interpreted as reflecting a change in the mechanical resistance of the samples, in particular, with the two steps corresponding to the first (enzymatic) and second (aggregation) stages of milk curdling [7], and the transition between them can be identified as the coagulation time [30]. During enzymatic hydrolysis, a specific enzyme, chymosin, transforms the liquid milk into a viscoelastic semi-solid, the coagulum. Chymosin acts upon milk's kappa-casein, partially fragmenting the molecules. This leads to a change in the surface charge of the casein micelles (colloidal particles containing many protein molecules), increasing their hydrophobicity, and favoring their aggregation [31]. Micelle aggregation is responsible for the increase in the milk's viscosity, and consequently also in the mechanical resistance of the medium.

Various studies [3,18] have observed similar UPV behavior during the curdling of samples of reconstituted skimmed milk under controlled conditions of milk powder concentration, temperature, and renneting pH. Other studies report the same ultrasound attenuation behavior during curdling of reconstituted skimmed milk [6,7,18] and whole cow's milk [8] under controlled conditions of rennet concentrations and temperature. Some of these studies establish an algorithm for the relationship between the coagulation time and the cutting time [6,32]. Our study is consistent with them in the sense that the earlier the coagulation time is reached, the earlier also is the cutting time. This relationship cannot be affirmed with any great precision, however, since the samples studied were from different sources, and the temperature and pH conditions were not fully controlled, but followed the indications of the skilled cheesemaker. Nonetheless, one can deduce from the results that the cutting time is roughly 6 times the coagulation time.

It has to be noted that the evolution curves of the ultrasound parameters analyzed differed from sample to sample, i.e., although the overall trend of the curdling process was as described above for each sample, there was no general overlap of the curves. That some curves of a given parameter can clearly be distinguished between different milks may be, as observed above, because the samples were taken from different batches.

We must make the proviso that if the ultrasound parameter studied had been the greatest amplitudes of the FFT ($\langle \text{FFT} \rangle$) then we would not have observed the aforementioned two stages in the process. Similarly, if the parameter chosen had been $\langle \text{FFT}_{25} \rangle$, there would have been a general overlap between the curves of the different samples, and, as noted above, the errors associated with the determination of $\langle \text{FFT}_{99} \rangle$ were very large. The variables $\langle \text{FFT} \rangle$, $\langle \text{FFT}_{25} \rangle$, and $\langle \text{FFT}_{99} \rangle$ were thus unsuitable for inclusion in the statistical analysis of the data.

The similar behavior exhibited by the relative variations in the time-of-flight, the attenuation, and $\langle \text{FFT}_{75} \rangle$ (or $\langle \text{FFT}_{50} \rangle$) during the curdling of the samples studied is reflected in statistically significant, positive, linear correlations ($P < 0.05$) between them. This implies, for example, that the aforementioned decrease in attenuation (or increase in transmission) during curdling is more clearly marked for the lower frequency components of the spectrum emitted by the transducer. In addition, as was to be expected, the ultrasound characteristics of the raw milk affect those of the curdling process. An example is presented in Fig. 12 which shows the result of the linear regression analysis of the attenuation measured in each raw milk sample against the relative variation in the time-of-flight measured at the cutting time of the respective four curdling processes. One observes that the smaller the ultrasound

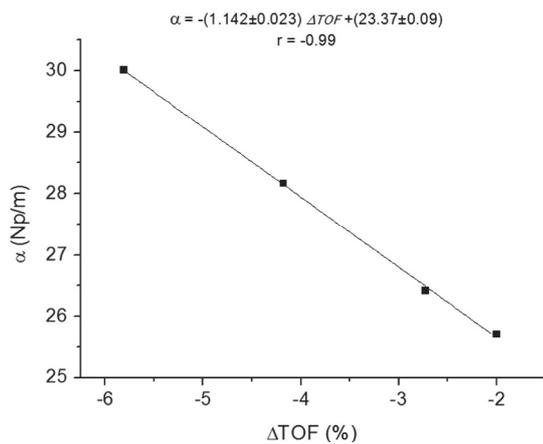


Fig. 12. Linear regression between the ultrasound attenuation (α) of the raw milk samples and the relative changes in the time-of-flight (ΔTOF) of the ultrasound waves as measured at the cutting times corresponding to their respective curdling processes.

attenuation coefficient of the raw milk sample, the smaller is the relative decrease in the time-of-flight of the waves during curdling.

4.3. Correlation study

Various studies have shown that the speed and attenuation of ultrasound in milk during curdling depend on such properties as pH, temperature, and the calcium chloride, milk powder, and rennet concentrations [3,6–8,10,18]. These parameters were not considered in the present work because: (i) for pH and temperature, the conditions were not those of a laboratory experiment, but were uncontrolled, following the criteria set by the skilled cheesemaker, (ii) calcium chloride and milk powder concentrations were inapplicable since raw milk was used, and (iii) for rennet concentration, this parameter was kept the same for all four samples. In this subsection, we shall describe the results of an ANOVA in which significant ($P < 0.05$) correlations were found, of particular interest being some involving parameters that had as yet not been considered in other studies of milks.

With regard to the raw milk samples, there were statistically significant negative correlations of their protein content with $\langle FFT_{50} \rangle$ ($r = -0.97$) and with $\langle FFT_{75} \rangle$ ($r = -0.98$) (Fig. 13). This result suggests that higher protein contents favor the transmission of the lower spectral frequencies emitted by the transducer as against the higher frequencies. In some form then, the micelle structure of the caseins (the most abundant of the milk proteins)

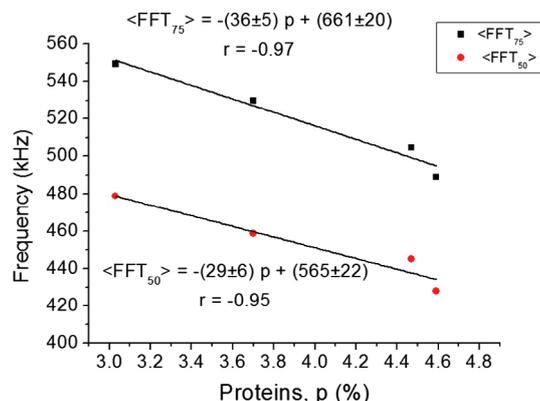


Fig. 13. Linear regressions of the protein content p of the raw milk samples with $\langle FFT_{50} \rangle$ and with $\langle FFT_{75} \rangle$.

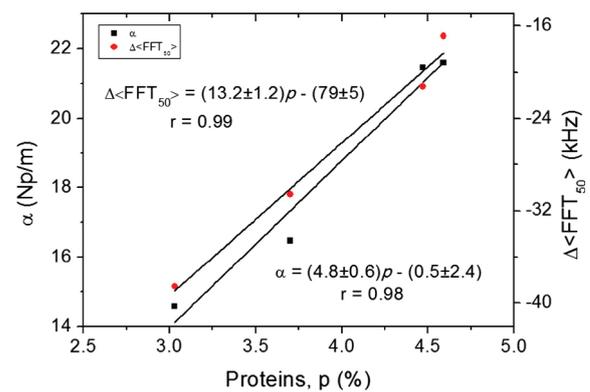


Fig. 14. Linear regressions of the protein content p of the raw milk samples with the ultrasound attenuation (α) measured at the cutting time, and with the changes ($\Delta \langle FFT_{50} \rangle$) in the $\langle FFT_{50} \rangle$ of the ultrasound waves also measured at the cutting time relative to the values measured at the initial time.

which forms the colloidal dispersion appears to significantly influence the differing attenuation of the ultrasound inspection frequencies of the milk samples. Other studies have reached the same conclusion by other means, finding in particular that micellar particles of reconstituted milk are the cause of the frequency-dependent attenuation measured for ultrasound waves propagating in it [10,11]. The milk's protein content also influences the attenuation of the different frequency components during curdling, as is apparent in the plots in Fig. 14 of the attenuation coefficient measured at the cutting time and the variation in $\langle FFT_{50} \rangle$ at the cutting time relative to the initial time of the curdling process, both plotted against the protein content of the milk samples. Given the fact noted above that the decrease in attenuation during curdling is more marked for the lower frequency components than for the higher frequencies, it is apparent that the milk samples with higher protein content will be those in which this decrease in attenuation is less. The strong dependence of attenuation on frequency is considered normal for protein solutions [33], although there is little evidence available on the acoustic properties of casein micelles, especially when they aggregate [12]. The present results may therefore shed some light on this question.

Finally, no statistically significant, mathematically simple, relationships were found between the ultrasound parameters and the dry matter, lactose, or fat contents of the samples analyzed.

5. Conclusions

For the raw milk samples, the UPV and attenuation results were consistent with the literature values. With respect to the FFTs, the frequencies of the ultrasound waves propagating through the samples were generally less than or equal to the nominal frequency of the transducer. A number of correlations were established between the various ultrasound parameters analyzed. In particular, the behavior of the FFT correlated with that of the UPV, with the samples of higher ultrasound velocities also presenting higher FFT values.

For the curdling processes, changes in ultrasound parameters occurred in two steps which corresponded to the first and second phases of milk curdling – the enzymatic and the aggregation phases. At first, there was an increase in the UPV, and decreases in the attenuation and frequency of the transmitted ultrasound waves, until reaching respective regions of a certain stability which remained until the end of the monitoring process. It was inferred from these results that the cutting time is roughly 6 times the curdling time. Statistically significant positive correlations were found between various ultrasound parameters.

The ultrasound characteristics of the raw milk influenced those measured during the curdling process. In particular, the samples of raw milk that had lower ultrasound attenuation coefficients experienced less relative decrease in the time-of-flight of the waves as measured during curdling.

The statistically significant correlations found between the ultrasound and non-ultrasound parameters of the four samples add value to the utility of this non-destructive technique. Of particular interest because of their novelty with respect to the literature existing on the topic are the correlations observed between: (a) the protein content of the milk, both raw and curdled, and the frequency components, and (b) the protein content and the attenuation of the frequency components as measured during the curdling process. These novel correlations lend further support to the use of ultrasound as a non-destructive technique for characterizing milk, since these are properties that can directly add to knowledge of the acoustic properties of casein micelles, especially as they aggregate.

Acknowledgements

Financial support from FEDER and the Plan Nacional I+D (CIT-060000-2008-0008) is gratefully acknowledged.

References

- [1] P. Garnot, N.F. Olson, Use of oscillatory deformation technique to determine clotting times and rigidities of milk clotted with different concentrations of rennet, *J. Food Sci.* 47 (1982) 1912–1915.
- [2] L. Elvira, J. Rodríguez, L.C. Lynnworth, Sound speed and density characterization of milk adulterated with melamine, *J. Acoust. Soc. Am.* 125 (2009) 177–182.
- [3] G. Nassar, B. Nongaillard, Y. Noël, Study by ultrasound of the impact of technological parameters changes in the milk gelation process, *J. Food Eng.* 63 (2004) 229–236.
- [4] T.H. Gan, P. Pallav, D.A. Hutchins, Non-contact ultrasonic quality measurements of food products, *J. Food Eng.* 77 (2006) 239–247.
- [5] A. Jiménez, A. Crespo, J. Piedehierro, M.M. Rufo, M.P. Guerrero, J.M. Paniagua, M.J. Riballo, A. Antolín, Preliminary study to assess ultrasonic characteristics of Torta del Casar – type cheese, on the CD-ROM: Sydney, August 23–27, in: Proceedings ICA 2010, 20th International Congress on Acoustics (ISBN 978-0-646-54052-8), 2010, paper 121.
- [6] S. Gunasekaran, C. Ay, Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics, *J. Food Process Eng.* 19 (1996) 63–73.
- [7] F. Bakkali, A. Moudden, B. Faiz, A. Amghar, G. Maze, F. Montero de Espinosa, F. Akhnaq, Ultrasonic measurement of milk coagulation time, *Meas. Sci. Technol.* 12 (2001) 2154–2159.
- [8] A.B. Koc, B. Ozer, Nondestructive monitoring of renneted whole milk during cheese manufacturing, *Food Res. Int.* 41 (2008) 745–750.
- [9] T. Kobayashi, H. Tai, S. Kato, Measurement method of particle concentration and acoustic properties in suspension using a focused ultrasonic impulse radiated from a plano-concave transducer, *Ultrasonics* 44 (2006) e491–e496.
- [10] L. Benguigui, J. Emery, D. Durand, J.P. Busnel, Ultrasonic study of milk clotting, *Lait* 74 (1994) 197–206.
- [11] W.G. Griffin, M.C.A. Griffin, The attenuation of ultrasound in aqueous suspensions of casein micelles from bovine milk, *J. Acoust. Soc. Am.* 87 (1990) 2541–2550.
- [12] M. Corredig, M. Alexander, D.G. Dalgleish, The application of ultrasonic spectroscopy to the study of the gelation of milk components, *Food Res. Int.* 557–565 (2004).
- [13] C. Dwyer, L. Donnelly, V. Buckin, Ultrasonic analysis of rennet-induced pre-gelation and gelation processes in milk, *J. Dairy Res.* 72 (2005) 303–310.
- [14] Q. Wang, S. Bulca, U. Kulozik, A comparison of low-intensity ultrasound and oscillating rheology to assess the renneting properties of casein solutions after UHT heat pre-treatment, *Int. Dairy J.* 17 (2007) 50–58.
- [15] A. Prieve, A. Sarvazyan, Cylindrical standing wave resonator for liquid food quality control, *J. Acoust. Soc. Am.* 125 (2009) 2593.
- [16] J. Benedito, J.A. Carcel, R. Gonzalez, A. Mulet, Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes, *Ultrasonics* 40 (2002) 19–23.
- [17] G. Nassar, M.N. Sabra, F. Lefebvre, M. Toubal, B. Nongaillard, Y. Noel, Design of low-frequency ultrasonic sensors for the analysis of the draining stage of cheese production, *Ultrasonics* 44 (2006) 1045–1050.
- [18] N. Taifi, F. Bakkali, B. Faiz, A. Moudden, G. Maze, D. Décultot, Characterization of the syneresis and the firmness of the milk gel using an ultrasonic technique, *Meas. Sci. Technol.* 17 (2006) 281–287.
- [19] E. Budelli, N. Pérez, P. Lema, C. Negreira, Analysis of ultrasonic techniques for monitoring milk coagulation during cheesemaking, in: On the International Symposium on Ultrasound in the Control of Industrial Processes (UCIP2012). IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering, vol. 42, 2012, IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/42/1/01204>.
- [20] S. Meyer, S.A. Hindle, J.P. Sandoz, T.H. Gan, D.A. Hutchins, Non-contact evaluation of milk-based products using air-coupled ultrasound, *Meas. Sci. Technol.* 17 (2006) 1838–1846.
- [21] E. Budelli, M. Bernal, P. Lema, M. Fink, C. Negreira, M. Tanter, J.L. Gennisson, Use of shear wave elastography for monitoring enzymatic milk coagulation, *J. Food Eng.* 136 (2014) 73–79.
- [22] OJEC 2002/C 291/02 Publication of an application for registration pursuant to Article 6(2) of Council Regulation (EEC) No 2081/92 of the protection of geographical indications and designations of origin. Official Journal of the European Communities C291/2 11.26.2002.
- [23] S.A. Panreac Química, Analíticos en alimentaria, Métodos oficiales de análisis, Leches y productos lácteos, 044-15-500-7/99 Dep. Legal B-36.720-99.
- [24] J.W. Cooley, J.W. Tukey, An algorithm for the machine calculation of complex Fourier Series, *Math. Comput.* 19 (1965) 297–301.
- [25] T. Gudra, K.J. Opielinski, Applying spectrum analysis and cepstrum analysis to examine the cavitation threshold in water and in salt solution, *Ultrasonics* 42 (2004) 621–627.
- [26] M.M. Rufo, A. Jiménez, J.M. Paniagua, Comparative study of different methods to assess ultrasonic velocities of waves in a liquid medium, on the CD-ROM: Prague, in: October 6–10, Conference Proceedings 11th ECNDT, 11th European Conference on NDT (ISBN 978-80-214-5018-9, available from <www.ndt.net> ISSN 1435-4934 vol. 19 No. 12), paper 284, 2014.
- [27] P. Avanesians, M. Momayez, Wave separation: application for arrival time detection in ultrasonic signals, *Ultrasonics* 55 (2015) 15–25.
- [28] C. Cerrillo, A. Jiménez, M. Rufo, J. Paniagua, F.T. Pachón, New contributions to granite characterization by ultrasonic testing, *Ultrasonics* 54 (2014) 156–167.
- [29] L. Elvira, L. Sampedro, F. Montero de Espinosa, J. Matesanz, Y. Gómez-Ullate, P. Resa, F.J. Echevarría, J.R. Iglesias, Eight channel ultrasonic device for non-invasive quality evaluation in packed milk, *Ultrasonics* 45 (2006) 92–99.
- [30] C. Ay, S. Gunasekaran, Ultrasonic attenuation measurements for estimating milk coagulation time, *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 37 (1994) 857–862.
- [31] C.G. de Kruif, C. Holt, Casein micelle structure, functions and interactions, in: F. Fox, P.L.H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry* (vol. 1): Proteins, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003, pp. 233–276.
- [32] A.W. Kowalchuk, N.F. Olson, Effect of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet, *J. Dairy Sci.* 60 (1977) 1256–1259.
- [33] K.C. Cho, W.P. Leung, H.Y. Mok, C.L. Choy, Ultrasonic absorption in myoglobin and other globular proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 830 (1985) 36–44.



