



Universitat Autònoma  
de Barcelona

Facultat de Veterinària  
Departament de Ciència Animal i dels Aliments

# Aplicación de dispersión de luz de infrarrojo próximo en la producción de derivados lácteos bajos en grasa con inulina

Tesis doctoral

**OSCAR ARANGO BEDOYA**

Bellaterra (Cerdanyola del Valles), julio de 2015





Manuel Castillo Zambudio y Antonio José Trujillo Mesa, profesores del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona hacen constar que:

El Ingeniero Agroindustrial Oscar Arango Bedoya ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Aplicación de dispersión de luz de infrarrojo próximo en la producción de derivados lácteos bajos en grasa con inulina”, que presenta para optar al título de Doctor en Ciencia de los Alimentos.

Y para que así conste firman el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) el 24 de julio de 2015.



MANUEL CASTILLO ZAMBUDIO  
Profesor Agregado



ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA  
Profesor Titular de Universidad



Durante la realización de este trabajo el autor contó con el apoyo de la Universidad de Nariño (Pasto, Colombia) y de la Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias y de Investigación, de la Generalitat de Catalunya, a través con una beca predoctoral de formación de personal investigador, entidades a las cuales expresa su profundo agradecimiento.



## *Dedicatoria:*

*A mi padre (q. d. e. p), cuan orgulloso estaría.*

*A mi madre por su amor, sus consejos, sus trasnochos y sus oraciones.*

*A mi esposa Mary Cruz y mis hijos José David y Sara*

*Este logro es por y para ustedes.*



## *Agradecimientos:*

*Al Dr. Manuel Castillo Zambudío investigador incansable por pasión y convicción, por su amabilidad, paciencia y por estar siempre dispuesto a escuchar y ayudar a pesar de sus múltiples ocupaciones, por las muchas horas de trabajo dedicadas a esta tesis y porque más que un director ha sido un amigo.*

*Al Dr. Antonio José Trujillo Mesa, por sus sugerencias y aportes siempre prácticos y oportunos, por guiar este proceso desde su amplia experiencia, por compartir su gran conocimiento de la ciencia y la tecnología de la leche, por sus acuciosas revisiones y por su ayuda más allá de lo académico.*

*A todos los profesores del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, porque creo que a todos acudí en busca de ayuda en algún momento y siempre estuvieron dispuestos a colaborar, de todos ellos he aprendido mucho.*

*A los responsables y técnicos de laboratorios y de Planta Piloto por facilitarme las cosas durante los largos periodos de trabajo experimental, gracias por su amabilidad y por estar siempre dispuestos a colaborar.*

*A todos los compañeros y compañeras de múltiples nacionalidades que he tenido la fortuna de conocer y con quienes he compartido muchos momentos agradables, porque con ellos he ampliado mi visión del mundo y me han brindado mucho de su cultura, gracias por su amistad y cuenten con la mía siempre.*

*A mi querida esposa Mary Cruz, gracias por estar ahí incondicionalmente, si he alcanzado este logro ha sido en gran parte por tu ayuda silenciosa, invisible pero invaluable. Gracias por comprender mis ausencias, por asumir en muchas ocasiones sola todas las responsabilidades del hogar, por soportar mi mal genio en los periodos de estrés, por motivarme y sobre todo por querernos y cuidarnos tanto a Sarita a José David y a mí.*



## **Publicaciones y presentaciones derivadas de esta tesis:**

### **Publicaciones:**

Arango, O., Trujillo, A. J., Castillo, M. 2015. Predicting coagulation and syneresis parameters of milk gels when inulin is added as fat substitute using infrared light backscatter. *Journal of Food Engineering*, 157: 63-69.

Arango, O., Trujillo, A. J., Castillo, M. 2015. Monitorización de la fermentación de yogur mediante un sensor óptico de dispersión de luz de infrarrojo cercano. Libro de Ponencias y Comunicaciones VIII CYTA – CESIA “Conocimiento para una estrategia de especialización inteligente del sector alimentario”. Universidad de Extremadura. ISBN: 978-84-606-6881-7. pp. 115.

Arango, O., Trujillo, A.J., Castillo, M. 2013. Influence of fat replacement by inulin on rheological properties, kinetics of rennet milk coagulation and syneresis of milk gels. *Journal of Dairy Science*, 96: 1984-1996.

Arango, O., Trujillo, A. J., Castillo, M. 2014. Predicción de parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos con inulina mediante un sensor de dispersión de luz infrarroja. Libro de Actas 9º Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA9. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. ISBN: 978-84-9048-168-4. pp. 552-559.

Arango, O., Castillo, M., Osorio, O. 2012. Control en línea del proceso de elaboración de queso mediante sensores de fibra óptica. *Vitae*, 19(1): 34-37.

### **Presentaciones orales:**

Arango, O., Trujillo, A.J., Castillo, M. Monitorización de la fermentación de yogur mediante un sensor óptico de dispersión de luz de infrarrojo cercano. VIII CYTA/CESIA (Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTA) y Congreso Español de Ingeniería de Alimentos (CESIA), Badajoz, España, 7 – 10 de abril de 2015.

Arango, O., Trujillo, A.J., Castillo, M. Predicción de parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos con inulina mediante un sensor de dispersión de luz infrarroja. 9º Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA9. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España, 13 – 16 de enero de 2014.

Arango, O., Trujillo, A.J., Castillo, M. Monitoring the effect of solids concentration and temperature on coagulation and cutting time of milk gels using NIR spectrometry. International Conference on Food and Biosystems Engineering FaBE 2013. Skyathos, Grecia, 30 mayo - 2 junio de 2013.

Arango, O., Castillo, M. La inulina como sustituto de grasa en productos lácteos. 2º Seminario Internacional de Actualización en Ingeniería Agroindustrial: Nuevas Tendencias en el Procesamiento de Alimentos. Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. 23 – 24 de noviembre de 2011.

**Posters:**

Arango, O., Taterka, H.M., Trujillo, A.J., Guamis, B., Castillo, M. Influence of fat replacement by inulin on rheological properties and kinetics of milk coagulation and syneresis of milk gels. ADSA®-AMPA-ASAS-CSAS-WSASAS Joint Annual Meeting, July 15–19, 2012, Phoenix, Arizona.

Arango, O., Castillo, M. Control en línea del proceso de elaboración de queso mediante sensores de fibra óptica. I Congreso Internacional en Investigación e Innovación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Junio 13-15 de 2012.

**Solicitudes de protección de propiedad intelectual derivadas de esta tesis:**

Como resultado del trabajo que se describe en el capítulo 9 de esta tesis, se solicitó un informe de patentabilidad de un método de predicción en línea del pH del yogur (y productos similares) con base en medidas ópticas, que actualmente está en trámite para solicitud de patente.

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar la aplicación de un sensor de dispersión de luz de infrarrojo próximo para la caracterización y monitorización de procesos en la elaboración de derivados lácteos bajos en grasa, específicamente en queso fresco y yogur firme con adición de inulina como sustituto de grasa. Se llevaron a cabo cuatro experimentos. En los dos primeros se estudió la coagulación de geles enzimáticos, evaluando el efecto de la temperatura y de las concentraciones de inulina, grasa, proteína y calcio sobre los parámetros de dispersión de luz relacionados con la coagulación y la sinéresis. A partir de la información generada se desarrollaron modelos de predicción de tiempos de coagulación y de corte, de la velocidad de la cinética de desuerado y del rendimiento de la cuajada. En el tercer experimento se validaron los modelos de predicción obtenidos anteriormente y se estudió la capacidad de retención de agua de los geles. En el último experimento se evaluó la aplicabilidad del sensor óptico para monitorizar el proceso de incubación durante la elaboración de yogur, analizando el efecto de las concentraciones de grasa y de inulina, sobre el desarrollo de la coagulación ácida y las características finales del producto. También se desarrollaron modelos para la monitorización en línea del pH y de parámetros reológicos en la elaboración de yogur.

El aumento en la temperatura de coagulación y la adición de inulina y calcio aceleraron las fases de hidrólisis enzimática, agregación y endurecimiento. El aumento en la concentración de proteína prolongó la duración de la fase de hidrólisis enzimática, pero al mismo tiempo aceleró las fases de agregación y el endurecimiento del gel. La adición de inulina produjo una disminución en la constante cinética de expulsión de suero y un aumento aparente en el rendimiento de la cuajada, pero no tuvo efecto sobre la capacidad de retención de agua de los geles enzimáticos y ácidos. Utilizando como predictores parámetros ópticos se obtuvieron modelos para la predicción en línea de los tiempos de gelificación y de corte en geles enzimáticos y un modelo que permite la monitorización del pH durante la incubación de yogur a partir del inicio de la gelificación. Adicionalmente se encontraron algoritmos para conocer en tiempo real la evolución del módulo elástico ( $G'$ ), el módulo viscoso ( $G''$ ) y  $tg \delta$  en la coagulación ácida.

El sensor de dispersión de luz NIR a 880 nm permite detectar los efectos de la adición de inulina en geles lácteos bajos en grasa y, por tanto, constituye una herramienta que puede contribuir no solo al desarrollo de productos de este tipo, sino también a la posterior monitorización y control de los procesos de elaboración de los mismos. Adicionalmente con el sensor óptico es posible realizar la monitorización en línea del proceso de incubación del yogur, permitiendo no solo la determinación del punto final de la misma, sino además conocer la firmeza y la tendencia al desuerado del producto.

## ABSTRACT

The objective of this PhD dissertation was to evaluate the application of a near infrared light scattering sensor to the characterization and process monitoring in low fat dairy products, specifically in fresh cheese and set yogurt with inulin as a fat substitute. Four experiments were carried out. In the first two experiments, enzymatic milk gels were studied in order to evaluate the effect of temperature as well as inulin, fat, protein and calcium concentration on the light backscatter with regard to milk coagulation and syneresis. From the information generated, models for the prediction of coagulation and cutting times, whey drainage kinetic rate constant and curd yield were developed. In the third experiment, prediction models previously obtained were validated and the water holding capacity of milk gels was studied. In the last experiment the usage of the optical sensor to monitor the milk fermentation process during yogurt production was evaluated, analyzing the effect of fat and inulin concentration on acid coagulation as well as on the final product characteristics. Also models to the inline monitoring of pH and rheological parameters in yogurt production were developed.

The increase in coagulation temperature and inulin and calcium addition accelerated enzymatic hydrolysis, aggregation and curd firming phases. The increase in the protein concentration prolonged the enzymatic hydrolysis step, but at the same time, accelerated the aggregation and curd firming processes. Inulin addition produced a decrease in the whey drainage kinetic rate constant and an apparent increase in the curd yield, but had no effect on the water holding capacity of enzymatic and acid milk gels. Using optical parameters as predictors, models for inline prediction of coagulation and cutting times in enzymatic gels were obtained, as well as a model to monitor pH during yogurt incubation, from coagulation time. Also, algorithms to determine the inline evolution of the elastic modulus ( $G'$ ), the viscous modulus ( $G''$ ) and  $\tan \delta$  during acid coagulation were developed.

The NIR light backscatter sensor at 880 nm allowed to detect the effects of inulin addition in low fat milk gels and, therefore, it can contribute not only to the development of that kind of products, but also to monitor and control the production process. Additionally, using the optical sensor, it is possible to monitoring inline the

yogurt fermentation process, allowing not only the detection of the incubation end-point, but also estimating the yogurt firmness and its syneresis tendency.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO 1. Interés del estudio</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2. Revisión bibliográfica</b> .....	3
<b>2.1 Interés por la producción de queso fresco y yogur bajos en grasa con adición de inulina</b> .....	3
<b>2.2 Factores asociados a la elaboración de quesos bajos en grasa</b> .....	5
2.2.1 Alternativas tecnológicas para mejorar la calidad de los quesos bajos en grasa .....	5
2.2.2 Utilización de sustitutos de grasa .....	8
<b>2.3 La inulina como sustituto de grasa en derivados lácteos</b> .....	11
2.3.1 Fuentes de inulina y su estructura química.....	11
2.3.2 Características físicoquímicas de la inulina.....	13
2.3.3 Beneficios para la salud de la inulina .....	15
2.3.4 Mecanismos y factores relacionados con la formación de geles de inulina .....	16
2.3.5 Aplicaciones de la inulina en derivados lácteos .....	18
<b>2.4 El proceso de elaboración del queso</b> .....	22
2.4.1 Selección de la leche.....	23
2.4.2 Tratamiento previo de la leche .....	23
2.4.3 La coagulación.....	27
2.4.3.1 Estructura de la micela de caseína.....	28
2.4.3.2 El Proceso de coagulación enzimática.....	34
2.4.3.2.1 Factores que afectan al proceso de coagulación enzimática.....	40
2.4.4 El corte de la cuajada.....	44
2.4.5 La sinéresis .....	46
2.4.5.1 Factores que afectan a la sinéresis .....	48
2.4.6 Moldeo y prensado .....	53
2.4.7 Salado .....	53
2.4.8 Maduración.....	53
<b>2.5 Proceso de elaboración del yogur</b> .....	54
2.5.1 Estandarización de la leche.....	55
2.5.2. Homogenización de la leche.....	56
2.5.3 Tratamiento térmico de la leche .....	56

2.5.4. Enfriamiento y adición del inóculo .....	57
2.5.5 El proceso de coagulación ácida.....	57
2.5.5.1 Factores que afectan al proceso de coagulación ácida .....	59
2.5.6. Enfriamiento del yogur.....	60
<b>2.6 Utilización de sensores ópticos para la monitorización y control de procesos clave en la fabricación de queso y yogur.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 3. Objetivos y plan de trabajo .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1 Objetivos.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2 Plan de trabajo.....</b>	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 4. Materiales y métodos .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 Reconstitución de la leche .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2 Enzima e inulina .....</b>	<b>78</b>
<b>4.3 Determinación de parámetros ópticos de dispersión NIR.....</b>	<b>78</b>
<b>4.4 Determinación de parámetros reológicos .....</b>	<b>81</b>
<b>4.5 Análisis estadístico.....</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 5. Estudio de la coagulación de geles enzimáticos bajos en grasa mediante un sensor óptico: efecto de la temperatura, grasa e inulina.....</b>	<b>85</b>
<b>5.1 Introducción.....</b>	<b>86</b>
<b>5.2 Materiales y métodos.....</b>	<b>88</b>
5.2.1 Diseño experimental.....	88
5.2.2 Procedimiento de los ensayos.....	88
5.2.3 Determinación de los parámetros visuales .....	89
5.2.4 Evaluación de la sinéresis.....	90
5.2.5 Monitorización de la coagulación de la leche .....	92

<b>5.3 Resultados y discusión</b> .....	92
5.3.1 Efecto de los factores experimentales sobre la coagulación y las propiedades reológicas del gel.....	93
5.3.1.1 Efecto de la temperatura.....	93
5.3.1.2 Efecto de la concentración de inulina.....	96
5.3.1.3 Efecto de la concentración de grasa.....	100
5.3.2 Efecto de los factores experimentales sobre la sinéresis y el rendimiento de la cuajada.....	101
5.3.2.1 Cinética de la sinéresis.....	101
5.3.2.2 Efecto de la temperatura.....	102
5.3.2.3 Efecto de la concentración de inulina.....	103
5.3.2.4 Efecto de la concentración de grasa.....	105
<b>5.4 Conclusiones</b> .....	105

**CAPÍTULO 6. Predicción de parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos con inulina como sustituto de grasa usando dispersión de luz infrarroja**..... 107

<b>6.1 Introducción</b> .....	108
<b>6.2 Materiales y métodos</b> .....	110
6.2.1 Análisis estadístico.....	110
<b>6.3 Resultados y discusión</b> .....	111
6.3.1. Predicción de parámetros que caracterizan el proceso de coagulación....	114
6.3.2 Predicción de la constante cinética de drenado del suero y del rendimiento de la cuajada.....	118
<b>6.4 Conclusiones</b> .....	121

**CAPÍTULO 7. Estudio de la coagulación de geles lácteos bajos en grasa mediante un sensor óptico: efecto de la proteína, el calcio y la inulina**..... 123

<b>7.1 Introducción</b> .....	124
<b>7.2 Materiales y métodos</b> .....	126

7.2.1 Relación entre parámetros ópticos y reológicos con las fases del proceso de coagulación enzimática .....	127
<b>7.3 Resultados y discusión</b> .....	128
7.3.1 Efecto de la adición de inulina .....	129
7.3.2 Efecto de la concentración de proteína.....	130
7.3.3 Efecto de la adición de cloruro de calcio.....	133
7.3.4 Efecto de las interacciones entre los factores experimentales.....	135
7.3.5 Predicción de los tiempos de gelificación y de corte reológicos.....	137
<b>7.4 Conclusiones</b> .....	142
<b>CAPÍTULO 8. Validación de modelos de predicción de tiempos de gelificación y de corte en geles lácteos con inulina</b> .....	143
<b>8.1 Introducción</b> .....	144
<b>8.2 Materiales y métodos</b> .....	145
<b>8.3 Resultados y discusión</b> .....	146
8.3.1 Efecto de los factores evaluados sobre la coagulación y la capacidad de retención de agua del gel .....	146
8.3.2 Validación de los algoritmos de predicción de los tiempos de gelificación y de corte reológico .....	150
<b>8.4 Conclusiones</b> .....	153
<b>CAPÍTULO 9. Monitorización de la fermentación de yogur con inulina usando un sensor de dispersión de luz NIR</b> .....	155
<b>9.1 Introducción</b> .....	156
<b>9.2 Materiales y métodos</b> .....	159
9.2.1 Diseño experimental.....	159
9.2.2 Preparación de la leche .....	159
9.2.3 Preparación del inóculo .....	160
9.2.4 Procedimiento de los ensayos.....	161
9.2.5 Evaluación de la sinéresis espontánea.....	162
9.2.6 Determinación de la capacidad de retención de agua.....	162

9.2.7 Evaluación de la firmeza del gel.....	163
9.2.8 Medidas de dispersión de luz, reología y pH.....	163
9.2.9 Análisis estadístico .....	165
<b>9.3 Resultados y discusión.....</b>	<b>166</b>
9.3.1 Composición de las muestras .....	166
9.3.2 Efecto de los factores experimentales sobre el proceso de fermentación del yogur.....	166
9.3.3 Caracterización de la coagulación del yogur en función del ratio de dispersión de luz y su relación con la curva de pH y los parámetros reológicos .....	180
9.3.4 Detección de cambios en la leche debidos al tiempo de almacenamiento	185
9.3.5 Aplicación del sensor óptico para el control del proceso de fermentación del yogur y la determinación del punto final.....	185
9.3.6 Aplicación del sensor óptico para la determinación de la firmeza y la tendencia al desuerado del yogur.....	187
<b>9.4 Conclusiones.....</b>	<b>188</b>
<b>CAPÍTULO 10. Conclusiones finales .....</b>	<b>191</b>
<b>CAPÍTULO 11. Referencias .....</b>	<b>195</b>

## LISTADO DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
$B$	Coefficiente de permeabilidad
$\beta$	Coefficiente de regresión
	Relación $t_{G'30}/t_{2min}$
CCD	Diseño compuesto central
CCP	Fosfato cálcico coloidal
CMP	Caseinomacropéptido
$CRA$	Capacidad de retención de agua
DWS	Espectrometría de dispersión difusa múltiple
$Firm$	Firmeza del gel
$G$	Concentración de grasa en la leche
$G'$	Módulo de almacenamiento o módulo elástico
$G''$	Módulo de pérdida o módulo viscoso
GDL	Glucono delta lactona
$GL$	Grados de libertad
GLM	Modelo lineal general
$G'pH_{4,8}$	Valor del módulo elástico a pH = 4,8
$G'pH_{4,6}$	Valor del módulo elástico a pH = 4,6
$hm$	Humedad inicial de la muestra
$In$	Concentración de inulina
IR	Índice de refracción
$k$	Constante cinética del proceso de sinéresis
LFV	Sensor de campo de visión amplio
LR	Leche reconstituida
LSM	Medias de mínimos cuadrados
min	Minutos
mM	Concentración milimolar
MFGM	Membrana del glóbulo graso de la leche
N	Número de observaciones
NIR	Infrarrojo próximo
NLIN	Regresión no lineal
$P$	Concentración de proteína
Pa	Pascales
$pH_{acmin1}$	Valor de pH al primer mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo
$pH_{acmin2}$	Valor de pH al segundo mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo
$pH_{acmin3}$	Valor del pH al tercer mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo
$pHt_{max}$	Valor de pH a tiempo $t_{max}$

$pHt_{max2}$	Valor de pH a tiempo $t_{max2}$
$pHt_{2min}$	Valor de pH a tiempo $t_{2min}$
$pHt_{G'1}$	Valor de pH al tiempo de gelificación
$pm$	Peso de la muestra
ppm	Partes por millón
$Q_{10}$	Coefficiente de temperatura
$r$	Coefficiente de correlación
$R$	Ratio de dispersión de luz
$R'$	Primera derivada del ratio de dispersión de luz con respecto al tiempo
$R''$	Segunda derivada del ratio de dispersión de luz con respecto al tiempo
$R^2$	Coefficiente de determinación
$R_c$	Rendimiento de la cuajada
$REP$	Réplica
$RPG$	Relación proteína - grasa
$R_{max}$	Valor de $R$ a $t_{max}$
$R_{2max}$	Valor de $R$ a $t_{2max}$
$R_{2min}$	Valor de $R$ a $t_{2min}$
$R_{2max2}$	Valor de $R$ a $t_{2max2}$
$R_{2min2}$	Valor de $R$ a $t_{2min2}$
$R'_{max}$	El valor de la primera derivada de $R$ a tiempo $t_{max}$
$R'_{max2}$	El valor de la primera derivada de $R$ a tiempo $t_{max2}$
$R'_{2max}$	El valor de la primera derivada de $R$ a tiempo $t_{2max}$
$R'_{2min}$	El valor de la primera derivada de $R$ a tiempo $t_{2min}$
$R_{pH4,8}$	Valor de $R$ a pH = 4,8
$R_{pH4,6}$	Valor de $R$ a pH = 4,6
s	Segundos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SEP	Error estándar de predicción
SNG	Sólidos lácteos no grasos
$SinE$	Sinéresis espontánea
$t$	Tiempo
$t_{acmin1}$	Tiempo al primer mínimo de la primera derivada de la curva pH vs $t$
$t_{acmin2}$	Tiempo al segundo mínimo de la primera derivada de la curva pH vs $t$
$t_{acmin3}$	Tiempo al tercer mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs $t$
$t_{ag}$	Tiempo de agregación
$t_{clot}$	Tiempo de coagulación visual
$t_{cut}$	Tiempo de corte visual
$t_{gel}$	Tiempo de gelificación reológico
$t_F$	Tiempo de endurecimiento
$t_{F30}$	Tiempo transcurrido entre $G' = 1$ y $G' = 30$ Pa
$t_{F60}$	Tiempo transcurrido entre $G' = 1$ y $G' = 60$ Pa
$t_{G'30}$	Tiempo al cual $G' = 30$ Pa
$t_{G'60}$	Tiempo al cual $G' = 60$ Pa
$tg \delta$	Ángulo de fase o tangente de $\delta$

$tg \delta_{30Pa}$	Valor de $tg \delta$ cuando $G' = 30$ Pa
$tg \delta_{60Pa}$	Valor de $tg \delta$ cuando $G' = 60$ Pa
$tg \delta_{30min}$	Valor de $tg \delta$ 30 min después de la adición de la enzima
$tg \delta_{pH4,6}$	Valor de $tg \delta$ a pH = 4,6
$t_{max}$	Tiempo desde la adición de enzima hasta el primer máximo de $R'$
$t_{max2}$	Tiempo desde la adición de enzima hasta el segundo máximo de $R'$
$t_{2max}$	Tiempo desde la adición de enzima hasta el primer máximo de $R''$
$t_{2min}$	Tiempo desde la adición de enzima hasta el primer mínimo de $R''$
$t_{2max2}$	Tiempo desde la adición de enzima hasta el segundo máximo de $R''$
$t_{2min2}$	Tiempo desde la adición de enzima hasta el segundo mínimo de $R''$
$t_{pH5,0}$	Tiempo a pH = 5,0
$t_{pH4,8}$	Tiempo a pH = 4,8
$t_{pH4,6}$	Tiempo a pH = 4,6
$T$	Temperatura
UF	Ultrafiltración
$\mu L$	Microlitros
$W$	Peso del suero
$W_{\infty}$	Masa de suero drenado a tiempo infinito
$W_A$	Masa total de suero drenado acumulado
$W_E$	Suero expulsado

# Capítulo 1

## Interés del estudio

Tanto el queso como el yogur son alimentos altamente nutritivos y muy apreciados por los consumidores, sin embargo el contenido de grasa en muchos tipos de queso es elevado, por lo que los nutricionistas desaconsejan a algunos grupos de consumidores, especialmente personas mayores y niños con riesgo de obesidad, incluirlo en su dieta. Por otro lado, en los últimos años se ha incrementado la demanda de quesos frescos por sus propiedades nutricionales, entre las que cabe destacar su bajo contenido energético y su contenido en proteínas de alto valor biológico, además de constituir una matriz muy adecuada para la incorporación de probióticos y prebióticos. Por estas razones existe la necesidad y la oportunidad para la industria láctea de continuar desarrollando productos con características saludables y funcionales, especialmente aquellos que incorporan ingredientes prebióticos como la inulina y con contenidos reducidos de grasa. Sin embargo, es sabido que la reducción o eliminación de la grasa, sin modificar el procedimiento regular de elaboración, afecta la textura y las características sensoriales y funcionales del producto, por lo que los fabricantes enfrentan el reto de suplir las expectativas de los consumidores, quienes preferirían que los productos bajos en grasa sean idénticos a aquellos con grasa.

La utilización de sustitutos de grasa tales como la inulina constituye una de las alternativas de procesamiento que contribuyen a obtener derivados lácteos bajos en grasa con características más próximas a las de aquellos con grasa. La inulina es un carbohidrato de origen natural con excelentes propiedades tecnológicas para su aplicación como sustituto de grasa en alimentos. Además la inulina es considerada un producto funcional, ya que no se digiere en el estómago, llegando intacta al colón donde actúa como prebiótico estimulando el desarrollo de microbiota benéfica y generando

efectos demostrados sobre la salud tales como el mejoramiento de la función intestinal, aumento en la absorción de minerales, reducción de triglicéridos, disminución del riesgo de enfermedad cardiovascular y de cáncer de colón, entre otros.

Las herramientas y sistemas de monitorización en línea, que permiten un mejor control y/o la automatización de procesos, repercuten en la estandarización de las etapas de fabricación y por tanto en la mejora de la homogeneidad y la calidad final del producto. En la fabricación del queso, la determinación del momento óptimo para el corte de la cuajada y el posterior desuerado de la misma son dos etapas que aún hoy día se controlan de forma empírica en la mayoría de las industrias, a pesar del alto impacto que tienen sobre el rendimiento, la calidad y el margen de utilidad de las empresas. La tecnología de sensores ópticos aplicada al control del tiempo de corte (ya disponible comercialmente) y al control de la sinéresis (en desarrollo) ha demostrado ser una alternativa viable para el logro de la automatización de esas dos importantes etapas de proceso, si bien aún no se ha estudiado su utilización en la elaboración de quesos bajos en grasa con adición de inulina.

En el caso de la fabricación de yogur no existe actualmente ningún sistema alternativo a la toma de muestras y análisis sucesivo en laboratorio y al uso de sondas de pH (sistema que presenta muchos inconvenientes), que permita realizar un seguimiento en línea del proceso de acidificación y determinar el punto final del mismo, controlando además, en tiempo real, parámetros de suma importancia sobre la calidad final del producto, como la dureza del gel y su tendencia al desuerado.

En la producción de queso y yogur a gran escala, la mayor limitación que ha impedido hasta ahora conseguir una completa automatización de los procesos, es la no disponibilidad de sistemas de monitorización, que resulten prácticos, adecuados y asequibles, para el control en línea de la coagulación, con determinación del tiempo de corte y de la intensidad del desuerado, en el caso del queso, y de la fermentación (coagulación ácida) en el caso del yogur, con determinación del punto final de la misma. Se espera que los resultados de esta tesis puedan contribuir al logro de la automatización de estas importantes etapas, especialmente en la elaboración de productos bajos en grasa donde se utiliza la inulina como sustituto de la misma.