Application of ultrasound for quality control of Torta del Casar cheese ripening

Abel Crespo,¹ Alberto Martín,^{2,3*} Santiago Ruiz-Moyano,^{2,3} María José Benito,^{2,3} Montaña Rufo,^{4,5} Jesús M. Paniagua,^{4,5} and Antonio Jiménez^{4,5}

¹National Technological Centre for Food and Agriculture “Extremadura” (CTAEX), Ctra. Villafranco a Balboa km. 1.2, Villafranco del Guadiana, 06195 Badajoz, Spain

²Food Science and Nutrition, School of Agricultural Engineering, University of Extremadura, Avda. Adolfo Suárez s/n, 06071 Badajoz, Spain

³University Research Institute of Agro-Food Resources (INURA), Avda. de la Investigación s/n, Campus Universitario, 06006 Badajoz, Spain

⁴Department of Applied Physics, School of Technology, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain

⁵Research Institute of Meat and Meat Product, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain

ABSTRACT

This work aimed to establish the ultrasound parameters that can be useful to classify the defects in the soft cheese Torta del Casar during ripening. During ripening by ultrasound, 1 standard and 3 defective cheese batches (anomalous microbial population, inadequate pressing curd, and excessive pressing curd) were evaluated. Ultrasound parameters related to velocity, attenuation, and frequency were calculated and correlated with the physicochemical and rheological properties of the cheeses. Ultrasound data were considered variables in linear discriminant analysis to attempt cheese classification at different periods of the ripening process. Defective soft cheeses could be discriminated from standard ones with good accuracy, mainly at the final stages of ripening. The differentiation of cheese samples from 2 of the defective cheese batches (anomalous microbial population and inadequate pressing curd) from the standard was mainly attributed to different values of the attenuation-related parameters, whereas for samples from the other defective batch (excessive pressing curd), some parameters related to velocity and frequency were responsible for such discrimination.

Key words: Torta del Casar, ultrasound, defect classification, linear discriminant analysis

INTRODUCTION

Torta del Casar is a high-quality Spanish cheese marketed under the Registry of the Protected Designation of Origin Torta del Casar, in accordance with Regulation (EC) 1491/2003 (European Commission, 2003). This type of soft-bodied cheese is made from raw ewe milk

using only vegetable coagulant as rennet and without any added starter culture. The absence of a standardizing thermal process means the final characteristics depend on the indigenous microbiota present (Ordiales et al., 2013a,b). In addition, the milk-clotting activity of the traditional vegetable coagulant, prepared using an aqueous infusion of the dried flowers from *Cynara cardunculus* L., presents great variability. Ordiales et al. (2012) showed that the diverse natural populations harvested at different flower ripening stages, mixed with other parts of the plant and dried in different conditions, strongly influence its coagulant properties. This major heterogeneity in Torta del Casar manufacture can negatively affect the quality parameters, including low product yield, and inhomogeneity of relevant sensorial factors between cheese batches, such as texture parameters (Tunick, 2000). Ordiales et al. (2013b) revealed that the uncontrolled growth of heterofermentative lactic acid bacteria (**LAB**) adversely influences the flavor of Torta del Casar. Likewise, the clotting and proteolytic activities of vegetable rennets used in the manufacturing of soft-type cheeses affect both the physicochemical parameters in the initial stages and the texture and sensorial properties of the final product (Ordiales et al., 2014). Thus, technological quality control during the cheese-making process by fast, reliable methods would be desirable for standardization of this high-quality product.

Highlighted among the nondestructive techniques for assessing food properties are small-displacement probes; vibration rheometers; visible-, near-, and mid-infrared spectroscopy; z-nose (advanced electronic nose); nuclear magnetic resonance spectroscopy; electronic noses; computer vision; and ultrasound (Benedito et al., 2006). Ultrasound-based technologies have been proposed as a quality control tool not only to determine the optimum cut time during cheese manufacture (Koc and Ozer, 2008; Jiménez et al., 2017) but also to detect

Received January 5, 2020.

Accepted May 30, 2020.

*Corresponding author: amartin@unex.es

process anomalies in-line (Telis-Romero et al., 2011). Other researchers used contact or noncontact ultrasound to detect defects and internal objects in cheeses (Lee et al., 1992; Hægström and Luukkala, 2001; Lee-mans and Destain, 2009) and to evaluate the texture of cheeses such as Cheddar, Mahon, and Manchego (Benedito et al., 2000, 2002, 2006; Cho et al., 2001; Cho and Irudayaraj, 2003; Nassar et al., 2010). Most studies carried out to detect texture defects in cheese using ultrasound have measured ultrasonic velocity and attenuation at one or more temperatures. In the present work, defective Torta del Casar batches were analyzed by ultrasound during ripening, and several ultrasound parameters related to the velocity, frequency, and attenuation were correlated with the physicochemical and texture parameters of the cheese and used to discriminate these defective batches from standard samples at the ripening temperature.

The objective of this work was to assess the feasibility of ultrasound as a tool for quality control in ripening of Torta del Casar, relating the ultrasonic parameters to the physicochemical and texture characteristics of the cheeses. In addition, ultrasonic parameters were used to discriminate between standard cheeses and defective products throughout the cheese-making process.

MATERIALS AND METHODS

Torta del Casar Cheese-Making Procedure

The cheeses were made with a mixture of raw milk obtained from the Merino and Entrefino breeds. The milk was heated in a 100-L stainless-steel vat to 28 to 30°C and clotted by adding 10 mL of the aqueous extract from flowers of the cardoon *C. cardunculus* L. per liter of milk, prepared by macerating 50 g of dried flowers in 1 L of water for 24 h. After the curd formed, it was broken at 30°C into rice grain-sized pieces using fine metallic threads agitated for 10 min, followed by 10 min of rest and 10 min of stirring. Afterward, it was transferred to suitable molds and pressed for 2 h at an initial pressure of 2 kg/cm², which was increased by 0.5 kg/cm² every 30 min. Once pressed, the cheese was submerged in brine (16% NaCl, wt/vol) for 4 h. Ripening was controlled at 5 to 7°C and relative humidity >90% for 70 d. Four batches of Torta del Casar cheese were prepared (Supplemental Figure S1, <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18160>), introducing a specific modification during the cheese-making procedure, as follows:

- Standard batch (**ST**): this cheese was manufactured by following the general cheese-making procedure.

- Pressing defect batch 1 (**PD1**): for the preparation of body mechanical hole defects, cold water was used instead of hot water in the double-jacketed vat during the stirring step. With this cheese-making modification, grains become cold when the curd is shaped, causing ineffective binding among the various curd parts.
- Pressing defect batch 2 (**PD2**): the curd was broken into rice grain-sized pieces, as indicated in the general cheese-making procedure, but the vat was set at 35°C rather than 30°C to achieve a higher moisture in the paste.
- Microbial defect batch (**MD**): the cheese with early blowing defects was prepared by adding 3.61 g of lyophilized inoculum to 96 L of milk tempered at 30°C before clotting. The inoculum comprised proteolytic and potential gas-producing microorganisms, including *Escherichia coli* (2.07×10^{10} cfu/g), *Enterobacter aerogenes* (3.2×10^{10} cfu/g), and *Kluyveromyces lactis* (1.19×10^{10} cfu/g).

A total of 30 to 32 units were obtained for each batch with approximately 950 g as initial weight (diameter: 13 cm; height: 7 cm). Three cheeses were randomly chosen from each batch for analysis after 0, 2, 4, 6, 8, and 10 wk of ripening.

Physicochemical Parameters

Dry matter (%), total protein, and total fat were analyzed using standard methods 5534:2004 (ISO, 2004), 3433:2008 (ISO, 2008), and 8968-1:2014 (ISO, 2014), respectively. Ash content was determined by incineration in a muffle furnace at 550°C (AOAC International, 2000). The pH was determined using a Crison 2002 pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain). In addition, each cheese was weighed, and the diameter and height were measured using a caliper. Density was calculated, assuming a cylindrical geometry.

Microbial Count

Ten-gram aliquots of each cheese sample were aseptically transferred to sterile plastic pouches for microbial enumeration. After 10-fold dilution with 1% peptone water (Pronadisa, Alcobendas, Madrid, Spain), each sample was homogenized for 120 s using a Stomacher Lab Blender 400 (Seward Ltd., London, UK). Serial 10-fold dilutions were prepared from the same solution and inoculated onto agar plates. The LAB were grown on de Man, Rogosa and Sharpe agar (Oxoid, Hampshire, UK) acidified to pH 5.6 with acetic acid (10%) under

anaerobic conditions at 30°C for 48 h. Mold and yeast counts were determined on oxytetracycline–glucose–yeast extract agar (Oxoid) at 25°C for 5 d, counting typical colonies. Violet red bile–glucose agar (Oxoid) was used for *Enterobacteriaceae* counts at 30°C for 24 h.

Texture

A TA.XTplus texture analyzer, fitted with a 5-kg load cell (Stable Micro Systems, Godalming, UK) and spherical stainless-steel probe (P/1S), was used to perform a texture compression analysis of the cheeses throughout the ripening process. Cheeses were removed from storage at 5°C, positioned under the probe, and measured on both sides (top and bottom). The operational parameters were as follows: pretest speed, 3 mm/s; test speed, 2.00 mm/s; posttest speed, 10.00 mm/s; distance, 10.0 mm; and trigger force, 25 g. From the resulting graphs, the values for firmness and stickiness of cheese were analyzed using the installed Exponent software version 3.0.5.0 (<http://www.stablemicrosystems.com/>).

In addition, a texture spreadability analysis was undertaken after approximately 4 wk of ripening, when the Torta del Casar had acquired a creamy appearance, using a TTC Spreadability Rig (HDP/SR) attachment (Texture Technologies Corp., Hamilton, MA) for the spreadability probe. The samples were packed into the lower cone with a spatula and measured at 20°C. The operational parameters were as follows: pretest speed, 3 mm/s; test speed, 2.00 mm/s; posttest speed, 10.00 mm/s; distance, 10.0 mm; and trigger force, 25 g. From the resulting graphs, the maximum force (the point at which the probe was at its maximum penetration depth) was calculated using the installed Exponent software version 3.0.5.0 and described as unctuousity.

Ultrasonic Parameters

The cheeses were inspected ultrasonically using contact techniques in through-transmission mode. The measurement setup is illustrated schematically in Figure 1A. To reduce the operator risk, the transducers were mounted on a custom-designed metal structure that ensured their perfect face-to-face alignment (Figure 2). The range of frequencies used in the study of cheese specimens was extended by using 2 different pairs of shear wave transducers of 250- and 500-kHz frequencies, respectively (Olympus Panametrics NDT, Waltham, MA). Table 1 lists the principal characteristics of the different transducers used, including the near-field zone and the beam spread angle. Both of these values depend on the propagation medium, so Table 1 also provides approximate values for cheeses,

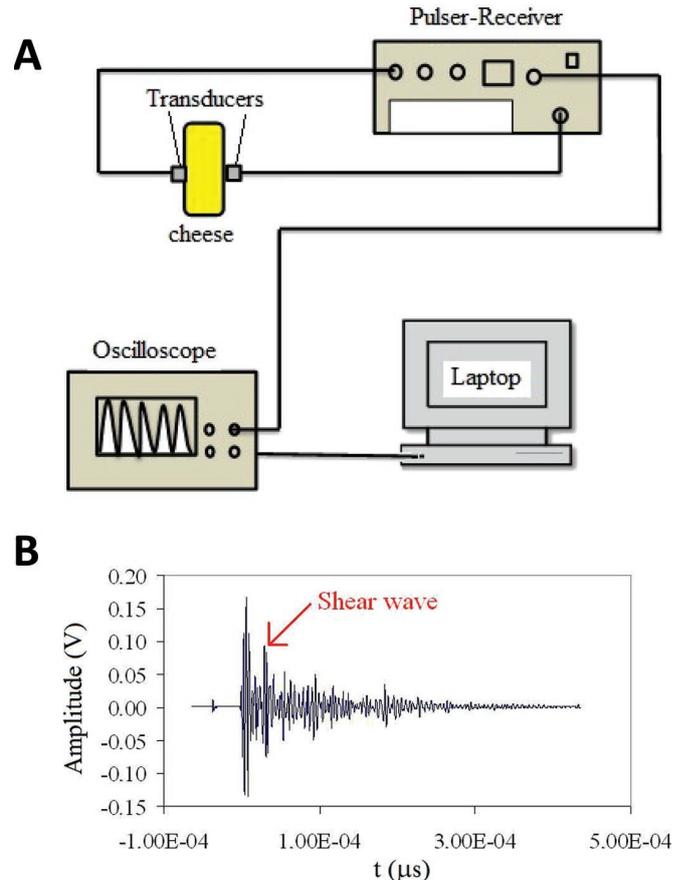


Figure 1. (A) Scheme of the setup used for the ultrasound inspection of the cheeses, and (B) typical A-scan (amplitude vs. time, t) obtained with one of the shear wave transducers.

considering a mean ultrasonic pulse velocity (UPV) of 750 m/s for shear waves. The pulser-receiver models 5058PR and 5077PR (Olympus Panametrics NDT) were used for emission and reception of the ultrasonic signals with transducers V150 and V151, respectively. For the acquisition and digitization of the signals, the pulser-receiver units were connected to an oscilloscope (100-MHz bandwidth, 1-GSa/s sample rate, 2.5k points record length; Tektronix TM TDS1012B, Wilsonville, OR). The Tektronix OpenChoice TDSPCS1 software package was used for subsequent data processing and analysis.

The shear UPV (UPV_s) values obtained with the respective transducers were calculated based on the time lapse from the signal's emission until its reception, called the time of flight (TOF). From the known distance (d) velocity was determined: $UPV = d/TOF$. In addition, with the shear wave transducer values, the received signal has an initial longitudinal wave train, generated by mode conversion. These particular longi-

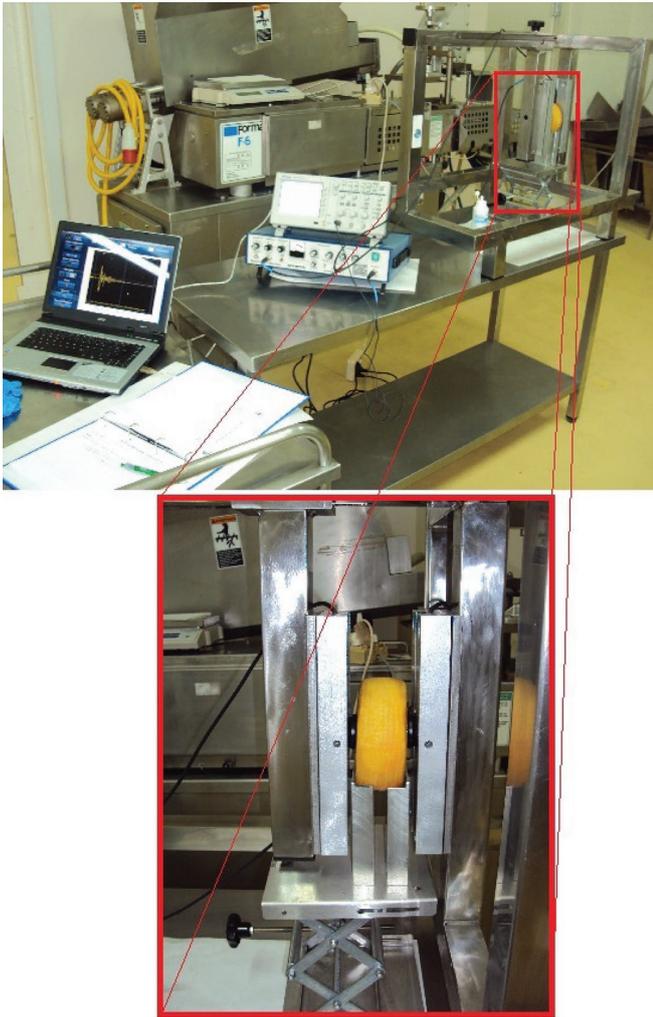


Figure 2. Custom-designed metal structure to ensure the perfect face-to-face alignment of the cheese.

tudinal waves (UPV_L) were also obtained. Figure 1B shows a typical A-scan obtained with one of the shear wave transducers. From UPV_L , UPV_S , and the apparent densities or specific weights (ρ) of each sample, the following constants were calculated for each piece of cheese according to the expressions established by the

American Society for Testing and Materials (2008) in protocol ASTM D2845-08.

Young's modulus (E):

$$E = \frac{\rho \times UPV_S^2 \times (3UPV_L^2 - 4UPV_S^2)}{UPV_L^2 - UPV_S^2}. \quad [1]$$

Shear modulus (μ):

$$\mu = \rho \times UPV_S^2. \quad [2]$$

Bulk modulus (k):

$$k = \frac{\rho \times (3UPV_L^2 - 4UPV_S^2)}{3}. \quad [3]$$

Lamé's constant (λ):

$$\lambda = \rho \times (UPV_L^2 - 2UPV_S^2). \quad [4]$$

Poisson's ratio (ν):

$$\nu = \frac{(UPV_L^2 - 2UPV_S^2)}{2 \times (UPV_L^2 - UPV_S^2)}. \quad [5]$$

Fast Fourier transform (**FFT**) frequencies corresponding to the 25th, 50th, 75th, and 99th percentiles (denoted respectively as FFT_{25} , FFT_{50} , FFT_{75} , and FFT_{99}) of the received signals in the cumulative frequency periodograms of the FFT, as well as the attenuation (denoted as AT 10, AT 20, AT 30, AT 40, AT 50, AT 60, AT 70, AT 80, and AT 90) quantified in terms of the time taken to receive the energy (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90%, respectively, of the total energy received), expressed as a multiple of the TOF, were also recovered (Cerrillo et al., 2014). These parameters were determined along the center of opposite faces of the

Table 1. Characteristics of the different transducer models used¹

Model ²	Diameter (m)	Central frequency (kHz)	-6 dB bandwidth (%)	Near-field length (cm)	Beam angle (°)
V150	0.025	250	92	5.21	8.41
V151	0.025	500	101	10.42	4.20

¹The value ultrasonic pulse velocity = 750 m/s was applied in the calculation of near-field length and beam angle.

²The pulser-receiver models 5058PR and 5077PR (Olympus Panametrics NDT, Waltham, MA) were used for emission and reception of the ultrasonic signals with transducers V150 and V151, respectively.

specimens for each of the selected inspection frequencies.

Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Descriptive statistics of the ultrasonic parameters were determined, and the evolution of the physicochemical, microbial, and texture parameters of the cheese batches was studied using 1-way ANOVA and separated by Tukey's honest significant difference test ($P \leq 0.05$). The efficiency of the selected ultrasonic parameters as control markers of physicochemical and texture parameters of the cheese specimens was evaluated by Pearson correlation coefficients. For classification of cheese batches during their ripening, linear discriminant analysis (LDA) was applied to the ultrasonic data. The discriminant variables for each ripening interval evaluated (2–4, 4–6, 6–8, and 8–10 wk) were identified by a step-wise algorithm based on the Wilks' lambda method. The results of the LDA classification model with best performance were graphically represented by projecting the cheese groups into the space of discriminant functions (DF).