## Capítulo 2

# Revisión bibliográfica

### 2.1 Interés de la producción de queso fresco y yogur bajos en grasa con adición de inulina

Se ha proyectado que para el 2020 las enfermedades crónicas representarán casi tres cuartas partes de todas las muertes a nivel mundial y que el 71% de las muertes debidas a enfermedad isquémica del corazón, el 75% de las debidas a infarto y el 70% de las debidas a diabetes ocurrirán en los países desarrollados. Además, desde hace muchos años se conoce que una dieta inadecuada juega un papel clave como factor de riesgo en las enfermedades crónicas (WHO/FAO, 2003). Se pronostica que la obesidad afectará a más de un billón de personas para el año 2030 y está asociada con un mayor riesgo de desarrollo de otras morbilidades como diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular (Phillips et al., 2013). El síndrome metabólico (SM) es una combinación de tres o más de los siguientes factores: sobrepeso u obesidad, hipertensión, desordenes en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos - elevada concentración de triglicéridos y bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en sangre-, siendo cada componente del SM un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2, aterosclerosis y enfermedad de la arteria coronaria (El Khoury et al., 2012; Mallappa et al., 2012). Se ha establecido que es posible prevenir o retrasar el SM a través de cambios en la alimentación y el estilo de vida (Pimenta et al., 2015; Grundi, 2008).

La mayoría de guías dietéticas recomiendan el consumo de leche y derivados lácteos como parte importante de una dieta saludable y bien equilibrada (Gidding et al., 2009). La razón fundamental sugerida para esta recomendación es que la leche y sus derivados son una rica fuente de proteína, calcio y nutrientes como vitaminas A y D. Sin

embargo, tanto para el público en general, como para la comunidad científica, la grasa láctea es percibida como un componente negativo, principalmente por su contenido calórico y por ser fuente de colesterol y ácidos grasos saturados (SFA). Por consiguiente, las guías dietéticas típicas recomiendan consumir leche y productos lácteos reducidos en grasa, ya que se cree que de esta forma se reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular y de sobrepeso (Kratz et al., 2013). Parcialmente como respuesta a esas guías, los patrones de consumo de grasas lácteas han cambiado considerablemente en los últimos 40 años, así por ejemplo en Estados Unidos el consumo de mantequilla se ha reducido en un 75% mientras que la leche semidesnatada o desnatada ha reemplazado ampliamente a la leche entera (Kratz et al., 2013).

A pesar de que en varios estudios recientes se ha cuestionado la hipótesis de que la grasa láctea contribuye a la obesidad o al riesgo cardiovascular, sugiriendo por el contrario que el consumo de alimentos lácteos ha mostrado tener efectos benéficos sobre los factores de riesgo asociados al SM (Astrup, 2014; Benatar et al., 2013; Kratz et al., 2013), la controversia continua y la demanda mundial de productos lácteos bajos en grasa ha crecido en tal magnitud, que es considerado actualmente un negocio multibillonario, reflejado en el hecho de que la introducción de nuevos productos dentro del sector lácteo en Europa ha estado dominada por declaraciones relacionadas con el contenido de grasa (Krystallis y Chrysochou, 2011).

Los alimentos funcionales se pueden definir como aquellos que pueden afectar beneficiosamente a una o más funciones específicas en el organismo, más allá de un adecuado efecto nutricional, de forma relevante, para mejorar el estado de salud, el bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad (Stanton et al., 2005). Los productos lácteos que contienen prebióticos o probióticos están dentro de los más populares en esta categoría. Gibson et al. (2004) revisaron el concepto de prebiótico como “un ingrediente selectivamente fermentado que estimula cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal que confiere beneficios a la salud y bienestar del huésped”. Entre los prebióticos, los fructoolisacáridos y los fructanos tipo inulina han sido los más investigados (Roberfroid, 2007).

## **2.2 Factores asociados a la elaboración de quesos bajos en grasa**

La Comisión del CODEX sobre Comercio Internacional ha fijado un 50% de reducción de grasa (sobre base seca) respecto a una variedad de referencia para que un queso pueda ser etiquetado como reducido en grasa. En Estados Unidos un queso “bajo en grasa” debe contener 6 g o menos de grasa por 100 g de queso, mientras que un queso “reducido en grasa” requiere al menos 25% de reducción en el nivel de grasa con relación al nivel de grasa de la variedad de referencia (FDA, 2008). En esta sección se utilizará indistintamente el término “bajo en grasa” para referirse a una reducción mínima del 25% de grasa.

### **2.2.1 Alternativas tecnológicas para mejorar la calidad de los quesos bajos en grasa**

La eliminación de toda o parte de la grasa de un queso puede afectar adversamente a su sabor, textura y funcionalidad. Muchos quesos bajos en grasa tienden a tener un sabor plano no característico y una textura gomosa y pegajosa, presentando menos cambios en las propiedades viscoelásticas durante la maduración (Banks, 2004; McMahon et al., 1996). La eliminación de los defectos en estos quesos ha demostrado ser un reto tecnológico; algunas aproximaciones incluyen modificación de los parámetros de proceso para aumentar el nivel de humedad, control de los niveles de lactosa, aumento del área superficial de los glóbulos grasos por homogeneización, selección de inóculos, utilización de cultivos adjuntos o de enzimas para manipular la textura y el sabor, y el uso de estabilizadores y sustitutos de grasa para mejorar la textura (Banks, 2004). Otras posibles modificaciones incluyen tratamiento térmico más intenso a la leche para retener proteínas desnaturalizadas del suero en la cuajada, preacidificación de la leche, reducción del tiempo de agitación y variaciones en el tiempo y temperatura durante el desuerado, lavado de la cuajada, entre otras (Johnson et al., 2009).

La leche para la elaboración de queso bajo en grasa es estandarizada a un nivel apropiado de grasa o a una relación caseína/grasa específica, dependiendo del contenido de grasa final requerido en el queso, lo que puede lograrse eliminando grasa (nata) o adicionando sólidos proteicos como caseína en polvo, leche en polvo desnatada, leche

desnatada, condensada o ultrafiltrada, a la leche entera o parcialmente desnatada (Banks, 2004). Cuando el contenido de grasa se reduce, la red de caseína se hace más densa o compacta, por tanto el queso retiene menos agua, su rendimiento es menor y su textura resulta más firme (Rogers et al., 2010). La dureza, gomosidad y masticabilidad aumentan linealmente, mientras que la cohesividad y elasticidad decrecen de forma no lineal cuando se reduce el contenido de grasa en queso tipo cheddar (Beal y Mittal, 2000).

Según Johnson (2011) existen 3 estrategias principales que se pueden utilizar para compensar el aumento de caseína en los quesos bajos en grasa: 1) diluir la red de caseína, lo que se puede lograr mediante el incremento de la humedad, la adición de productos miméticos de grasa, almidones y proteínas desnaturalizadas del suero, entre otros; 2) debilitar las interacciones entre las moléculas de caseína, a través de la solubilización del fosfato cálcico coloidal (CCP), la disminución del pH por debajo de 5,1 o la adición de surfactantes; 3) romper la continuidad de la red de caseína mediante proteólisis en quesos maduros.

Para mejorar la textura de los quesos bajos en grasa se requiere aumentar la humedad de la cuajada. Los métodos para mejorar el contenido de humedad incluyen entre otros aumentar el tratamiento térmico de la leche, homogeneizar la leche, retrasar el momento de corte, cortar la cuajada en trozos más grandes, reducir el tiempo de agitación antes y después de drenar el suero, lavar la cuajada con agua fría tras el desuerado, disminuir las temperaturas y tiempos de cocción, reducir el salado y el prensado (Johnson et al., 2001; Johnson y Chen, 1995; Banks et al., 1989).

El corte de la cuajada en granos más grandes, el aumento del valor de pH antes del desuerado y la reducción de la temperatura de cocción producen una menor sinéresis, resultando en una mayor retención de humedad en la cuajada; por ejemplo para el queso Cheddar reducido en grasa se ha encontrado que la temperatura de cocción debe ser de 30 a 35°C (Banks et al., 1989) y el valor de pH para el corte debe ser de 5,6 a 5,9 (Mistry, 2001; Guinee et al., 1998). El lavado de la cuajada con agua fría reduce la velocidad de la sinéresis y la cuajada absorbe humedad, además retira la lactosa residual y el calcio soluble, produciendo una mayor solubilización del fosfato de calcio coloidal y un aumento de la hidratación de la caseína, lo que en conjunto favorece el desarrollo

de una textura más suave y previene la acidez excesiva durante la maduración (Banks, 2004; Mistry, 2001; Johnson et al., 1998).

La homogeneización de la grasa de la leche es un tratamiento previo opcional que posibilita la retención de humedad en la cuajada debido a que aumenta la superficie de contacto de los glóbulos de grasa, facilitando la absorción de caseína y proteínas del suero en su superficie, lo que mejora su distribución y hace que puedan interactuar con la matriz de *para*-caseína, reduciendo así la efectividad global del proceso de sinéresis (Kelly et al., 2008). Karaman y Akalin (2013) analizaron los efectos de la homogeneización de la crema en las características sensoriales, la textura y la microestructura del queso Blanco de Turquía bajo en grasa. En los quesos obtenidos con leche homogenizada hubo una mayor retención de grasa, la dureza fue significativamente menor y tuvieron mejor sabor, olor, textura y apariencia en comparación con el testigo con el mismo nivel de grasa sin homogeneizar. Las micrografías mostraron un mayor número de partículas de grasa dispersas en la matriz de caseína comparado con el testigo sin homogeneizar.

Otra alternativa utilizada para mejorar la textura de los quesos producidos a partir de leche desnatada es la preconcentración de la leche por ultrafiltración para obtener un alto contenido de sólidos totales. Teóricamente este proceso resulta en la mejora de la textura debido a la incorporación de proteínas del suero que aumentan la capacidad de retención de agua del queso (Barros et al., 2006).

Reducir la cantidad de calcio unido a la caseína en el queso es importante para mejorar las propiedades de los quesos bajos en grasa que con frecuencia son muy duros. Un queso con menores niveles de calcio es más suave, tiene menor módulo elástico y viscoso, funde más fácilmente y mejora la elasticidad (Joshi et al., 2004a,b). La forma más efectiva de reducir el contenido de calcio en el queso es por acidificación de la leche antes de la adición del coagulante. La utilización de un ácido quelante de calcio, como el ácido cítrico, resulta en un menor contenido de calcio comparado con la acidificación con ácidos no quelantes como el láctico o acético (Keceli et al., 2006; Zisu y Shah 2007), pero tiende a producir menor recuperación de caseína en el queso (Metzger et al., 2000).

### 2.2.2 Utilización de sustitutos de grasa

Un sustituto de grasa es un ingrediente que puede usarse para proporcionar alguna o todas las funciones de la grasa, pero proporcionando menos calorías que ésta (American Dietetic Association, 2005). En este trabajo el término sustituto de grasa será empleado de manera genérica, considerándolo como un ingrediente que tiene la capacidad de promover mejoras sensoriales y funcionales en quesos bajos en grasa. Hay varias categorías de sustitutos de grasa y esto genera confusión en el uso de la terminología, razón por la que, a continuación, se presenta una adaptación de los términos utilizados en inglés (American Dietetic Association, 2005; Pinheiro y Penna, 2004).

1. Reemplazante de grasa (*fat replacer*), es un ingrediente que puede usarse para proporcionar algunas o todas las funciones de la grasa, pero con un contenido calórico menor. Los reemplazantes de grasa deben ser capaces de replicar todas o algunas de las propiedades funcionales de la grasa en un alimento con modificación del contenido de grasa. El término sustituto de grasa se emplea de modo general para describir cualquier ingrediente usado para reemplazar la grasa.
2. Sustituto de grasa (*fat substitute*), compuesto sintético desarrollado para sustituir la grasa en una base peso por peso. Su estructura química está basada en la de la grasa, por lo que suelen ser estables a las temperaturas de cocción y fritura, proporcionando las funciones de la grasa pero con un contenido calórico menor de 9 kcal g<sup>-1</sup>.
3. Análogos de grasa (*fat analogs*), son compuestos con muchas de las características de la grasa, pero tienen una digestibilidad y valor nutricional alterados.
4. Extensores de grasa (*fat extenders*), optimizan la funcionalidad de la grasa, permitiendo así una disminución en la cantidad usual de grasa en el producto.
5. Miméticos o imitadores de grasa (*fat mimetics*), son ingredientes que imitan una o más de las funciones sensoriales o físicas de la grasa en un alimento. Están basados en carbohidratos, proteínas o componentes grasos, que se utilizan solos o en combinación. Generalmente para su uso requieren la presencia de un alto contenido de agua y proporcionan entre 0 y 9 kcal g<sup>-1</sup>.

Dependiendo de su estructura química, los sustitutos de grasa se pueden clasificar en tres categorías (American Dietetic Association, 2005): los basados en

lípidos, cuya estructura y propiedades físicas son similares a las de los triglicéridos; los basados en carbohidratos, tales como celulosa, dextrinas, gomas, almidones modificados, fibras e inulina, los cuales generalmente absorben agua y forman geles que proporcionan una textura y sensación en boca similar a la grasa; y, finalmente, los basados en proteínas, elaborados con proteínas de leche o suero, que son micropartículas que incorporan agua y proporcionan una sensación cremosa similar a la grasa. En la Tabla 2.1 se presentan los principales atributos de los sustitutos de grasa según su categoría.

**Tabla 2.1** Clasificación y atributos funcionales de los sustitutos de grasa\*.

Categoría	Tipo de producto	Atributos funcionales
Basados en carbohidratos	Celulosa, dextrinas y almidones modificados, fibras de frutas y granos, gomas hidrocoloides, inulina, maltodextrinas, pectina, polidextrosa.	Agente ligante, agente de relleno, gelificante, texturizador, espesante, proporcionan cuerpo, retienen humedad, proporcionan sensación en boca, reducen la sinéresis, estabilizan emulsiones y espumas, aumentan la viscosidad.
Basados en proteínas	Proteína microparticulada, concentrado modificado de proteínas del suero.	Formación de geles coloidales, sensación en boca, reducción de la velocidad de fusión, disminución de la sinéresis, capacidad de retención de agua.
Basados en grasas	Triglicéridos modificados bajos en calorías, poliésteres de sacarosa sin calorías.	Emulsionante, sensación en boca.

\*Reproducido de American Dietetic Association (2005).

Se han realizado muchos estudios acerca de la utilización de sustitutos de grasa para mejorar las características de los quesos con bajo contenido de grasa, con resultados muy variables, que dependen entre otros factores del tipo de sustituto añadido, de su concentración y del atributo o variable evaluados.

Rashidi et al. (2015) estudiaron la posibilidad de mejorar las características de textura tanto sensorial como instrumental de queso Feta elaborado con leche ultrafiltrada, mediante la adición de proteína de suero concentrada (WPC; 0 – 20 g kg<sup>-1</sup>), lecitina (0 – 2 g kg<sup>-1</sup>) y mezcla de goma xantana y goma guar (GG, 0 – 1 g kg<sup>-1</sup>). La lecitina y la GG ejercieron un efecto positivo en la dureza, masticabilidad y gomosidad

de los quesos, mientras que WPC tuvo efectos negativos sobre estos parámetros. La lecitina tuvo efectos negativos en el sabor, la aceptación y la apariencia, pero mejoró la textura.

Lashkari et al. (2014) evaluaron el efecto de la goma guar (GG; 0, 75, 150 y 300 ppm) y goma arábica (GA; 0, 150 y 300 ppm) en la elaboración de queso Blanco iraní bajo en grasa. Los quesos con GG tuvieron mayor lipólisis, lo que fue atribuido al mayor contenido de humedad que favorece las reacciones enzimáticas y el crecimiento microbiano, mientras que en los quesos con GA se observó el mismo efecto a concentraciones menores a 150 ppm, pero a concentraciones superiores el efecto fue inverso. Los valores del módulo elástico ( $G'$ ) disminuyeron con la adición de GG, debido a una mayor relación humedad/proteína, pero al nivel más alto de GG la matriz proteica fue excesivamente blanda.

Con el fin de optimizar la elaboración de quesos Cheddar con reducido o bajo contenido de grasa, Nateghi et al. (2014) estudiaron la utilización de goma xantana (GX; 0,030 y 0,045%, *p/p*) y caseinato de sodio (CS, 0 y 0,15%, *p/p*). Con la adición de GX se obtuvieron quesos con menor dureza, adhesividad y gomosidad, mientras que la adición de CS tuvo el efecto contrario.

Sayadi et al. (2013) investigaron el efecto de tratar la leche con transglutaminasa (TG) simultáneamente con la adición del coagulante, con o sin adición de aislado de proteína de suero (WPI) sobre las características químicas y la textura de queso Blanco iraní bajo en grasa. El tratamiento enzimático de la leche aumentó el contenido de humedad, el rendimiento quesero y la relación humedad/proteína, resultando en una disminución en la fuerza de fractura y el  $G'$  del producto. Cuando la TG se adicionó a la leche después de la fortificación con WPI, se obtuvieron una mayor recuperación de proteína y una mayor dureza en comparación con la sola adición de TG.

También ha sido investigada la posibilidad de añadir  $\beta$ -glucanos de cebada a la leche en relación con las propiedades de coagulación, la reología, la textura y la microestructura de las cuajadas frescas (Tudorica et al., 2004). La adición de  $\beta$ -glucanos redujo los tiempos de gelificación y de coagulación, el rendimiento de la cuajada aumentó y se obtuvieron valores más altos de  $G'$  y  $G''$  en comparación con las muestras control con el mismo nivel de grasa pero sin  $\beta$ -glucanos.

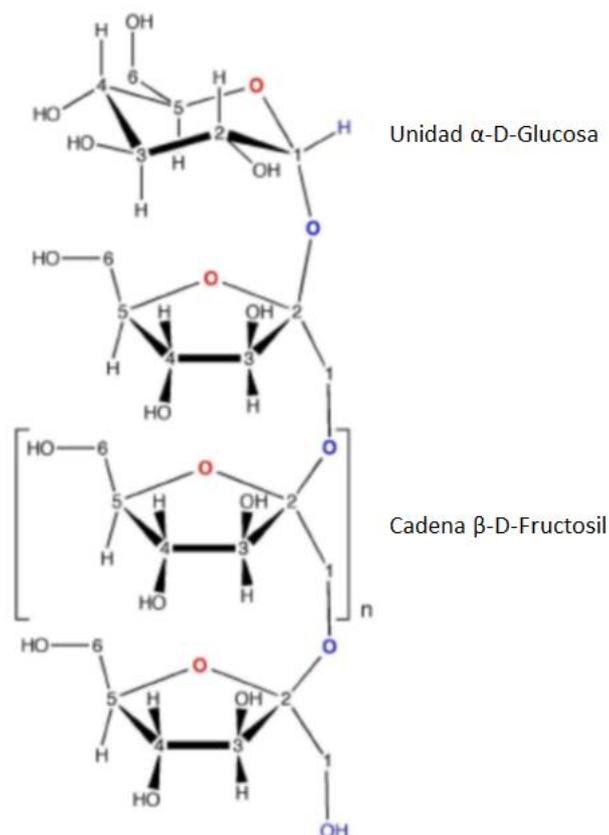
Otra alternativa que ha sido investigada para mejorar las características de los quesos bajos en grasa es la utilización de cultivos microbianos que generan grandes cantidades de exopolisacáridos, los cuales pueden reducir la sinéresis y aumentar la humedad final en el producto. Estos parecen funcionar bloqueando la interacción de algunas cadenas de proteína, disminuyendo así la contracción de las partículas de cuajada (Hassan y Awad, 2005; Perry et al., 1997), lo que resulta en una matriz proteica menos compacta y con grandes bolsas de suero dispersas (Dabour et al., 2006). Este método ha sido estudiado en la elaboración de quesos Mozzarella (Zisu y Shah 2007; Perry et al., 1998) y queso Cheddar (Dabour et al., 2006; Awad et al., 2005) bajos en grasa.

## **2.3 La inulina como sustituto de grasa en derivados lácteos**

### **2.3.1 Fuentes de inulina y su estructura química**

La inulina es un carbohidrato de almacenamiento presente en muchas verduras, frutas y cereales y por tanto forma parte de nuestra dieta diaria. Al menos 36.000 plantas de una amplia variedad de géneros contienen inulina como reserva de energía o como osmorregulador para resistencia al frío (Nair et al., 2010). A nivel industrial, la inulina se obtiene principalmente de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*) que contiene hasta 79% de inulina en base seca, 10% de mono y disacáridos, principalmente fructosa, y aproximadamente 30% de oligosacáridos (Niness, 1999; van Loo et al., 1995). La inulina está reconocida oficialmente como un ingrediente alimentario natural en toda la Unión Europea y se clasifica como producto GRAS (*Generally Recognized as Safe*) en Estados Unidos (Nair et al., 2010).

La inulina está constituida por moléculas de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) fructosil-fructosa (Fig. 2.1), compuestos denominados generalmente como “fructanos”. Las cadenas de fructosa tienen la particularidad de terminar en una unidad de glucosa unida por un enlace  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) (residuo -D-glucopiranosil), como en la sacarosa, pero también el monómero terminal puede corresponder a un residuo de  $\beta$ -D-fructopiranosil (Flamm et al., 2001; Roberfroid, 1999).



**Figura 2.1** Estructura química de la inulina. Reproducido de Barclay et al. (2010).

Los fructanos más ampliamente estudiados y de mayor uso a nivel industrial son la inulina, la oligofructosa y los fructooligosacáridos o FOS (Biedrzycka y Bielecka, 2004). Los FOS y la oligofructosa son muy similares, pero con diferencias estructurales asociadas a sus diferentes orígenes (hidrólisis enzimática de inulina para la oligofructosa y transfructosilación de sacarosa para los FOS). Se caracterizan por sus enlaces de tipo  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) entre las unidades de fructosa y se les considera carbohidratos de cadena corta o de bajo nivel de polimerización (Roberfroid, 2000; Englyst y Hudson, 1996). Dependiendo de su origen (vegetal o microbiano), los fructanos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y suelen definirse en términos de grado de polimerización promedio ( $GP_{prom}$ ) y grado de polimerización máximo ( $GP_{m\acute{a}x}$ ). En los de origen vegetal,  $GP_{m\acute{a}x}$  no excede de 200, pero puede ser tan alto como 100.000 en los de origen bacteriano. Tanto la inulina, como la oligofructosa y los fructooligosacáridos o FOS presentan una estructura polimérica predominantemente lineal; las diferencias radican en el grado de polimerización, siendo la inulina el compuesto con el mayor rango y promedio (Roberfroid, 2005).

La inulina nativa siempre se extrae de plantas frescas, teniendo precaución de inhibir las inulinasas propias de la planta o de prevenir la hidrólisis ácida, pero no se aplican procedimientos de fraccionamiento para eliminar los monómeros y pequeños oligosacáridos que están presentes de forma natural, como si ocurre con los productos comerciales disponibles en el mercado (Franck y De Leenheer, 2005).

### 2.3.2 Características fisicoquímicas de la inulina

Los fructanos por su configuración química, especialmente por la presencia de enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso, colon). De esta manera, este tipo de compuestos se comportan como fibra dietética (Slavin, 2003; Flamm et al., 2001). Los fructanos aportan un valor calórico reducido (1,5 kcal g<sup>-1</sup>) si se comparan con los carbohidratos digeribles (4 kcal g<sup>-1</sup>) (Roberfroid, 1999b).

Las propiedades físico-químicas de la inulina dependen de su grado de polimerización así como de la presencia de ramificaciones en su estructura. La fracción corta (oligofructosa) es mucho más soluble y dulce que la inulina nativa y la inulina de cadena larga, y puede contribuir a mejorar la sensación en boca debido a que sus propiedades son similares a las de los otros azúcares pero con menor contenido calórico (1 – 2 kcal g<sup>-1</sup>) y menor poder endulzante (30 – 35%) (Guggisber et al., 2009; Tarrega et al., 2010). La inulina de cadena larga es menos soluble y más termoestable que la inulina nativa, aumenta la viscosidad en aquellos productos de base acuosa donde se incorpora, pudiendo actuar como modificador de la textura, con capacidad de formar geles, la firmeza de los cuales depende también de su grado de polimerización (Meyer et al., 2011). En estos casos, la inulina actúa como relleno o elemento que causa disrupción en la estructura, en forma similar a los glóbulos de grasa (Guggisber et al., 2009). Sin embargo, cuando la inulina se adiciona a los alimentos en baja concentración, las propiedades reológicas y la calidad sensorial del producto se ven poco afectadas debido a su reducido efecto sobre la viscosidad y a su sabor neutro (Nair et al., 2010; Franck, 2002).

A pHs menores de 4, los enlaces tipo  $\beta$  de las unidades de fructosa, tanto en la inulina como en la oligofructosa, se hidrolizan con la consecuente formación de fructosa. Por esta razón, estos compuestos no pueden ser usados en alimentos muy ácidos (Franck, 2002).

En la Tabla 2.2 se presenta un resumen de las características de la oligofructosa, la inulina y la inulina purificada o llamada de “alto rendimiento” o HP (*high performance*) (Franck, 2002).