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical and Texture Parameters

Table 2 presents the physicochemical and texture parameters of the cheese batches during the ripening process. In general, DM, total protein, and total fat increased during the ripening process, with ranges of 45.1 to 59.6, 11.7 to 19.3, and 23.0 to 33.6%, respectively, without differences among the batches studied at the end of ripening. In the same way, the results for ash, pH, and density did not show any relevant differences among the studied batches during the ripening process. These physicochemical results were similar to those obtained previously for Torta del Casar and other similar soft-bodied cheeses (Roa et al., 1999; Sanjuán et al., 2002; Ordiales et al., 2013a). In contrast, texture data were more variable between batches. The firmness of the standard batch (ST) increased until the end of ripening, whereas for batch PD1, this tendency was not evident. In batch MD, maximal firmness occurred at 6 wk after ripening and then declined continuously. For batch PD2, this parameter was particularly high throughout ripening. Delgado et al. (2010) found a reduction of cheese hardness during the ripening of Torta del Casar, which is characteristic of this type of cheese. In this study, cheeses were previously opened by cutting the whole upper rind to evaluate the texture of the cheese paste. Data on the other measured texture

parameters revealed the highest values for unctuousity and stickiness for batch MD. The effect of microbial population on the rheology properties of this type of cheese has been described by Pereira et al. (2010). The relationship between textural and proteolytic parameters has been attributed to the degradation of the casein matrix, decreasing the hardness and consistency of Torta del Casar and increasing its adhesiveness during ripening (Delgado et al., 2010). Conversely, batch PD1 showed lowest values for unctuousity and stickiness.

Evolution of Microbial Population During Cheese Ripening

The mean counts of LAB during ripening were greater than 8 log cfu/g for all batches without significant differences (Figure 3). Yeast counts were essentially constant until wk 6 of ripening, with most values ranging from 4 log cfu/g (PD2) to 6 log cfu/g (MD and PD1). At the end of ripening, 3 batches showed a noticeably decreased yeast count, with values close to 4 log cfu/g for MD and 3 log cfu/g for ST and PD2. A similar evolution was observed for the *Enterobacteriaceae* population, with counts stable around 8 cfu/g in all batches during the initial 4 wk of ripening and a progressive decrease in the second period. However, batches ST and PD2 exhibited a more pronounced decline in this microbial group relative to batch PD1. The counts of LAB, yeast, and *Enterobacteriaceae* found in this study are similar to those previously reported in this type of cheese (Pintado et al., 2010; Ordiales et al., 2013a). Lactic acid bacteria appear to be the predominant microbial group in Torta del Casar (Mas Mayoral et al., 1991), in which they eventually reach viable numbers of 8 log cfu/g by the time of consumption (Ordiales et al., 2013a). In addition, the presence of high numbers of *Enterobacteriaceae* is not unusual in soft cheese made from raw milk (Alegría et al., 2009; Gonçalves et al., 2018). These high levels of microorganisms during ripening suggest a relevant contribution of their associated activity in the development of the sensory characteristics of Torta del Casar cheese, including its texture.

Ultrasonic Parameters

The evaluation of the properties of food, including different types of cheese, mainly occurs through the analysis of the ultrasonic velocity as the simplest and the most reliable measurement (Benedito et al., 1998; Gallo et al., 2018). Benedito et al. (2000) noticed an increase in ultrasonic velocity during ripening of the firm-textured Cheddar cheese, ranging from 1,657 to 1,677 m/s at 12°C and from 1,684 to 1,693 m/s at 5°C (transducers of 1 MHz, 1.9-cm crystal diameter; model

Table 2. Physicochemical and texture parameters of Torta del Casar cheese batches during ripening

Batch and week	Physicochemical parameter						Texture parameter		
	DM (%)	Total protein (%)	Fat (%)	Ash (%)	pH	Density (g/cm ³)	Firmness (g)	Unctuousity (g)	Stickiness (g)
Standard (ST)									
0	45.1 ^{D,b}	12.5 ^C	23.0 ^D	2.22	6.69 ^A	1.074 ^{A,a}	853 ^{C,b}	—	—
2	46.2 ^{D,c}	16.1 ^{B,a}	24.1 ^{D,c}	2.21	5.17 ^{B,b}	1.051 ^{AB,a}	878 ^{C,b}	—	—
4	48.7 ^{C,b}	16.2 ^{B,ab}	27.7 ^{C,c}	2.27	4.73 ^{B,b}	1.000 ^B	787 ^{C,c}	1.918	-1.736
6	53.5 ^{B,c}	17.2 ^{AB,a}	30.3 ^{B,b}	2.37	5.03 ^B	1.047 ^{AB,a}	1,387 ^{B,c}	1.652 ^c	-1,543 ^a
8	54.3 ^{B,c}	18.3 ^{AB,a}	30.9 ^{B,b}	2.33	5.18 ^B	939 ^{C,b}	1,608 ^{B,b}	1.597	-1,731 ^a
10	58.1 ^A	19.3 ^A	33.3 ^{A,ab}	2.51	5.24 ^B	951 ^{C,b}	2,252 ^{A,a}	1,626 ^b	-1,632 ^a
Defective pressure (PD1)									
0	46.2 ^{D,b}	11.7 ^D	24.6 ^D	2.34	6.73 ^A	1,011 ^b	1,090 ^{AB}	—	—
2	53.6 ^{C,a}	13.7 ^{C,b}	30.9 ^{C,a}	2.44	5.50 ^{B,b}	997 ^b	774 ^{B,b}	—	—
4	54.8 ^{BC,ab}	15.7 ^{BC,ab}	32.2 ^{BC,a}	2.18	5.50 ^{B,a}	970	923 ^{AB,c}	—	—
6	55.1 ^{BC,bc}	14.6 ^{C,b}	34.6 ^{A,a}	2.61	5.48 ^B	990 ^b	857 ^{AB,d}	1,895 ^{B,ab}	-2,060 ^{A,a}
8	55.3 ^{B,c}	18.4 ^{A,a}	33.0 ^{AB,a}	2.42	5.40 ^B	999 ^a	862 ^{AB,c}	2,336 ^B	-2,631 ^{A,b}
10	58.4 ^A	17.5 ^{AB}	33.0 ^{AB,ab}	2.72	5.47 ^B	1,001 ^a	1,073 ^{A,c}	3,477 ^{A,a}	-3,755 ^{B,c}
Excessive pressure (PD2)									
0	48.3 ^{E,a}	10.8 ^C	23.3 ^C	2.49	6.68 ^A	1,013 ^b	4,242 ^{A,a}	—	—
2	52.9 ^{D,ab}	13.2 ^{BC,b}	24.2 ^{C,c}	3.02	5.37 ^{B,b}	1,028 ^{ab}	4,040 ^{A,a}	—	—
4	57.1 ^{C,a}	14.9 ^{B,b}	29.0 ^{B,bc}	3.10	5.04 ^{B,ab}	1,006	3,658 ^{B,a}	—	—
6	59.6 ^{B,a}	15.7 ^{AB,ab}	31.2 ^{A,b}	3.31	5.04 ^B	1,008 ^{ab}	3,600 ^{B,a}	8,169 ^{A,a}	-5,586 ^{B,b}
8	63.2 ^{A,a}	10.7 ^{C,b}	31.7 ^{A,ab}	3.30	4.97 ^B	987 ^{ab}	4,291 ^{A,a}	2,281 ^B	-2,117 ^{A,ab}
10	59.0 ^B	17.8 ^A	31.7 ^{A,b}	3.17	5.24 ^B	1,011 ^{ab}	3,728 ^{B,c}	3,173 ^{AB,a}	-2,521 ^{A,b}
Anomalous microbial population (MD)									
0	48.0 ^{D,a}	11.7 ^C	24.0 ^D	2.06	6.55 ^A	1,022 ^b	823 ^{C,b}	—	—
2	51.8 ^{C,b}	13.0 ^{B,b}	28.0 ^{C,b}	2.21	5.98 ^{B,a}	1,019 ^{ab}	791 ^{C,b}	—	—
4	54.9 ^{B,ab}	17.9 ^{A,a}	30.3 ^{B,b}	2.39	5.55 ^{B,a}	972	1,551 ^{B,b}	—	—
6	55.4 ^{B,b}	16.2 ^{A,ab}	29.5 ^{BC,b}	2.37	5.54 ^B	979 ^b	2,277 ^{A,b}	2,818	-1,755 ^a
8	57.7 ^{AB}	17.0 ^{A,a}	32.5 ^{A,ab}	2.40	4.80 ^C	985 ^{ab}	1,612 ^{B,b}	1,892 ^{bc}	-2,085 ^{ab}
10	57.6 ^A	18.0 ^A	33.6 ^{A,a}	2.31	5.49 ^C	982 ^{ab}	1,690 ^{B,b}	1,812 ^b	-1,917 ^{ab}

^{A-E}Mean values within a column of the same batch with different uppercase superscripts are significantly different during processing ($P < 0.05$).

^{a-d}Mean values within a column of the same processing week with different lowercase superscripts are significantly different between batches ($P < 0.05$).

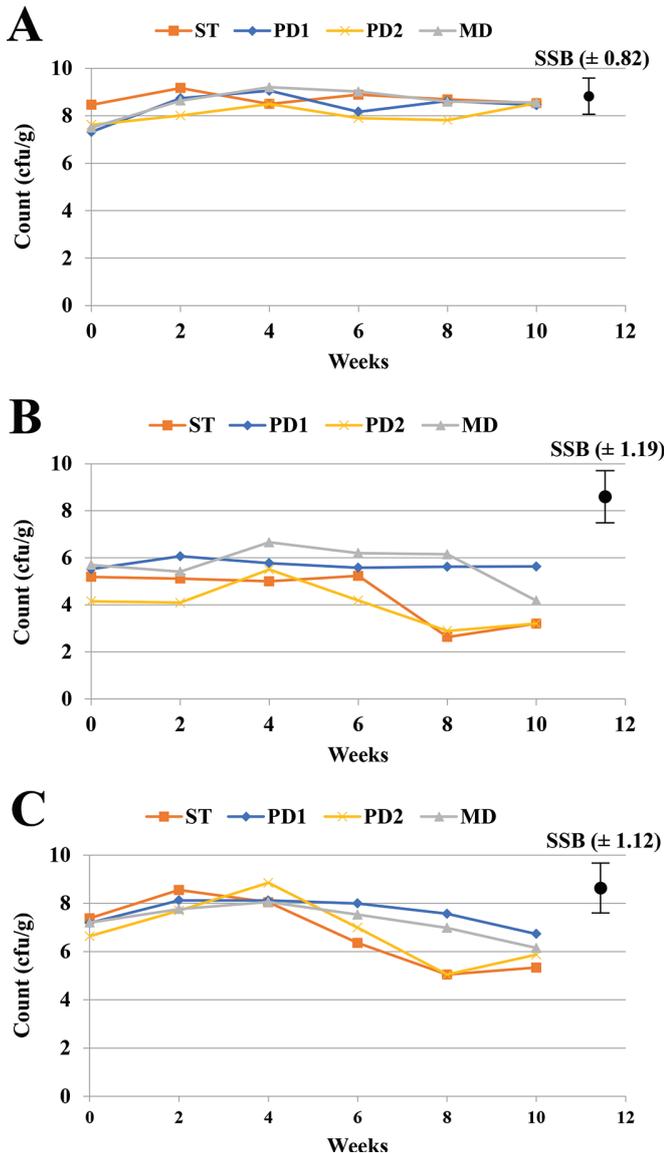


Figure 3. Evolution of (A) lactic acid bacteria, (B) yeast, and (C) *Enterobacteriaceae* counts during the ripening of the cheese batches studied: standard (ST), defective pressure (PD1), excessive pressure (PD2), and anomalous microbial population (MD). SSB = statistical significance bar using Tukey's honestly significant difference test.

A314S-SU, Panametrics NDT). These values are more constant than those found in this study for Torta del Casar, a soft-textured cheese, with ranges of 1,144 to 1,723 and 1,246 to 1,547 m/s for transducers V150 and V151, respectively (Table 3).

Several parameters related to velocity, frequency, and attenuation were studied in this work. In addition to ultrasound velocity in the longitudinal (VL) and transverse (VT) directions and the velocity ratio (VT/VL), the elastic constants were calculated from the

ultrasonic velocity measurements. From these parameters, VL showed the lowest relative standard deviation (3.71–5.18%), whereas Lamé's constant and ν presented the highest coefficients of variation (40.37–48.47 and 30.37–38.08%, respectively). In all cases, the level of dispersion of the parameters related to the velocity was higher with transducer V150 than with V151. On the contrary, the relative standard deviation values of the highest amplitude frequency and the FFT frequencies corresponding to the 25th, 50th, 75th, and 99th percentiles of the received signals were higher for transducer V151 than for V150, mainly for the highest amplitude frequency, showing more than 40% of the variability (Table 3). Regarding the attenuation-related parameters, the dispersion data were slightly higher with transducer V150 than with V151, with AT 60 showing the highest coefficients of variation for both transducers (35.6 and 31.2%, respectively). The high variability found for some ultrasound parameters means that those could show a good response to the changes and variations in the physicochemical and texture parameters associated with the cheese defects or ripening process.

Relationship Between Physicochemical and Texture Properties with Ultrasonic Parameters During Ripening of Soft Cheese Torta del Casar

Correlations of the ultrasound parameters obtained using both transducers V150 and V151 with the physicochemical and texture properties of the Torta del Casar cheese batches during ripening are shown in Table 4. These results evidenced that transducer V150 performed better than transducer V151. Using transducer V150, the ultrasonic parameters presented a strong correlation ($P < 0.01$) with several physicochemical and texture parameters. The values of most velocity-related parameters and elastic constants were negatively correlated (positive in the case of ν) with the fat in DM of the cheese samples during ripening, particularly for VT, E , and Shear modulus (Table 4). This inverse correlation between the fat content of food and ultrasound velocities (VL and VT) is a well-recognized phenomenon. Consequently, these parameters have been used to predict the fat percentage in meat products, fish, and different types of cheese (Park et al., 1994; Simal et al., 2003; Shannon et al., 2004; Telis-Romero et al., 2011). Conversely, the fat content in DM of Torta del Casar was also the most important physicochemical parameter for explaining the attenuation behavior. The AT 70 value showed the highest correlation with fat in DM (Table 4). This indicates that when fat in DM increases, a given percentage of energy is received in a longer time (i.e., the attenuation decreases). Considering that the cheeses are less

Table 3. Descriptive statistics of ultrasonic parameters measured in Torta del Casar cheese batches during processing using transducers V150 and V151¹

Ultrasonic parameter	Transducer V150					Transducer V151				
	Mean	SD	RSD ²	Minimum	Maximum	Mean	SD	RSD	Minimum	Maximum
Velocity ³										
VL (m/s)	1,496	77	5.18	1,144	1,723	1,434	53	3.71	1,246	1,547
VT (m/s)	833	132	15.83	533	1,202	797	93	11.70	605	1,079
VT/VL ratio	0.56	0.08	14.55	0.36	0.76	0.56	0.07	11.70	0.43	0.74
Young's modulus	1.74E+09	3.93E+08	22.56	8.01E+08	2.53E+09	1.61E+09	2.62E+08	16.22	9.80E+08	2.31E+09
Poisson's ratio	0.26	0.10	38.08	0.006	0.423	0.27	0.082	30.37	0.0167	0.388
Bulk modulus	1.32E+09	3.06E+08	23.22	7.03E+08	2.11E+09	1.20E+09	2.55E+08	21.21	5.11E+08	1.69E+09
Shear modulus	7.12E+08	2.23E+08	31.36	2.83E+08	1.60E+09	6.48E+08	1.51E+08	23.27	3.54E+08	1.10E+09
Lamé's constant	8.48E+08	4.11E+08	48.47	1.22E+07	1.83E+09	7.87E+08	3.18E+08	40.37	3.24E+07	1.40E+09
Frequencies ⁴ (Hz)										
Highest amplitude frequency	278,404	39,596	14.22	180,201	371,000	284,901	114,252	40.10	138,952	625,860
FFT ₂₅	246,563	23,415	9.50	180,472	305,940	262,719	56,438	21.48	175,834	461,402
FFT ₅₀	283,546	22,298	7.86	185,100	352,147	352,947	85,409	24.20	204,267	578,995
FFT ₇₅	318,158	22,021	6.92	261,453	401,160	470,989	86,125	18.29	290,513	663,735
FFT ₉₉	517,473	52,070	10.06	347,222	633,528	758,842	59,168	7.80	637,765	1,068,455
Attenuations ⁵										
AT 10	1.4	0.3	23.2	1.1	2.8	1.4	0.3	19.8	1.0	2.2
AT 20	1.6	0.5	28.9	1.1	3.2	1.6	0.4	25.9	1.1	3.1
AT 30	1.8	0.6	31.6	1.1	3.3	1.8	0.5	27.9	1.1	3.2
AT 40	2.0	0.7	33.8	1.1	3.8	2.0	0.6	30.8	1.1	3.4
AT 50	2.2	0.8	35.5	1.2	4.2	2.3	0.7	31.1	1.1	4.2
AT 60	2.5	0.9	35.6	1.2	4.5	2.6	0.8	31.2	1.1	4.7
AT 70	2.8	1.0	35.2	1.2	5.1	3.0	0.9	30.6	1.4	6.0
AT 80	3.3	1.1	33.5	1.3	6.2	3.5	1.0	28.6	1.7	6.1
AT 90	4.2	1.3	31.6	1.6	7.6	4.4	1.2	27.3	2.4	7.7

¹The pulser-receiver models 5058PR and 5077PR (Olympus Panametrics NDT, Waltham, MA) were used for emission and reception of the ultrasonic signals with transducers V150 and V151, respectively.

²Relative standard deviation expressed as a percentage.