**Tabla 2.2** Características fisicoquímicas de la oligofructosa, la inulina y la inulina HP.

Característica	Oligofructosa	Inulina	Inulina HP
Estructura química*	GFn + Fn ( $2 \leq n \leq 7$ )	GFn ( $2 \leq n \leq 60$ )	GFn ( $10 \leq n \leq 60$ )
GP <sub>prom</sub>	4	12	25
Materia seca (g 100 g <sup>-1</sup> )	95	95	95
Pureza (g 100 g <sup>-1</sup> )	95	92	99,5
Azúcares (g 100 g <sup>-1</sup> )	5	8	0,5
pH	5 – 7	5 – 7	5 – 7
Cenizas (g 100 g <sup>-1</sup> )	<0,2	<0,2	<0,2
Apariencia	Polvo blanco o jarabe viscoso	Polvo blanco	Polvo blanco
Sabor	Moderadamente dulce	Neutral	Neutral
Dulzor % (vs. Sacarosa = 100%)	30 – 35	10	Ninguno
Solubilidad en agua a 25 °C (g L <sup>-1</sup> )	> 750	120	25
Viscosidad en agua (5% p/p sol. acuosa) a 10 °C (mPa.s)	< 1,0	1,6	2,4
Funcionalidad en alimentos	Sustituto de azúcar	Sustituto de grasas	Sustituto de grasas
Sinergismo	Con edulcorantes intensos	Con agentes gelificantes	Con agentes gelificantes

\*G: unidades de glucosa, F: unidades de fructosa

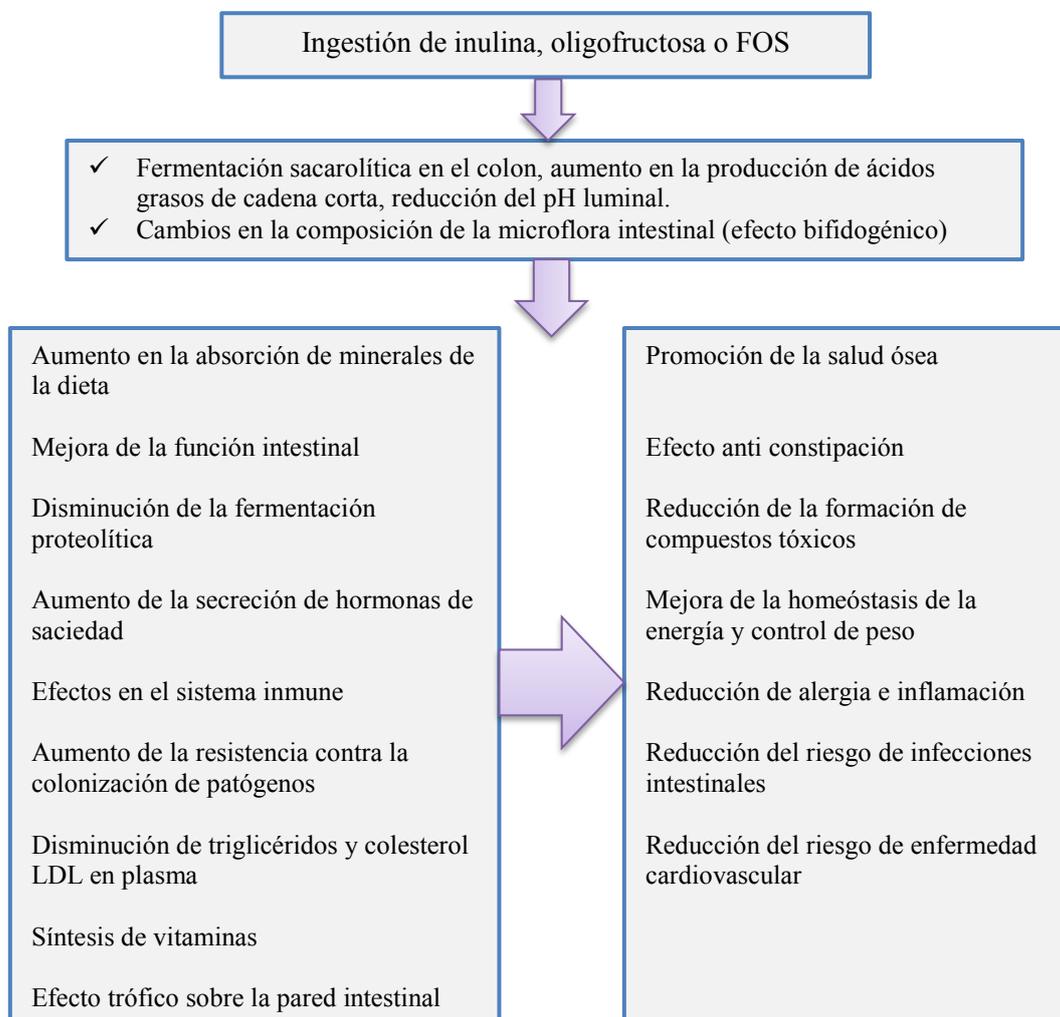
### 2.3.3 Beneficios para la salud de la inulina

Junto con los trans-galacto-oligosacáridos (que se obtienen de la transgalactosilación de la lactosa del suero de queso, con  $\beta$ -galactosidasa), la inulina y la oligofructosa son fermentados selectivamente y producen cambios específicos tanto en la composición como en la actividad de la microbiota gastrointestinal, que confieren beneficios en la salud y el bienestar del huésped (Roberfroid, 2007). Está bien establecido que la inulina y la oligofructosa estimulan el crecimiento de las bifidobacterias (Roberfroid et al., 2010; Meyer y Stasse-Wolthuis, 2009; Roberfroid, 2007), las cuales son los principales microorganismos en la flora del colón de niños y adultos saludables, jugando un importante papel en la salud. La microbiota intestinal juega un papel muy importante en la salud humana. Investigaciones en la última década han mostrado que los cambios en la composición de la microbiota están asociados con enfermedades específicas incluyendo alergias, enfermedad celiaca, obesidad, anorexia, enfermedad inflamatoria del intestino y diabetes tipo II (Clemente et al., 2012).

Estudios *in vivo* muestran que solo 4 g diarios de inulina o de sus compuestos relacionados son efectivos para incrementar el número de bacterias beneficiosas en el colon (Gibson et al., 2004; Rao, 1999; Schneeman, 1999). Este incremento en las bifidobacterias está ligado a una variedad de efectos fisiológicamente beneficiosos que incluyen la mejora de los hábitos intestinales (Marteau et al., 2011), un incremento en la absorción de calcio y otros minerales (Meyer y Stasse-Wolthuis, 2006; Roberfroid et al., 2002), una disminución de los niveles lipídicos en sangre con relevancia para la salud del corazón (Brighenti, 2007), un efecto positivo en la sensación de saciedad, con consecuencias positivas en el manejo del peso corporal (Parnell y Reimer, 2009; Cani et al., 2006), además de un efecto potencial para mejorar la resistencia a infecciones (Cummings et al., 2001) y estimular el sistema inmune (Lomax y Calder, 2009). Estudios realizados en ratas cuya dieta fue suplementada con inulina evidenciaron una disminución del desarrollo de cáncer de colon (Pietro et al., 2002) y la inhibición del cáncer mamario (Taper y Roberfroid, 1999).

Para solicitar alegaciones de producto con fibra, la inulina debe agregarse en cantidades de 3 a 6% (Regulación N° 1924 del Parlamento Europeo, 2006) y se requieren cantidades de 3 a 8 g por porción para asegurar un efecto bifidogénico (Meyer y Stasse-Wolthuis, 2009; Coussement, 1999).

En la Figura 2.2 se resumen los efectos intestinales y sistémicos de la ingestión de inulina, oligofruktosa y FOS, según los resultados de estudios realizados en animales y/o en humanos.



**Figura 2.2** Efectos intestinales y sistémicos de la ingestión de inulina, oligofruktosa y FOS. Reproducido de Schaafsma y Slavín (2015).

### 2.3.4 Mecanismos y factores relacionados con la formación de geles de inulina

Respecto a la gelificación, Kim et al. (2001) encontraron que la inulina puede gelificar por agitación o calentamiento – enfriamiento de una suspensión. La disolución de la inulina no es necesaria para obtener un gel, ya que inulina al 15% en suspensión es capaz de formar un gel constituido por una red tridimensional de partículas que se extiende a todo el volumen del recipiente (Roberfroid, 2005). Las suspensiones de inulina tienen un color similar al de la leche, pero un incremento en la temperatura

convierte la suspensión en una solución de color amarillo claro. Dependiendo del tiempo y de la temperatura de calentamiento, la solución de inulina puede formar un gel fuerte o débil o puede no gelificar (Glibowski y Wasko, 2008; Kim et al., 2001). La estabilidad química de la inulina disminuye en medio ácido a  $\text{pH} < 4,0$  dependiendo del tiempo y la temperatura de calentamiento a que haya sido sometida la disolución, pero a  $\text{pH} > 5,0$  la inulina es estable (no se hidroliza) independientemente de la intensidad de tratamiento térmico a que sea sometida (Glibowski y Bukowska, 2011).

El mecanismo de gelificación es inducido por la presencia de cristales semilla, por lo que el calentamiento de la solución a alta temperatura puede causar una completa disolución de estos cristales y como consecuencia impedir el proceso de gelificación (Glibowski y Wasko, 2008; Bot et al., 2004). El proceso de producción de inulina en polvo involucra la extracción de la inulina de las raíces de achicoria por difusión en agua caliente y después de varias etapas de purificación se somete a un secado por atomización (Roberfroid, 2005; Franck, 2002). Cuando la temperatura de entrada del aire durante el secado por atomización alcanza  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la inulina es completamente amorfa y si esta se almacena en condiciones de elevada humedad relativa se forman cristales y se produce un fenómeno de apelmazamiento, similar a la formación de grumos que sucede si se adiciona inulina amorfa en polvo al agua de forma rápida (Glibowski, 2010, 2009). Esos grumos son difíciles de disolver o dispersar. Cuando la temperatura de entrada del aire en el secado por atomización de la suspensión de inulina es baja, se obtiene inulina en forma cristalina (Ronkart et al., 2009).

De acuerdo con los resultados del estudio de Glibowski y Pikus (2011), el proceso de gelificación y las propiedades reológicas de los geles de inulina dependen de la temperatura de preparación, de la presencia de cristales semilla y del grado de ordenamiento de la estructura de la inulina en polvo. Las partículas amorfas de inulina forman una estructura cristalina estable en agua a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mientras que la inulina cristalina forma geles mucho más débiles a esa temperatura, probablemente porque los cristales ya existen y la estructura del gel formado está basada en muchos menos puntos de conexión entre los cristales presentes que en la estructura primaria formada por la inulina amorfa, la cual al contacto con el agua se dispersa en partículas más pequeñas y de forma regular que tratan de atrapar agua dentro de su estructura. En el caso de la inulina amorfa, un aumento de la temperatura de la dispersión hasta  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  hace que se

disuelva casi por completo, tornándose la solución translúcida, sin embargo algunas partículas no se disuelven completamente y actúan como cristales semilla en la gelificación. El calentamiento a 100 °C por 5 min ocasiona la completa disolución de la inulina incluyendo los cristales semilla y tras el enfriamiento no hay formación de un gel, independientemente del grado de ordenación de la estructura de la inulina en polvo, pero la adición de una pequeña cantidad de inulina justo después del calentamiento hace que las partículas disueltas encuentren puntos de unión y puedan estructurar un gel.

### **2.3.5 Aplicaciones de la inulina en derivados lácteos**

Debido a que la adición de inulina no contribuye a un aumento significativo de la viscosidad, esta puede considerarse como una forma “invisible” de incorporar fibra a los alimentos (Nair, et al., 2010). La alta solubilidad de este ingrediente funcional comparado con otras fibras dietéticas hace de la inulina una buena opción para fortificar productos lácteos como bebidas, yogures, quesos y postres, que tradicionalmente han sido difíciles de fortificar (Franck, 2002; Niness, 1999). Cuando la inulina se mezcla en concentración suficiente con agua u otro líquido acuoso forma un gel blanco con estructura cremosa y de naturaleza extensible que puede ser fácilmente incorporado en alimentos para reemplazar la grasa hasta en un 100%. El gel de inulina tiene una buena estabilidad física que es atribuida a su capacidad de inmovilizar gran cantidad de agua y proporciona propiedades reológicas y de textura a los alimentos bajos en grasa (Franck, 2002).

Sołowiej et al. (2015) estudiaron el efecto de la inulina como sustituto de grasa en sucedáneos de queso procesado obtenido por acidificación de la caseína. En general la sustitución parcial de la grasa de la leche con inulina aumentó la fusibilidad, la densidad y la cohesividad, pero disminuyó la dureza de las muestras y la adhesividad. La adición de inulina no influyó en la actividad de agua ( $a_w$ ) de los quesos, pero alteró su color. Salvatore et al. (2014) evaluaron la sustitución de grasa con inulina de cadena larga en concentraciones de 2 a 7% en la elaboración de queso fresco con leche de cabra. Las muestras con inulina se caracterizaron por tener valores menores de fuerza de compresión, rigidez, viscosidad y adhesividad. Las imágenes obtenidas con microscopía de barrido electrónico mostraron que la posición de la inulina dentro del gel interrumpió

la red de caseína/grasa. Alnemr et al. (2013) estudiaron el efecto de la adición de inulina HP a concentraciones de 2 y 4% en las características físicoquímicas, rendimiento, textura, microestructura y propiedades sensoriales de queso Karish egipcio (queso de coagulación ácida). Los resultados mostraron que la adición de inulina aumentó el rendimiento y el contenido de humedad, reduciendo significativamente la dureza de los quesos en comparación con el control elaborado con leche con 0,5% de grasa y sin inulina. Los quesos con 4% de inulina tuvieron mejor evaluación sensorial que el queso control.

Juan et al. (2013) compararon las propiedades sensoriales de un queso fresco reducido en grasa con 3% de inulina (GP = 23), respecto a quesos control con grasa (3,5%) y reducido en grasa (1,5%) sin adición del prebiótico. Los quesos elaborados con inulina fueron menos duros, elásticos, cohesivos y correosos que los quesos reducidos en grasa y más similares a los obtenidos con leche entera. El panel sensorial describió los quesos reducidos en grasa con inulina como más aceptables que aquellos sin inulina.

La inulina también ha sido utilizada para incrementar las cualidades funcionales del yogur y otras leches fermentadas, así como también para mejorar los atributos de las versiones sin grasa o bajas en grasa. Por ello en los últimos años han sido varios los estudios realizados con relación a estos aspectos. Guggisberg et al. (2009) evaluaron distintos niveles de inulina (1, 2 y 4%) y de grasa (0,1; 1; 2 y 3,5%) en yogur, encontrando que los yogures con más inulina tuvieron valores mayores en el límite elástico, firmeza y cremosidad. Además la adición de hasta 2% de inulina redujo la sinéresis. Pasephol et al. (2008) añadieron 4% de inulina con diferente GP a leche desnatada para elaboración de yogur. En comparación con el control sin grasa, todos los yogures con inulina se caracterizaron por tener menores valores de firmeza, límite elástico, viscosidad aparente y módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ). Las muestras suplementadas con inulina de cadena larga tuvieron curvas de viscosidad y un comportamiento reológico cercano al de las muestras control con grasa. En contraste, Kip et al. (2006) encontraron que la adición de inulina con diferente longitud de cadena en diferentes concentraciones (1,5; 3 y 4%) a yogures bajos en grasa aumentó la viscosidad aparente en comparación con la muestra control sin grasa, siendo mayor el incremento cuando se añadió inulina de cadena larga. El efecto más importante de la

adición de inulina se observó en los atributos de textura que contribuyen a la sensación de cremosidad en boca.

En ocasiones los resultados acerca de los efectos de la adición de inulina sobre la textura, las características reológicas y los atributos sensoriales en productos como queso y yogur bajos en grasa han resultado contradictorios, lo que posiblemente se debe a la disparidad en los métodos empleados y a la gran cantidad de factores que pueden influir en los resultados, como por ejemplo el tipo de inulina utilizado (amorfa o cristalina, de cadena corta o larga), la concentración añadida, la preparación de la dispersión/solución, la variación en la composición de las muestras (concentración de proteína, sólidos totales, grasa, contenido de humedad) y la temperatura entre otros factores.

Como se comentó previamente, la propiedad de la inulina de cadena larga para actuar como sustituto de grasa se debe a su capacidad de formar microcristales, los cuales interactúan dando origen a pequeños agregados que finalmente pueden aglomerarse para generar un gel que incluye una cantidad significativa de fase acuosa (Hébert et al., 1998). El grado de polimerización de la oligofructosa o inulina de cadena corta es insuficiente para favorecer la aparición de microcristales, solo la inulina nativa y la inulina de cadena larga en soluciones acuosas concentradas pueden desarrollar una estructura tipo gel formada por una red de partículas cristalinas (Chiavaro et al., 2007; Hébert et al., 1998).

En la Tabla 2.3 se presenta un resumen de algunos estudios en los cuales se ha usado inulina, oligofructosa y oligosacáridos como sustitutos de grasa en queso, yogur y leches fermentadas.

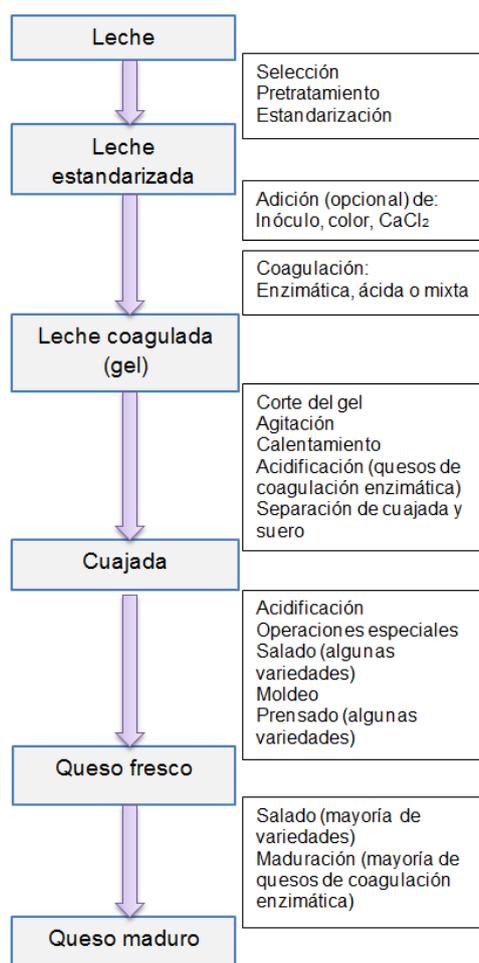
**Tabla 2.3** Algunos estudios en los que se ha usado inulina como sustituto de grasa en queso, yogur y leches fermentadas.

Producto	% grasa en la leche	Tipo de inulina y concentración*	Aspectos estudiados	Referencia
Queso fresco de cabra	2, 4, 7 y 9%	GP <sub>prom</sub> = 23 (2, 5 y 7%)	Textura, microestructura	Salvatore et al. (2014)
Queso Karish egipcio	0,5%	GP <sub>prom</sub> = 23 (2 y 4%)	Propiedades fisicoquímicas, rendimiento, textura, microestructura, recuentos microbiológicos, características sensoriales	Alnemr et al. (2013)
Queso <i>Petit-suisse</i>	12,6% nata con 25% de grasa	Mezcla de inulina (GP <sub>prom</sub> = 10), oligofruktosa y oligosacáridos hasta un 10%	Propiedades fisicoquímicas, recuentos microbiológicos, características sensoriales	Cardarelli et al. (2008)
Queso Cottage	1% en el producto final	GP <sub>prom</sub> = 23 (5% en el producto final)	Propiedades fisicoquímicas, recuentos microbiológicos, características sensoriales	Araujo et al. (2010)
Queso Kashar	0,6 y 2,5%	GP <sub>prom</sub> = 23 (5%)	Propiedades fisicoquímicas, textura, fusibilidad, características sensoriales	Koca y Metin (2004)
Leche fermentada	Desnatada	GP <sub>prom</sub> = 23 (5%)	Propiedades fisicoquímicas, reología, recuentos microbiológicos	Debon et al. (2010)
Yogur firme	0,2, 1, 2 y 3,5%	GP <sub>prom</sub> = 23 (1, 2 y 4%)	Propiedades fisicoquímicas, textura, viscoelasticidad, microestructura, características sensoriales	Guggisberg et al. (2009)
Leche fermentada	3 y 6%	ND (1, 2 y 4%)	Propiedades fisicoquímicas, cinética de acidificación, firmeza, recuentos microbiológicos	Pinheiro et al. (2009)
Yogur firme	0,5 y 3,2%	GP <sub>prom</sub> = 23 (0,7 y 2,7%)	Viscosidad aparente, recuentos microbiológicos, características sensoriales	Modzelewska-Kapitula y Klebukowska (2009)
Yogur firme	0,1 y 3,5%	GP <sub>prom</sub> = 23 (4%), GP <sub>prom</sub> = 10 (4%), GP <sub>prom</sub> = 4 (4%)	Propiedades fisicoquímicas, textura, reología	Pasephol et al. (2008)
Leche fermentada	2,2%	GP <sub>prom</sub> = 4 (2 y 5%)	Propiedades fisicoquímicas, propiedades de flujo, características sensoriales	De Castro et al. (2008)
Yogur batido	0,1 y 3,2%	GP <sub>prom</sub> = 23 (2, 4 y 6%)	Reología, textura, sinéresis, características sensoriales	Brennan y Tudorica (2008)
Yogur batido	0,1%	GP <sub>prom</sub> = 23 (1,5, 3 y 4%), GP <sub>prom</sub> = 9 (3%)	Reología, textura, características sensoriales	Kip et al. (2006)

\* GP<sub>prom</sub> = grado de polimerización promedio, ND = no disponible.

## 2.4 El proceso de elaboración del queso

El proceso general de coagular leche líquida para convertirla en productos como queso y yogur se basa en la formación de una red de agregados de proteína (principalmente caseína) en la cual el agua, la grasa y otros componentes de la leche quedan atrapados. Los procesos bioquímicos son diferentes entre el queso y los productos lácteos fermentados ya que la elaboración del queso involucra la separación de la caseína del suero, mientras que en las leches fermentadas toda la leche es incluida en el producto final (Hallén, 2008). La elaboración de queso es un proceso complicado que implica varias etapas y muchas transformaciones bioquímicas. Todas esas variables afectan al rendimiento, la composición y la calidad del producto, por lo que la optimización de la elaboración del queso es intrincada (Walstra et al., 1999). La fabricación de la mayoría de las variedades de queso involucra un protocolo general similar al que se muestra en la Figura 2.3 (Fox, 2011).



**Figura 2.3** Protocolo general para la fabricación de queso. Reproducido de Fox (2011).

### 2.4.1 Selección de la leche

Las propiedades y el rendimiento de los productos lácteos están influidos en gran magnitud por la cantidad y las proporciones relativas de cada uno de los componentes de la leche. La mayor causa de variación en las características del queso es la especie animal de la cual se obtiene la leche, siendo las especies productoras de leche más importantes la vaca, el búfalo de agua, la oveja y la cabra, las cuales producen el 85, 11, 2 y 2%, respectivamente de la leche comercial (Fox, 2011). También hay diferencias significativas en la composición de la leche entre razas de la misma especie. Estudios han demostrado que la selección de variantes genéticas de proteínas de la leche podría ser una opción para cambiar la composición de las proteínas y obtener propiedades mejoradas de procesamiento que resulten en un mayor rendimiento y calidad del producto (Hallén et al., 2010a). La leche debe tener buena calidad microbiológica y estar libre de residuos de antibióticos.

### 2.4.2 Tratamiento previo de la leche

La leche puede ser sometida a varios procesos desde que es ordeñada hasta que es añadida a la cuba de quesería, aunque tales prácticas pueden variar ampliamente entre países y entre industrias queseras. El acondicionamiento previo de la leche puede incluir: filtración, refrigeración de la leche cruda, bactofugación, estandarización, homogeneización, tratamiento térmico y acidificación (Johnson, 2011).

**La filtración** tiene por finalidad retirar material extraño como paja, heno, pelos, grumos de células somáticas o insectos que inadvertidamente se hayan incorporado a la leche durante el ordeño, el almacenamiento en granja o el transporte.

**El almacenamiento refrigerado.** La leche para quesería normalmente se refrigera a 4 °C inmediatamente después del ordeño y puede llegar a mantenerse alrededor de esa temperatura por varios días desde la granja hasta la fábrica. El almacenamiento refrigerado es selectivo para el desarrollo de microflora psicrotrofica, que junto con algunos miembros de la familia de las enterobacterias tienen significativa actividad proteolítica y lipolítica en leche refrigerada, causando deterioro de la caseína y olores extraños (Nornberg et al., 2010; Canigova y Benczova, 2001; Vyletelova et al.,

2000). Además, el almacenamiento refrigerado puede causar cambios fisicoquímicos en la leche, como alteración en el equilibrio del fosfato de calcio y disociación de algunas caseínas micelares, que tienen efectos indeseables en las propiedades tecnológicas, aunque esos cambios son revertidos durante el tratamiento térmico, por lo que, generalmente no tienen significación práctica (Fox y McSweeney, 2004).

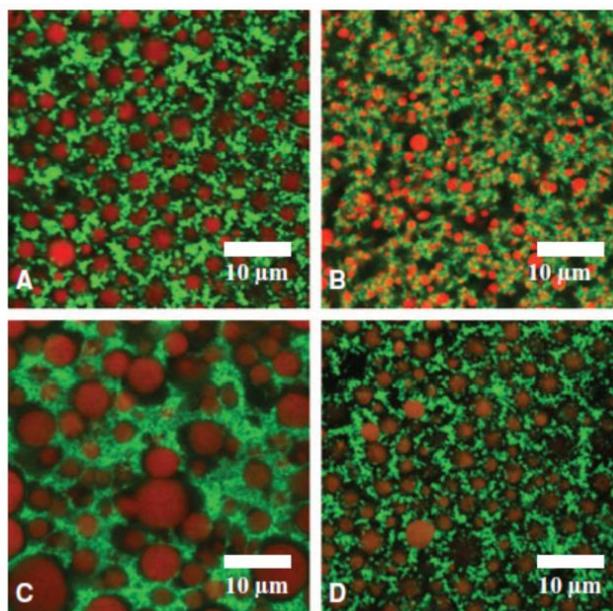
**La bactofugación** es un proceso de centrifugación especial que elimina esporas de la leche. Las esporas germinadas, especialmente del género *Clostridium* pueden causar sabores indeseables y el gas que producen, causa fisuras o hinchamiento en el queso. La bactofugación es usada principalmente en plantas que procesan quesos como Suizo y Gouda que tienen relativamente alto pH y poca sal, lo que los hace más vulnerables al crecimiento de *Clostridium* (Johnson, 2011).

**La estandarización** es el proceso de ajuste del contenido de sólidos de la leche a fin de establecer una relación específica proteína – grasa, lo cual incluye la eliminación de grasa por centrifugación y/o la adición de leche desnatada, nata, leche en polvo, leche evaporada, leche ultrafiltrada o caseína en polvo (Fox, 2011). La estandarización es un proceso importante debido a que la variación natural en la composición de la leche, especialmente en el contenido de grasa y caseína influye en muchos aspectos de la calidad del queso incluyendo: composición, microestructura, rendimiento, textura, propiedades reológicas, bioquímica de la maduración y propiedades funcionales (Guinee y McSweeney, 2006).

De acuerdo con Johnson (2011), las siguientes son las principales razones que justifican la estandarización de la leche para la fabricación de queso: 1) la variabilidad en la composición de la leche, especialmente del contenido de caseína resulta en diferencias en la velocidad de coagulación, la firmeza del coagulo, el tiempo de corte y la velocidad de disminución del pH debido a la capacidad tampón de la caseína, lo que de no ser ajustado ocasiona la obtención de quesos que no cumplen los estándares de calidad relacionados con la funcionalidad, el contenido de humedad y la textura; 2) la estandarización de la composición de la leche reduce la variabilidad en la composición del queso, esto es, el contenido de grasa en base seca, el contenido de humedad y el pH, disminuyendo la variación en la calidad del queso; 3) la fortificación o estandarización mediante adición de sólidos de leche mejora la productividad, ya que se obtiene más queso por cuba y por hora hombre, además hay menor procesamiento de suero.

**La homogeneización** de la leche previa a la elaboración de queso puede tener efectos negativos o positivos. La homogeneización puede resultar en un aumento en la recuperación de grasa, mayor humedad y quesos con textura más suave o cremosa, razón por la cual esta técnica ha sido utilizada en la elaboración de quesos bajos en grasa, aunque por otro lado el uso de leche homogenizada puede resultar en quesos excesivamente pegajosos o que tienen una sensación en boca similar a la de los quesos procesados (Johnson, 2011). La homogeneización de la leche para la elaboración de queso fresco ayuda a prevenir la separación de grasa durante el almacenamiento, mejora la consistencia, aumenta la blancura y reduce el desuerado del queso en el envase (Lucey, 2004). Sin embargo en el caso de quesos maduros, la leche normalmente no se homogeniza debido a que el gel tiene una menor tendencia al desuerado, resultando un queso con mayor contenido de humedad, menor elasticidad y firmeza, con alteraciones del aroma (rancidez hidrolítica) y de su funcionalidad (Fox et al., 2000).

Ong et al. (2010) utilizaron microscopía de barrido laser confocal (CLSM) para observar la microestructura de geles enzimáticos elaborados con leche cruda (3,53% P, 4,45% G), leche pasteurizada homogeneizada (3,20% P, 3,20% G), leche cruda ultrafiltrada (6,83% P, 8,46% G) y leche estandarizada (3,86% P, 4,72% G) para la elaboración de queso, obtenida mezclando leche entera cruda con retenido de leche cruda ultrafiltrada. Las micrografías CLSM para los geles con leche sin homogeneizar (Fig. 2.4A, 2,4C y 2,4D) revelaron que la mayoría de los glóbulos de grasa estuvieron localizados en los poros de suero de la matriz proteica, lo que soporta la idea de que la grasa sin homogeneizar actúa como material de relleno inerte (Hassan y Awad, 2005), aunque otros estudios sugieren que los glóbulos de grasa nativos están retenidos dentro de la matriz de caseína por algunas interacciones con la membrana del glóbulo graso (Everett y Auty, 2008). La homogeneización resultó en gotas de grasa más pequeñas y cubiertas con proteínas que aparecieron embebidas en la matriz proteica del gel (Figura 2.4B).



**Figura 2.4** Micrografías CLSM (63x) de geles enzimáticos elaborados con A) leche cruda, B) leche pasteurizada homogeneizada, C) leche cruda ultrafiltrada y D) leche estandarizada pasteurizada. La grasa se observa en rojo y la proteína en verde. Reproducido de Ong et al. (2010).

**Tratamiento térmico.** Aunque el queso elaborado a partir de leche cruda desarrolla un sabor más intenso que el producido con leche pasteurizada (debido a la acción de la microflora y las enzimas propias de la leche), el primero es menos consistente en sus características y presenta riesgos para la salud pública, razones por las cuales en las grandes factorías se suele utilizar leche pasteurizada. Sin embargo una gran cantidad de queso se sigue elaborando con leche cruda, incluyendo variedades famosas como Emmental, Gruyère de Comte, Parmigiano Reggiano y Grana Padano (Fox, 2011). Un tratamiento térmico en condiciones más intensas que la pasteurización convencional (72 °C, 15 s o tratamientos equivalentes) resulta en la desnaturalización de las proteínas del suero y la unión de éstas a las micelas de caseína a través de interacciones con la  $\kappa$ -caseína, lo que puede ocasionar un aumento en el rendimiento quesero por la retención de proteínas del suero y una menor tendencia a la sinéresis en la cuajada (Kelly et al., 2008; Creamer y Matheson, 1980). Sin embargo un tratamiento térmico fuerte también puede ocasionar efectos negativos como menor capacidad de contracción del gel y por tanto cuajas más húmedas y débiles, prolongación en el tiempo de coagulación o incluso incapacidad de coagular. Estos efectos adversos se atribuyen a la inhibición de la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína debido a su unión con la  $\beta$ -lactoglobulina que impide el acceso del enzima coagulante a la  $\kappa$ -caseína (Kelly et al., 2008) y también

a la precipitación parcial del fosfato de calcio (van Hooydonk et al., 1987). Los efectos adversos sobre la coagulación ocasionados por tratamientos térmicos más intensos que la pasteurización pueden reducirse o evitarse mediante la acidificación de la leche o la adición de cloruro cálcico (Fox, 2004).

**La acidificación** es una operación que se realiza a través de las etapas de procesado en la mayoría de las variedades de queso. Normalmente se lleva a cabo mediante la producción *in situ* de ácido láctico generado por un cultivo (inóculo) de bacterias ácido lácticas seleccionadas, aunque también se puede añadir ácido preformado o gluco- $\delta$ -lactona para acidificar la cuajada, lo que es práctica usual en variedades como queso Mozzarella, UF Feta o Cottage (Fox, 2004). La acidificación directa es más controlable que la biológica y no se tiene el problema de la posible infección del inóculo con bacteriófagos, sin embargo las enzimas procedentes de las bacterias del inóculo son esenciales en la maduración del queso y es por esto que la acidificación química se usa principalmente en variedades de queso en las cuales la textura es más importante que el sabor (Fox, 2011).

La acidificación afecta a numerosos aspectos en la elaboración del queso y finalmente a su composición y calidad. A menor pH la actividad proteolítica de las enzimas coagulantes es más alta y aumenta su retención en la cuajada tras el desuerado, por lo que la proteólisis durante la maduración se intensifica. La velocidad de contracción de la cuajada y de expulsión del suero también se incrementa con la reducción del pH, afectando al contenido de humedad, la textura y al desarrollo de reacciones bioquímicas durante la maduración. La velocidad de descenso del pH determina el grado de disolución del fosfato de calcio coloidal, lo que a su vez modifica las propiedades reológicas de la cuajada y la susceptibilidad de las caseínas a la proteólisis (Powell et al., 2011).

### **2.4.3 La coagulación**

Desde el punto de vista industrial y tecnológico las caseínas son, sin duda, el más importante y valioso componente de la leche. Los principales productos lácteos como la leche líquida, el queso y el yogur deben su textura y propiedades sensoriales y nutricionales principalmente a la caseína (de Kruif et al., 2012). Por este motivo, para

comprender mejor los fenómenos relacionados con la coagulación de la leche y los factores que la afectan se requiere conocer primero las principales características estructurales de la caseína.

#### 2.4.3.1 Estructura de la micela de caseína

La caseína es el principal componente proteico de la leche bovina y comprende ~80% de la proteína total (Lucey, 2011a). Existen 4 tipos individuales de moléculas de caseína, las  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas en cantidades relativas aproximadas de 4,0 - 1,0 - 3,5 y 1,5 respectivamente, las cuales difieren en su estructura primaria y en el tipo y grado de modificación post-traslacional (Swaisgood, 2003). En la leche, las caseínas junto con el fosfato de calcio forman agregados de varios miles de moléculas de proteína individuales con diámetro promedio de 150 a 200 nm conocidas como micelas de caseína (de Kruif, 1998). Las micelas están muy hidratadas, con ~3,5 kg de agua por kg de proteína (Jeurnink y de Kruif, 1993). Así, aunque las caseínas representan ~2,5% del peso total de la leche, las micelas ocupan ~10% del volumen (Dalglish y Corredig, 2012). Las micelas pueden ser moderadamente calentadas o enfriadas sin que presenten agregación significativa o disrupción de sus estructuras básicas, por otro lado, pueden ser fácilmente desestabilizadas bien sea por tratamiento con enzimas proteolíticas o por acidificación, para producir el coágulo que es la base de los productos como el queso y el yogur (Dalglish y Corredig, 2012).

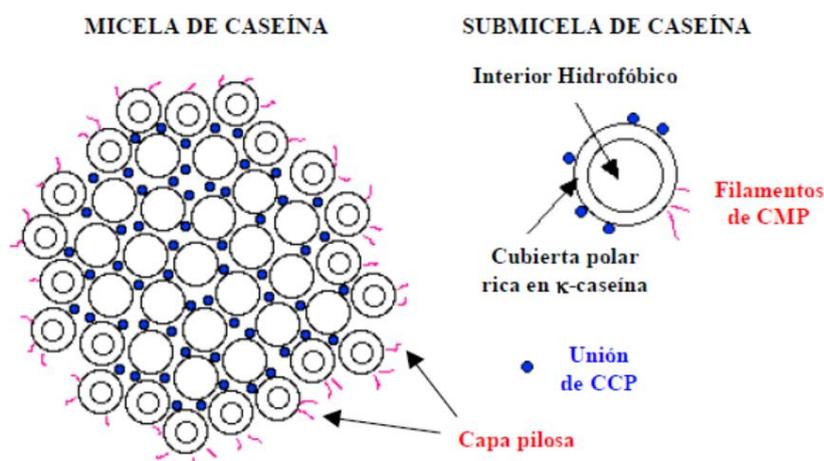
La micela de caseína ha sido muy estudiada publicándose números estudios en los últimos años, dando puntos de vista divergentes (de Kruif et al., 2012; Dalglish y Corredig, 2012; Dalglish, 2011; Fox y Brodkorb, 2008; Horne, 2008; Farrell et al., 2006; Horne, 2006; de Kruif y Holt, 2003). A día de hoy no existe una visión unificada sobre qué es la micela de caseína, cómo se forma, cómo se comporta y cuál es su estructura, todo lo cual sigue siendo objeto de intensos debates entre la comunidad científica, particularmente en lo referente al tamaño de la micela (distribución) y su estructura interna (de Kruif et al., 2012).

La composición de las micelas nativas depende de su tamaño. Varios estudios han mostrado que las micelas más pequeñas son relativamente ricas en  $\kappa$ -caseína y relativamente deficientes en  $\beta$ -caseína, mientras que los contenidos de  $\alpha_s$ -caseínas

parecen ser independientes del tamaño (Marchin et al., 2007; Dalgleish et al., 1989). Esos resultados implican que la  $\kappa$ -caseína está predominantemente en la superficie de la micela, la  $\beta$ -caseína está mayoritariamente presente en el interior y que las  $\alpha_s$ -caseínas se encuentran en toda la estructura (Dalgleish y Corredig, 2012).

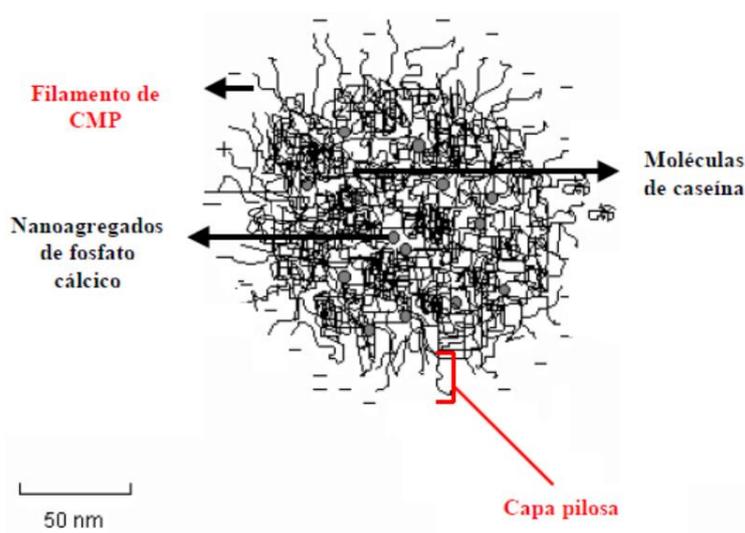
Las micelas de caseína presentes en la leche tienen un amplio intervalo de tamaños, con diámetros desde 50 hasta 500 nm y un diámetro medio de  $\sim 120$  nm (Fox y Brodtkorb, 2008). El tamaño de las micelas nativas está determinado por la cantidad de superficie que puede ser estabilizada por la  $\kappa$ -caseína disponible; así cuanto más grande la proporción de  $\kappa$ -caseína presente en la proteína total, más pequeñas son las micelas (Delacroix-Buchet et al., 1993).

Se han propuesto varios modelos para describir la estructura de la micela de caseína, los cuales han ido evolucionando hasta la actualidad, donde, según Dalgleish y Corredig (2012) hay dos corrientes principales, el modelo submicelar y el modelo de nanoagregados (Farrell et al., 2006; Horne, 2006). La hipótesis submicelar se formuló primero y postula básicamente que las micelas están formadas por agregados de caseínas (submicelas) unidas por pequeños dominios de fosfato de calcio (Schmidt, 1982) (Fig. 2.5). El hecho de que la  $\kappa$ -caseína se encuentra principalmente en la superficie de las micelas implica que deben existir al menos dos tipos de submicelas, ricas y pobres en  $\kappa$ -caseína (Dalgleish y Corredig, 2012).



**Figura 2.5** Modelo submicelar de la micela de caseína. CMP, caseinomacropéptido; CCP, fosfato cálcico coloidal. Reproducido de Castillo (2001).

El modelo alternativo de nanoagregados se derivó de la observación de que los fosfopéptidos de la  $\beta$ -caseína son capaces de estabilizar el fosfato de calcio en soluciones a concentraciones en las cuales este precipitaría (Little y Holt, 2004). Los nanoagregados son pequeñas formaciones de fosfato cálcico que interaccionan con los grupos fosfoserina de las caseínas y, probablemente, con los residuos de glutamina, constituyendo centros a partir de los cuales crecen las micelas (de Kruif y Holt, 2003; Holt y Horne, 1996; Holt, 1995) (Fig. 2.6). Sin embargo las distancias de 18 nm entre nanoagregados adyacentes descrita por estos autores son tan grandes que la unión por proteínas individuales parece improbable (Horne, 2006).

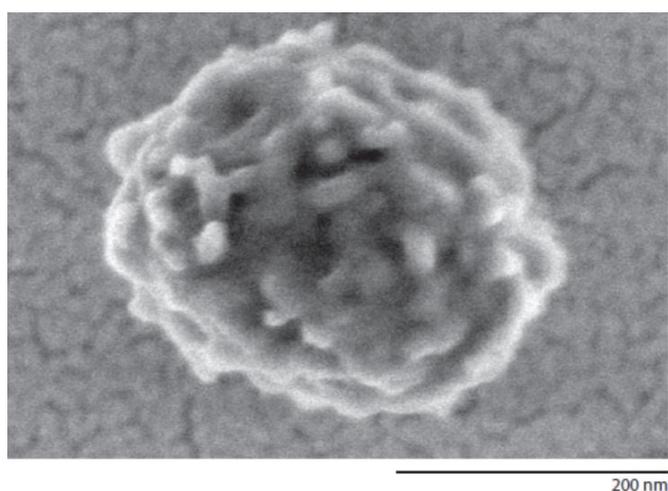


**Figura 2.6** Modelo de nanoagregados de la micela de caseína. CMP, caseinomacropéptido. Reproducido de Castillo (2001).

La alternativa es que la unión fosfato de calcio/nanoagregados pueda ocurrir vía interacciones no covalentes entre ellos y con otras caseínas para producir la formación de las micelas (Dalgleish 2011; Horne, 1998, 2006). De acuerdo con Dalgleish y Corredig (2012), dado que la  $\kappa$ -caseína no puede participar en la formación de nanoagregados porque carece de centros de fosfato, estará disponible para asociarse con las proteínas agregadas vía interacciones no covalentes para formar la capa superficial, actuando como una cadena terminal monofuncional, como está descrita en el modelo de enlace dual de Horne (Horne, 2008) y estabilizando las uniones de nanoagregados. Tomado desde este punto de vista, las micelas tendrían una subestructura, en lugar de una distribución de fosfato de calcio dentro de una matriz de proteínas bastante

uniforme, pero no sería la misma que la prevista en la hipótesis original submicelar (Dalglish, 2011). Según Dalglish y Corredig (2012) esta forma de realización del modelo de nanoagregados se puede tomar para invertir el modelo submicelar; en lugar de partículas de caseína unidas por enlaces de fosfato de calcio, hay partículas de fosfato de calcio/partículas de caseína unidas por enlaces no covalentes. Lo que es importante sobre el modelo de nanoagregados es que proporciona un mecanismo distinto para la formación de las micelas de caseína a través de la interacción entre los grupos fosfato serina de las caseínas y el fosfato de calcio (Dalglish y Corredig, 2012).

Un estudio donde se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para observar las micelas, proporcionó pruebas de que la estructura era más bien de una red extendida que una compuesta por subunidades y sugirió que podrían existir canales de agua en toda la micela (McMahon y Oomen, 2008). Resultados similares han sido sugeridos por Trejo et al. (2011), quienes proponen una estructura abierta de la micela con canales de agua. Dalglish y Corredig (2012) afirman que los resultados de los estudios que utilizan microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la estructura de la micela también dependen de los métodos de preparación de la muestra. Las micrografías más detalladas de las muestras no recubiertas utilizando campo de emisión SEM no muestran submicelas, sino más bien una estructura irregular con características aparentemente tubulares y con hendiduras profundas que parecen conducir al interior de las micelas (Fig. 2.7) (Dalglish et al., 2004).

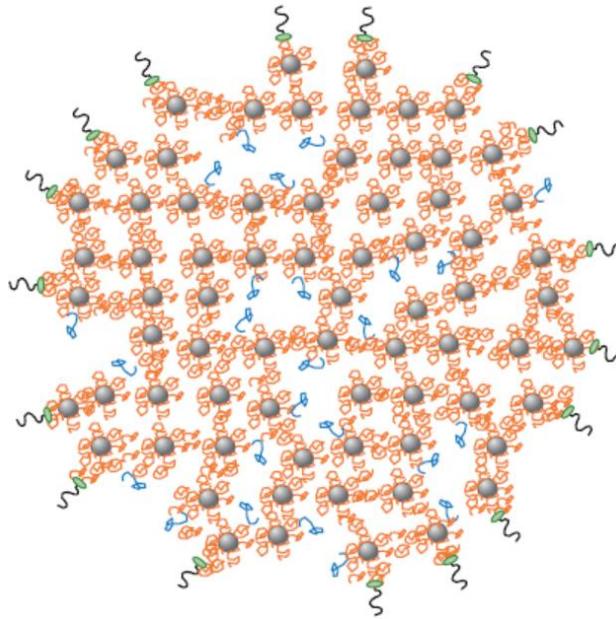


**Figura 2.7** Imagen obtenida con SEM de una micela de caseína. Reproducido de Dalglish y Corredig (2012).

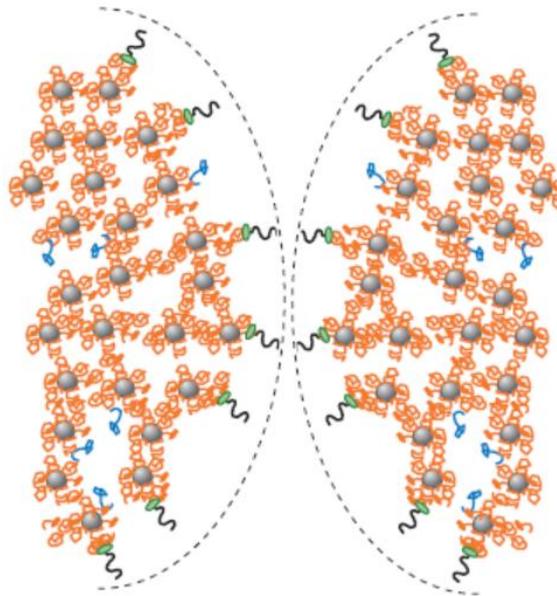
Por otra parte, de Kruif (2014) realizó una revisión de la estructura de la micela de caseína usando datos de dispersión de luz de ángulo pequeño (*small-angle scattering data*), concluyendo que: 1) la micela de caseína es una partícula homogénea, con una dispersión en el tamaño de ~35%, por lo que los datos experimentales sobre el tamaño de partícula dependen mucho del método usado, 2) la estructura de la micela de caseína puede describirse mejor como una matriz proteica en la que se dispersan los agregados (2 nm de radio) de fosfato de calcio, 3) la matriz de proteína tiene variaciones de densidad en una escala de magnitud similar, 4) el modelo de caseína micela – submicela y los modelos con grandes agujeros y canales son altamente improbables.

Los estudios realizados utilizando dispersión de luz de rayos X generalmente han sido interpretados sobre la base del modelo de nanoagregados (Marchin et al., 2007), pero una interpretación más reciente realizada por Bouchoux et al. (2010), basada en estudios de micelas que fueron progresivamente concentradas y deshidratadas por estrés osmótico planteó que la micela contiene regiones de proteína/fosfato de calcio dentro de una estructura altamente hidratada similar a una esponja. Según Dalglish y Corredig (2012), esta interpretación es interesante porque explícitamente tiene en cuenta la gran hidratación de la micela y de qué forma la pérdida de esa agua durante el estrés osmótico afecta a su estructura. La estructura propuesta es similar a la sugerida por Dalglish (2011) que se muestra en la Figura 2.8.

Está bien establecido que la mayoría o probablemente toda la  $\kappa$ -caseína está en la superficie de las partículas (Dalglish et al., 1989), lo que confiere estabilidad a la micela contra la agregación, porque parte de la molécula, el caseinomacropéptido (residuos 106 – 169 de la proteína) se extiende desde la superficie de la micela para crear una capa (5 – 10 nm de espesor) alrededor de las partículas (Horne, 1986). Esta capa pilosa proporciona estabilidad estérica y electrostática a las micelas de modo que no pueden aproximarse entre ellas (Fig. 2.9).



**Figura 2.8** Sección esquemática de la micela mostrando las regiones con agua dentro de la estructura. Las  $\alpha_s$ -caseínas y las  $\beta$ -caseínas (naranja) están unidas a los nanoagregados de fosfato de calcio y los enlazan (esferas grises). Algunas  $\beta$ -caseínas (azul) se unen hidrofóticamente a otras caseínas y pueden ser liberadas por enfriamiento. La *para- $\kappa$* -caseína (verde) y las cadenas de caseinomacropéptido (negro) se encuentran en la parte más externa de la superficie. No está dibujado a escala y el tamaño de los canales de agua está exagerado para mayor claridad. Reproducido de Dalgleish y Corredig (2012).

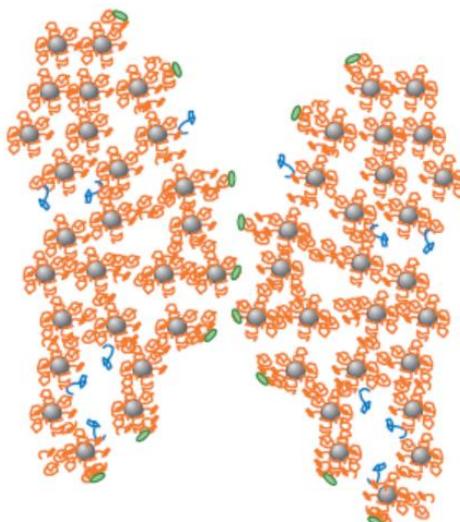


**Figura 2.9** Estabilidad micelar debida a la capa pilosa de caseinomacropéptido (basado en el esquema presentado en la Fig. 2.6). La zona de acción del efecto estérico está indicada por líneas punteadas. Reproducido de Dalgleish y Corredig (2012).

### 2.4.3.2 El Proceso de coagulación enzimática

Generalmente se considera que en la coagulación enzimática hay dos procesos cinéticos principales: (1) la hidrólisis o desestabilización enzimática de las micelas de caseína y (2) la formación del gel por medio de la agregación de las micelas desestabilizadas (van Hooydonk y Walstra, 1987; Walstra y van Vliet, 1986). Sin embargo, dicha división en dos etapas no es universalmente aceptada (Castillo et al., 2003a), ya que algunos autores consideran el ensamblado de la cuajada como la última etapa de la agregación y la analizan de forma separada, mientras que otros dividen la coagulación en las dos etapas mencionadas, pero al mismo tiempo utilizan ambiguamente términos como agregación y ensamblado del gel. En este trabajo se considerará que el proceso de coagulación enzimática comprende dos fases: 1) una fase primaria o enzimática donde se produce la desestabilización del sistema coloidal y 2) la fase de ensamblado o formación del gel, que incluye los procesos de agregación y de endurecimiento.

Dado que las micelas están estabilizadas por la repulsión estérica generada por la capa polielectrolítica de  $\kappa$ -caseína, cualquier proceso que retire la región terminal de la  $\kappa$ -caseína causa una disminución en la estabilidad coloidal de las micelas y produce una transición sol-gel (Dalglish y Corredig, 2012). La quimosina y otras enzimas proteolíticas (de origen animal, vegetal, microbiano o de ingeniería genética) rompe la  $\kappa$ -caseína en el enlace Phe105-Met106 y libera el dominio polar de la proteína, el caseinomacropéptido (CMP), con disminución de la densidad de la capa pilosa y colapso de la misma (van Hooydonk y Walstra, 1987). Durante la primera etapa de la reacción enzimática hay un aumento en el coeficiente de difusión de las micelas debido a la remoción gradual de su capa filamentosa polielectrolítica (de Kruif, 1992). La viscosidad de la leche disminuye hasta que más de 85% de la  $\kappa$ -caseína es hidrolizada (Tunier y de Kruif, 2002). En este punto, la estabilización estérica generada por la capa pilosa de  $\kappa$ -caseína remanente es insuficiente para mantener las micelas separadas y empiezan a agregar (Fig. 2.10) y eventualmente a gelificar (Kethiredipalli et al., 2011; Sandra et al., 2006; Dalglish, 1979).



**Figura 2.10** Micelas donde la capa filamentosa ha sido retirada por la enzima, permitiendo la aproximación superficial. Para mayor descripción del esquema ver Figura 2.6. Reproducido de Dalgleish y Corredig (2012).

La naturaleza de las fuerzas de atracción durante la agregación de las micelas de caseína no está aún completamente clara, aunque parece deberse a puentes de calcio, fuerzas de van der Waals y a interacciones hidrofóbicas (Lucey, 2002).

Carlson (1982) y Dalgleish (1993) demostraron que la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína se ajusta a una cinética de Michaelis–Menten, definiendo la velocidad de proteólisis por:

$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{k_m + [S]}$$

donde

$V_{max}$  = máxima velocidad de hidrólisis a concentración infinita de sustrato

$k_m$  = constante de disociación del complejo enzima sustrato

$[S]$  = concentración de sustrato a tiempo  $t$ .

Cuando se cumple  $[S] \gg k_m$ , entonces  $-d[S]/dt = V_{max}$ , esto es, la reacción de hidrólisis se aproxima a una cinética de orden cero y la velocidad es independiente de la concentración de sustrato, mientras que si  $k_m \gg [S]$  la reacción es de orden uno, por lo que la velocidad de hidrólisis es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Según Stryer (1988) y Lehninger (1987), el valor de  $k_m$  para una enzima

determinada depende de cada sustrato particular y de su estructura, así como del pH, la temperatura y la fuerza iónica.

Numerosos autores afirman que habitualmente una reacción de primer orden describe de forma correcta la reacción de hidrólisis enzimática (Mellema et al., 1999; López et al., 1997a; van Hooydonk y Walstra, 1987). También hay autores como Lomholt (1996), Hyldig (1993), Saputra (1992) y van Hooydonk et al. (1984) que han observado una disminución en la constante de velocidad de hidrólisis con la concentración de proteína, lo que fue atribuido por van Hooydonk et al. (1984) a una disminución de la velocidad efectiva de difusión de la enzima causada por el aumento de la concentración proteica.

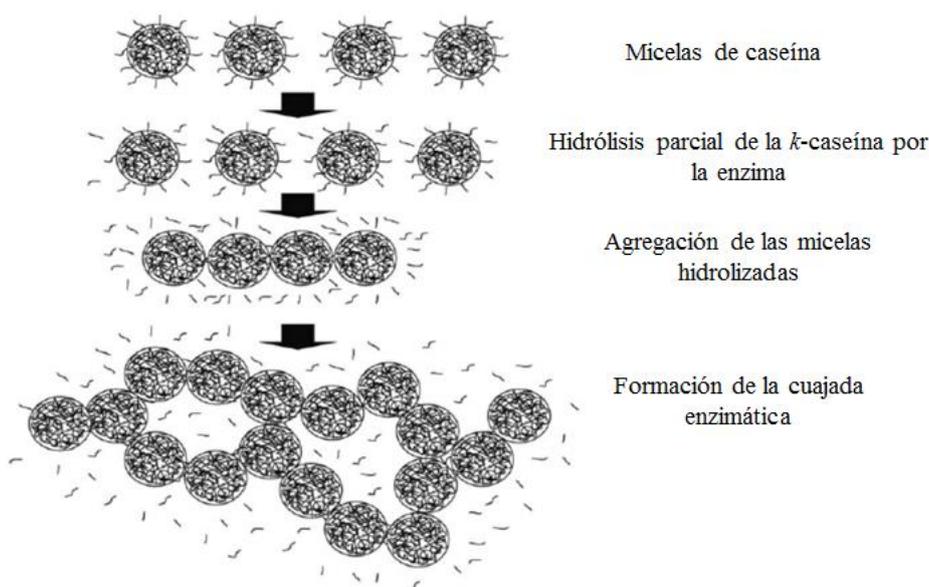
La fase de formación del gel o no enzimática se inicia con la agregación de las micelas desestabilizadas por la acción enzimática para formar una red tridimensional que va endureciéndose hasta dar lugar al gel definitivo. Peri et al. (1990) afirma que la agregación empieza al mismo tiempo que la hidrólisis, aunque otros autores discrepan considerando que la agregación no comienza hasta que un alto porcentaje de la  $\kappa$ -caseína ha sido hidrolizada (Lucey, 2011a; Sandra et al., 2007; Dalgleish, 1979).

La naturaleza de las fuerzas de atracción durante la agregación de las micelas de caseína no es aún del todo clara, pero se cree que están involucradas fuerzas de van der Waals, puentes de calcio e interacciones hidrofóbicas. Las micelas desestabilizadas agregarán solo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y la gelificación ocurre solo si hay suficiente fosfato de calcio coloidal (CCP) presente, o sea que se requiere que la estructura de las micelas esté intacta (Lucey, 2011a). Cuando la leche se coagula en condiciones normales de pH y contenido de proteína, la viscosidad no aumenta hasta que la fase enzimática se ha completado al menos en un 87%, lo que equivale a más del 60% del tiempo de coagulación visual ( $t_{clot}$ ), por lo que hay algo de solapamiento entre las fases de hidrólisis y agregación, cuyo grado depende de condiciones como pH, temperatura y contenido de proteína (Lucey, 2011a).