³VL = ultrasound velocity in the longitudinal direction; VT = ultrasound velocity in the transverse direction.

⁴Fast Fourier transform frequencies corresponding to the 25th, 50th, 75th, and 99th percentiles.

⁵The attenuation quantified in terms of the time taken to receive the energy (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90% of the total energy received).

attenuating when the AT 70 value is greater, this result suggests that the most attenuating Torta del Casar cheese specimens are those with a lower ratio of fat in DM. In heterogeneous products, such as meat and fish, the attenuation coefficient is mainly associated with the scattering contribution (Buckin et al., 2002). In these cases, attenuation is much more sensitive to changes in the structure of the tissue than to changes in composition, which limits their use in composition analysis (Sigfusson et al., 2001; Awad et al., 2012). In semi-hard and hard cheeses, such as Manchego cheese, the number and size of holes of a particular cheese can mask the possible changes in attenuation during maturation (Benedito et al., 2001, 2006). However, attenuation has been proposed as a useful indicating parameter for detecting intramuscular fat (marbling) in homogeneous meat pieces, such as longissimus muscle (Park et al., 1994). In our study, Torta del Casar is a soft-type cheese with a relatively homogeneous paste, so both the dispersion and absorption by casein micelles and fat globules can be considered to provide a noticeable contribution to the attenuation. The attenuation coefficient due to scattering plays the same role as an intrinsic absorption coefficient in cheeses with a weak gas cavity concentration (Nassar et al., 2010).

A strong negative correlation between the density and both total fat and fat in DM of the studied cheeses was confirmed ($P < 0.01$). It can explain, at least partly, the lower values of the ultrasonic attenuation for denser cheese samples, whereas k and Lamé's constant showed a positive correlation with the density of the cheeses (Table 4). However, as mentioned above, good correlations have already been found between penetrated acoustic signals and the density of porous food products (Awad et al., 2012), such as Torta del Casar.

Regarding the ash content, which mainly constitutes chloride and calcium salts, it was correlated with VL and E (Table 4). These results corroborate those recorded by Dukhin et al. (2005), who described the ultrasound parameters related to the speed of sound as the better parameters for investigating effects on a molecular scale, whereas attenuation was considered more suitable for characterizing effects related to the heterogeneity and phase composition of the particular dairy product system, containing casein micelles and fat globules.

Among the texture properties of cheese, firmness was significantly related to the VL, as well as the attenuation coefficient, which showed a high negative correlation at AT 90 (Table 4). Again, this result would indicate a greater firmness of Torta del Casar cheese samples with more ultrasound attenuation and, consequently, with higher propagation speeds. Benedito et al. (2000) described the firmness as the textural pa-

rameter best related to the ultrasonic velocity during the ripening of cheeses. In general, cheese maturation increases firmness, thereby increasing the ultrasonic velocity, whereas the attenuation coefficient can show a relatively high variability due to porosities or holes in the cheese samples (Benedito et al., 2002). However, in other food gels with bland taste and porous texture, such as tofu, the ultrasonic attenuation has been used as an alternative to textural or rheological analysis in gel characterization (Ting et al., 2009). In contrast, the results obtained for unctuosities seem to indicate that only ultrasonic parameters related to velocity and frequency would be reliable to determine this textural property of Torta del Casar. The unctuosities values showed a strong positive correlation with the values of VT, E , and Shear modulus but negative correlation with v and FFT₉₉.

These results suggest the efficacy of these ultrasonic parameters as tools for the development of discriminative models during Torta del Casar ripening based on their relationship with some physicochemical parameters (mainly fat in DM and density) and texture properties (firmness and unctuosities) of the cheese during ripening.

Discrimination of Soft Cheese Defects by Ultrasound Parameters During Ripening

The LDA was developed using ultrasonic parameters determined during the ripening of the different batches studied. Leave-more-out cross-validation with 4 cancellation groups was used for testing the predictive capability of the LDA. The results of the LDA for classification of different defects in Torta del Casar cheese as a function of the ripening duration are summarized in Table 5, which displays the ultrasonic variables selected by the stepwise algorithm per ripening phase, ordered according to decreasing importance and the number (and percentage) of correct classifications in both calibration and prediction. The LDA of the ultrasound data collected during the cheese ripening confirms the role of some parameters related to attenuation and velocity as useful tools for the discrimination of the types of cheese studied, besides revealing the discrimination potential of the FFT₇₅. Regarding the attenuation parameters, AT 90 and AT 10 are among the discriminant variables of cheese at 2 to 4 wk of ripening. In contrast, for the 4 to 6- and 6 to 8-wk intervals of ripening, AT 50 appears to be the most discriminant variable, although FFT₇₅ was also an influential variable (Table 5). For the velocity-related parameters, VL, VT, k , v , and E were also discriminants with a comparatively high weight in the LDA model of the last ripening period (8–10 wk).

Table 4. Physicochemical and texture parameters significantly correlated ($P < 0.01$) with ultrasonic parameters during the processing of Torta del Casar¹

Ultrasonic parameter	Transducer V150					Transducer V151						
	Physicochemical parameter			Texture		Physicochemical parameter			Texture			
	Fat	Fat in DM	Ash	Density	Firmness	Unctuosity	Fat	Fat in DM	Ash	Density	Firmness	Unctuosity
Velocity ²												
VL (m/s)		-0.426	0.592		0.500						0.439	
VT (m/s)		-0.582				0.533						
VT/VL ratio		-0.452										
Young's modulus		-0.565	0.389			0.532						-0.535
Poisson's ratio		0.400				-0.511				0.307		
Bulk modulus				0.342		0.556						0.530
Shear modulus		-0.532										
Lamé's constant				0.227								
Frequencies ³ (Hz)												
FFT ₉₉												
Attenuations ⁴												
AT 10		0.379		-0.240							0.429	
AT 20		0.488		-0.203								
AT 30		0.552		-0.202							0.420	
AT 40		0.592		-0.209								
AT 50	0.369	0.607		-0.228							0.420	
AT 60		0.612		-0.235							0.426	
AT 70		0.613		-0.211								
AT 80		0.587		-0.201								
AT 90		0.579								-0.446		

¹The pulser-receiver models 5058PR and 5077PR (Olympus Panametrics NDT, Waltham, MA) were used for emission and reception of the ultrasonic signals with transducers V150 and V151, respectively.

²VL = ultrasound velocity in the longitudinal direction; VT = ultrasound velocity in the transverse direction.

³Fast Fourier transform (FFT) frequencies corresponding to the 99th percentile.

⁴The attenuation quantified in terms of the time taken to receive the energy (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90% of the total energy received).

Table 5. Linear discriminant analysis classification applied to the Torta del Casar cheese samples during processing

Processing period (wk)	Selected variables ¹	Count ²	Cheese batch ³				Total
			ST	PD1	PD2	MD	
2–4	AT 90 VL (m/s) AT 10	n	20	18	23	16	77
		Computed classes					
		Class	14	12	18	10	54
		%	70.0	66.7	78.3	62.5	70.1
		Predicted classes					
		Class	14	10	18	12	54
4–6	AT 50 VT (m/s) FFT ₇₅ (Hz)	n	16	14	16	11	57
		Computed classes					
		Class	7	11	14	9	41
		%	43.8	78.6	87.5	81.8	71.9
		Predicted classes					
		Class	9	7	14	11	41
6–8	AT 50 FFT ₇₅ (Hz) Bulk modulus Poisson's ratio	n	12	9	11	8	40
		Computed classes					
		Class	10	9	11	6	36
		%	83.3	100	100	75.0	90.0
		Predicted classes					
		Class	10	7	11	3	31
8–10	Young's modulus VT (m/s) Poisson's ratio AT 40	n	8	5	8	4	25
		Computed classes					
		Class	8	5	8	2	23
		%	100	100.0	100	50	92.0
		Predicted classes					
		Class	8	5	7	0	20
	%	100	100	87.5	0.0	80.0	

¹VL = ultrasound velocity in the longitudinal direction; VT = ultrasound velocity in the transverse direction. FFT₇₅ = Fast Fourier transform frequencies corresponding to the 75th percentile. AT = The attenuation quantified in terms of the time taken to receive the energy (40, 50, and 90% of the total energy received).

²Class = number of cases correctly classified; % = percentage of cases correctly classified.

³ST = standard batch; PD1 = defective pressure batch; PD2 = excessive pressure batch; MD = microbial defect batch.

Table 6. Linear discriminant analysis classification applied to the Torta del Casar cheese samples after 6 to 8 and 8 to 10 wk of processing, considering the batches PD1 and MD one sample group

Processing period (wk)	Selected variables ¹	Count ²	Cheese batch ³			Total
			ST	PD2	PD1+MD	
6–8	FFT ₇₅ (Hz) AT 50 Poisson's ratio Bulk modulus	n	12	12	17	41
		Computed classes				
		Class	11	12	15	37
		%	91.7	100.0	88.2	92.7
		Predicted classes				
		Class	10	12	15	37
8–10	VT (m/s) AT 40 Young's modulus Poisson's ratio	n	8	8	9	25
		Computed classes				
		Class	8	8	8	24
		%	100.0	100.0	88.9	96.0
		Predicted classes				
		Class	8	8	8	24
	%	100.0	100.0	88.9	96.0	

¹VT = ultrasound velocity in the transverse direction. FFT₇₅ = Fast Fourier transform frequencies corresponding to the 75th percentile. AT = The attenuation quantified in terms of the time taken to receive the energy (40, 50, and 90% of the total energy received).

²Class = number of cases correctly classified; % = percentage of cases correctly classified.

³ST = standard batch; PD1 = defective pressure batch; PD2 = excessive pressure batch; MD = microbial defect batch.

The descriptive and predictive performance of the LDA models reflects the reciprocal location of cheese samples in the canonical space of the different ripening periods. In particular, the percentages of the total recognized external samples increased from 70.1 to 80.0% throughout the ripening periods analyzed (from 2–4 wk to 8–10 wk). In general, the correct predictions were relatively lower, between 0 and 65%, for the PD1 cheese samples, mainly due to the misclassification of cheese samples from other batches (PD1 and MD) in the last periods of ripening (6–8 and 8–10 wk; Supplemental Tables S1 and S2, <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18160>). There is high similarity between defects PD1 and MD in soft cheese from the textural viewpoint when the product is at the final stage of ripening. Accordingly, when the LDA models included both defects in the same group (PD1+MD), the percentages of the total external samples recognized were higher than 90% for 6 to 8 and 8 to 10 wk of ripening (Table 6). Figure 4 displays the 40 and 25 cheese samples ripened during 6 to 8 and 8 to 10 wk, respectively, projected in the plane of the 2 DF. The LDA model based on the ultrasonic data of samples with 6 to 8 wk of ripening allowed for differentiation of the 3 groups. Different values of AT 50 and FFT₇₅ had a relevant role in the differentiation of PD1+MD and PD2 samples, whereas k and v were the best discriminant parameters for differentiation of ST samples. In samples at 8 to 10 wk, all 3 cheese groups were located in distinct regions of the DF plane. In particular, ST cheese samples were well separated along DF1, whereas DF2 separated PD1+MD samples from PD2 samples by different values of v , AT 40, E , and VT.

CONCLUSIONS

In this paper, we discuss the usefulness of the ultrasound parameters to the quality control of the soft cheese Torta del Casar during ripening, confirming the high correlation between several ultrasonic parameters and both the physicochemical and textural properties of the final cheese product. To the best of our knowledge, in soft cheese, such as Torta del Casar, this is the first literature study to report the discrimination of defective cheeses during ripening by analyzing the ultrasonic parameters and, in turn, validating the on-line capability of ultrasound for nondestructive evaluation of the soft cheese-making process. During the intervals of 6 to 8 and 8 to 10 wk of ripening, cheese samples included in PD1 and MD batches differed from the control in the attenuation values (mainly for AT 40 and AT 50). On the contrary, discrimination of cheeses with the PD2 defect (excessive pressure) was mainly based

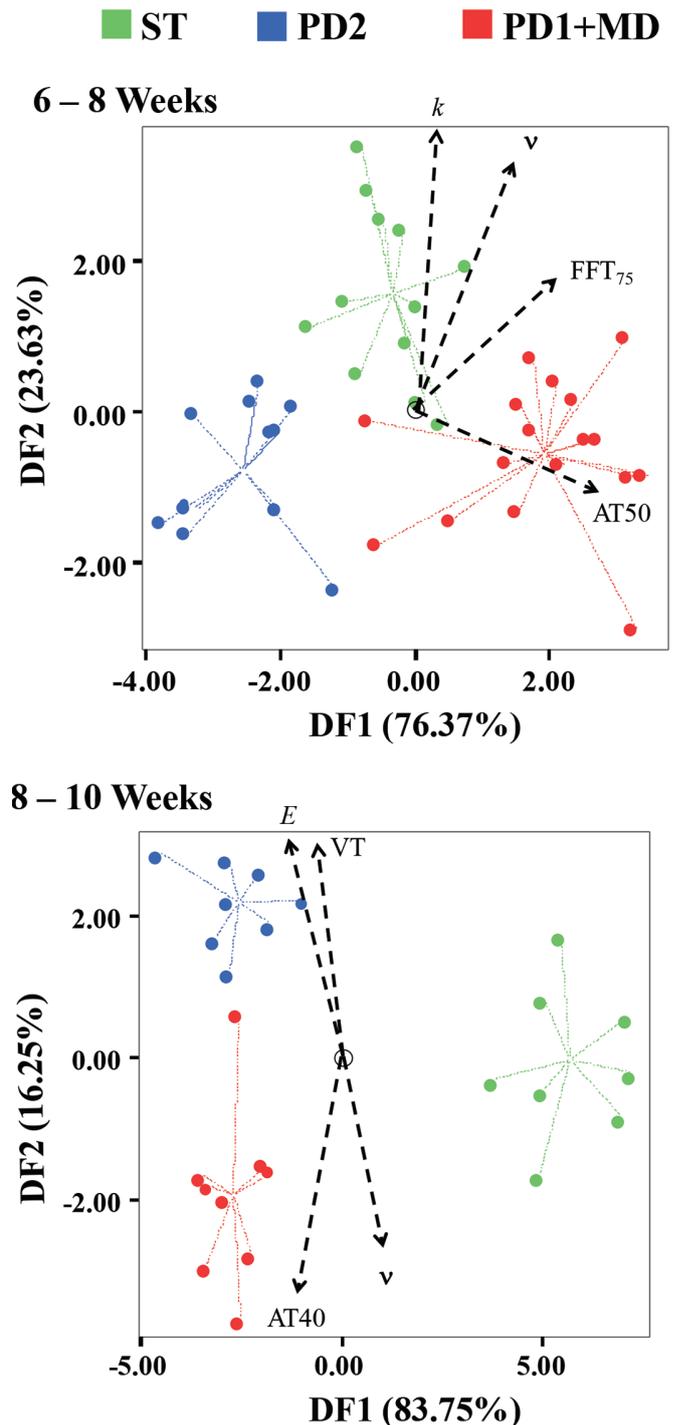


Figure 4. Cheese samples grouped into batches (ST = standard; DP1 = defective pressure; DP2 = excessive pressure; MD = anomalous microbial population) and variable loadings projected on discriminant function (DF) 1 and 2 planes for samples at 6 to 8 and 8 to 10 wk of ripening. k = bulk modulus; v = Poisson's ratio; E = Young's modulus; FFT₇₅ = fast Fourier transform frequencies corresponding to the 75th percentile; AT = attenuation quantified in terms of the time taken to receive the energy; VT = ultrasound velocity in the transverse direction.

on different values of some velocity-related ultrasound parameters, such as v , k , E , and VT .