Sandra et al. (2007) usaron espectrometría de dispersión difusa múltiple (DWS) para monitorizar los mecanismos de coagulación enzimática en leche desnatada, encontrando que la segunda etapa de la reacción de coagulación ocurrió cuando al menos el 85 – 90% del CMP fue liberado a la solución. Los autores mencionados

observaron que los cambios en el radio de las partículas y  $G'$  parecen depender solo de la cantidad de CMP removido y no de la velocidad a la cual la proteólisis ocurre, concluyendo que la agregación es controlada por las propiedades de la superficie de las micelas y que la estructura del gel formado está condicionada por las partículas que están presentes cuando éste se empezó a formar, esto es, 90% de micelas de caseína hidrolizadas.

La agregación hace que se generen inicialmente pequeñas cadenas lineales de micelas que continúan creciendo para formar cadenas de agregados hasta que eventualmente el sistema adquiere la estructura de un gel (Lucey, 2011a; Horne y Banks, 2004). En la Figura 2.11 se representan de forma esquemática las etapas del proceso de coagulación enzimática.



**Figura 2.11** Representación esquemática de los procesos que ocurren durante la coagulación enzimática de la leche. Reproducido de Lucey, (2011a).

La velocidad de agregación depende de la frecuencia con la que las micelas chocan entre sí y de la probabilidad de que su energía térmica sea lo bastante grande para superar la barrera de energía potencial de repulsión para la agregación cuando tengan lugar estos encuentros. La teoría de agregación rápida pericinética (von

Smoluchowski, 1917) asume la ausencia de cualquier barrera energética ( $u_{total} = 0$ ), esto es:

$$u_{total}(h) = u_R(h) + u_A(h) + u_S(h) = 0$$

siendo  $u_{total}$  el potencial total,  $u_R$  el potencial de repulsión debido a la capa eléctrica doble,  $u_A$  el potencial de atracción causado por las fuerzas de van der Waals,  $u_S$  el potencial de repulsión estérica y  $h$  la distancia entre las superficies de las partículas. Por la ausencia de una barrera de energía cualquier colisión conduce a un contacto permanente. El modelo asume que las partículas están animadas por movimientos brownianos y supone que la agregación sólo está controlada por la difusión. En el caso de un sol monodisperso y diluido de partículas esféricas de radio  $a$  la teoría de agregación rápida predice que la velocidad de agregación inicial debe seguir una cinética de segundo orden (Walstra, 1996; Dickinson, 1992):

$$-\frac{dn}{dt} = k_2 n^2 = 4\pi D \sigma n^2 \approx 8\pi D a n^2$$

donde  $n$  es el número de partículas por unidad de volumen, es decir, de partículas no agregadas más agregados por unidad de volumen,  $t$  es tiempo,  $D$  es el coeficiente de difusión de las partículas,  $\sigma$  es la distancia de encuentro, esto es, la distancia entre los centros de dos partículas de radio  $a$  en contacto o  $\approx 2a$  y  $k_2$  es la constante de velocidad de segundo orden de von Smoluchowski.

La naturaleza del proceso de endurecimiento que finaliza la formación del gel con consolidación del mismo no es bien conocida. Así, McMahon et al. (1984) afirman que en el punto crítico de gelificación, las partículas independientes que se movían y colisionaban de forma aleatoria, repentinamente cesan de moverse en libertad porque la organización de la red primaria dificulta los movimientos y colisiones aleatorios. En el momento de la coagulación sólo un 90% (Fox y Mulvihill, 1990) de las micelas se han incorporado a la estructura tridimensional por lo que las micelas libres podrían tanto reaccionar con la matriz proteica como con otra partícula libre. Green et al. (1978) observan mediante microscopía y viscosimetría que cuando se alcanza el tiempo de coagulación visual ( $t_{clot}$ ) la red primaria se mantiene mecánicamente porque las micelas agregadas permanecen unidas mediante puentes, sin contacto directo entre las micelas. Pero esos puentes, cuya naturaleza exacta se desconoce, sufren un lento proceso de

contracción, que acerca a las micelas entre sí hasta que contactan entre ellas y finalmente se funden unas con otras. Zoon et al. (1988a) y van Vliet (2000) consideran que el endurecimiento de la cuajada después de la gelificación, se debe a la reorganización, la fusión y a la incorporación de más partículas de caseína a la red tridimensional proteica.

La reacción de endurecimiento, ha sido mayoritariamente estudiada mediante la monitorización de los módulos de rigidez durante el tiempo. El primer modelo para la descripción matemática del endurecimiento fue propuesto por Scott-Blair y Burnett (1963):

$$G = G_{\infty} e^{-\tau/(t-t_{gel})}$$

donde  $G$  describe el incremento en el módulo de rigidez con el tiempo después del punto de gelificación  $t_{gel}$ ,  $t$  es tiempo,  $G_{\infty}$  es el valor de  $G$  cuando  $[E] \rightarrow \infty$ ,  $\tau$  es una constante característica de la muestra que se determina por ajuste y  $e$  es la base de los logaritmos naturales.

Douillard (1973) propuso un modelo que asume que la velocidad de cambio de  $G$  se ajusta a una cinética de primer orden:

$$G = G_{\infty} (1 - e^{-k(t-t_{gel})})$$

con la condición inicial de que  $G = 0$  a  $t = t_{gel}$ ,

donde  $G$ ,  $G_{\infty}$ ,  $t$  y  $t_{gel}$  se definieron en el modelo anterior y  $k$  es la constante de velocidad de reacción de primer orden. La aplicación del modelo de Douillard ha sido amplia, habiéndose contrastado para ajuste de datos experimentales de  $G$  determinados con métodos tanto lactodinamométricos como reométricos (Horne y Banks, 2004). Usando la ecuación de Douillard, Tokita et al. (1982) concluyeron que más allá del punto de gelificación, la mayoría del crecimiento en la firmeza del gel surge como resultado de la unión entre la matriz proteica infinita y los agregados más pequeños y las micelas en la fase sol.

#### 2.4.3.2.1 Factores que afectan al proceso de coagulación enzimática

Además de los factores relacionados con la composición y el pretratamiento de la leche, la coagulación se ve afectada por las condiciones del proceso como la temperatura, la concentración de enzima, el pH, la adición de cloruro cálcico y el contenido de sólidos.

**La temperatura.** El aumento en la temperatura tiene un efecto mucho más marcado en la fase de agregación ( $Q_{10} = 11 - 16$ ) que en la hidrólisis ( $Q_{10} = 1,3 - 2,0$ ) (Castillo, 2001); la temperatura óptima para la firmeza de los geles enzimáticos es 30 – 35 °C y la temperatura típica de coagulación usada en la elaboración de queso es 31 °C (Lucey, 2011a), cuando se utiliza quimosina, sin embargo cuando se usan enzimas bacterianos, las temperaturas óptimas son más altas. El efecto de la temperatura sobre las fases de hidrólisis y agregación ha sido atribuido al aumento en el número de colisiones efectivas entre las partículas y en la velocidad de formación de los enlaces hidrofóbicos (Lagoueyte et al., 1994). El proceso de agregación disminuye significativamente si la temperatura es inferior a 15 °C, lo que indica la importancia de las interacciones hidrofóbicas, mientras que la fuerza del gel (indicada por el módulo dinámico) disminuye marcadamente al incrementar la temperatura (Zoon et al., 1988b), sugiriendo que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel más indirecto en la modulación de las interacciones entre las micelas hidrolizadas (Lucey, 2002). También está demostrado que el efecto de la temperatura sobre los tiempos de las reacciones del proceso de coagulación no es lineal (Lagoueyte et al., 1994; Sharma et al., 1993, 1989).

La leche que ha sido tratada en condiciones que exceden a las de la pasteurización presenta malas características de coagulación y resulta en la formación de un gel más débil y menos apropiado para la elaboración del queso (Singh y Wauguna, 2001; Dalgleish, 1992), lo que ha sido atribuido principalmente a dos causas: 1) una incompleta acción de la enzima por la formación de enlaces entre la  $\beta$ -lactoglobulina desnaturalizada y la  $\kappa$ -caseína y 2) la asociación entre agregados de proteínas del suero con la superficie de las micelas de caseína formando complejos que afectan la aproximación de los sitios reactivos formados en las micelas por acción de la enzima, por tanto la agregación ocurriría principalmente entre micelas que no estuviesen completamente cubiertas por  $\beta$ -lactoglobulina, resultando en la formación de geles con menos enlaces y más débiles (Horne y Banks, 2004). Vasbinder et al. (2003)

encontraron que la desnaturalización de las proteínas del suero por tratamiento térmico de la leche causó una muy leve reducción en la actividad de la enzima y por tanto no afectó al inicio de la agregación, pero si tuvo un claro efecto en el proceso de coagulación, lo que probablemente fue debido a una precipitación parcial del fosfato cálcico.

**La concentración de enzima.** Una alta concentración de enzima al pH normal de la leche produce una disminución en  $t_{clot}$  y una mayor velocidad de endurecimiento (Tranchant, 2000; Passos et al., 1999). La influencia de la concentración de enzima en el tiempo de coagulación se puede describir mediante la ecuación de Foltmann (1959):

$$T_c = \frac{a}{[E]} + b$$

donde

$T_c$  = tiempo de coagulación (incluye la hidrólisis y la agregación),

$[E]$  = concentración de enzima,

$a$  = constante, y

$b$  = constante (tiempo de coagulación mínimo cuando  $[E] \rightarrow \infty$ ).

De acuerdo con la ecuación anterior, la representación del tiempo de coagulación con respecto a la inversa de la concentración de enzima debe ser lineal. Por otro lado, las constantes  $a$  y  $b$  no sólo dependen del método de determinación del tiempo de coagulación sino también del pH, la temperatura y las concentraciones de calcio y proteína (van Hooydonk y van den Berg, 1988). Castillo (2001) encontró que el aumento en la concentración de enzima produjo una disminución significativa de los parámetros  $t_{max}$  (tiempo desde la adición de la enzima hasta el primer máximo de la primera derivada del perfil de dispersión de luz),  $t_{clot}$  (el tiempo de coagulación de Berridge) y  $t_{cut}$  (el tiempo de corte visual), además de una interacción estadísticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) entre la concentración de enzima y los factores pH y temperatura, para las mismas variables. Estos resultados coinciden con los de Landfeld et al. (2002) quienes determinaron que el tiempo de inicio de la coagulación fue más corto al aumentar la dosis de enzima.

**El pH.** Algunos de los efectos de la reducción del pH fueron comentados previamente cuando se describió la acidificación como pretratamiento de la leche. El

descenso del pH produce una reducción en el tiempo de coagulación y mayor velocidad de aumento en la firmeza del gel. Muchos factores están involucrados en ese fenómeno, incluyendo la disminución de la repulsión electrostática entre las micelas, incremento en  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la solubilización del CCP, agregación a menor grado de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína y aumento en la actividad de la enzima (Dejmek y Walstra, 2004). La acidificación de la leche aumenta la dureza de los geles de coagulación enzimática hasta pH de 6,3 – 6,0, a valores de pH < 6,0 se reduce la dureza y hay un incremento en  $\text{tg } \delta$  ( $\text{tg } \delta = G''/G'$ ), debido probablemente a una excesiva solubilización de CCP, el cual actúa como puente de unión entre moléculas y micelas de caseína (Lucey, 2011a).

**La adición de cloruro cálcico.** Para superar las variaciones en el tiempo de coagulación de la leche y acelerar la reacción de coagulación durante la elaboración del queso, es práctica común agregar  $\text{CaCl}_2$  a la leche en concentraciones entre 0,005 y 0,02% previamente a la adición de la enzima (Hallén et al., 2010b). Generalmente se piensa que la adición de  $\text{CaCl}_2$  no afecta directamente a la fase de hidrólisis, pero sí lo hace de forma indirecta al reducir el pH, lo que acelera la reacción de hidrólisis al mejorar la actividad de la enzima (Lucey, 2002; van Hooydonk et al., 1986a). La adición de calcio (< 50 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) reduce el tiempo de coagulación (aun a pH constante), facilitando que la agregación ocurra a menor grado de hidrólisis de  $\kappa$ -caseína y en dosis de hasta 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  aumenta la fuerza del gel (Lucey, 2011a). El tratamiento térmico de la leche por encima de 65–70 °C provoca la precipitación parcial del fosfato cálcico (van Hooydonk et al., 1987) por lo que, la adición de  $\text{CaCl}_2$  se ha constituido en una práctica común durante la elaboración de queso con el objetivo de compensar la disminución de la actividad de calcio producida durante la pasteurización. Parte del calcio añadido contribuye a incrementar la actividad del calcio, pero la mayor parte se une directamente a los grupos funcionales de las caseínas con carga negativa (principalmente a residuos de fosfoserina y grupos carboxílicos) o al fosfato cálcico coloidal (van Hooydonk y van den Berg, 1988).

Los resultados de los estudios acerca del efecto del calcio sobre la fase de hidrólisis son contradictorios. Tras medir la liberación de CMP en función del tiempo después de la adición de la enzima, Sandra et al. (2012) demostraron que la adición de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  no afectó la fase de hidrólisis enzimática, mientras que Bringe y Kinsella (1986) mostraron que la velocidad de dicha fase aumentó con la adición de 3 – 10 mM

de  $\text{CaCl}_2$ . Usando reología, Sandra et al. (2012) encontraron además que los tiempos de gelificación ( $tg \delta = 1$ ) fueron más cortos en las muestras con adición de calcio que para aquellas sin calcio. El efecto de la adición de calcio sobre la agregación se atribuye a un descenso adicional del potencial zeta ( $\zeta$ ) de las micelas de caseína que ya han sido hidrolizadas (Lucey et al. 1993b). En un estudio donde se utilizó un sensor de dispersión de luz para monitorizar la coagulación de leche de cabra (Castillo et al., 2002), la adición de  $\text{CaCl}_2$  (1,38 y 5,06 mmol L<sup>-1</sup>) produjo una disminución significativa en los parámetros  $t_{clot}$  y  $t_{cut}$ , y debido a que el pH de la leche se ajustó tras la adición del calcio, la reducción en tales variables fue atribuida a un efecto directo sobre las velocidades de agregación y endurecimiento. Otros autores también han señalado un descenso en el tiempo de corte con la adición de calcio, especialmente en niveles entre 1 y 10 mM (Erdem, 1997; van Hooydonk y van den Berg, 1988).

**El contenido de sólidos.** En leche con mayor contenido de sólidos la coagulación ocurre a menor grado de hidrólisis de  $\kappa$ -caseína y frecuentemente el tiempo de coagulación solo se reduce ligeramente en leche concentrada, pero esto depende de la concentración de enzima añadida (es decir, si es añadida por volumen de leche o con base en la caseína presente) y del método usado para detectar el tiempo de coagulación (Lucey, 2011a). Está generalmente aceptado que la dureza del gel aumenta con el nivel de concentración en retenidos de leche ultrafiltrada (UF) (Karlsson et al., 2007; Waungana, 1998). Sin embargo existen aún desacuerdos en si la concentración de la leche afecta o no a los tiempos de gelificación enzimática. Guinee et al., (1996) encontraron que la concentración por UF reduce el tiempo de gelificación y acelera el endurecimiento. Karlsson et al. (2007) investigaron las diferencias en la coagulación enzimática de leche muy concentrada (19,8% de caseína) y leche desnatada sin concentrar (2,8% de caseína), a pH 5,8 y encontraron que cuando se adicionó la misma cantidad de enzima a ambos tipos de leche, la leche concentrada tuvo un tiempo de coagulación (definido como el tiempo cuando  $G' > G''$ ) más largo y el gel resultante fue más firme. Lucisano et al. (1985) y Waungana et al. (1998) mostraron tiempos de coagulación similares entre leche concentrada y leche sin concentrar a pH neutro.

Según Sandra et al. (2011) las discrepancias en los resultados pueden ser parcialmente atribuidas a factores como las diferencias en los métodos empleados para medir el tiempo de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína o los tiempos de coagulación o agregación,

las diferentes fuentes de caseína y las variaciones en el procesamiento de la leche concentrada, así como también la falta de homogeneidad en la definición de los tiempos de agregación o coagulación.

Sandra et al. (2011) evaluaron mediante DWS, reología y liberación de CMP, las diferencias en la coagulación entre muestras de leche concentrada por UF en relaciones de volumen de 1× (control), 3× y 5×, coaguladas a 30 °C con quimosina (4,36  $\mu\text{L L}^{-1}$  leche). Los autores no encontraron diferencias en la cantidad de CMP liberado en función del tiempo entre la leche concentrada 1×, 3× y 5×, concluyendo que la velocidad enzimática de la quimosina no fue afectada por la concentración de proteína, lo que fue confirmado por la ausencia de diferencias en los tiempos requeridos para alcanzar 90% de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína. Tampoco se observaron diferencias en los tiempos de gelificación determinados por DWS (rápido incremento en el radio aparente) y por reología ( $tg \delta = 1$ ) entre las muestras con diferentes concentraciones de proteína.

Sin embargo al analizar los datos del estudio de Sandra et al. (2011) se detecta que hubo una disminución sistemática en todos los parámetros usados para evaluar el tiempo de gelificación, con el aumento en la concentración de proteína en la leche, pero la alta variabilidad en los resultados (solo se usaron dos repeticiones) hizo que las diferencias no fueran estadísticamente significativas, lo que deja en duda algunas de las conclusiones de dicho trabajo. Si se considera que una mayor concentración de proteína en la leche se corresponde con una menor fracción de volumen de la fase acuosa, lo que en consecuencia reduce las distancias medias entre las micelas de caseína, es entonces lógico suponer que habrá un aumento en el número de colisiones entre partículas de caseína y un mayor grado de agregación.

#### **2.4.4 El corte de la cuajada**

La elaboración del queso puede considerarse como un proceso de deshidratación y la sinéresis es el método por el cual la mayor parte de la humedad es retirada de la cuajada. Después de la coagulación, la sinéresis es el siguiente proceso más importante en la elaboración del queso, porque afecta directamente al rendimiento, la maduración y la calidad a través de su efecto en la humedad y el contenido de lactosa y minerales en la cuajada (Dejmek y Walstra, 2004; Weber, 1987). La sinéresis puede ocurrir de forma

espontánea, pero los geles coagulados enzimáticamente pueden permanecer estables por muchas horas si no son perturbados, por lo que la sinéresis es inducida mediante el corte y agitación de la cuajada (Lucey, 2002).

Al permitir la separación de las fases sólida y líquida, más o menos rápidamente, el corte de la cuajada (Fig. 2.12) condiciona la amplitud del desuerado, por lo que constituye un factor especialmente decisivo (Weber, 1989). El corte debe ser muy cuidadoso, en función de la fragilidad del coágulo. Las cuchillas o hilos de las liras de corte deben diseñarse de forma que no provoquen roturas innecesarias de la cuajada y deben manipularse lentamente, para realizar un corte limpio y disminuir al máximo la formación de “finos de caseína”, que son posteriormente drenados con el lactosuero disminuyendo el rendimiento final.



**Figura 2.12** Corte de la cuajada en la cuba quesera.

El tamaño de los cubos de cuajada o “granos” regula la intensidad del desuerado, de tal manera que los quesos frescos, que requieren menos desuerado, se cortan en granos grandes y los quesos curados, se cortan en granos pequeños que intensifican el desuerado. Una vez alcanzado el punto de gelificación, la dureza del gel evoluciona aumentando con el tiempo, por tanto se requiere seleccionar el momento de dureza óptimo para el corte. Para evitar los finos, el corte debe hacerse cuando la cuajada está todavía fuertemente mineralizada, pero aún no ha alcanzado un grado excesivo de endurecimiento (Weber, 1989). Un corte prematuro de la cuajada, cuando ésta es excesivamente frágil, da lugar a una pérdida de rendimiento por aumento de finos y de

grasa en el suero, mientras que un corte tardío produce un aumento de humedad de la cuajada y una disminución de calidad (Fagan et al., 2007b; Passos et al., 1999). Prolongar el tiempo de corte puede representar un aumento en el rendimiento, pero el mayor contenido de humedad puede acelerar las reacciones de deterioro del producto, afectar a la maduración y reducir su vida útil.

#### **2.4.5 La sinéresis**

La sinéresis es un proceso mediante el cual el suero es separado de las partículas de cuajada y, como resultado, las partículas de cuajada reducen su volumen. Probablemente sea más correcto describir la contracción de gel como un proceso que fuerza o “escurre” la salida del suero fuera de la matriz a través de los poros, ya que la fase acuosa en geles de coagulación enzimática está principalmente atrapada físicamente y no ligada químicamente (Lucey, 2011b).

El control de la humedad de la cuajada es importante debido a que la humedad afecta directamente a las propiedades sensoriales y funcionales del queso, de modo que para estandarizar la calidad del queso, todas las variables que influyen la velocidad y el grado de drenado del suero deben ser controladas durante el proceso (Calvo y Balcones, 2000).

Si no se aplica una presión externa, se espera que solo se presente una contracción limitada en el gel, pero puede tener lugar la llamada “microsinéresis”, lo que significa que a escala local tiende a haber una segregación en regiones densas y menos densas formándose grandes poros y una estructura abierta, lo que puede reflejarse en un aumento de la permeabilidad del gel con el tiempo y facilitar la sinéresis macroscópica (Tranchant, 2000).

Walstra (2004) propuso tres posibles causas de la sinéresis: 1) cambios en solubilidad, 2) reorganización y 3) contracción de las partículas de caseína, considerando la reorganización de la red de micelas de caseína como la causa principal del fenómeno. La magnitud de la reorganización se relaciona con la dinámica (vida media) y la relajación de los enlaces proteína-proteína y se ve acelerada por el incremento en la temperatura y la disminución del pH (Walstra, 2004; Mellema, 2000;

van Vliet et al., 1991). La reorganización de las partículas de caseína en una estructura más compacta incrementa el número de enlaces y por consiguiente decrece la energía libre total del sistema, lo que implica que la estructura de la red se debe deformar y romper localmente para formar nuevas uniones (Walstra, 2004).

Debido a la complejidad de modelizar la contracción de las partículas de cuajada en varias dimensiones, el proceso de sinéresis se ha modelizado en una sola dimensión usando rebanas delgadas de gel (en las que el diámetro es mucho mayor que el espesor), que no se cortan sino que se humedecen en su superficie, lo que genera una presión suficiente para iniciar la sinéresis y el flujo de líquido (suero) a través de la matriz proteica, que es gobernado por la ecuación de Darcy (Lucey, 2011b). De acuerdo con Darcy, la velocidad  $v$  de un líquido de viscosidad  $\eta$  que fluye a través de un material poroso viene dado por:

$$v = \frac{Q}{A} = B\Delta p/\eta l$$

donde  $Q$  es el caudal volumétrico a través de un área de sección transversal  $A$ ;  $B$  es el coeficiente de permeabilidad, el cual en un gel de coagulación enzimática es aproximadamente  $0,2 \mu\text{m}^2$ ;  $l$  es la distancia sobre la cual debe fluir el líquido y  $\Delta p$  es el gradiente de presiones que actúa como fuerza motriz del proceso. Cuanto más grande sea  $l$ , mayor es la resistencia al flujo, por lo que hacer  $l$  pequeño tiene un efecto positivo, lo que se consigue cortando el gel en cubos. El corte también aumenta el área a través de la cual puede salir el suero y, por lo tanto, el flujo volumétrico  $Q = vA$ . La presión de sinéresis endógena  $\Delta p$  resulta ser demasiado pequeña, alrededor de 1 Pa (que corresponde a una columna de agua de 0,1 mm de altura), por lo que la sinéresis debe ser promovida ejerciendo una presión mecánica, efecto que se consigue mediante la agitación (Walstra et al., 1999).

Inicialmente la velocidad de sinéresis es muy alta, pero debido a la contracción, el gel se vuelve localmente denso, el módulo reológico aumenta y la permeabilidad disminuye, de modo que después que el gel ha sufrido una contracción considerable, la sinéresis adicional se inhibe por la reducción en la permeabilidad y el aumento de la resistencia de la matriz a deformación adicional. En la práctica la sinéresis de las

partículas coaguladas ocurre en tres dimensiones simultáneamente y es mucho más difícil de estudiar que el modelo unidimensional.

Al contrario que la contracción unidimensional de la cuajada, la cantidad de suero expulsado por los granos de cuajada puede medirse fácilmente. La mayoría de las investigaciones acerca de la cinética de la sinéresis se han realizado por medición directa o indirecta de la masa o volumen de suero expulsado desde los granos de cuajada (Castillo et al., 2006b). Peri et al. (1985) usaron una ecuación basada en una cinética de primer orden para describir la velocidad de sinéresis:

$$V_{\infty} - V_t = V_{\infty}e^{-kt}$$

donde  $V_{\infty}$  es el volumen final de suero drenado a tiempo infinito,  $V_t$  es la cantidad de suero liberado a tiempo  $t$ , y  $k$  es la constante cinética para la sinéresis. Otros autores también han encontrado que la expulsión del suero en geles enzimáticos sigue una cinética de primer orden (Castillo et al., 2000a; Grundelius et al., 2000).

#### 2.4.5.1 Factores que afectan a la sinéresis

Para la mayoría de tipos de queso la mezcla de trozos de cuajada y suero obtenida tras el corte es agitada y, frecuentemente, parte del suero es retirado, siendo además muy común aumentar la temperatura de la mezcla (escaldado o cocción), acciones todas ellas que tienen por finalidad promover la sinéresis (Dejmek y Walstra, 2004).

Weber (1989) clasificó los factores que afectan al desuerado en tres grupos:

1. **Factores directos**, que intervienen tras la formación del coágulo y que son de naturaleza física. A este grupo pertenecen los tratamientos mecánicos de la cuajada (corte, agitación y prensado) y los tratamientos térmicos (cocción).
2. **Factores indirectos**, que son responsables de la coagulación y determinan las propiedades de la cuajada e indirectamente su desuerado. Destacan la acidez de la cuajada y el enzima coagulante.

3. **Factores ligados a la leche**, previos a la coagulación, como concentración de grasa y de proteína, y los tratamientos de refrigeración y de pasteurización.

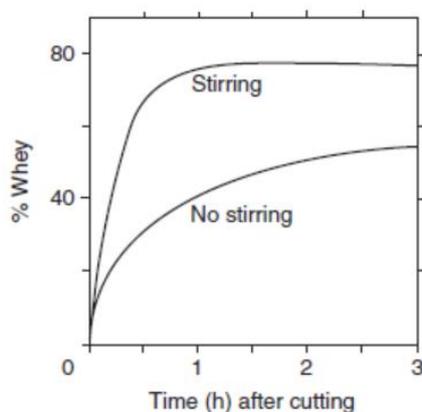
Según Walstra (1999), el efecto que tienen algunos factores sobre la sinéresis puede variar ampliamente de acuerdo con las condiciones, debido principalmente a que la presión endógena de sinéresis así como la permeabilidad pueden verse afectadas. A continuación se describirán brevemente algunos de los factores más importantes.

**La firmeza de la cuajada al momento del corte.** Algunos de los principales aspectos de este factor fueron comentados en la sección 2.4.4. De acuerdo con Abd El-Gawad y Ahmed (2011), la información existente sobre la influencia de la firmeza al momento del corte en la sinéresis y el rendimiento quesero es inconsistente, debido probablemente a la dificultad de evaluar la firmeza de los geles enzimáticos de forma objetiva ya que los factores que influyen en el grado de pérdida de grasa y caseína en el suero son complejos. El tipo de cuba, la construcción de las cuchillas, la forma en que se desarrolla la coagulación, el régimen de corte y las propiedades de la cuajada en relación con la variedad de queso, son todos factores importantes (Lawrence, 1993). Mayes y Sutherland (1989) encontraron un incremento en la retención de sólidos al prolongar el tiempo de coagulación, sin embargo un 16% de incremento en el tiempo normal de coagulación aumentó el contenido de humedad y disminuyó la calidad del queso tras la maduración. Los autores mencionados concluyeron que una desviación de 10% respecto al tiempo de coagulación óptimo podría ser tolerada y que las desviaciones por debajo del óptimo fueron más críticas respecto al rendimiento global del proceso (rendimiento y calidad) que las desviaciones por encima del óptimo.

**El tamaño del grano de cuajada.** Inicialmente la sinéresis es proporcional al área de la interface entre cuajada y suero, por lo que cuanto más pequeños los cubos, más rápida es la sinéresis, pero al mismo tiempo más grasa y finos de cuajada son transferidos al suero. Los granos más pequeños se contraen y desueran más rápido, por lo que si el tamaño de los granos varía mucho, el queso resultante puede no ser homogéneo (Dejmek y Walstra, 2004; Walstra et al., 1999).

**La velocidad de agitación.** Como se puede ver en la Figura 2.13, la agitación aumenta la sinéresis debido a factores como la prevención de la sedimentación de los granos de cuajada, la generación de presión adicional por flujo turbulento y por colisión

de los granos entre sí mismos y con las cuchillas, la deformación de los granos de cuajada y la formación de fracturas en los mismos (Dejmek y Walstra, 2004). Según Everard et al. (2008), la velocidad de agitación mostró efectos significativos sobre el contenido de sólidos totales, finos y grasa en el suero.



**Figura 2.13** Volumen de suero expulsado (como % del volumen de leche original) por la cuajada mantenida en el suero a 38 °C en función del tiempo después del corte, con o sin agitación. Reproducido de Dejmek y Walstra (2004).

**El pH.** Pequeños ajustes en el pH (p. ej. una disminución de 6,5 a 6,3) pueden resultar en una reducción global de la sinéresis, debido al incremento en la dureza de los geles enzimáticos a causa de la disminución en la repulsión electrostática entre las partículas. Sin embargo una reducción mayor en el pH (p. ej. de 6,3 a 5,2) ocasiona una mayor sinéresis, probablemente debido a la solubilización de CCP que incrementa la flexibilidad de las partículas de caseína (Lucey, 2011b) y por consiguiente un menor contenido de humedad final. Giroux et al. (2014) evaluaron el efecto combinado del pH inicial de la leche (6,2; 6,4 y 6,6) y la temperatura de cocción (40, 45 y 50 °C) sobre la cinética de contracción de la cuajada después de la coagulación. Muestras de 5 g de leche (3,3% proteína y 3,9% grasa) fueron depositadas en tubos plásticos antiadherentes y coaguladas a 32 °C por 30 min e inmediatamente fueron introducidos en un baño a la temperatura de cocción. La cinética de contracción de los geles coagulados se evaluó midiendo el peso de suero liberado en función del tiempo durante 75 min. Los autores encontraron que la constante cinética de velocidad de contracción de la cuajada aumentó aproximadamente el doble al disminuir el pH de coagulación de 6,6 a 6,2, coincidiendo con los resultados de Thomann et al. (2008) quienes encontraron que la disminución del pH previa a la coagulación produjo una mayor sinéresis y menor firmeza de la cuajada.

**La temperatura.** Tanto la temperatura de coagulación, como la del proceso de sinéresis afectan a la velocidad y al grado de sinéresis. La temperatura de coagulación cambia la vida media y la velocidad de formación de enlaces (Mishra et al., 2005; Lucey, 2002), los cuales afectan fuertemente a las propiedades reológicas y la microestructura del gel al momento del corte. Van den Bijgaart (1988) encontró que  $dB/dt$  aumentó con el incremento de la temperatura y afirmó que esto puede ser causado por una más fácil ruptura de los enlaces y la disrupción de las uniones a mayor temperatura, por consiguiente la cuajada tiene mayor capacidad de reorganizarse y contraerse, resultando en una mayor expulsión de suero. Con relación al efecto de la temperatura sobre la sinéresis, Lucey (2011b) plantea que el aumento de la temperatura incrementa el movimiento de las partículas y los enlaces en la red proteica, además reduce la voluminosidad (las partículas reducen su tamaño por aumento de las fuerzas hidrofóbicas) lo que disminuye el área de contacto potencial entre cadenas y agregados. En el estudio de Fagan et al. (2007a) los geles formados a temperatura más alta tuvieron una mayor velocidad de sinéresis y el grado de separación del suero aumentó.

**La adición de cloruro cálcico.** El efecto de la adición de  $\text{CaCl}_2$  sobre la sinéresis es complejo debido a que produce cambios en la fuerza iónica, el CCP y el pH de la leche, lo que afecta tanto a la formación y la fuerza del gel como a la sinéresis. De acuerdo con el trabajo de Fagan et al. (2007b) existen resultados contradictorios en cuanto al efecto de la adición de  $\text{CaCl}_2$  sobre la sinéresis. Así por ejemplo, van den Bijgaart (1988) concluyó que la adición de calcio estimula la agregación y acelera el endurecimiento del gel, produciendo una disminución en la capacidad de reorganización y una disminución en la sinéresis. Por otro lado en el estudio de Fagan et al. (2007b) no se encontraron efectos significativos de la adición de  $\text{CaCl}_2$  (0,38 – 3,38 mM) sobre la humedad de la cuajada a 85 min tras el corte ni sobre el rendimiento de la cuajada.

**La composición de la leche.** A mayor contenido de grasa en la leche, menor capacidad de contracción de la cuajada. Además la grasa impide el flujo de suero desde el interior, es decir, disminuye la permeabilidad de la cuajada, por lo que la grasa reduce la sinéresis (Walstra, 1999). Los estudios de Peri et al. (1985) mostraron que la constante cinética de expulsión del suero varió poco con la concentración de la leche. Caron et al. (2001) al ajustar la concentración de caseína con retenidos de UF o MF encontraron que la sinéresis fue más rápida para leches ajustadas con retenidos de MF

de leche preacidificada. De acuerdo con Lucey (2011b), los geles enzimáticos elaborados con leche que ha sido concentrada hasta el contenido de sólidos totales de esa variedad de queso (prequeso líquido) presentan mínima sinéresis. Presumiblemente en leche muy concentrada el número de enlaces y puntos de unión entre proteínas en la matriz del gel se vuelve muy alta y la resistencia a la deformación o rotura de las cadenas en la matriz es demasiado fuerte para facilitar la sinéresis.

Según Dejmeek y Walstra (2004), las diferencias en los resultados de los estudios relacionados con el efecto de la concentración de la leche sobre la sinéresis se deben a la variación en el tiempo transcurrido después de la adición de la enzima antes del corte. En la coagulación de leche normal alrededor de 2% de la  $\kappa$ -caseína está aún sin hidrolizar al momento del corte, mientras que esto puede llegar a ser 12% en leche concentrada 2× por UF (van Hooydonk y van den Berg, 1988). En consecuencia las primeras etapas de la formación del gel y la sinéresis probablemente transcurren de forma diferente, dependiendo del momento del corte.

Hansen et al. (2010) utilizaron resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  para la monitorización *in situ* de la coagulación enzimática de la leche y la sinéresis del gel encontrando que la velocidad a la cual el agua sale del gel después del corte puede ser descrita como una reacción de primer orden, indicando que la velocidad de expulsión de suero depende de la cantidad de agua presente en un momento dado, confirmando lo que ya se había observado en muchos estudios previos (Fox y McSweeney, 1998; Peri et al., 1985). Estos autores además encontraron que la constante cinética de la reacción de expulsión del suero ( $k$ ) aumentó con la temperatura y con la reducción en el pH lo que es conocido por estudios anteriores (Everard et al., 2008; Fagan et al., 2007b, Daviau, et al., 2000), pero no hallaron dependencia significativa de  $k$  con la firmeza del gel al momento del corte, resultado que fue asumido por los autores como una paradoja, ya que se esperaría que un gel más firme, con alta presión interna, debería expulsar suero más rápidamente que un gel menos firme. Quizá debieron considerar que cuanto más firme es un gel menor es su capacidad de reorganización.

#### **2.4.6 Moldeo y prensado**

Tras el desuerado, la cuajada es transferida a moldes con la forma y tamaño característico de cada tipo de queso, con el propósito de que la cuajada forme una masa continua. Los quesos que tendrán un alto contenido de humedad final se prensan bajo su propio peso (autoprensado) o en prensas a muy baja presión, pero aquellos que tendrán baja humedad se someten a sistemas de prensado más intenso con el fin de propiciar la expulsión de suero, proporcionar textura y forma, además de formar una corteza en quesos con largos periodos de maduración. La presión debe aplicarse de forma gradual al inicio ya que de lo contrario se comprime la capa superficial que se reseca quedando bloqueada la humedad en el interior del producto. La intensidad y la duración del prensado varían con el tipo de queso en un rango generalmente comprendido entre 0,1 y 1,0 kg cm<sup>-2</sup>, donde las menores presiones se aplican a los quesos frescos (Walstra, 2004).

#### **2.4.7 Salado**

En algunos tipos de queso, especialmente los frescos y aquellos de corta vida útil, la sal se suele añadir a la cuajada antes del moldeo, pero en la mayoría de quesos madurados el salado se realiza por inmersión en salmuera tras el moldeo (p. ej. Gouda, Suizo, Emmental, Camembert, Feta) o por frotación en superficie (p. ej. quesos azules) (Fox, 2011). La sal contribuye a la sinéresis, pudiéndose eliminar hasta ~2 kg de agua por cada kilo de sal incorporada (Dejmak y Walstra, 2004); sin embargo la presencia de sal y la forma como ésta es incorporada tiene mucho impacto en el curso de la fermentación de la lactosa a ácido láctico y en la microbiología, la bioquímica y las características finales del queso (Guinee y Sutherland, 2011).

#### **2.4.8 Maduración**

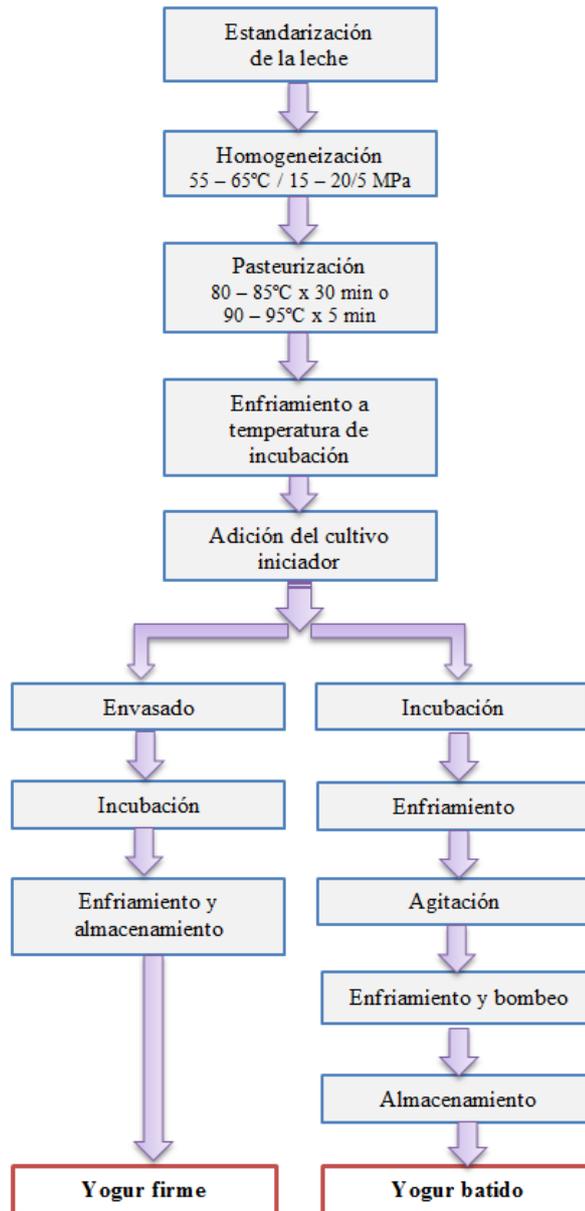
Algunos quesos se consumen frescos y constituyen la mayor proporción de quesos consumidos en algunos países, sin embargo la mayoría de variedades de queso se someten a un periodo de maduración que puede variar desde ~2 semanas (p. ej. Mozzarella) hasta ~2 años (p. ej. Parmigiano-Reggiano o Cheddar extramaduro), siendo

la duración de la maduración generalmente inversamente proporcional al contenido de humedad en el queso (Fox y McSweeney, 2004). Durante la maduración se desarrollan procesos bioquímicos como proteólisis y lipólisis entre otros, a través de los cuales cada tipo de queso desarrolla características únicas, aunque en la mayoría de los casos, los cambios que confieren el aroma, el sabor y la textura, están bastante predeterminados por el proceso de manufactura, incluyendo la composición, especialmente la humedad, el pH, el contenido de sal y por el tipo de inóculo u otro cultivo secundario añadido, entre otros (Fox, 2011).

De acuerdo con el objetivo general de esta tesis, el trabajo desarrollado con relación a la producción de queso se centró en las etapas de coagulación y sinéresis, hasta la obtención de un gel fresco, ya que es en tales etapas donde el sensor de dispersión de luz NIR evaluado puede ser aplicado. Es por esa razón que en la revisión bibliográfica se ha enfatizado en aspectos como las características de la inulina y su utilización como sustituto de grasa, la descripción de la micela de caseína y en los procesos de coagulación y sinéresis junto con los factores que los afectan, que fueron el centro de estudio en la fase experimental, sin llegar a incidir en las etapas posteriores de la elaboración del queso como el prensado, salado y maduración.

## **2.5 Proceso de elaboración del yogur**

Según el Real Decreto 271/2014 que establece la Norma de Calidad para yogur, en España, se entiende por “yogur” o “yoghourt” el producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada, leche concentrada, desnatadas o no, o de nata, o de mezcla de dos o más de dichos productos, con o sin la adición de otros ingredientes lácteos indicados en el apartado 2 del artículo 5 de esta norma, que previamente hayan sufrido un tratamiento térmico u otro tipo de tratamiento, equivalente, al menos, a la pasteurización. Las principales etapas en la fabricación del yogur se presentan en la Figura 2.14.



**Figura 2.14** Principales etapas del proceso de elaboración de yogur firme y batido. Reproducido de Lee y Lucey (2010).

### 2.5.1 Estandarización de la leche

Una de las características críticas de la leche utilizada para la elaboración de yogur es el contenido de sólidos no grasos (SNG), el cual en la leche de vaca es de 8,5 – 9,0%. Sin embargo los niveles de proteína (3,3% de los cuales 2,6% son caseína y 0,75% son proteínas del suero) no son suficientemente altos para obtener un producto de calidad satisfactoria, razón por la cual el primer paso en la elaboración del yogur es aumentar el contenido de SNG hasta alrededor de 14 – 16% (Robinson, 2000). El

contenido de sólidos en la leche puede aumentarse mediante procesos de concentración tales como evaporación a vacío, ósmosis inversa o UF o añadiendo leche en polvo, proteínas del suero en polvo o caseína en polvo. La estandarización de la leche puede también incluir la adición de otros ingredientes tales como estabilizantes o emulsionantes (utilizados para mejorar la textura final del producto), edulcorantes, colorantes y conservantes; sin embargo el uso de éstos depende de las regulaciones de cada país (Lee y Lucey, 2010).

### **2.5.2. Homogeneización de la leche**

Una vez se ha conseguido la composición deseada en términos de grasa, SNG y, si es aplicable, otros ingredientes, la leche usualmente es sometida a un proceso de homogeneización usando presiones de 15 – 20 MPa a 70 °C (Tamime, 2006). Esta etapa asegura la incorporación de los ingredientes y rompe los glóbulos de grasa hasta un tamaño uniforme alrededor de 1  $\mu\text{m}$ , lo que resulta esencial para prevenir la separación de la grasa por efecto de cremado. Además contribuye a mejorar la consistencia del producto y reduce la separación de suero (Sodini et al., 2004).

### **2.5.3 Tratamiento térmico de la leche**

La siguiente etapa en la elaboración del yogur es el tratamiento térmico de la leche. Las combinaciones temperatura – tiempo comúnmente usadas son 80 – 85 °C por 30 min o 90 – 95 °C por 5 min, siendo este último el tratamiento más común en la producción a gran escala (Tamime y Robinson, 1999). Según Krasaekoopt et al. (2003), el yogur elaborado con leche sometida a tratamiento con ultra alta temperatura (UHT > 135 °C por 2 – 4 s) tiene menor viscosidad y el gel es menos consistente comparado con los tratamientos térmicos convencionales, presentando también menor sinéresis.

El calentamiento de la leche por un periodo prolongado de tiempo altera las propiedades físico-químicas de las caseínas y desnaturaliza las proteínas del suero (más del 80% de la  $\beta$ -lactoglobulina se desnaturaliza por un tratamiento LHT). Como resultado, la  $\beta$ -lactoglobulina se une a la  $\kappa$ -caseína lo que mejora la textura (yogur

firme) o la viscosidad (yogur batido) del producto final (Tamime, 2006). Las proteínas desnaturalizadas del suero hacen que la gelificación se presente a pH más alto que en el caso de la leche sin tratamiento térmico (Lucey, 2002). El aumento en el número de enlaces entre partículas de proteína incrementa la rigidez del gel y su capacidad aparente de retención de agua, aunque esto depende también de la temperatura de incubación (Croguennec et al., 2004; Lee y Lucey, 2003).

Otras acciones importantes del tratamiento térmico son: 1) romper algunas proteínas del suero para liberar aminoácidos que estimulan la actividad del inóculo, 2) desairear la leche para proporcionar a las bacterias del inóculo un medio apropiado para su crecimiento y 3) destruir posibles patógenos no esporulados y reducir la microbiota nativa de la leche que podría competir con el inóculo (Robinson, 2000).

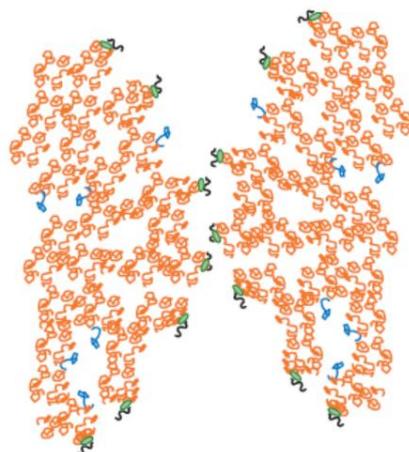
#### **2.5.4. Enfriamiento y adición del inóculo**

Una vez terminado el tratamiento térmico, la leche se enfría hasta la temperatura de incubación usando generalmente un intercambiador de calor de placas, e inmediatamente se añade el inóculo compuesto por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. En el caso del yogur firme la leche es dispensada en los envases individuales que saldrán luego al mercado, mientras que en el caso del yogur batido la leche es bombeada a tanques con aislamiento térmico que mantienen la temperatura durante el proceso de fermentación (Tamime, 2006).

#### **2.5.5 El proceso de coagulación ácida**

Durante la acidificación, los cambios ocurren no solo en la capa filamentosa de la micela, sino también en su estructura interna. La acidificación desde pH 6,6 hasta 5,3 causa la liberación progresiva de iones de fosfato de calcio, magnesio y citrato desde el interior de la micela (Le Graët y Gaucheron, 1999). Todo el fosfato inorgánico está solubilizado cuando se alcanza un pH de 5,2 y la mayor parte de los iones de calcio están solubilizados cuando se alcanza un pH de 4,6 (Le Graët y Gaucheron, 1999). En la superficie de las micelas la disminución en la carga de CMP con la reducción del pH causa el colapso de la capa de  $\kappa$ -caseína debido a que las interacciones dentro y entre las

cadena en el CMP no son suficientes para mantenerla extendida, lo que causa una disminución en la estabilización estérica de las micelas (de Kruif, 1999). Por consiguiente, las micelas pueden difundir más cerca una de la otra y tan pronto como las fuerzas de atracción aparecen, ocurre la transición sol-gel (Fig. 2.15) (Dalglish y Corredig, 2012).

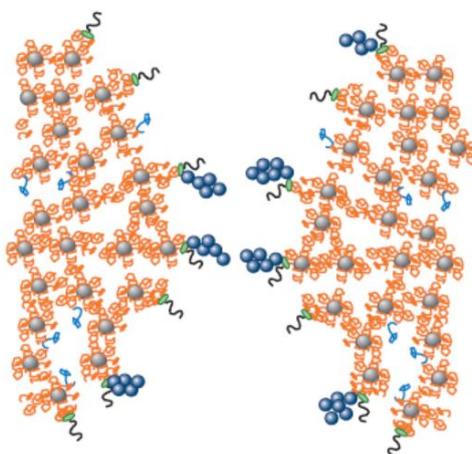


**Figura 2.15** Micelas acidificadas donde el fosfato de calcio se ha disuelto y la capa pilosa de  $\kappa$ -caseína ha colapsado (basado en el modelo de la Fig. 2.8). Naranja:  $\alpha_s$ -caseínas y  $\beta$ -caseínas; verde: para- $\kappa$ -caseína; negro: cadenas de caseinomacropeptido; azul: algunas  $\beta$ -caseínas que se unen hidrofóticamente a otras caseínas. Reproducido de Dalglish y Corredig (2012).

En leche sin tratamiento térmico la agregación ocurre a pH  $\sim$ 4,8 cerca del punto isoelectrónico de las caseínas (Rodríguez del Angel y Dalglish, 2005; Vasbinder et al. 2003a) y la red formada es débil debido a que las interfases entre las partículas más próximas están aún muy hidratadas; aunque colapsada, la capa de  $\kappa$ -caseína aún las separa una de la otra, haciendo el enlace entre ellas muy débil (Li y Dalglish, 2006).

En leche tratada térmicamente la presencia de agregados de proteínas del suero, en solución o en la superficie de las micelas es de gran importancia en la gelificación ácida (Lucey, 2002). Como se comentó antes, un tratamiento térmico intenso de la leche origina complejos entre las proteínas del suero desnaturalizadas y la  $\kappa$ -caseína micelar o en solución y también con la caseína  $\alpha_{s2}$ , generándose partículas con un rango de tamaño de 30 a 100 nm (Donato et al., 2007b; Donato y Dalglish, 2006; Anema y Li, 2003). Cuando se ha producido suficiente neutralización de la carga de los complejos dentro y fuera de las micelas de caseína, a pH  $\sim$ 5,3, los complejos de proteínas del suero

se unen a las micelas y forman puentes entre las partículas de proteína (Fig. 2.16) (Donato et al., 2007a).



**Figura 2.16** Micelas de leche tratada térmicamente con complejos de proteínas del suero unidos a la  $\kappa$ -caseína, que proporcionan puntos de unión durante la gelificación ácida (basado en el modelo de la Fig. 2.8). Reproducido de Dalgleish y Corredig (2012).

### 2.5.5.1 Factores que afectan al proceso de coagulación ácida

Como se ha comentado antes, el tratamiento térmico de la leche tiene un gran efecto sobre el proceso de coagulación ácida y sobre las características finales del gel. Las diferencias entre los mecanismos de agregación en leche con y sin tratamiento térmico han sido analizadas usando DWS y reología (Alexander y Dalgleish, 2005). En leche sin tratamiento térmico el descenso repentino en la movilidad de las micelas ocurre al mismo pH que el incremento rápido en el módulo elástico, sugiriendo que las interacciones intramicelares son la única influencia en la formación del gel ácido. En leche con tratamiento térmico, los cambios en la movilidad de las micelas ocurren a pH  $\sim 5,3$  y están acompañados por un incremento moderado en el módulo elástico, sin embargo, esto precede al aumento principal en el módulo elástico que sucede a pH  $\sim 4,8$ , donde comienza la formación de un gel rígido (Dalgleish y Corredig, 2012).

Aunque 42 – 43 °C es la temperatura típica de fermentación para yogur, utilizar temperaturas ligeramente más bajas (p. ej. 40 °C en lugar de 43 °C) produce un leve aumento en el tiempo de incubación, pero se forma un gel más firme y más viscoso, menos propenso a la sinéresis o a presentar defectos de textura grumosa después de la agitación (Lucey, 2002; Lee y Lucey, 2003). A temperatura de incubación más baja hay

un aumento en el tamaño de las partículas de caseína debido a una reducción en las interacciones hidrofóbicas, lo que a la vez ocasiona un aumento en el área de contacto entre las partículas de caseína (Lee y Lucey, 2003). Temperaturas de incubación altas también hacen que el gel sea más propenso a reestructuración y esos cambios pueden producir una mayor separación de suero (Mellema et al., 2002).

Para geles elaborados a la misma temperatura de incubación, el uso de un nivel de inóculo pequeño (p. ej. 0,5%) resulta en un gel más débil que si se usa un nivel de inóculo alto (p. ej. 4%) (Lee y Lucey, 2004). Probablemente, la acidificación más lenta proporciona más tiempo para la disolución del CCP, especialmente durante las primeras etapas de la gelificación (Tamime, 2006).

A medida que el pH desciende por debajo de 6,0, la carga negativa neta de las micelas de caseína, y por tanto la repulsión electrostática, decrecen, al tiempo que la velocidad de solubilización del CCP aumenta, lo que debilita la estructura interna de las micelas de caseína. Cuando el pH se acerca al punto isoeléctrico de la caseína (pH 4,6) la atracción entre partículas de caseína aumenta debido al incremento de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. El proceso de acidificación resulta en la formación de una red tridimensional conformada por agregados y cadenas de caseína (Lee y Lucey, 2010).

#### **2.5.6. Enfriamiento del yogur**

Para el yogur firme fermentado en envases individuales, el enfriamiento generalmente se logra soplando aire frío a través de la cámara de incubación o trasladando el producto a una cámara refrigerada. Este enfriamiento produce un aumento en la firmeza del gel debido al hinchamiento de las partículas de caseína a medida que se debilitan las interacciones hidrofóbicas y aumenta el área de contacto entre las partículas (Tamime, 2006). En el caso del yogur batido el enfriamiento requiere la circulación de agua (2 °C) a través de la doble pared del tanque de fermentación o también se suele realizar bombeando el yogur caliente a un sistema de enfriamiento tubular o de placas, aunque en este caso se debe tener cuidado para evitar ocasionar pérdida de viscosidad al producto (Anon, 2003; Afonso et al., 2003).

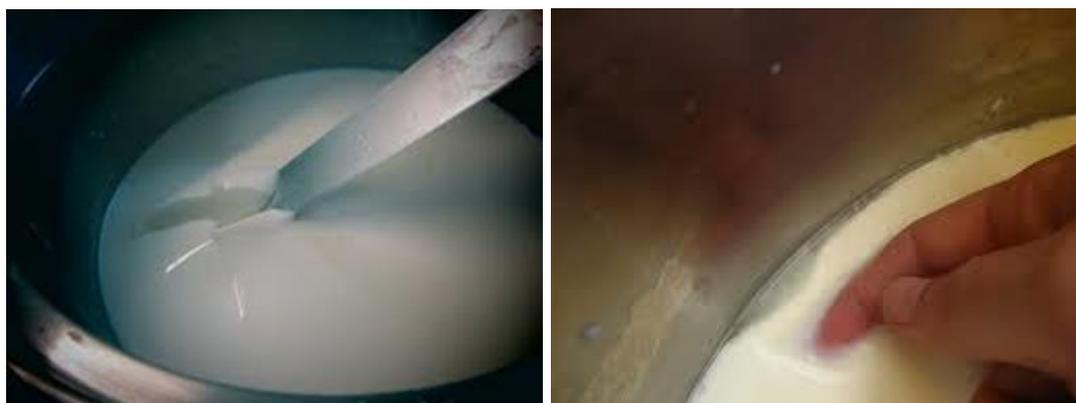
## **2.6 Utilización de sensores ópticos para la monitorización y control de procesos clave en la fabricación de queso y yogur**

El corte de la cuajada y la sinéresis podrían considerarse como dos de las etapas más importantes en la fabricación del queso debido a su alto impacto sobre el contenido de humedad, el rendimiento y la calidad final del producto (Fagan et al., 2007; Castillo, 2006). En cuanto a la elaboración de yogur, el control de la fermentación y la determinación del punto final de la misma, mediante un valor específico de pH o de acidez titulable, es indispensable para garantizar la homogeneidad del producto y el cumplimiento de regulaciones específicas.

Como se describió antes, un control apropiado del punto óptimo para el corte de la cuajada y del proceso de expulsión de suero permitiría minimizar las pérdidas de grasa y finos de caseína en el suero, y al mismo tiempo conseguir un nivel de humedad adecuado, según la variedad de queso a obtener, de tal forma que se maximice el rendimiento y se obtenga la calidad deseada de manera consistente.