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Science, Innovation and Universities of the Spanish Government [grant number CIT-060000-2008-0008]; research group support was from the Junta Extremadura Government (GR18165) and the European Regional Development Fund (ERDF). The authors are grateful to Hnos. Pajuelo SAT Dairy (Almoharin, Cáceres, Spain) and Diego Lindo (Hnos. Pajuelo SAT) for technical assistance and to PDO Torta del Casar (Casar de Cáceres, Cáceres, Spain) for technical support. The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

- Alegria, Á., P. Álvarez-Martín, N. Sacristán, E. Fernández, S. Delgado, and B. Mayo. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int. J. Food Microbiol.* 136:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.023>.
- AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- American Society for Testing and Materials. 2008. ASTM D2845-08. Standard test method for laboratory determination of pulse velocities and ultrasonic elastic constants of rock (Withdrawn 2017). American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA.
- Awad, T. S., H. A. Moharram, O. E. Shaltout, D. Asker, and M. M. Youssef. 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res. Int.* 48:410–427. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004>.
- Benedito, J., J. Carcel, M. Gisbert, and A. Mulet. 2001. Quality control of cheese maturation and defects using ultrasonics. *J. Food Sci.* 66:100–104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15589.x>.
- Benedito, J., J. A. Carcel, R. Gonzalez, and A. Mulet. 2002. Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes. *Ultrasonics* 40:19–23. [https://doi.org/10.1016/s0041-624x\(02\)00085-9](https://doi.org/10.1016/s0041-624x(02)00085-9).
- Benedito, J., J. A. Carcel, N. Sanjuan, and A. Mulet. 2000. Use of ultrasound to assess Cheddar cheese characteristics. *Ultrasonics* 38:727–730. [https://doi.org/10.1016/S0041-624x\(99\)00157-2](https://doi.org/10.1016/S0041-624x(99)00157-2).
- Benedito, J., N. Sanjuan, J. A. Carcel, and A. Mulet. 1998. Ultrasonic determination of cheese maturity. Pages 44–61 in *Automatic Control of Food and Biological Processes: Proceedings of the Internal Symposium ACoFoP IV*, Göteborg, Sweden.
- Benedito, J., S. Simal, G. Clemente, and A. Mulet. 2006. Manchego cheese texture evaluation by ultrasonics and surface probes. *Int. Dairy J.* 16:431–438. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.04.005>.
- Buckin, V., E. Kudryashov, and B. O'Driscoll. 2002. High-resolution ultrasonic spectroscopy for material analysis. *Am. Lab.* 34:28–31.
- Cerrillo, C., A. Jiménez, M. Rufo, J. Paniagua, and F. T. Pachón. 2014. New contributions to granite characterization by ultrasonic testing. *Ultrasonics* 54:156–167. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2013.06.006>.
- Cho, B. K., and J. M. K. Irudayaraj. 2003. A noncontact ultrasound approach for mechanical property determination of cheeses. *J. Food Sci.* 68:2243–2247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05754.x>.
- Cho, B. K., J. M. K. Irudayaraj, and S. Omata. 2001. Acoustic sensor fusion approach for rapid measurement of modulus and hardness of Cheddar cheese. *Appl. Eng. Agric.* 17:827–832. <https://doi.org/10.13031/2013.6827>.
- Delgado, F. J., J. Rodríguez-Pinilla, J. González-Crespo, R. Ramírez, and I. Roa. 2010. Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ("Torta del Casar") manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45:512–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02157.x>.
- Dukhin, A. S., P. J. Goetz, and B. Travers. 2005. Use of ultrasound for characterizing dairy products. *J. Dairy Sci.* 88:1320–1334. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72798-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72798-3).
- European Commission. 2003. Commission Regulation (EC) No 1491/2003 of 25 August 2003 supplementing the Annex to Regulation (EC) No 2400/96 (Ficodindia dell'Etna, Monte Etna, Colline di Romagna, Pretuziano delle Colline Teramane, Torta del Casar, Manzana de Girona or Poma de Girona). *Off. J. Eur. Union*, L 214/6 August 2003.
- Gallo, M., L. Ferrara, and D. Naviglio. 2018. Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. *Foods* 7:164. <https://doi.org/10.3390/foods7100164>.
- Gonçalves, M. T. P., M. J. Benito, M. de Guía Córdoba, C. Egas, A. V. Merchán, A. I. Galván, and S. Ruiz Moyano. 2018. Bacterial communities in Serpa cheese by culture dependent techniques, 16s rRNA gene sequencing and high-throughput sequencing analysis. *J. Food Sci.* 83:1333–1341. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14141>.
- Hægström, E., and M. Luukkala. 2001. Ultrasound detection and identification of foreign bodies in food products. *Food Control* 12:37–45. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00007-4).
- ISO (International Organization for Standardization). 2004. Cheese and processed cheese—Determination of the total solids content (Reference method). Standard number 5534:2004. ISO, Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). 2008. Cheese—Determination of fat content—Van Gulik method. Standard number 3433:2008. ISO, Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). 2014. Milk and milk products—Determination of nitrogen content—Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. Standard number 8968-1:2014. ISO, Geneva, Switzerland.
- Jiménez, A., M. Rufo, J. M. Paniagua, A. T. Crespo, M. P. Guerrero, and M. J. Riballo. 2017. Contributions to ultrasound monitoring of the process of milk curdling. *Ultrasonics* 76:192–199. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2017.01.007>.
- Koc, A. B., and B. Ozer. 2008. Nondestructive monitoring of renneted whole milk during cheese manufacturing. *Food Res. Int.* 41:745–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.05.008>.
- Lee, H. O., H. Luan, and D. G. Daut. 1992. Use of an ultrasonic technique to evaluate the rheological properties of cheese and dough. *J. Food Eng.* 16:127–150. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(92\)90024-Z](https://doi.org/10.1016/0260-8774(92)90024-Z).
- Leemans, V., and M. F. Destain. 2009. Ultrasonic internal defect detection in cheese. *J. Food Eng.* 90:333–340. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.042>.
- Mas Mayoral, M., J. González Crespo, and M. J. Nieto Villaseca. 1991. Casar cheese: Production, physicochemical and microbiological characteristics. *Arch. Zootec.* 40:359–369.
- Nassar, G., F. Lefbvre, A. Skaf, J. Carlier, B. Nongaillard, and Y. Noël. 2010. Ultrasonic and acoustic investigation of cheese matrix at the beginning and the end of ripening period. *J. Food Eng.* 96:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.029>.
- Ordiales, E., M. J. Benito, A. Martín, R. Casquete, M. J. Serradilla, and M. G. Córdoba. 2013a. Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese "Torta del Casar" made without the addition of a starter. *Food Control* 33:448–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.027>.
- Ordiales, E., A. Martín, M. J. Benito, M. Fernández, R. Casquete, and M. G. Córdoba. 2014. Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical,

- sensory and rheological characteristics of 'Torta del Casar' cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 67:402–409. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12129>.
- Ordiales, E., A. Martín, M. J. Benito, A. Hernández, S. Ruiz-Moyano, and M. G. Córdoba. 2012. Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FZCE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in "Torta del Casar" cheese-making. *Food Chem.* 133:227–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.012>.
- Ordiales, E., A. Martín, M. J. Benito, A. Hernández, S. Ruiz-Moyano, and M. G. Córdoba. 2013b. Role of the microbial population on the flavor of the soft-bodied cheese Torta del Casar. *J. Dairy Sci.* 96:5477–5486. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6587>.
- Park, B., A. D. Whittaker, R. K. Miller, and D. S. Hale. 1994. Predicting intramuscular fat in beef longissimus muscle from speed of sound. *J. Anim. Sci.* 72:109–116. <https://doi.org/10.2527/1994.721109x>.
- Pereira, C. I., J. A. Graça, N. S. Ogando, A. M. P. Gomes, and F. Xavier Malcata. 2010. Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. *Food Microbiol.* 27:339–346. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.012>.
- Pintado, A. I., T. G. Tavares, F. K. Tavora, and F. X. Malcata. 2010. Tradition versus modernism in cheesemaking technology: A Portuguese case study encompassing plant coagulant, non-bovine milks and adventitious microflora. *Aust. J. Dairy Technol.* 65:128–134.
- Roa, I., M. Belén López, and F. J. Mendiola. 1999. Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Res. Int.* 32:413–419. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00098-8).
- Sanjuán, E., R. Millán, P. Saavedra, M. A. Carmona, R. Gómez, and J. Fernández-Salguero. 2002. Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chem.* 78:281–289. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00098-5).
- Shannon, R. A., P. J. Probert-Smith, J. Lines, and F. Mayia. 2004. Ultrasound velocity measurement to determine lipid content in salmon muscle; the effects of myosepta. *Food Res. Int.* 37:611–620. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.01.012>.
- Sigfusson, H., E. A. Decker, and D. J. McClements. 2001. Ultrasonic characterization of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Res. Int.* 34:15–23. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00123-X).
- Simal, S., J. Benedito, G. Clemente, A. Femenia, and C. Rosselló. 2003. Ultrasonic determination of the composition of a meat-based product. *J. Food Eng.* 58:253–257. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00375-8).
- Telis-Romero, J., H. A. Váquiro, J. Bon, and J. Benedito. 2011. Ultrasonic assessment of fresh cheese composition. *J. Food Eng.* 103:137–146. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.008>.
- Ting, C. H., F. J. Kuo, C. C. Lien, and C. T. Sheng. 2009. Use of ultrasound for characterising the gelation process in heat induced $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tofu curd. *J. Food Eng.* 93:101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.015>.
- Tunick, M. H. 2000. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *J. Dairy Sci.* 83:1892–1898. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75062-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75062-4).

ORCID

- Abel Crespo  <https://orcid.org/0000-0003-1605-7610>
- Alberto Martín  <https://orcid.org/0000-0001-6104-8102>
- Santiago Ruiz-Moyano  <https://orcid.org/0000-0003-0309-5888>
- María José Benito  <https://orcid.org/0000-0001-8432-8035>
- Montaña Rufo  <https://orcid.org/0000-0002-3760-8795>
- Jesús M. Paniagua  <https://orcid.org/0000-0001-9756-9161>
- Antonio Jiménez  <https://orcid.org/0000-0002-2750-4132>

Supplemental Table S1. Prediction of group membership of “Torta del Casar” cheese sample of 6–8 weeks of processing based on the LDA model performed.

		Predicted membership group				Total
Batch		PD1	PD2	S	DM	
Computed classes						
Count ¹	PD1	1	0	1	6	8
	PD2	0	11	0	0	11
	S	0	0	10	2	12
	DM	9	0	0	0	9
% ²	PD1	12.5	0	12.5	75	100
	PD2	0	100	0	0	100
	S	0	0	83.3	16.7	100
	DM	100	0	0	0	100
Predicted classes						
Count ¹	PD1	3	1	1	3	8
	PD2	0	11	0	0	11
	S	0	0	10	2	12
	DM	7	0	0	2	9
% ²	PD1	37.5	12.5	12.5	37.5	100
	PD2	0	100	0	0	100
	S	0	0	83.3	16.7	100
	DM	77.8	0	0	22.2	100

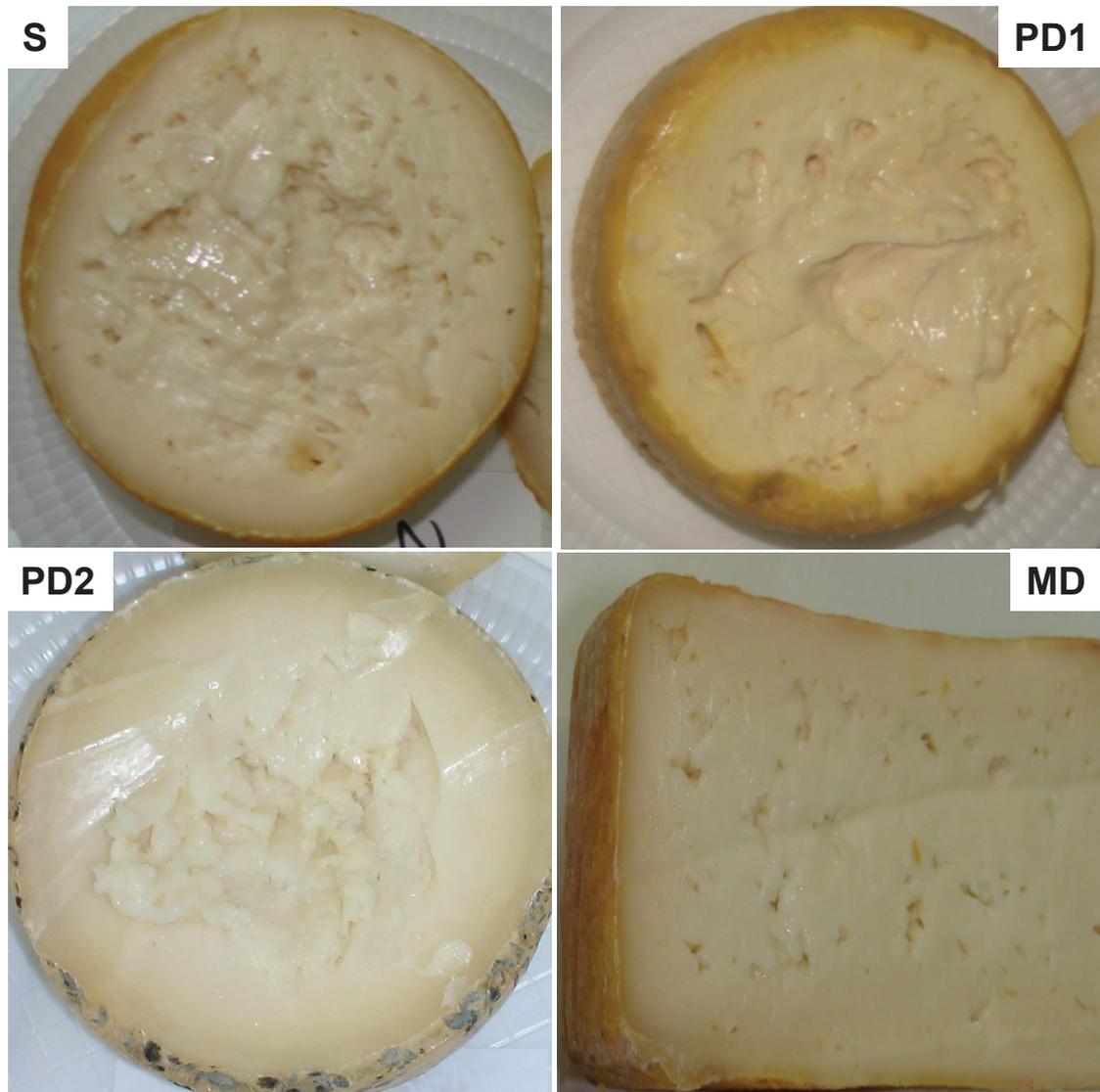
¹Number of cases correctly classified.²Percentage of cases correctly classified.

Supplemental Table S2. Prediction of group membership of cheese sample of 8–10 weeks of processing based on the LDA model performed.

		Predicted membership group				Total
Batch		PD1	PD2	S	DM	
Computed classes						
Count ¹	PD1	1	1	0	2	4
	PD2	0	8	0	0	8
	S	0	0	8	0	8
	DM	5	0	0	0	5
% ²	PD1	25	25	0	50	100
	PD2	0	100	0	0	100
	S	0	0	100	0	100
	DM	100	0	0	0	100
Predicted classes						
Count ¹	PD1	3	1	0	0	4
	PD2	0	7	0	1	8
	S	0	0	8	0	8
	DM	5	0	0	0	5
% ²	PD1	75	25	0	0	100
	PD2	0	87.5	0	12.5	100
	S	0	0	100	0	100
	DM	100	0	0	0	100

¹Number of cases correctly classified.

²Percentage of cases correctly classified.



Supplemental Figure S1. Detail of the core of four batches of “Torta del Casar” cheese at the end of the ripening time: Standard batch (S), Pressing defect batch (PD1), Pressing excess batch (PD2), and Microbial defect batch (MD)



Low-frequency ultrasound as a tool for quality control of soft-bodied raw ewe's milk cheeses

Abel Crespo^a, Antonio Jiménez^{b,c}, Santiago Ruiz-Moyano^{d,e,*}, Almudena V. Merchán^{d,e}, Ana Isabel Galván^{d,e}, María José Benito^{d,e}, Alberto Martín^{d,e}

^a National Technological Centre for Food and Agriculture "Extremadura" (CTAEX), Ctra. Villafranco a Balboa Km. 1.2, Villafranco del Guadiana, 06195, Badajoz, Spain

^b Department of Applied Physics, School of Technology, University of Extremadura, Avenida de la Universidad, s/n, 10003, Cáceres, Spain

^c Research Institute of Meat and Meat Products, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003, Cáceres, Spain

^d Food Science and Nutrition, School of Agricultural Engineering, University of Extremadura, Avda. Adolfo Suárez s/n, 06007, Badajoz, Spain

^e University Research Institute of Agro-Food Resources (INURA), Avda. de la Investigación s/n, Campus Universitario, 06006, Badajoz, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Soft-bodied cheese
Ultrasound parameters
Quality control
Multivariate linear regression

ABSTRACT

The relationship between the quality attributes and the ultrasound parameters of Protected Designation of Origin (PDO) soft-bodied cheeses from "Torta del Casar" and "Queso de la Serena" was studied. Cheese samples were taken from six different dairy industries (three for each PDO) in two different seasons. Ultrasound parameters related to velocity, attenuation and frequency were calculated and correlated with the physico-chemical, microbiological, rheological and sensorial properties of the cheeses. Several ultrasonic parameters showed a high correlation with changes in the physico-chemical, textural and sensorial properties of this product, which were partially associated with microbial activity. Among these, stand out the negative correlation of the sensorial descriptor "firmness" with bulk modulus (κ). The predictive models achieved by the multivariate linear regression method (MLR) showed the highest correlation coefficients for firmness by texture compression analysis (TCA) and the sensory descriptor "intensity", including as the explanatory variables for both models, fast Fourier transform (FFT) frequencies and attenuation parameters. This work highlights the on-line capability of ultrasound for non-destructive quality assessment of this traditional and heterogeneous soft cheese based on the predictive potential of several secondary ultrasonic parameters.

1. Introduction

Protected Designation of Origin (PDO) Spanish and Portuguese soft-bodied cheeses are highly appreciated by consumers. Although their manufacturing and ripening processes vary, they are always made from raw ewe's milk without any added starter culture and an aqueous infusion of dried flowers of *Cynara cardunculus* L. as rennet, which gives them unique sensory properties. In the region of Extremadura (Spain) are located two of the most appreciated Protected Designations of Origin cheeses of this type: "Torta del Casar" and "Queso de la Serena". However, the final characteristics of these traditional cheeses presents great variability depending on the milk-clotting activity of the vegetable coagulant and the indigenous microbiota present in raw ewe's milk (Ordiales et al., 2013 a, b; Tabla et al., 2016). The quality of a vegetable

coagulant depends on the diversity of the natural cardoon populations harvested, the flower ripening stages and their drying conditions (Ordiales et al., 2012); these factors influence both the physico-chemical parameters in the initial stages of cheese processing and the texture and sensorial properties of the final product (Ordiales et al., 2014). Likewise, the absence of a starter culture can lead to uncontrolled growth of undesirable microorganisms that adversely influence the texture and taste of this type of cheese (Ordiales, Martín, et al., 2013; Tabla et al., 2016), resulting in consumer dissatisfaction. Thus, industries and distributors have a great interest in the quality control of soft-bodied cheeses such as "Torta del Casar" and "Queso de la Serena" by fast, reliable and non-destructive techniques mainly for their rheological characterization and classification.

Ultrasound-based technologies have been proposed as a quality-

* Corresponding author. Food Science and Nutrition, School of Agricultural Engineering, University of Extremadura, Avda. Adolfo Suárez s/n, 06007, Badajoz, Spain.

E-mail address: srmsh@unex.es (S. Ruiz-Moyano).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108405>

Received 15 April 2021; Received in revised form 25 June 2021; Accepted 4 July 2021

Available online 5 July 2021

0956-7135/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Table 1
Ultrasonic parameters related to velocity.

Parameters	Equations	
UPV _S ^a	d/TOF _S	d: distance between transducers TOF _S : shear wave time of flight
UPV _L ^b	d/TOF _L	TOF _L : longitudinal wave time of flight
Young's modulus (E):	$E = \frac{\rho \cdot UPV_S^2 \cdot (3UPV_L^2 - 4UPV_S^2)}{UPV_L^2 - UPV_S^2}$	ρ : specific weight
Shear modulus (μ):	$\mu = \rho \cdot UPV_S^2$	
Bulk modulus (k):	$k = \frac{\rho \cdot (3UPV_L^2 - 4UPV_S^2)}{3}$	
Lamé's constant (λ):	$\lambda = \rho \cdot (UPV_L^2 - 2UPV_S^2)$	
Poisson's ratio (ν):	$\nu = \frac{(UPV_L^2 - 2UPV_S^2)}{2 \cdot (UPV_L^2 - UPV_S^2)}$	

^a Ultrasonic shear velocity.

^b Ultrasonic longitudinal velocity.

control tool to determine the optimum cut time during cheese manufacturing (Jiménez et al., 2017; Koc & Ozer, 2008) and to screen process anomalies in-line (Crespo et al., 2020; Telis-Romero, Váquiro, Bon, & Benedito, 2011). Contact or non-contact low-frequency ultrasound has also been used to evaluate the texture of different types of cheeses, such as Manchego, Mahon and Cheddar (Benedito, Carcel, Sanjuan, & Mulet, 2000; Benedito, Carcel, Gonzalez, & Mulet, 2002; Benedito, Simal, Clemente, & Mulet, 2006; Cho, Irudayaraj, & Omata, 2001; Cho & Irudayaraj, 2003; Nassar et al., 2010). However, most of the studies carried out to detect texture defects in cheeses and other foods have been achieved on the basis of changes in ultrasonic velocity and, exceptionally, the attenuation when the echoes are clearly perceived on the A-scan. Nonetheless, other secondary ultrasound parameters, such as the frequency components extracted from fast Fourier transform (FFT) and attenuation, less commonly used in the literature, have shown a high characterization and discrimination capacity, being successfully applied to different food matrices (González-Mohino, Jiménez, Paniagua, Perez-Palacios, & Rufo 2019 a; González-Mohino, Jiménez, Rufo, et al., 2019; Jiménez et al., 2017). The physical properties of cooked pork loin associated with the relevant sensory attributes have been significantly ($p < 0.05$) correlated with ultrasound parameters, especially with those related to the FFT and attenuation (González-Mohino et al., 2021). Likewise, in the discrimination of defective cheeses during the soft cheese-manufacturing and ripening processes by ultrasound, attenuation and ultrasonic parameters related to the FFT play a relevant role (Crespo et al., 2020).

The objective of this work was to assess the feasibility of ultrasound as a tool for quality control of PDO soft-bodied raw ewe's milk cheeses, relating the ultrasonic parameters with the physico-chemical, microbial, textural and sensorial characteristics of the cheeses. In addition, ultrasonic parameters related to velocity, FFT and attenuation were used to construct regression models to predict the sensory attributes of chesses.

2. Materials and methods

2.1. Cheese sampling

"Torta" cheese samples with approximately 700 gr and dimension of 11 cm (diameter) and 5.5 cm (height) were collected at the end of the ripening process (60 days) from six different dairy industries, three from "Torta del Casar" PDO (Casar batch) and three from "Queso de la Serena" PDO (Serena batch), in two different seasons, winter and spring. Six cheese per industry in each season were collected at random and transported under refrigerated conditions (<5 °C) for ultrasonic

inspection. Subsequently, all other assessments were conducted in less than 72 h. All cheese samples were stored under refrigerated conditions (<5 °C) until analysis. Each determination was performed in duplicate for every cheese sample (n = 72).

2.2. Ultrasonic measurements

The cheeses, stored at 5 °C, were immediately inspected ultrasonically using contact techniques in through-transmission (T-T) mode following the experimental set-up and methodology previously described by Crespo et al. (2020) in "Torta" cheese. In order to check the dependence of the propagation velocity with the frequency of the ultrasonic signal used, it was decided to inspect the samples with two resonance frequencies different. For this issue, two different pairs of shear wave transducers of 250 and 500 kHz frequencies, models V150-RB and V151-RB, respectively, were used (Olympus Panametrics NDT, Waltham, MA, USA). For emission and reception of the ultrasonic signals with the V150-RB and V151-RB transducers, the pulser-receiver models 5058 PR and 5077 PR (Olympus Panametrics NDT) were used, respectively. For the acquisition and digitisation of the signals, the pulser-receiver units were connected to an InfiniiVision DSO-X 3032A oscilloscope from KEYSIGHT (350 MHz bandwidth, 4 GSa/s sample rate and 10,000-point record length), which stored the data (.csv format) of the displayed signals for subsequent processing and analysis.

The parameters related to the velocity of the ultrasound are shown in Table 1. For each piece of cheese, constants were calculated according to the expressions established by the American Society for Testing and Materials (ASTM International, 2008) in protocol ASTM D2845-08. Fast Fourier transform (FFT) frequencies corresponding to the 25th, 50th, 75th and 99th (FFT₂₅, FFT₅₀, FFT₇₅ and FFT₉₉, respectively) percentiles of the received signals in the cumulative frequency periodograms of the FFT and the highest amplitude frequency, as well as the attenuation quantified in terms of the time taken to receive the energy (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% and 90% of the total energy received, denoted as AT 10, AT 20, ..., AT 90, respectively), expressed as a multiple of the TOF (n•TOF), were also recovered (Cerrillo, Jiménez, Rufo,). These parameters were determined along the centre of opposite faces of the specimens for each of the selected inspection frequencies.

2.3. Microbial counts

The cheeses were cut aseptically and a core sample of approximately 10 g was placed under sterile conditions in a stomacher bag and diluted 10 times with sterile peptone water. (Condalab, Madrid, Spain). After homogenisation for 120 s in a stomacher instrument (Lab-Blender 400 Seward Lab., London, England), serial 10-fold dilutions were performed with sterile peptone water, and aliquots of 0.1 mL from each dilution were inoculated onto agar plates. Plate count agar (PCA, Condalab; 30 °C/24 h) was used for enumeration of aerobic mesophilic bacteria (AMB); de Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Condalab) agar acidified to pH 5.6 with acetic acid (10%) for mesophilic (MLAB) and thermophilic lactic acid bacteria (TLAB) after incubation at 30 °C and 42 °C for 48 h, respectively; Slanetz and Bartley (SB, Condalab; 37 °C/48 h) for enterococci; Baird-Parker agar (BP, Condalab; 37 °C/48 h) supplemented with potassium tellurite and egg yolk emulsion (Condalab) for gram-positive catalase-positive cocci (GPCPC); Violet Red Bile Glucose agar (VRBG, Condalab; 30 °C/24 h) for enterobacteria; Violet Red Bile Lactose agar (VRBA, Condalab; 37 °C/24 h) for coliforms; chromogenic tryptone bile X-glucuronide agar (TBX, Condalab; 44 °C/24 h) for *Escherichia coli* and Potato Dextrose agar (PDA, Condalab; 25 °C/4 days) acidified to pH 3.5 with a sterilised solution of tartaric acid (10%) for yeast and moulds.

2.4. Physico-chemical analysis

Dry matter, moisture, fat, protein and NaCl contents were

Table 2
Descriptive statistics of ultrasonic parameters measured in the cheese batches.

Ultrasonic parameter	Transducer V150-RB					Transducer V151-RB				
	Mean	SD ^a	%RSD ^b	Min ^c	Max ^c	Mean	SD	%RSD	Min	Max
<i>Velocity-related parameters</i>										
UPV _L (m/s)	1,571	95	6.06	1,101	1,731	1,611	65	4.02	1,316	1,703
UPV _S (m/s)	789	74	9.39	561	940	834	74	8.88	574	1,018
UPV _S /UPV _L	0.502	0.032	6.36	0.430	0.610	0.518	0.039	7.61	0.420	0.610
Young's modulus (<i>E</i>) (N/m ²)	1.63E+09	3.09E+08	19.00	7.82E+08	2.36E+09	1.79E+09	3.09E+08	17.27	8.96E+08	2.54E+09
Poisson's ratio (ν)	0.330	0.030	9.22	0.200	0.390	0.313	0.041	12.98	0.200	0.390
Bulk modulus (κ) (N/m ²)	1.60E+09	2.35E+08	14.67	6.60E+08	2.03E+09	1.63E+09	2.18E+08	13.41	1.00E+09	1.97E+09
Shear modulus (μ) (N/m ²)	6.14E+08	1.27E+08	20.71	3.00E+08	9.17E+08	6.84E+08	1.34E+08	19.62	3.22E+08	1.06E+09
Lamé's constant (λ) (N/m ²)	1.19E+09	2.13E+08	17.85	4.60E+08	1.67E+09	1.17E+09	2.32E+08	19.80	5.10E+08	1.57E+09
<i>Frequencies</i>										
HAF ^d (Hz)	274,666	46,009	16.75	125,219	420,787	341,683	137,617	40.28	164,703	604,222
FFT ₂₅ (Hz)	247,145	33,041	13.37	160,815	321,881	288,721	78,570	27.21	164,866	486,103
FFT ₅₀ (Hz)	283,882	27,224	9.59	226,368	357,645	388,151	94,559	24.36	224,336	580,465
FFT ₇₅ (Hz)	323,080	27,019	8.36	251,319	420,787	500,362	83,706	16.73	290,768	691,910
FFT ₉₉ (Hz)	514,269	60,324	11.73	380,305	630,755	754,806	64,038	8.48	603,658	913,680
<i>Attenuations</i>										
AT 10	1.41	0.31	21.91	1.06	2.19	1.29	0.23	17.97	1.04	2.14
AT 20	1.58	0.41	25.88	1.07	2.77	1.43	0.33	23.03	1.05	2.50
AT 30	1.74	0.48	27.89	1.10	3.07	1.56	0.40	25.59	1.05	2.79
AT 40	1.88	0.55	29.26	1.11	3.21	1.70	0.48	28.48	1.07	3.11
AT 50	2.06	0.62	30.20	1.12	3.36	1.87	0.56	30.13	1.08	3.37
AT 60	2.27	0.71	31.24	1.16	3.76	2.09	0.64	30.74	1.11	3.75
AT 70	2.56	0.86	33.48	1.19	4.28	2.36	0.76	32.17	1.14	4.24
AT 80	2.88	0.98	34.06	1.24	4.88	2.78	0.93	33.36	1.21	5.30
AT 90	3.64	1.21	33.12	1.30	6.14	3.51	1.12	31.90	1.51	6.59

^a SD: standard deviation.

^b %RSD: relative standard deviation expressed as a percentage.

^c Min (minimum); Max (maximum).

^d HAF: Highest amplitude frequency.

determined according to standard methods: dry matter and moisture (International Organization for Standardization, 2004), fat (International Organization for Standardization, 2008), protein (International Organization for Standardization, 2014) and NaCl (International Organization for Standardization, 2006a). The acidity (lipolysis index) was measured by the titration method as described by De Filippis, Genovese, Ferranti, Gilbert, and Ercolini (2016).

2.5. Texture assessment

To evaluate the rheological characteristics of cheese samples, two different assays were conducted using a TA.XT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, UK). In both assays, the operational parameters of the instrument were as follows: pre-test speed, 3 mm/s; test speed, 2.00 mm/s; post-test speed, 10.00 mm/s; distance, 10.0 mm and trigger force, 25 g. Firstly, a texture compression analysis (TCA) was performed by fitting the analyzer instrument with a 30-kg load cell (Stable Micro Systems, Godalming, UK) and spherical stainless-steel probe (P/1S). Cheese sample at 5 °C were positioned under the probe and measured on both sides (top and bottom) in the centre. In total, two measurements per cheese were carried out. The values for firmness (g) and stickiness (g) of the cheese were calculated using the Exponent software version 5.0.4.0 (Stable Micro System).

In addition, a texture spreadability analysis (TSA) was performed using an HDP/SR spreadability probe and instrument equipped with a 5-kg load cell (Stable Micro Systems). The cheeses were tempered at 20 °C, and a sample from the core of the cheese was packed into the lower cone with a spatula and measured at 20 °C. In the resulting graphs, firmness (g) and work of shear (g·s) were measured as the maximum peak and the area under the first curve using Exponent software version 5.0.4.0 (Stable Micro System), while the maximum negative peak was used to calculate the stickiness (g) of the sample, and the maximum negative area the work of adhesion (g·s).

2.6. Sensory evaluation

To evaluate the sensory quality of the cheese, a descriptive analysis was performed according to international standard methods by a panel of 20 panellists. Members of the panel were previously selected and trained under International Organization for Standardization standards (International Organization for Standardization, 2006b) with samples of commercial "Torta" cheese. All sessions were conducted in a sensory panel room conditioned at 20–22 °C and 60%–70% relative humidity in cabinets equipped with white light (6000 °K). Before the analysis, the cheeses were equilibrated at sensory room temperature. A portion of approximately 10 g of cheese paste and 4 cm² of rind per sample was presented individually in a plastic dish for tasting. Samples were 3-digit coded, and presented in random order. Between samples, mineral water and bread were supplied for cleansing the palate. In each session, only three different cheese samples were evaluated. Twelve sensory attributes related to the colour of the paste and rind (from light yellow to dark yellow), texture (firmness and creaminess), taste (salty, acidic, bitter, spicy and astringent), pungency sensation and flavour (intensity, persistence and rancidity) were assessed quantitatively using a structured numerical scale scored from 0 (low intensity) to 9 (high intensity). Two panel replicates were carried out on each sample. The response to each attribute for each panellist was determined as the mean value of his or her responses. In addition to this descriptive evaluation, a panel of 50 untrained consumers evaluated the samples for overall acceptability.

2.7. Statistical data analysis

Data were analysed statistically using SPSS Statistics, Version 21.0 for Windows (Armonk, NY: IBM, Inc.). Descriptive statistics of the ultrasonic, microbial, physico-chemical, textural and sensory determinations between the two PDO samples was studied by one-way analysis of variance (ANOVA) and separated by Tukey's honestly significant differences test ($p \leq 0.05$). The relationship between ultrasonic parameters and microbial, physico-chemical, texture and sensory data of

Table 3
Microbial, physico-chemical and textural parameters of soft cheeses.

Parameters ^a	Casar batch					Serena batch					P value
	Mean	SD	%RSD	Max	Min	Mean	SD	%RSD	Max	Min	
<i>Microbial parameters (log CFU g⁻¹)^c</i>											
AMB	8.6	0.4	4.5	9.0	8.0	8.8	0.2	2.2	9.1	8.6	0.334
MLAB	8.3	0.4	4.7	8.7	7.8	8.7	0.2	2.8	8.9	8.4	0.067
TLAB	6.1	0.8	13.1	6.8	4.7	5.6	1.4	24.2	7.4	4.0	0.505
GPCPC	5.1	0.5	9.9	5.6	4.4	4.9	1.1	23.6	6.4	3.5	0.661
Enterococci	6.4	0.9	13.7	6.9	4.7	5.6	0.7	12.4	6.5	4.9	0.090
Enterobacteriaceae	5.8	1.6	28.5	7.6	3.6	5.9	1.0	16.5	7.0	4.7	0.842
Total coliforms	5.5	1.9	34.1	7.4	3.0	5.6	1.0	17.4	6.7	4.5	0.826
Yeasts	3.3	0.7	19.9	4.1	2.6	4.0	0.4	10.7	4.3	3.1	0.068
Moulds	0.06	0.14	245	0.33	0.00	0.07	0.16	245	0.40	0.00	0.901
<i>Physico-chemical parameters</i>											
Moisture (%)	46.7	3.5	7.6	50.4	40.3	45.8	2.1	4.6	49.3	43.6	0.627
Total protein (%)	21.4	0.9	4.3	22.5	20.2	21.1	0.8	3.9	22.6	20.4	0.509
Total protein DM ^b (%)	40.4	2.5	6.2	42.9	37.3	39.0	2.0	5.1	42.2	37.1	0.323
Fat (%)	29.4	2.9	9.9	32.8	25.6	29.1	3.2	10.9	33.8	25.3	0.860
Fat DM (%)	55.1	4.2	7.6	58.8	47.8	53.6	4.4	8.3	60.2	47.2	0.550
Salt (%)	2.3	1.0	43.6	4.4	1.5	2.1	0.7	33.4	3.5	1.5	0.715
pH	5.8	0.3	5.0	6.1	5.4	5.4	0.2	3.7	5.6	5.1	0.025
Acidity (mg KOH g ⁻¹)	12.8	5.1	39.6	18.1	5.6	8.1	3.2	39.8	12.1	3.2	0.088
<i>Texture compression analysis (TCA)</i>											
Firmness (g)	3796	3120	82.2	9986	1670	3412	2209	65	7349	1121	0.811
Stickiness (g)	-39.8	39.4	-99.0	-4.8	-113	-28.7	25.6	-89.5	-3.7	-59.0	0.574
<i>Texture spreadability analysis (TSA)</i>											
Firmness (g)	723	635	87.8	1593	73	805.8	317.3	39.4	1288	363	0.782
Work of Shear (g*s)	0.028	0.023	81.7	0.070	0.008	0.022	0.011	52.0	0.041	0.008	0.549
Stickiness (g)	-449	395	-87.9	-50	-987	-606	318	-53	-193	-995	0.467
Work of adhesion (g*s)	-166	108	-65.0	-56	-320	-230	112	-49	-72	-383	0.337

^a SD: standard deviation; %RSD percent relative standard deviation.

^b DM: Dry mater.

^c AMB: aerobic mesophilic bacteria; MLAB: mesophilic lactic acid bacteria; TLAB: thermophilic lactic acid bacteria; GCCPC: Gram-positive catalase-positive cocci.

Table 4
Sensory descriptive attributes of soft cheeses and their correlation with overall acceptance.