Sin embargo, a pesar de la gran importancia de las dos etapas mencionadas antes en la fabricación del queso, actualmente el control de las mismas en la gran mayoría de industrias se realiza de forma empírica y subjetiva. El corte de la cuajada generalmente se realiza tras un tiempo prefijado a partir de la adición de la enzima, o con base en una evaluación subjetiva de las características de la cuajada realizada por un operario entrenado (Fig. 2.17), pero en ambas situaciones existe el riesgo de no cortar en el momento más oportuno. El corte tras un tiempo pre-establecido no tiene en cuenta el efecto de los diversos factores que influyen sobre la cinética de coagulación, tales como la variabilidad en la composición de la leche o en las condiciones de procesado; mientras que la decisión tomada por un operario recae sobre el entrenamiento y experiencia del mismo, por lo que no deja de tener un nivel de subjetividad.

En el caso de la sinéresis el control de ésta se realiza mediante la modificación de los factores pre-coagulación, directos e indirectos que la afectan y que se mencionaron antes, pero actualmente no existe a nivel comercial un sistema capaz de monitorizar y predecir “en línea” el curso de la sinéresis y la humedad final de la cuajada de una forma precisa.



**Figura 2.17** Evaluación subjetiva del momento de corte de la cuajada.

Se considera que las propiedades de coagulación de la leche (PCL) tienen un papel importante en la producción de queso, principalmente por su relación con el rendimiento quesero (Wedholm et al., 2006; Martin et al., 1997) y la calidad del queso (Johnson et al., 2001). Las PCL han sido ampliamente estudiadas en los últimos años y han sido propuestas como rasgos tecnológicos para incrementar la eficiencia de la industria láctea (Jõudu, 2008; Ikonen et al., 2004). Además se ha encontrado que las PCL tienen una variación genética con una heredabilidad de 15 a 41%, por lo que las PCL podrían ser mejoradas genéticamente (Vallas et al., 2010; Cassandro et al., 2008; Ikonen et al., 2004).

Comúnmente los principales rasgos de las PCL estudiadas son el tiempo de coagulación enzimático (RCT), que es el tiempo desde la adición del coagulante a la leche hasta el inicio de la coagulación, y la firmeza de la cuajada 30 min después de la adición del coagulante ( $A_{30}$  mm) (Bittante et al., 2012).

Se han utilizado muchas técnicas para medir las PCL y actualmente se encuentra disponibles un amplio rango de instrumentos mecánicos, vibratoriales, ultrasónicos, térmicos y ópticos (Klandar et al., 2007; Kubarsepp et al., 2005; O'Callaghan et al., 2002). La reología dinámica es usada frecuentemente en ensayos de laboratorio (Frederiksen et al., 2011; Jakob et al., 2011; Glantz et al., 2010) y el *Formagraph* (Foss Electric A/S, Hillerød, Dinamarca) es un equipo que permite analizar varias muestras simultáneamente y ha sido ampliamente usado por décadas (Bittante et al., 2012; Dal Zotto et al., 2008; McMahon y Brown, 1982). Castillo (2006) elaboró una exhaustiva

revisión de los métodos disponible hasta ese momento para la predicción del tiempo de corte.

Cipolat-Gotet et al. (2012) compararon el *Formagraph* y el *Optigraph* (OPT, Ysebaert, Frépillon, Francia) para la determinación de las PCL, encontrando que los resultados de las mediciones fueron muy diferentes entre ambos equipos. Cassandro et al. (2008) e Ikonen (2004) emplearon un equipo denominado *computerized renneting meter* (CRM, Polo Trade, Monselice, Italia) para determinar parámetros genéticos relacionados con las propiedades de coagulación de la leche. Vallas et al. (2010) usaron el *Optigraph* con un propósito similar al anterior, mientras que Jõudu (2008) emplearon un *Lattodinamografo* (LAT, Foss-Italia, Padova, Italia), equipo del mismo fabricante que ha sustituido al *Formagraph*, para estudiar el efecto de la composición proteica, contenidos de proteína y polimorfismo sobre las PCL. Según el principio con el que se realiza la medida, el CRM y el LAT son clasificados como sistemas mecánicos o reológicos (O'Callaghan et al., 2002), mientras que las medidas del OPT son realizadas con una señal óptica en infrarrojo cercano y por medio de una ecuación de calibración que transforma la señal óptica en valores de firmeza de la cuajada (Pretto et al., 2011; Dal Zotto et al., 2008, Kübarsepp et al., 2005).

La espectrometría de dispersión difusa múltiple (DWS) también ha sido usada como una técnica para estudiar la coagulación enzimática y ácida de la leche y se ha encontrado una relación directa entre DWS y la reología, sugiriendo la posibilidad de inferir la viscosidad y las propiedades viscoelásticas a partir de las medidas de DWS (Sandra et al., 2012, 2011, 2007; Donato et al., 2007a; Alexander y Dalglish, 2004; Hemar et al., 2004).

Recientemente la tecnología de espectroscopía de infrarrojo medio (MIRS) se ha propuesto como una metodología para la predicción rutinaria de las PCL a nivel de fábrica y para la obtención de registros durante largos periodos de tiempo (de Marchi et al., 2009). Sin embargo esa tecnología está basada en la determinación de una ecuación de calibración predicha a partir de los datos espectrales y un método de referencia y, por lo tanto, la existencia de diferentes metodologías para el análisis de las PCL sin un método para convertir los datos en valores equiparables, podría causar complicaciones (Pretto et al., 2011).

Blecker et al. (2012) utilizaron espectroscopía de fluorescencia sincrónica (SFS) para estudiar el efecto del tratamiento térmico y la temperatura de coagulación sobre la reología y la estructura molecular en leche desnatada coagulada enzimáticamente, concluyendo que la SFS es una técnica rápida y no destructiva que permite monitorizar la estructura de la red, las interacciones moleculares durante el proceso de coagulación y la determinación del tiempo de gelificación.

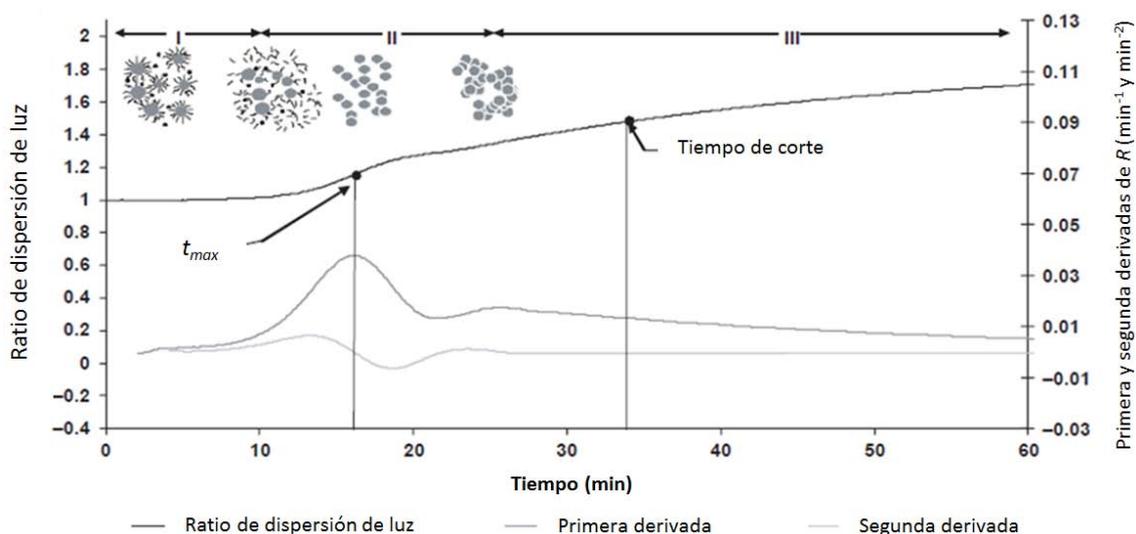
A nivel de planta, un sistema ideal de monitorización de la coagulación debería operar en línea en la cuba de proceso, no ser intrusivo ni destructivo y ser compatible con los requerimientos higiénicos (Klandar et al., 2007). El desarrollo de las fibras ópticas aplicado a la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas de la leche durante la coagulación, permitieron el desarrollo de un sensor que cumple con las características antes mencionadas. El CoAguLite® (Reflectronics Inc., Lexington, KY, USA) es un sensor que mide la dispersión de luz de infrarrojo cercano producida por la agregación de las partículas durante la coagulación de la leche. Este sensor ha demostrado ser uno de los métodos no destructivos más prometedores para la monitorización en línea de la coagulación de la leche y ya se encuentra disponible a nivel comercial para el control del tiempo de corte en la fabricación de queso, siendo de aplicación cada vez más frecuente en Estados Unidos.

La medición directa de la dispersión de luz, tal como aquella que se realiza a 880 nm por el sensor en línea CoAguLite, tiene la ventaja de que las medidas no dependen de una cierta longitud de onda comparado con las mediciones indirectas de dispersión de luz basadas en transmisión relativa como en el caso del *Optigraph* (Castillo, 2000).

En el CoAguLite, la luz emitida por un diodo se transfiere a la leche a través de una fibra óptica, y la luz dispersada se transmite a través de una fibra adyacente a un detector óptico que convierte la señal en un voltaje. Luego se obtiene un ratio de dispersión de luz ( $R$ ) dividiendo la salida de voltaje del detector a tiempo  $t$  sobre el voltaje inicial (Castillo et al., 2000). El perfil de dispersión de luz aumenta de forma sigmoidal a consecuencia del proceso de coagulación y contiene información sobre la agregación de las micelas de caseína y el endurecimiento del gel.

Como se muestra en la Figura 2.18, el perfil del ratio de dispersión de luz tiene un periodo de latencia que corresponde con la fase de reacción enzimática, en el que no

hay cambios detectables en la luz dispersada. Posteriormente se observa una forma sigmoideal en el perfil, como resultado del incremento en el tamaño de partícula debido a la unión de las caseínas y en el cual predominan las reacciones de agregación, seguido por un periodo asintótico durante el que continúan las uniones y entrecruzamientos correspondientes al endurecimiento de la cuajada (Payne y Castillo, 2007).



**Figura 2.18** Perfil del ratio de dispersión de luz con su primera y segunda derivadas en función del tiempo. (I) periodo de latencia, (II) periodo sigmoideal, (III) periodo asintótico. Reproducido de Payne y Castillo (2007).

A partir del perfil del ratio de dispersión de luz se obtiene el parámetro  $t_{max}$  (Fig. 2.18), que corresponde al tiempo desde la adición de la enzima hasta el punto de inflexión del perfil, que a su vez corresponde al máximo de su primera derivada. El parámetro  $t_{max}$  fue fuertemente correlacionado ( $R^2 = 0.9913$ ) con el tiempo de Coagulación de Berridge (Castillo et al., 2000) y la siguiente ecuación fue desarrollada por Payne et al. (1993) para predecir el tiempo de corte ( $t_{cut}$ ):  $t_{cut} = \beta t_{max}$ . El coeficiente  $\beta$  se obtuvo por calibración en planta para replicar el tiempo de corte evaluado por el maestro quesero. Adicionalmente, se ha estimado que un 78% de  $\kappa$ -caseína ha sido hidrolizada a tiempo  $t_{max}$  (Castillo et al., 2003a).

El sensor de dispersión de luz de infrarrojo cercano ha sido utilizado con éxito para monitorizar la coagulación de leches de vaca, cabra, oveja y mezclas de éstas, obteniéndose bajo diferentes condiciones de proceso, modelos de predicción del tiempo de corte bastante ajustados (Abdelgawad et al., 2014; Castillo et al., 2006a; Castillo et al., 2003b; Castillo et al., 2000; Payne et al., 1993).

El sensor CoAguLite fue evaluado por Castillo y colaboradores en la Universidad de Kentucky, para monitorizar simultáneamente la coagulación y la sinéresis, pero la respuesta del sensor durante la sinéresis tuvo un alto grado de dispersión debido a la mezcla de las dos fases: cuajada y suero (Castillo, 2015, comunicación personal). Este problema se atribuyó a que la fibra óptica empleada (0.6 mm de diámetro) tenía un campo de visión muy pequeño respecto al tamaño medio de los granos de cuajada (5 – 10 mm de diámetro). Por consiguiente se desarrolló un prototipo de sensor óptico con un campo de visión amplio (LFV, *Large Field View*) que demostró ser capaz de monitorizar la coagulación y la sinéresis simultáneamente, permitiendo obtener información relacionada con parámetros tales como el rendimiento de suero, la humedad de la cuajada y los niveles de grasa, proteína y sólidos en el suero (Castillo et al., 2005a).

Posteriormente Fagan et al. (2008) desarrollaron modelos de predicción de parámetros de sinéresis usando el sensor LFV, que fueron validados por Mateo et al. (2009b y 2009c). En los estudios citados antes se ha encontrado que el sensor LFV es capaz de detectar la velocidad y la magnitud de la sinéresis, permitiendo un mejor control del contenido de humedad en la cuajada tras el desuerado, por lo que dicha tecnología podría proporcionar mayor eficiencia y consistencia durante la producción de queso.

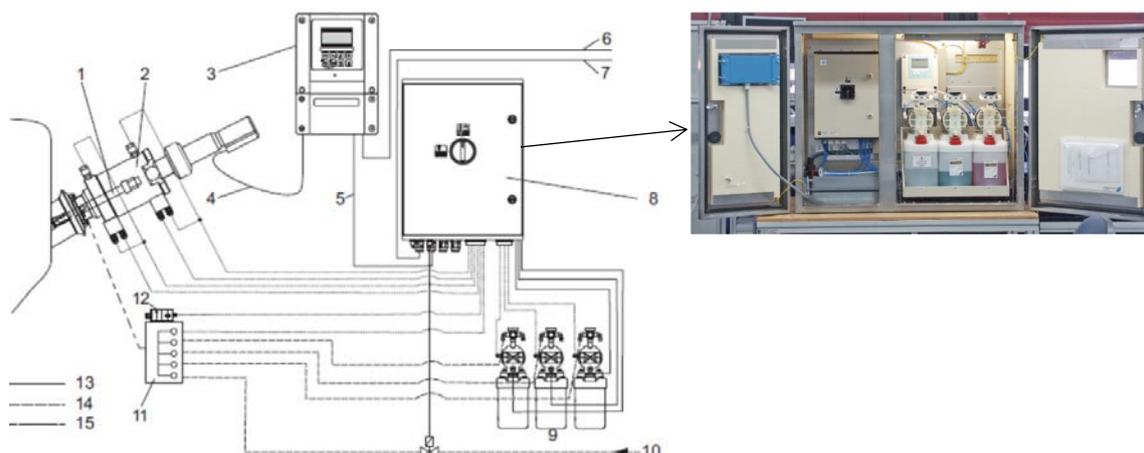
En el caso de la fabricación de yogur, la etapa de proceso clave que define las características de calidad del producto es la incubación, la cual determina la formación de ácido láctico, y se controla midiendo el pH hasta un valor final en el cual el producto alcanza la acidez deseada, por ejemplo, alrededor de  $\text{pH} = 4,6$  o 0,9% de ácido láctico, dependiendo del tipo de yogur producido, del método de enfriamiento utilizado o de la velocidad de transferencia de calor (Tamime y Robinson, 1999). En España según el RD 271/2014, el yogur debe tener un  $\text{pH} \leq 4,6$  y por motivos de seguridad alimentaria en otros países se tienen establecidas regulaciones similares.

Debido a la complejidad del proceso de fermentación y al gran número de factores involucrados, la predicción del punto final de la etapa de incubación es difícil, por lo que la práctica habitual es realizar un control empírico (Soukoulis et al., 2007).

Según el tamaño y el nivel de tecnología con que cuente la empresa, el control del punto final de la incubación del yogur se realiza de dos maneras: 1) mediante tomas sucesivas de muestras que son llevadas a un laboratorio donde se miden el pH y la acidez por titulación, 2) utilizando sondas de pH que permiten un control *in-line* durante todo el proceso. El primer método presenta desventajas tales como consumo de tiempo, riesgo de contaminación del producto, variación en las lecturas y dificultad para realizar un control preciso y oportuno del proceso. En cuanto al segundo método, el uso de electrodos de vidrio que constituían la opción más fiable, práctica y económica, está prácticamente en desuso, por inconvenientes tales como el riesgo de ruptura y la formación de depósitos de proteína que ocasionan distorsión en la lecturas y exigen dispendiosas labores de mantenimiento y calibración (de Brabandere y de Baerdemaeker, 1999).

Actualmente están disponibles electrodos irrompibles basados en la tecnología ISFET (*hydrogen ion-selective field effect transistor*), pero también requieren de labores permanentes de limpieza y calibración. Además no resisten las condiciones extremas de temperatura y pH durante los procesos de limpieza *in situ* (Wesstrom, 2001; [www.all-about-ph.com/](http://www.all-about-ph.com/)). Algunas compañías (p. ej. Endress+Hauser Inc. Greenwood, Indiana, USA) ofrecen complejos sistemas como el que se muestra en la Figura 2.19, en los que la sonda de pH puede ser retraída durante la limpieza *in situ*, limpiada, calibrada y vuelta a posicionar de forma automática.

Las mediciones manuales de pH tienen una variación mucho mayor comparada con aquellas realizadas en línea, aunque la misma persona esté realizando las mediciones manuales usando el mismo instrumento. La medición en línea proporciona un control más preciso y una respuesta más rápida a las variaciones en el proceso, mientras también ayuda a la reducción de costos (Wesstrom, 2001).



**Figura 2.19** Sensor de pH con sistema automático de limpieza y calibración (Endress+Hauser Inc. Greenwood, Indiana, USA). 1. Sensor de pH irrompible, 2. Conjunto portador del electrodo, 3. Transmisor, 4. Cable de conexión, 5. Cable de alimentación, 6. Suministro eléctrico al transmisor, 7. Suministro eléctrico a la unidad de limpieza y calibración, 8. Unidad de limpieza y calibración, 9. Bombas y botellas con soluciones para limpieza y calibración, 10. Línea de vapor y agua, 11. Bloque de aclarado, 12. Válvula para control de aclarado, 13. Cableado eléctrico, 14. Aire comprimido, 15. Líneas de soluciones de limpieza, soluciones tampón, vapor, etc.

El proceso de fermentación de la leche en la elaboración del yogur puede describirse adecuadamente por la evolución del pH y la viscosidad respecto al tiempo; el modelo que expresa la evolución del pH durante el tiempo de fermentación es el modelo modificado de Gompertz propuesto por de Brabandere y de Baerdemaeker (1999).

$$pH = pH_0 + (pH_\infty - pH_0) \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{e \cdot \mu}{pH_\infty - pH_0} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

donde  $pH_0$ ,  $pH_\infty$  son los valores inicial y final de pH respectivamente;  $\mu$  ( $\text{min}^{-1}$ ) es la velocidad máxima de disminución del pH con el tiempo y  $\lambda$  (min) es la duración de la fase lag de la curva de pH.

Adicionalmente, el modelo que describe la evolución de la viscosidad durante la fermentación es el modelo modificado de Gompertz propuesto por Soukoulis et al. (2007).

$$\mu_\alpha = \mu_{\alpha 0} + (\mu_{\alpha 0} - \mu_{\alpha \infty}) \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{e \cdot \mu_v}{(\mu_{\alpha 0} - \mu_{\alpha \infty})} \cdot (\lambda_v - t) + 1 \right] \right\}$$

donde  $\mu_{a0}$ ,  $\mu_{a\infty}$  (Pa·s) son los valores inicial y final de la viscosidad respectivamente;  $\mu_v$  ( $\text{min}^{-1}$ ) es la velocidad máxima de la viscosidad aparente y  $\lambda_v$  (min) es la duración de la fase *lag* de la curva de viscosidad.

En la industria de las bebidas lácteas fermentadas, la definición del tiempo óptimo de incubación es significativo no solo para la disminución de los costos, sino también para evitar el deterioro de las características de calidad del producto final. Desafortunadamente, en la actualidad no se cuenta con una técnica de monitorización en línea robusta, rápida y confiable que permita superar los problemas relacionados con la medición del pH.

Se han realizado varios estudios para encontrar algún método alternativo para monitorizar el proceso de incubación de yogur. Cimander et al. (2002) monitorizaron la fermentación de yogur a escala de laboratorio utilizando una nariz electrónica (EN) y sondas estándar de biorreactores, usando redes neuronales para integrar y analizar las señales y tratar de predecir los parámetros de proceso. Navrátil et al. (2004) utilizaron espectrometría NIR, datos de una nariz electrónica y la técnica de análisis de componentes principales para monitorizar la fermentación de yogur. El pH y el contenido de azúcar en diferentes marcas comerciales de yogur fueron medidos por Shao y He (2009) mediante la técnica de espectroscopía NIR. Sin embargo ninguno de los métodos evaluados en los estudios anteriores ha conseguido medir o predecir el pH final del proceso de fermentación con precisión aceptable. Además, dadas sus características y complejidad, no representan alternativas viables para la monitorización en línea de la incubación del yogur a nivel industrial. Soukoulis et al. (2007) monitorizaron la fermentación de yogur bajo diferentes condiciones de producción mediante un pH-metro y un viscosímetro, concluyendo que los perfiles de pH y viscosidad vs tiempo, resultado de la monitorización de la fermentación, pueden usarse para verificar la calidad del producto y además con propósitos predictivos o correctivos (p. ej. para detener el proceso de fermentación antes que los costos de operación y el deterioro de la calidad del producto hagan que el proceso no sea rentable).



## Capítulo 3

# Objetivos y plan de trabajo

### 3.1 Objetivos

#### Objetivo general

El objetivo general de esta investigación fue evaluar la aplicación de un sensor de dispersión de luz de infrarrojo próximo para la caracterización y monitorización de procesos en la elaboración de derivados lácteos bajos en grasa, específicamente en queso fresco y yogur firme con adición de inulina como sustituto de grasa.

#### Objetivos específicos

Para el logro del objetivo general propuesto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de la temperatura y la concentración de grasa, proteína, inulina y calcio sobre el perfil de dispersión de luz de infrarrojo cercano y los parámetros derivados de éste, durante la coagulación enzimática de geles lácteos.
2. Desarrollar y validar modelos de predicción de parámetros tecnológicos de coagulación y sinéresis para geles enzimáticos bajos en grasa según diferentes condiciones de procesamiento, utilizando predictores ópticos.

3. Evaluar la utilización de un sensor óptico, como herramienta alternativa a las sondas de pH, para monitorizar el proceso de incubación y controlar parámetros críticos de calidad en la elaboración de yogur.

### 3.2 Plan de trabajo

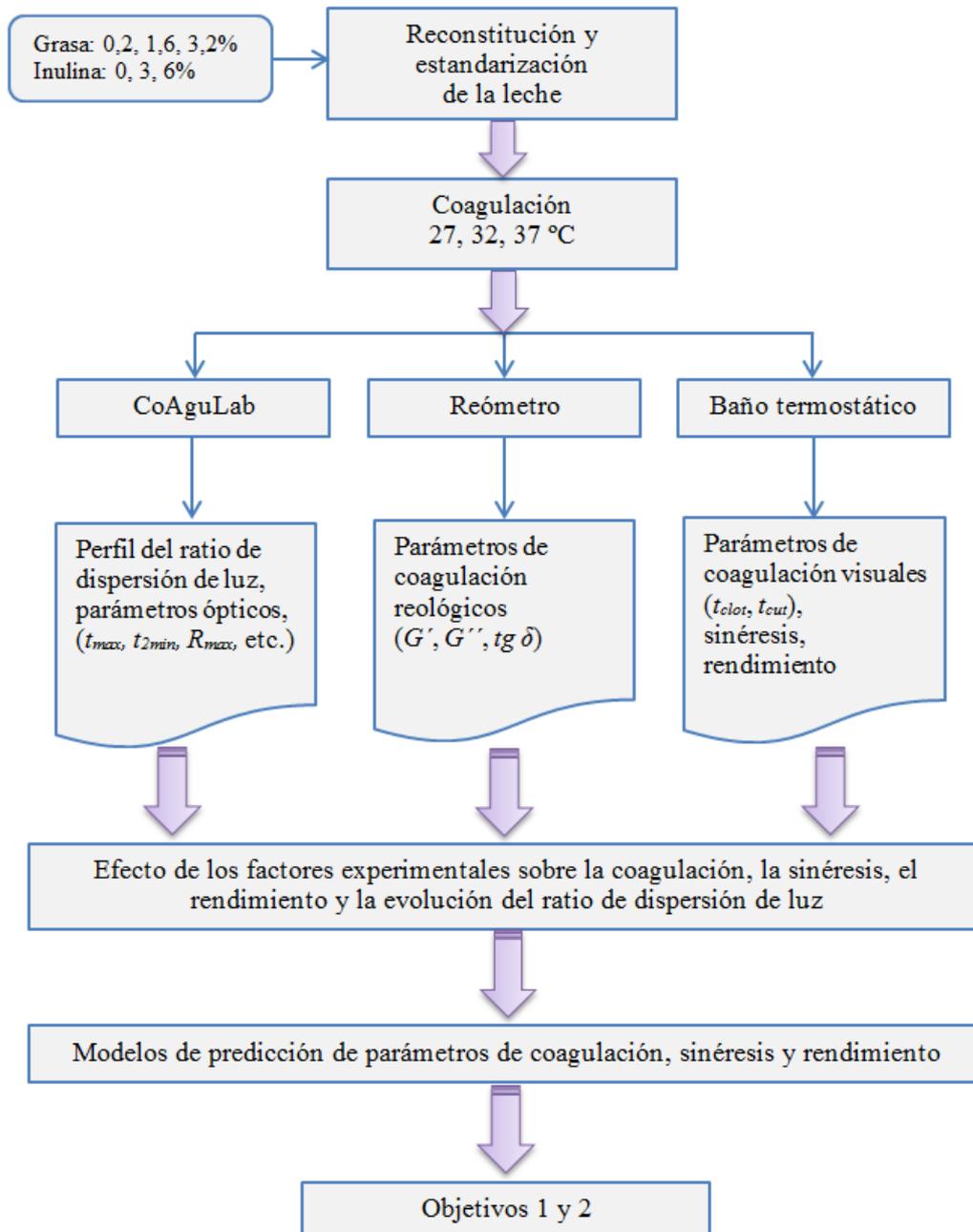
Para la consecución de los objetivos de esta tesis se llevaron a cabo cuatro experimentos. En el primer experimento (Fig. 3.1) se utilizó un sensor de fibra óptica de dispersión de luz a escala de laboratorio (CoAguLab, Reflectronics Inc., Lexington, Kentucky) para estudiar la coagulación de geles enzimáticos, evaluando el efecto de la temperatura de coagulación y de las concentraciones de grasa e inulina, así como también las interacciones entre estos factores sobre los parámetros de dispersión de luz relacionados con la coagulación y la sinéresis. A partir de la información generada se desarrollaron modelos de predicción de parámetros importantes para el control del proceso, tales como el tiempo de corte, la velocidad de la cinética de desuerado y el rendimiento de la cuajada. Los resultados de este experimento se presentan en los capítulos 5 y 6 de esta memoria.

El segundo experimento (Fig. 3.2) tuvo los mismos objetivos que el primero y se realizó de forma similar, pero esta vez se evaluó el efecto de las concentraciones de proteína, inulina y calcio y de las interacciones entre éstas variables. También se obtuvieron modelos de predicción de tiempos de gelificación y de corte para geles lácteos bajos en grasa considerando las variaciones en los niveles de proteína, inulina y calcio. Los resultados se presentan en el capítulo 7.