Sensory attributes	Casar					Serena					P value ¹	Overall Accep. ²	
	Mean	SD	%RSD	Max	Min	Mean	SD	%RSD	Max	Min		Coef	Sig.
Appearance (rind)	7.63	0.49	6.5	8.2	7.0	5.34	1.84	34.4	8.0	3.2	0.014	0.612	**
Appearance (paste)	4.43	0.60	13.4	5.2	3.7	4.00	0.98	24.5	5.6	2.6	0.378	0.214	
Firmness	4.20	0.52	12.4	5.1	3.6	4.15	0.63	15.2	5.1	3.3	0.899	-0.371	
Creaminess	6.34	0.51	8.0	6.8	5.5	6.17	0.83	13.4	7.3	5.0	0.660	0.561	*
Salty	5.41	0.45	8.3	6.2	5.0	4.91	0.44	9.1	5.5	4.4	0.078	0.568	*
Bitter	4.27	0.45	10.6	4.9	3.7	3.61	0.36	10.0	4.0	3.0	0.019	0.485	
Spicy	3.81	0.54	14.2	4.6	3.2	3.00	0.37	12.4	3.3	2.3	0.013	0.552	*
Acid	4.70	0.45	9.5	5.4	4.2	4.36	0.55	12.6	5.2	3.7	0.278	0.338	
Astringent	3.99	0.44	11.2	4.8	3.7	3.52	0.30	8.4	3.9	3.2	0.058	0.445	
Rancid	2.50	0.37	15.0	2.8	1.9	2.17	0.32	14.6	2.7	1.9	0.129	0.203	
Intensity	6.63	0.40	6.0	7.3	6.1	5.93	0.40	6.8	6.4	5.2	0.013	0.612	**
Persistence	6.37	0.45	7.1	6.9	5.6	5.75	0.48	8.3	6.1	4.8	0.043	0.509	*

¹Black font indicates significance ($p < 0.05$) between batches.

²Overall Accep.: Overall acceptance Coef: Pearson correlation coefficient for each sensory descriptive attribute; Sig: Sig (two-tailed) value; *: Sig <0.05; **: Sig <0.01.

the cheese specimens was evaluated by Pearson correlation coefficients (r) and principal component analysis (PCA). Finally, a multivariate linear regression analysis (MLR) was applied to the data using a stepwise regression model to explore the capacity of ultrasonic parameters to predict the variables studied.

3. Results and discussion

3.1. Ultrasonic parameters

The results obtained for the ultrasonic parameters determined in the cheese batches are presented in Table 2. The ultrasonic longitudinal velocity (UPV_L) showed mean values of 1,571 and 1,611 $m s^{-1}$ for the

V150-RB and V151-RB transducers, respectively. This ultrasonic parameter is the simplest and most reliable measurement for evaluation of the food properties, including different types of cheese (Benedito, Sanjuan, Carcel, & Gallo, Ferrara, & Naviglio, 2018). In general, the values reached in our study were in close agreement with those found in other works for the soft cheese "Torta del Casar" (Crespo et al., 2020) but lower than those found for firm-textured cheese. For Manchego cheese, mean values of ultrasonic velocity ranged from 1,622 to 1,679 $m s^{-1}$ at 8 °C, very similar to those found for fully ripened Cheddar cheese at 12 °C (1,677 $m s^{-1}$) with transducers of 1 MHz and a crystal diameter of 1.9 cm (Benedito et al., 2000a, 2006). In the case of Mahon cheese, a linear relationship between the ultrasonic velocity in cheese cubes and the maturation time was found, attributed to changes in

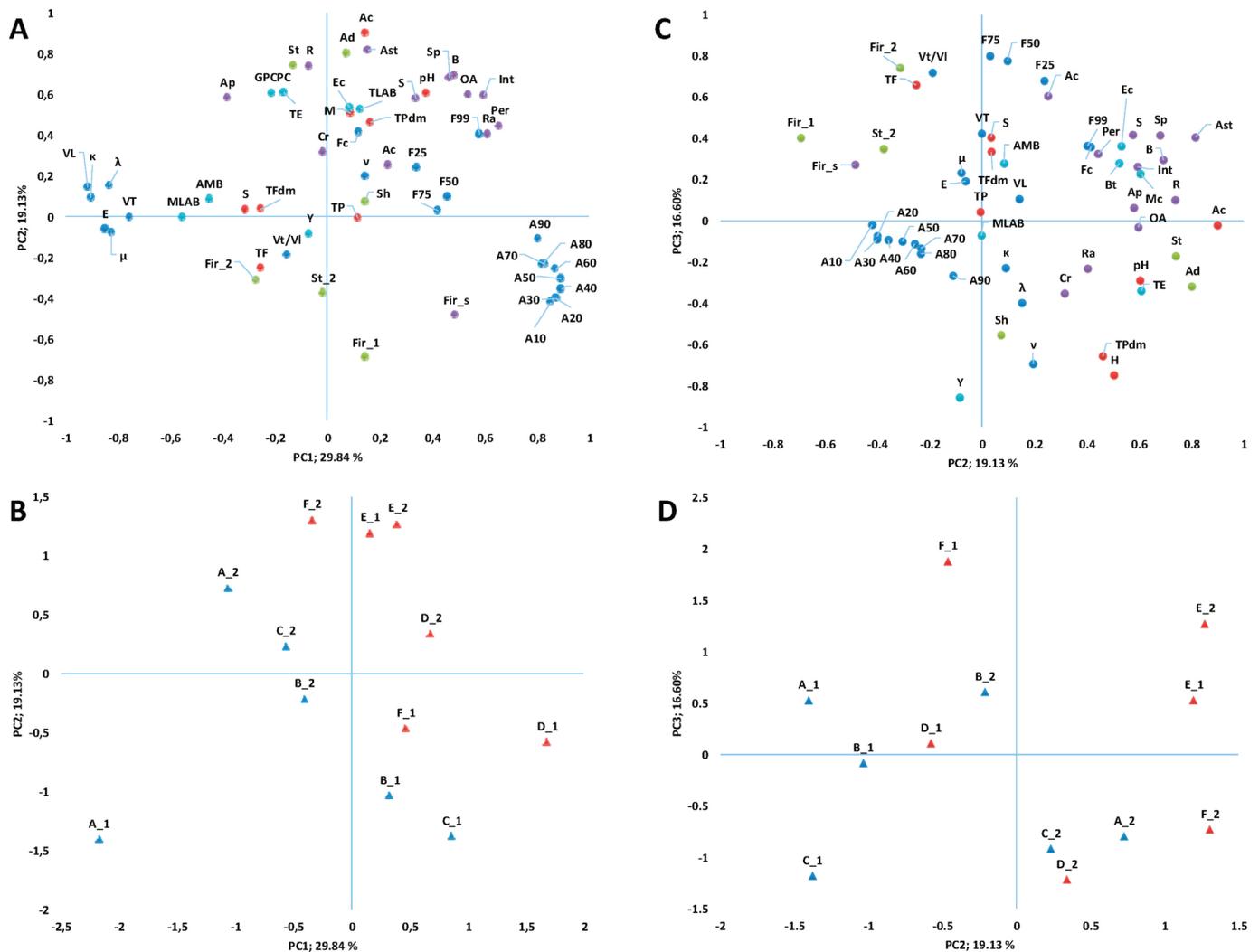


Fig. 1. Loading plot (A and C) and score plot (B and D) after principal component analysis of the quality attributes and ultrasound parameters of the soft-bodied cheeses “Torta del Casar” and “Torta de la Serena” in the planes defined by the three first principal components (PC1 and PC2; PC2 and PC3) Microbial parameters (●): TLAB (Bt); GPCPC (Mc); Enterococci (Ec); Enterobacteriaceae (TE); Yeasts (Y). Physico-chemical parameters (●): Moisture (H); Total protein (TP); Total protein DM2 (TPdm); Fat (TF); Fat DM (TFdm); Salt (S) and Acidity (Ac). Rheology parameters (●): TSA Firmness (Fir); TSA Work of Shear (Sh); TSA Stickiness (St); TSA Work of adhesion (Ad); TCA Firmness (Fir2) and TCA Stickiness (St2). Sensorial parameters (●): External appearance (Ra); Internal appearance (Ap); Firmness (Fir_s); Creaminess (Cr); Salty (S); Bitter (B); Spicy (Sp); Acid (Ac); Astringent (Ast); Rancid (R); Intensity (Int); Persistence (Per) and Overall acceptance (OA). “Torta del Casar” (▲); “Torta de la Serena” (▲); winter season (1); spring season (2).

textural parameters during ripening (Benedito, Carcel, Clemente, & Mulet, 2000). The ultrasonic shear velocity (UPV_S) and the velocity ratio (UPV_S/UPV_L) were also determined, and the elastic constants were calculated from the ultrasonic velocity measurements. From these parameters, UPV_L showed the lowest relative standard deviation (RSD; 4.02–6.06%), whereas Lamé’s constant (λ) and the Shear modulus (μ) presented the highest coefficients of variation (17.85%–19.80% and 19.62%–20.71%, respectively). In general, these results are concordant with those obtained by Crespo et al. (2020) for “Torta del Casar” during ripening, the level of dispersion for the parameters being related to the higher velocity obtained with the V150-RB than with the V151-RB transducer. These authors also observed that the %RSD values of the frequency measures were higher for the V151-RB than for the V150-RB transducer, mainly for the highest amplitude frequency, showing 40.28% of the variability in this study. In this sense, it should also be noted that for all the frequency parameters (FFT₂₅, FFT₅₀, FFT₇₅ and FFT₉₉), the values obtained with the V151-RB transducer were clearly higher than those obtained with the V150-RB, precisely due to the lower frequency of the latter. Regarding the attenuation-related parameters,

slightly higher values were observed in those obtained with the V150-RB transducers, which is logical in the sense that higher values of these attenuation parameters are indicative of a lower attenuation of the ultrasonic waves (Crespo et al., 2020), which must obviously occur with the waves emitted by the lowest frequency transducer, in our study, the V150-RB. In addition, the dispersion data ranged from 17.97% (AT 10 for the V151-RB transducer) to 34.06% (AT 80 for the V150-RB transducer). The high variability found for some ultrasound parameters may be linked to dataset variability in the physico-chemical and texture parameters associated with the sensory quality of cheese.

3.2. Microbiological analysis

The counts of AMB and MLAB were higher than 8 log CFU g⁻¹ in both batches studied, showing slightly higher mean values of MLAB counts (p = 0.067) in the Serena batch than in the Casar batch (Table 3). MLAB are reported to be the predominant microbial groups during the ripening of soft ewe’s milk cheeses clotted with vegetable rennets, such as “Serra da Estrela”, “Serpa”, “Queso de la Serena” and “Torta del Casar” cheese (Del

Table 5

Statistical indicators, MLR coefficients and their significance for the developed MLR models for the TCA parameter firmness and sensorial attribute using a stepwise regression technique.

		Response variables						
		Firmness (TCA)			Sensorial attribute "Intensity"			
Model Summary								
R		0.928				0.918		
R-squared		0.861				0.843		
R-sq (adj) ^a		0.809				0.785		
Std error		1130				0.24		
ANOVA								
F-values		16.5				14.4		
P values		0.001				0.001		
Coefficients		Explanatory variables			Explanatory variables			
Term	(Intercept)	F ₇₅	F ₉₉	AT 60	(Intercept)	F _c	VL	F ₉₉
Unstd Coeff.^b								
B	-30198	0.18	-0.04	-1584	7.550	3.7E-06	-3.0E-03	4.3E-06
Std. Error	6452	0.029	0.012	639	2.476	7.7E-07	1.2E-03	1.8E-06
Std Coeff.^c								
Beta		1.200	-0.686	-0.373		0.707	-0.363	0.361
t-value	-4.681	6.26	-3.283	-2.479	3.049	5.035	-2.380	2.369
P value	0.002	0.000	0.011	0.038	0.016	0.001	0.045	0.045
VIF ^d		2.115	2.519	1.300		1.008	1.190	1.185

^a R-sq (adj): Adjusted R-squared.

^b Unstd Coeff.: Unstandardized coefficients.

^c Std Coeff.: Standardized coefficients.

^d VIF: Variance inflation factor.

Pozo, Gaya, Medina, Rodríguez-Marín, & Nuñez, 1988; Gonçalves et al., 2018; Ordiales, Benito, et al., 2013; Tavaría & Malcata, 1998), in which they commonly reach viable numbers of 8 log CFU g⁻¹ by the time of consumption. The rest of the bacterial groups studied ranged from 4.9 log CFU g⁻¹ of GPCPC in the Serena batch to 6.4 log CFU g⁻¹ of enterococci in the Casar batch. This last microbial group seemed to present ($p < 0.1$) higher counts for the Casar batch, while TLAB, GPCPC and Enterobacteriaceae did not present significant differences. These microbial populations are considered typical of chesses made from raw milk (Freitas & Malcata, 2000). Enterobacteriaceae showed the greatest variability in the Casar batch with a %RSD value of 28.5%, in contrast to AMB and MLAB with %RSD values lower than 5% for both batches studied.

Regarding fungal counts, the mean values of the yeast counts were higher than 3 log CFU g⁻¹, in agreement with the results reported in other works (Ordiales, Martín, et al., 2013), with higher mean values ($p = 0.068$) observed in the Serena batch. In the case of mould, the counts found in the paste of the cheeses were unremarkable (Table 3).

3.3. Physicochemical parameters

The values of physicochemical parameters for the cheese batches are presented in Table 3. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) in the moisture, total protein, fat and salt concentration (calculated from chloride concentration) between the two batches studied, with ranges of 45.8%–46.7%, 21.1%–21.4%, 29.1%–29.4% and 2.1%–2.3%, respectively. In general, these results were similar to those reported for other soft cheeses, including "Torta del Casar" (Ordiales et al., 2014; Roa, López, & Mendiola, 1999; Sanjuán et al., 2002). However, significant differences were found for pH values between the batches, probably reflecting the metabolic activity of MLAB in this type of raw ewe's milk cheese during ripening. In fact, the lower pH value in the Serena batch may be associated with the higher MLAB count found in this batch. Salt concentration and acidity showed the highest variability in physicochemical parameters, with %RSD ranges of 33.4%–43.6% and 39.6%–39.8%, respectively. On the contrary, pH and total protein presented %RSD values equal to or less than 5%.

3.4. Texture analysis

Table 3 also shows the descriptive statistics of TCA and TSA parameters in the two batches studied. For TCA, the mean values of firmness and stickiness ranged from 3412 to 3796 g and from -39.8 to -28.7 g, respectively; the absence of differences between the two type of cheeses was mainly due to the great intra-batch variability found in these parameters (%RDS higher than 65). The mean values of the TCA parameters are similar to those observed for other cardoon-coagulated cheeses with extensive proteolysis (Crespo et al., 2020). In the same way, the results for TSA parameters did not show any differences among the studied batches, and the observed value ranges were comparable to those previously reported for this type of cheese (Delgado, Rodríguez-Pinilla, González-Crespo, Ramírez, & Roa, 2010). Again, the intra-batch heterogeneity was obvious, the variability of TSA parameters clearly higher for the Casar batch with %RSD values over 65%, whereas for the Serena batch, the values reached were lower than 52%. This highlights the need to non-destructive assessment of these essential parameters for the quality of this type of cheese.

3.5. Sensory analysis

The results for the sensory descriptive attributes of the cheeses and their correlation with overall acceptance are shown in Table 4. In terms of variability, the descriptors showed similar %RDS values for both batches studied except for acceptance descriptors, which showed a higher dispersion in the Serena batch (data not shown). The values of the attributes rind appearance, bitter, spicy, intensity and persistence were higher for the Casar batch. Except for the descriptor "bitter", all of them were correlated with overall acceptance together with creaminess. The relation between creaminess and overall acceptance in the sensory analysis has been broadly described for soft-bodied cheese associated with not only the proteolytic activity of the vegetable rennet but also the microbial population (Guiné, Tenreiro, Correia; Tavaría & Malcata, 2003). A high enzymatic activity in this type of cheese has also been related to such descriptors as bitter, spicy, intensity and persistence (Ordiales et al., 2014). However, with respect to the descriptor firmness, differences found between both batches were not significant ($p < 0.05$),

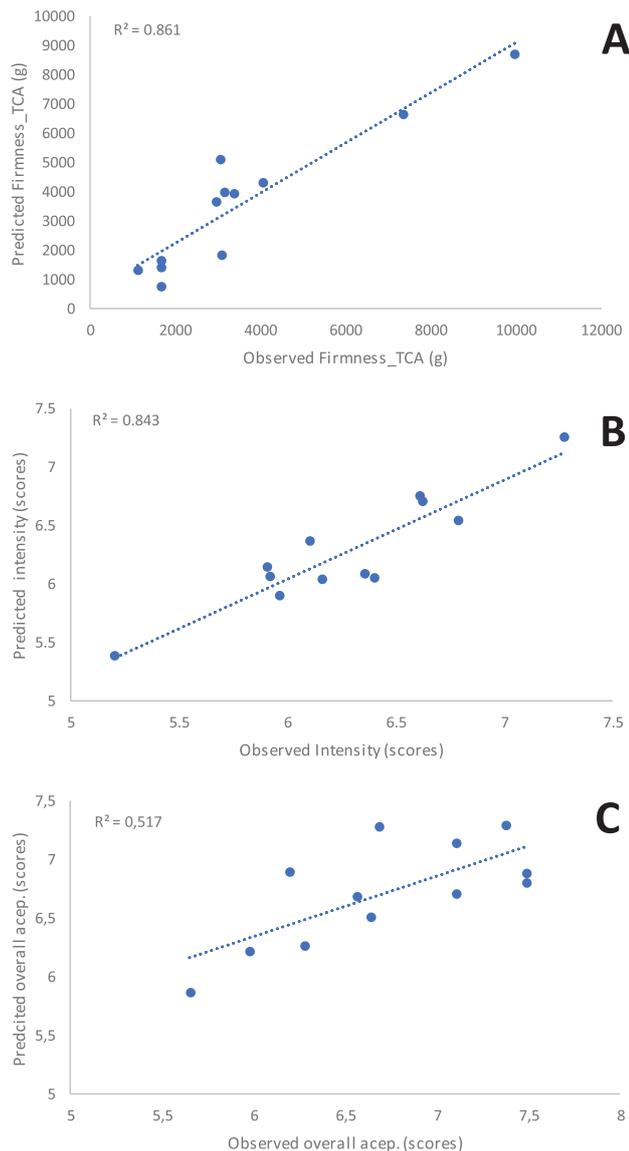


Fig. 2. Comparison between the observed and predicted values of firmness (TCA) (A) and the sensory attribute “intensity” (B) for multiple linear regression (MLR) and overall acceptance (C) for simple linear regression (SLR).

and its variability in this study (%RDS 12.4–15.2) was not significantly correlated with overall acceptance.

3.6. Relationship of microbial, physico-chemical, textural and sensory parameters with ultrasonic parameters

Correlations of the ultrasound parameters obtained using both transducers (V150-RB and V151-RB) with microbial, physico-chemical, textural and sensory parameters evidenced that the V150-RB transducer performed better than the V151-RB transducer (Table S1). Thus, ultrasonic parameters obtained with the V150-RB transducer were used for principal component analysis (PCA) (Fig. 1).

The PCA of the microbial, physico-chemical, textural, sensory and ultrasonic parameters showed major differences among the cheese samples manufactured in different PDO, allowing their discrimination (Fig. 1B). PC1 accounted for 29.84% of the variance and was mainly defined by attenuation in the positive axis and most of the velocity-related parameters along the negative axis; however, it was also

defined by several sensory parameters and, to a lesser extent, by microbial counts (MLAB and AMB) (Fig. 1A). Concretely, the descriptors firmness (Fir_s) and persistence (Per) showed the most significant negative correlation with κ ($R = -671$ and -689 , respectively), whereas for rind appearance (Ra), the highest absolute value of the correlation coefficient was with μ ($R = -734$) and E ($R = -715$). The common terms “firmness”, “rigidity” and “stiffness” can be related to κ , μ and E , respectively (Ludger & Teixeira, 2007). The shear modulus (μ) is concerned with the deformation of the cheese when a force is applied parallel to its surface; therefore, cheeses with a rigid and well-formed rind would be shown lower values for this ultrasonic parameter.

The PC2 and PC3 explained 19.13% and 16.60% of the variance, respectively (Fig. 1C), being able to observe a certain distribution of samples according to the season produced (Fig. 1D). PC2 was defined by the TSA texture parameters (stickiness and work of adhesion by the positive axis; firmness by the negative axis), fat acidity index, pH, sensorial descriptors (rancid, astringent, spicy and bitter) and to a lesser extent by microbial counts (GPCPC and enterobacteria) (Fig. 1C). The contribution to the lipolytic and proteolytic activities of these microbial groups can explain their relation to the abovementioned parameters. The relationship between textural and proteolytic activity has been described for this type of cheese, observing that the degradation of the casein matrix decreases the hardness and consistency of “Torta del Casar” and increases their adhesiveness during ripening (Delgado et al., 2010). High pH values in “Torta del Casar” have been associated with the buffering effect generated by the products of protein hydrolysis (Ordiales et al., 2014), which also contribute to bitter peptide accumulation in cheese (Broadbent, Strickland, Weimer, Johnson, & Steele, 1998). In addition, the microbial lipolytic activity in cheeses yielded free fatty acids, some of them associated with spicy and rancidity descriptors (Salles et al., 2002). Several sensory parameters, including some of those mentioned above, presented the highest correlation coefficients (>0.683) with the frequency parameter FFT₉₉ and HAF, such as the descriptors salty, spicy, fat acidity index, intensity and overall acceptance (Fig. 1C). Therefore, structural changes in the cheeses associated with higher microbial proteolytic and lipolytic activities may explain these correlations. With respect to PC3, it was defined by other frequency parameters (FFT₂₅, FFT₅₀ and FFT₇₅) and UPV_S/UPV_L in the positive axis and mainly by ν in the negative axis (Fig. 1C). This last ultrasound parameter showed the highest positive values for the correlation coefficient ($R = 0.639$) with total protein DM, whereas FFT₇₅ presented a significant correlation ($R = 0.604$) for the texture TCA parameter firmness. The latter result would suggest that stiffer samples would favour the transmission of higher-frequency ultrasonic waves. The rest of the physico-chemical parameters were not clearly associated with any PC, and their explained variability was distributed over the three PCs studied.

In order to predict the behaviour of the microbial, physico-chemical, textural and sensory parameters of the cheeses by the ultrasonic parameters as predictor variables, the multivariate linear regression method (MLR) was employed (Table 5). The predictive models for the TCA parameter firmness and sensory descriptor intensity showed the highest correlation coefficients ($r = 0.928$ and 0.918 , respectively), indicating that 80.9% and 78.5% of the variation in these relevant variables for the quality of cheeses could be predicted from several secondary ultrasound parameters, according to the adjusted determination coefficient ($\text{adj-}R^2$) of the MLR models (Table 5). The explanatory variables to predict the outcome of TCA firmness were FFT₇₅, FFT₉₉ and AT60, whereas in the case of the sensory descriptor intensity they were HAF, VL and FFT₉₉, showing no collinearity between variables for both models ($\text{VIF} \geq 10$). This last ultrasound parameter also provided the best adjusted simple linear regression model to the values of overall acceptance. Based on the regression models achieved, the relationship between ultrasound parameters and TCA firmness, sensory descriptor intensity and overall acceptance is shown in Fig. 2. Therefore, in order to interpret these results, the role of the hitherto secondary ultrasound

parameters in cheese quality control, such as FFT and attenuation, should be recalled. The attenuation values were already shown to be a useful tool for discriminating soft cheeses with different defects (Crespo et al., 2020), whereas FFT and attenuation showed the greatest significance in their linear correlations with parameters of texture for cooked pork loin (González-Mohino et al., 2021).

4. Conclusion

In this study, we discussed the usefulness of ultrasound parameters in the quality control of soft cheeses, confirming the high correlation between several ultrasonic parameters and changes in the physico-chemical, textural and sensorial properties of this product, which are partially associated with microbial activity. To the best of our knowledge, in soft cheeses, such as “Torta del Casar” and “Queso de la Serena”, this is the first literature study to report the predictive potential of several secondary ultrasonic parameters for relevant quality attributes of cheeses and, in turn, to validate the on-line capability of ultrasound for non-destructive evaluation of soft-cheese quality at an industrial level.

CRedit authorship contribution statement

Abel Crespo: Term, Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – review & editing. **Antonio Jiménez:** Term, Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. **Santiago Ruiz-Moyano:** Term, Conceptualization, Validation, Investigation, Resources, Writing – original draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Almudena V. Merchán:** Methodology, Investigation. **Ana Isabel Galván:** Methodology, Investigation. **María José Benito:** Benito, Methodology, Writing – review & editing. **Alberto Martín:** Term, Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing – review & editing, Supervision.

Declarations of competing interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministry of Science, Innovation and Universities, Spain (ref. CIT-060000-2008-0008); Junta Extremadura Government, Spain (ref. GR18165; IB16038; GR18089); University of Extremadura, Spain (223/18). A.V. Merchán and A.I. Galván are funded by pre-doctoral grants from the Junta Extremadura Government (PD16026) and Ministry of Science, Innovation and Universities (RTA2017-00032-CO2-01), respectively. The authors are grateful to García Risco C.B., S. Coop. Agrícola Ganadera de Castuera -COVICA-, Arteserena S.L., Los Casareños S.L., Quesería Doña Francisca S.L., and Quesería los Castúos dairies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108405>.

References

- ASTM International. (2008). *ASTM D2845-08. Standard test method for laboratory determination of pulse velocities and ultrasonic elastic constants of rock (Withdrawn 2017)*. West Conshohocken, PA, USA: American Society for Testing and Materials.
- Benedito, J., Carcel, J., Clemente, G., & Mulet, A. (2000b). Cheese maturity assessment using ultrasonics. *Journal of Dairy Science*, 83(2), 248–254. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74871-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74871-5)
- Benedito, J., Carcel, J. A., Gonzalez, R., & Mulet, A. (2002). Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes. *Ultrasonics*, 40, 19–23. [https://doi.org/10.1016/S0041-624X\(02\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0041-624X(02)00085-9)
- Benedito, J., Carcel, J. A., Sanjuan, N., & Mulet, A. (2000a). Use of ultrasound to assess Cheddar cheese characteristics. *Ultrasonics*, 38, 727–730. [https://doi.org/10.1016/S0041-624X\(99\)00157-2](https://doi.org/10.1016/S0041-624X(99)00157-2)
- Benedito, J., Sanjuan, N., Carcel, J. A., & Mulet, A. (1998). Ultrasonic determination of cheese maturity. In G. Trystram, & C. Skjöldebrand (Eds.), *Automatic control of food and biological processes: Proceedings of the internal symposium ACoFOP IV* (pp. 44–61). Sweden: Göteborg.
- Benedito, J., Simal, S., Clemente, G., & Mulet, A. (2006). Manchego cheese texture evaluation by ultrasonics and surface probes. *International Dairy Journal*, 16, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.04.005>
- Broadbent, J. R., Strickland, M., Weimer, B. C., Johnson, M. E., & Steele, J. L. (1998). Peptide accumulation and bitterness in cheddar cheese made using single-strain *Lactococcus lactis* starters with distinct proteinase specificities. *Journal of Dairy Science*, 81, 327–337. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75581-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75581-X)
- Cerrillo, C., Jiménez, A., Rufo, M., Paniagua, J., & Pachón, F. T. (2014). New contributions to granite characterization by ultrasonic testing. *Ultrasonics*, 54, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2013.06.006>
- Cho, B. K., & Irudayaraj, J. M. K. (2003). A noncontact ultrasound approach for mechanical property determination of cheeses. *Journal of Food Science*, 68, 2243–2247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05754.x>
- Cho, B. K., Irudayaraj, J. M. K., & Omata, S. (2001). Acoustic sensor fusion approach for rapid measurement of modulus and hardness of Cheddar cheese. *Applied Engineering in Agriculture*, 17, 827–832. <https://doi.org/10.13031/2013.6827>
- Crespo, A., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Benito, M. J., Rufo, M., Paniagua, J. M., et al. (2020). Application of ultrasound for quality control of Torta del Casar cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 103(10), 8808–8821. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18160>
- De Filippis, F., Genovese, A., Ferranti, P., Gilbert, J. A., & Ercolini, D. (2016). Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Scientific Reports*, 6, 21871. <https://doi.org/10.1038/srep21871>
- Del Pozo, B. F., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M. A., & Nuñez, M. (1988). Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 55(3), 449–455. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028703>
- Delgado, F. J., Rodríguez-Pinilla, J., González-Crespo, J., Ramírez, R., & Roa, I. (2010). Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese (“Torta del Casar”) manufactured with raw Ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(3), 512–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02157.x>
- Freitas, C., & Malcata, F. X. (2000). Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83(3), 584–602. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74918-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74918-6)
- Gallo, M., Ferrara, L., & Naviglio, D. (2018). Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. *Foods*, 7, 164. <https://doi.org/10.3390/foods7100164>
- González-Mohino, A., Jiménez, A., Paniagua, M. J., Perez-Palacios, T., & Rufo, M. (2019a). New contributions of ultrasound inspection to the characterization of different varieties of honey. *Ultrasonics*, 96, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2019.02.010>
- González-Mohino, A., Jiménez, A., Rufo, M., Paniagua, J. M., Nas, S. V., & Olegario, L. S. (2019b). Changes of ultrasonic parameters as a tool to determine the influence of cooking in pork loin samples. *Acta Acustica united with Acustica*, 105(6), 943–952.
- González-Mohino, A., Jiménez, A., Rufo, M., Paniagua, J. M., Olegario, L. S., & Ventanas, S. (2021). Correlation analysis between acoustic and sensory technique data for cooked pork loin samples. *LWT-Food Science and Technology*, 141, 110882. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110882>
- Gonçalves, M. T. P., Benito, M. J., Córdoba, M. D. G., Egas, C., Merchán, A. V., Galván, A. I., et al. (2018). Bacterial communities in serpa cheese by culture dependent techniques, 16S rRNA gene sequencing and high-throughput sequencing analysis. *Journal of Food Science*, 83(5), 1333–1341. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14141>
- Guiné, R. P., Tenreiro, M. I., Correia, A. C., Correia, P. M., & Barracosa, P. (2016). Analysis of factors influencing the physical, chemical and sensorial properties of Serra da Estrela cheeses. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 643–657. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9348-6>
- International Organization for Standardization. (2008). *Cheese—determination of fat content—van Gulik method*. Geneva, Switzerland: (UNE-ISO Standard No. 3433:2008). ISO.
- International Organization for Standardization. (2014). *Milk and milk products—Determination of nitrogen content—Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation*. Geneva, Switzerland: (UNE-ISO Standard No. 8968-1:2014). ISO.
- Jiménez, A., Rufo, M., Paniagua, J. M., Crespo, A. T., Guerrero, M. P., & Riballo, M. J. (2017). Contributions to ultrasound monitoring of the process of milk curdling. *Ultrasonics*, 76, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2017.01.007>
- Koc, A. B., & Ozer, B. (2008). Nondestructive monitoring of renneted whole milk during cheese manufacturing. *Food Research International*, 41(7), 745–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.05.008>
- Ludger, O., & Teixeira, A. A. (2007). *Food physics. Physical properties-measurement and applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Nassar, G., Lefbvre, F., Skaf, A., Carlier, J., Nongailard, B., & Noël, Y. (2010). Ultrasonic and acoustic investigation of cheese matrix at the beginning and the end of ripening

- period. *Journal of Food Engineering*, 96, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.029>
- Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Casquete, R., Serradilla, M. J., & Córdoba, M. G. (2013a). Bacterial communities of the traditional raw Ewe's milk cheese "Torta del Casar" made without the addition of a starter. *Food Control*, 33, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.027>
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Fernández, M., Casquete, R., & Córdoba, M. G. (2014). Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory, and rheological characteristics of "Torta del Casar" cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 402409. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12129>
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., & Córdoba, M. G. (2013b). Role of the microbial population on the flavor of the soft-bodied cheese Torta del Casar. *Journal of Dairy Science*, 96, 5477–5486. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6587>
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., & de Guía Córdoba, M. (2012). Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in "Torta del Casar" cheese-making. *Food Chemistry*, 133(1), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.012>
- Roa, I., López, M. B., & Mendiola, F. J. (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*, 32, 413–419. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00098-8)
- Salles, C., Sommerer, N., Septier, C., Issanchou, S., Chabanet, C., Garem, A., et al. (2002). Goat cheese flavor: Sensory evaluation of branched-chain fatty acids and small peptides. *Journal of Food Science*, 67, 835–841. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10686.x>
- Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M. A., Gómez, R., & Fernández-Salguero, J. (2002). Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry*, 78, 281–289. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00098-5)
- Tabla, R., Gómez, A., Simancas, A., Rebollo, J. E., Molina, F., & Roa, I. (2016). Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw Ewe's milk cheese: Gas production capacity. *Small Ruminant Research*, 145, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.008>
- Tavaria, F. K., & Malcata, F. X. (1998). Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protegee region. *Journal of Food Protection*, 61, 601–607. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.5.601>
- Tavaria, F. K., & Malcata, F. X. (2003). Enzymatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Portuguese cheese. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 236–243. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00112-1)
- Telis-Romero, J., Váquiro, H. A., Bon, J., & Benedito, J. (2011). Ultrasonic assessment of fresh cheese composition. *Journal of Food Engineering*, 103, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.008>
- International Organization for Standardization. (2004). Cheese and processed cheese—Determination of total solids content. (UNE-ISO Standard No. 5534:2004). ISO: Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization (2006a). Cheese and processed cheese products—Determination of chloride content—Potentiometric titration method. (UNE-ISO Standard No. 5943:2006). ISO: Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization (2006b). Sensory Analysis—Guidelines for the Use of Quantitative Response Scales. (UNE-ISO Standard No. 4121-2006). ISO: Geneva, Switzerland.

**Low-frequency ultrasound as a tool for quality control of soft-bodied raw
ewe's milk cheeses**

Abel Crespo¹, Antonio Jiménez^{2,3}, Santiago Ruiz-Moyano^{4,5*}, Almudena V.
Merchán^{4,5}, Ana Isabel Galván^{4,5}, María José Benito^{4,5}, Alberto Martín^{4,5}

SUPPLEMENTAL MATERIAL

This article contains a supplementary Table

Table S1. Significant correlation (sig <0.05) between microbial, physico-chemical, textural and sensory parameters of soft cheeses with ultrasound parameters

Ultrasonic parameter	Transducer V150-RB				Transducer V151-RB			
	Micr. ¹	Phys ² .	Text ³	Sens ⁴ .	Micr. ¹	Phys ² .	Text ³	Sens ⁴ .
<i>Velocity-related parameters</i>								
UPV _L (m/s)				-1, -12	2			-1
UPV _S (m/s)				-1				-3⁵
UPV _S /UPV _L		-3		8				4
Young's modulus (<i>E</i>)				-1, -12				-3
Poisson's ratio (ν)		3		1, -8				-4
Bulk modulus (κ)				-2, -12				
Shear modulus (μ)				-1, -12				-3
Lamé's constant (λ)				-12				
<i>Frequencies</i>								
HAF (Hz)		6		6, 7, 11, 12				9 6, 7, 9, 13
FFT ₂₅ (Hz)	-8, 5							
FFT ₅₀ (Hz)	-8		1	8				
FFT ₇₅ (Hz)	-8		1	8				
FFT ₉₉ (Hz)				5, 7, 8, 13				
<i>Attenuations</i>								
AT 10				-1	-4			-1, 3
AT 20				-1	-4			-1, 3
AT 30				-1	-4			-1, 3
AT 40				-1	-4			-1, 3
AT 50					-4			-1, 3
AT 60					-4			-1
AT 70					-4			-1
AT 80					-4			-1
AT 90				-1	-4		-1	-1

¹Microbial parameters: AMB (1), MLAB (2), TLAB (3), GPCPC (4), Enterococci (5), Enterobacteriaceae (6), Total coliforms (7), Yeasts (8), Moulds (9).

²Physico-chemical parameters: Moisture (1), Total protein (2), Total protein DM (3), Fat (4), Fat DM (5), Salt (6), pH (7), Acidity (8).

³Textural parameters: TCA: Firmness (1), Stickiness (2); TSA: Firmness (3), Work of Shear (4), Stickiness (5), Work of adhesion (6).

⁴Sensory analysis: Appearance (rind) (1), Appearance (paste) (2), Firmness (3), Creaminess (4), Salty (5), Bitter (6), Spicy (7), Acid (8), Astringent (9), Rancid (10), Intensity (11), Persistence (12), Overall acceptance (13).

⁵Black font: Sig value <0.01.