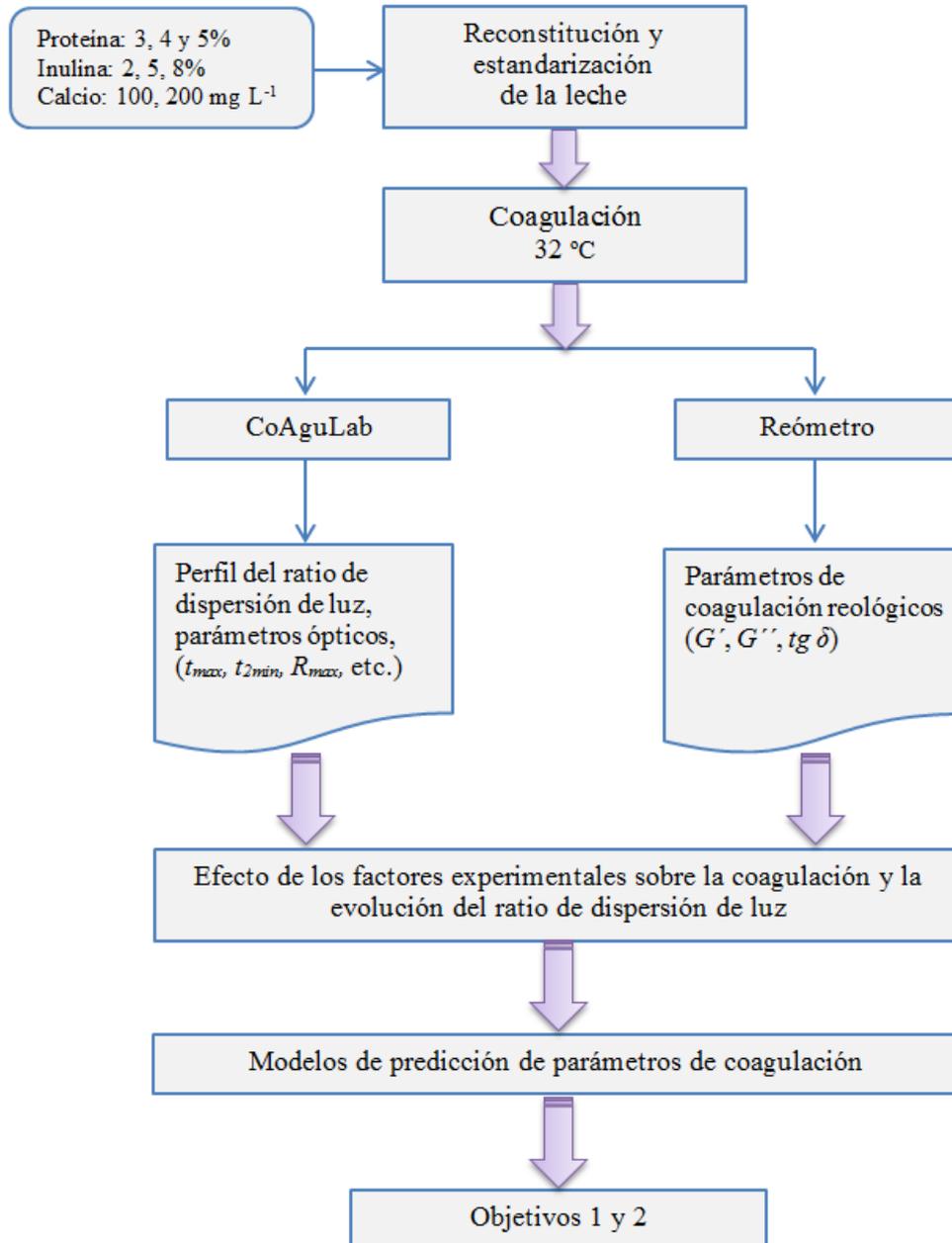
En el tercer experimento se procedió a la validación de los modelos de predicción obtenidos anteriormente y, adicionalmente, se estudió la expulsión de suero por centrifugación, como parámetro indicador de la estabilidad física de los geles con inulina y de su capacidad de retención de agua (Fig. 3.3). Este trabajo corresponde al capítulo 8 de la memoria de tesis.

El cuarto y último experimento que se presenta en el capítulo 9, tuvo por finalidad evaluar la aplicabilidad del sensor óptico como método alternativo a las sondas

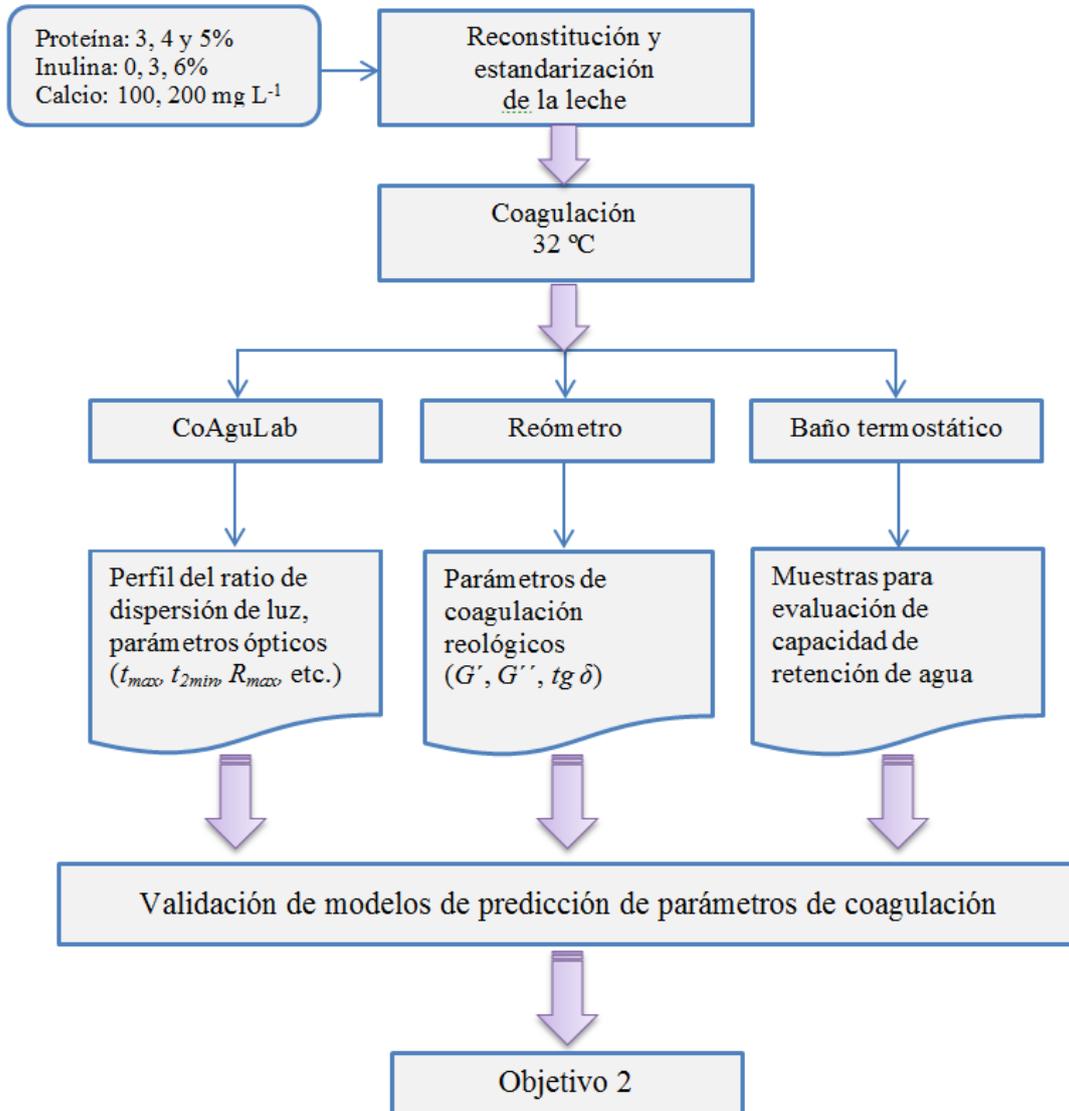
de pH para monitorizar el proceso de incubación durante la elaboración de yogur. Para ello se planteó un diseño experimental factorial que permitió evaluar el efecto de las concentraciones de grasa y de inulina, sobre el desarrollo de la coagulación ácida y las características finales del producto (Fig. 3.4). También se evaluaron la sinéresis espontánea y la capacidad de retención de agua por centrifugación.



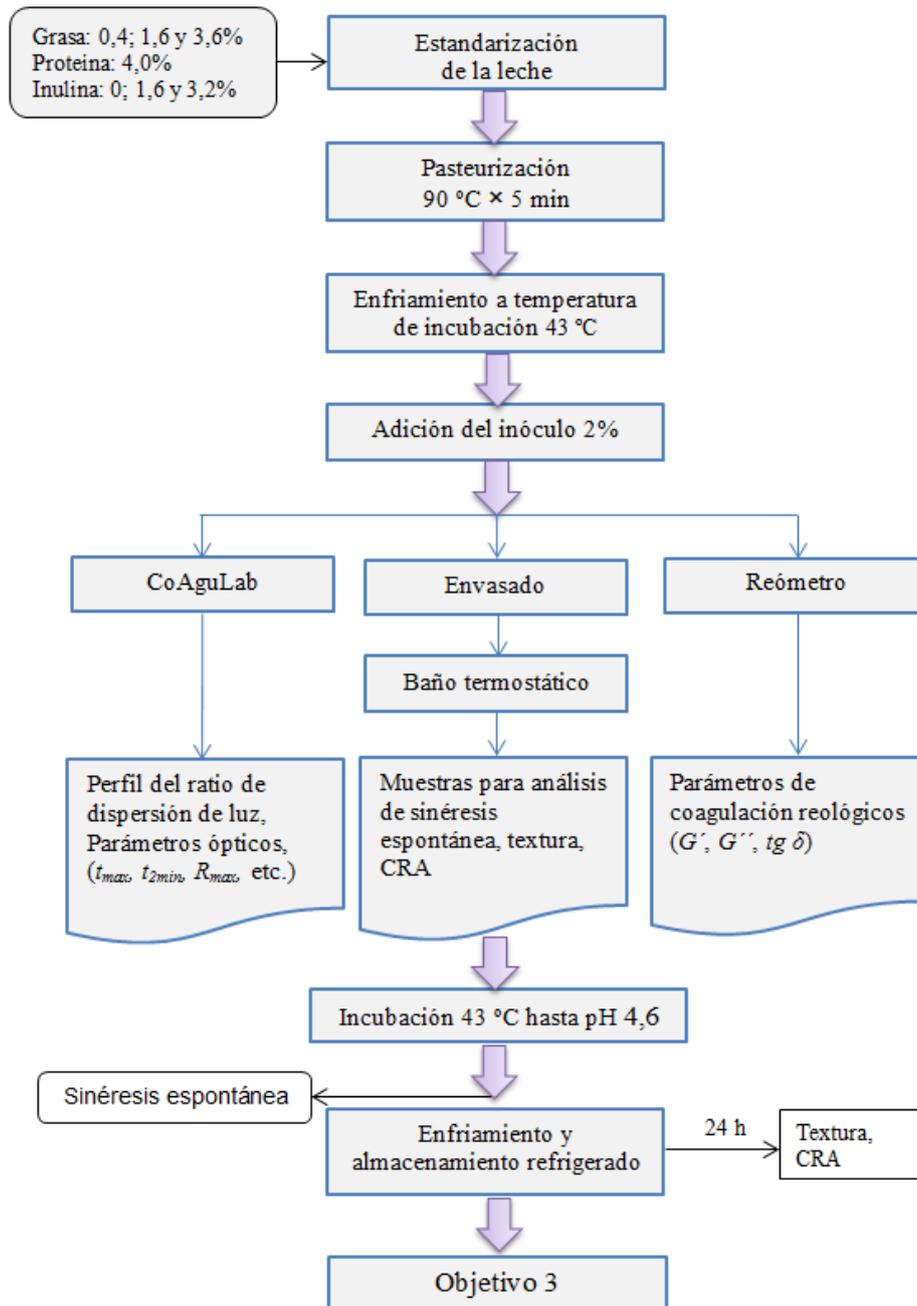
**Figura 3.1** Primer experimento: efecto de la temperatura de coagulación y de las concentraciones de grasa e inulina sobre los parámetros de dispersión de luz relacionados con la coagulación y la sinéresis.



**Figura 3.2** Segundo experimento: efecto de las concentraciones de proteína, inulina y calcio sobre los parámetros de dispersión de luz relacionados con la coagulación de geles enzimáticos bajos en grasa.



**Figura 3.3** Tercer experimento: validación del efecto de las concentraciones de proteína, inulina y calcio sobre la coagulación de geles enzimáticos bajos en grasa.



**Figura 3.4** Cuarto experimento: aplicabilidad del sensor óptico como método alternativo a las sondas de pH para monitorizar el proceso de incubación durante la elaboración de yogur firme. CRA, capacidad de retención de agua.

## Capítulo 4

# Materiales y métodos

En este capítulo se describen los materiales y métodos que son comunes en diferentes experimentos, reservándose la descripción de la metodología específica a los capítulos correspondientes.

### 4.1 Reconstitución de la leche

Con el fin de reducir la variabilidad inherente a la composición de la leche fresca, en los experimentos de coagulación enzimática (capítulos 5, 6, 7, y 8) se trabajó con leche reconstituida a partir de leche en polvo desnatada elaborada a baja temperatura (Chr Hansen, Barcelona, España). Como fuente de grasa se utilizó nata extraída mediante centrifugación a partir de leche fresca obtenida de una granja local (S.A.T. Can Badó Santa Agnés, Barcelona, España). Una vez extraída, la nata se envasó en tubos de ensayo de 11 mL y se sometió a un proceso de pasteurización en un baño termostático a 63 °C durante 30 min e inmediatamente se almacenó en una cámara de refrigeración a 4 °C hasta el momento de su utilización. Los contenidos de proteína y de grasa de la leche reconstituida y de la nata se determinaron mediante los métodos de Dumas (IDF, 2002) y Gerber (AOAC, 1995) respectivamente.

Para la estandarización de las muestras de leche se llevaron a cabo balances de materia, con ayuda de una plantilla en Excel, para ajustar las proporciones de proteína, grasa e inulina en función del tratamiento a realizar. Una vez calculadas las cantidades adecuadas de cada materia prima, la cantidad de leche en polvo correspondiente se disolvió en agua destilada a una temperatura de ~43 °C usando una placa de calefacción

con agitación. Luego se añadió lentamente la inulina (Frutafit® TEX, Brenntag Química S.A., Barcelona) con agitación fuerte para evitar la formación de grumos. La nata se atemperó a 30 °C en un baño termostático, se agitó suavemente, se pesó la cantidad requerida en un vaso de precipitados y se adicionó a la leche, realizando luego un enjuague del recipiente para arrastrar completamente la nata y minimizar el error experimental.

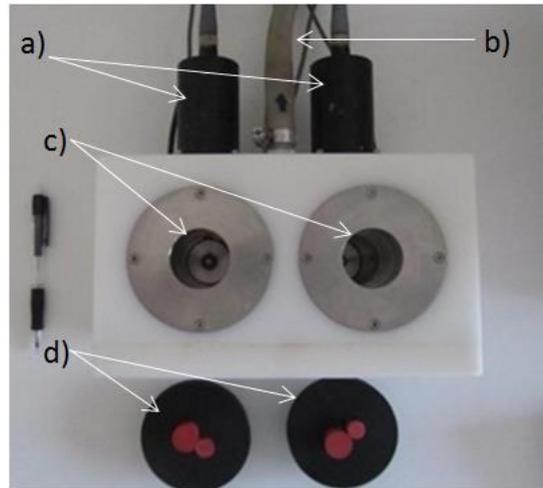
#### **4.2 Enzima e inulina**

Se utilizó como coagulante quimosina recombinante 100% (CHY-MAXs extra; EC 3.4.23.4, isozyme B, 600 IMCU mL<sup>-1</sup>) suministrada por Chr. Hansen Inc. (Chr. Hansen Barcelona, España). La enzima se almacenó en refrigeración a 4 °C y se adicionó en una concentración de 100  $\mu$ L kg<sup>-1</sup> de leche al iniciar los ensayos.

La inulina utilizada fue Frutafit® TEX, suministrada por Brenntag Química S.A. (Barcelona), con un contenido de inulina  $\geq 99,5\%$  en base seca. Este tipo de inulina que es extraída de raíces de achicoria, presenta un grado medio de polimerización  $\geq 23$  y una estructura amorfa (Glibowski y Pikus, 2011).

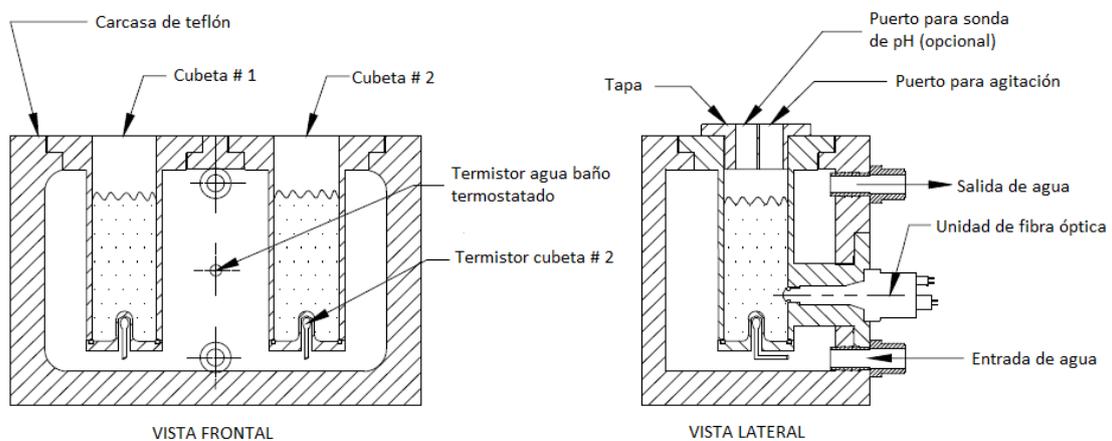
#### **4.3 Determinación de parámetros ópticos de dispersión NIR**

El CoAguLab, equipo empleado para determinar la dispersión de luz de infrarrojo cercano durante la coagulación de la leche fue diseñado en la Universidad de Kentucky. Cuenta con dos cubetas que permiten monitorizar la coagulación en dos muestras simultáneamente, cada una de ellas con la instrumentación necesaria para medir la dispersión de luz NIR, la temperatura y el pH durante la coagulación (Fig. 4.1). Las dimensiones de las cubetas son 36 mm de diámetro y 115 mm de profundidad. Están fabricadas en acero inoxidable pulido para fácil limpieza y tienen una capacidad máxima de 98 mL. Durante los ensayos se utilizó una tapa plástica para cubrir cada cubeta y evitar el enfriamiento de la muestra por evaporación. Se usaron termistores lineales (Modelo OL-710-PP, Omega Engineering, Stamford, CT) para medir la temperatura de la leche en ambos compartimentos y del agua circulante procedente del baño termostático.



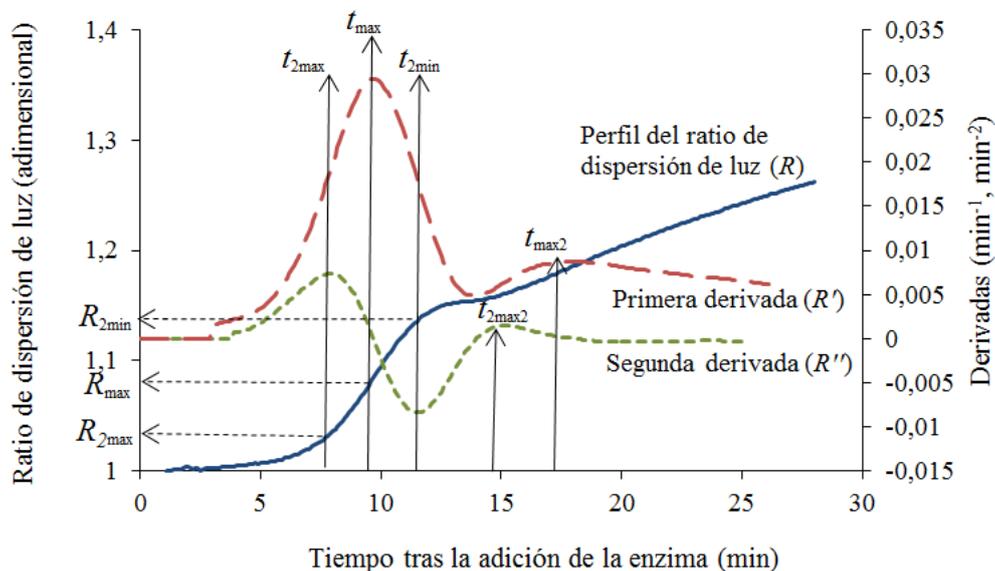
**Figura 4.1** Vista superior del CoAguLab mostrando: a) sensores ópticos, b) salida de agua para control de temperatura (la entrada de agua se encuentra debajo), c) cubetas de acero inoxidable donde se depositan las muestras, d) tapas plásticas para evitar evaporación superficial, con posibilidad de insertar electrodos de pH.

La dispersión de luz de infrarrojo cercano a 880 nm se midió mediante una unidad de fibra óptica (Modelo 5, Reflectronics, Inc., Lexington, KY) que dirige la luz infrarroja generada por un diodo de emisión de luz (LED Modelo L2791, Hamamatsu Corp., Bridgewater, NJ) hasta la muestra de leche a través de una fibra óptica de 600  $\mu\text{m}$  de diámetro. La luz dispersada por la muestra a 180° retorna a través de una segunda fibra óptica idéntica a la descrita anteriormente hasta un detector de silicio (Modelo TSL250, TAOS, Plano, TX). Un esquema detallado del equipo se puede apreciar en la Figura 4.2.



**Figura 4.2** Esquema del equipo empleado para determinar la dispersión de luz de infrarrojo cercano durante la coagulación de la leche (adaptado de Tabayehnejad, 2011).

El sensor cuantifica la luz dispersada, que es linealmente convertida en una señal de 4-20 mA, que a través de una resistencia de 250  $\Omega$ , proporciona un voltaje de 1 a 5 V. El voltaje se mide cada 2 s, en función de la intensidad de la luz dispersada, almacenándose cada 6 s la media de tres medidas. Los primeros 10 registros de voltaje (1 min de datos), corregidos con respecto al valor cero de dispersión (1 V) y promediados, constituyen el voltaje inicial ( $V_0$ ). El sistema calcula a tiempo real un ratio de dispersión de luz, construyendo un perfil con respecto al tiempo (Fig. 4.3). El ratio de dispersión de luz ( $R$ ) se calcula mediante división del voltaje medido a cada tiempo (-1 V correspondiente al cero de dispersión) por  $V_0$ . También se calcula a tiempo real la primera derivada del ratio de dispersión de luz con respecto al tiempo ( $R'$ ), empleando lotes de 4 min de las medidas más recientes (41 puntos). La pendiente de cada lote de datos se calcula mediante regresión lineal cada 6 s, y se asigna al punto medio de cada lote de datos. De forma análoga se obtiene la segunda derivada ( $R''$ ) (Castillo *et al.* 2000).



**Figura 4.3** Perfil típico del ratio de dispersión de luz con sus respectivas derivadas y parámetros ópticos resultantes.

Acorde con el trabajo de Castillo (2001), se establecieron varios parámetros ópticos de tiempo (min) correspondientes a los máximos y mínimos de las derivadas como se muestra en la Figura 4.3, los cuales se definen de la siguiente manera:

$t_{max}$ : tiempo transcurrido desde la adición de enzima hasta el primer máximo de la primera derivada (min).

$t_{max2}$ : tiempo transcurrido desde la adición de enzima hasta el segundo máximo de la primera derivada (min).

$t_{2max}$ : tiempo desde la adición de enzima hasta el primer máximo de la segunda derivada (min).

$t_{2max2}$ : tiempo desde la adición de enzima hasta el segundo máximo de la segunda derivada (min).

$t_{2min}$ : tiempo desde la adición de enzima hasta el primer mínimo de la segunda derivada (min).

$t_{2min2}$ : tiempo desde la adición de enzima hasta el segundo mínimo de la segunda derivada (min).

$R_{max}$ : el valor del ratio de dispersión de luz ( $R$ ) a tiempo  $t_{max}$ .

$R_{2min}$ : el valor  $R$  a tiempo  $t_{2min}$ .

$R_{2max}$ : el valor  $R$  a tiempo  $t_{2max}$ .

$R_{2max2}$ : el valor  $R$  a tiempo  $t_{2max2}$ .

$R_{2min2}$ : el valor  $R$  a tiempo  $t_{2min2}$ .

$R'_{max}$ : el valor de la primera derivada de  $R$  a tiempo  $t_{max}$ .

$R'_{max2}$ : el valor de la primera derivada de  $R$  a tiempo  $t_{max2}$ .

$R'_{2max}$ : el valor de la primera derivada de  $R$  a tiempo  $t_{2max}$ .

$R'_{2min}$ : el valor de la primera derivada de  $R$  a tiempo  $t_{2min}$ .

#### 4.4 Determinación de parámetros reológicos

El proceso de coagulación de la leche fue monitorizado mediante reología oscilatoria de pequeña amplitud (SAOR) utilizando un reómetro ThermoHaake RS1 (Thermo-Haake GmbH, Karlsruhe, Alemania), acoplado a un baño termostático Haake SC100 (Thermo Scientific) para el control preciso de la temperatura y conectado a un compresor CARAT 106/E (FIAC S.P.A., Bologna, Italia). Se utilizó un sensor con geometría de cilindros concéntricos (Z34) con diámetros de 34 mm y 36,88 mm para los cilindros interno y externo respectivamente. Los ensayos con coagulación enzimática (experimentos 1, 2 y 3) se realizaron aplicando una deformación de 3%, mientras que en aquellos con coagulación ácida (experimento 4) la deformación aplicada fue de 1%, las

cuales se encuentran dentro de la región de viscoelasticidad lineal para este tipo de geles (Lucey et al., 1997a; Zoon et al., 1988b); en ambos casos la frecuencia fue de 1 Hz. Una alícuota de 40 mL de leche tras la adición de la enzima o del inóculo, atemperada a la temperatura del ensayo, se depositó en el cilindro del reómetro y una capa delgada de aceite mineral se puso en la superficie para evitar pérdidas por evaporación y enfriamiento superficial. Los datos reológicos se almacenaron cada ~25 s mediante el programa Rheowin 3 Job Manager (Haake Rheowin Job Manager 3.61 2007, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemania) instalado en un ordenador conectado al reómetro. Los parámetros que se determinaron fueron el módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ) y  $tg \delta$  ( $tg \delta = G''/G'$ ). El tiempo de gelificación ( $t_{G'1}$ ) se definió como el tiempo en que los geles alcanzaron un  $G' = 1$  Pa (Peng et al., 2009; Lucey et al., 1997a). Para el caso de los geles enzimáticos se determinaron además otros parámetros como  $t_{G'30}$  y  $t_{G'60}$  correspondientes a los tiempos a los cuales  $G'$  alcanzó valores de 30 Pa y 60 Pa respectivamente;  $t_{F30}$  y  $t_{F60}$  que hacen referencia a los tiempos transcurridos entre  $G' = 1$  Pa y  $G' = 30$  y 60 Pa respectivamente, y que representan el tiempo de endurecimiento. Del mismo modo, los parámetros  $tg \delta_{30Pa}$  y  $tg \delta_{60Pa}$  se refieren al valor de  $tg \delta$  cuando  $G' = 30$  y 60 Pa respectivamente. Adicionalmente, el parámetro  $tg \delta_{30min}$  corresponde al valor de  $tg \delta$  medido 30 min después de la adición de la enzima.

Se cronometró el lapso de tiempo transcurrido desde la adición de la enzima (en el caso de los experimentos con coagulación enzimática) o del inóculo (en el caso del experimento con yogur), hasta el momento de la puesta en marcha de los programas de monitorización del CoAguLab y del reómetro, con el fin de corregir posteriormente los parámetros de tiempo obtenidos en ambos sistemas de monitorización de la coagulación.

#### 4.5 Análisis estadístico

Todos los datos fueron procesados y analizados utilizando “*Statistical Analysis System*” (SAS, versión 9, 2009, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU). Los coeficientes de correlación de Pearson se determinaron con el procedimiento *Correlación (CORR)*, mientras que los análisis de varianza (ANOVA) se realizaron usando el procedimiento *Modelo Lineal General (GLM)*. En los modelos estadísticos se introdujeron los factores

del diseño experimental como efectos principales, incluyéndose en el análisis las interacciones más importantes entre los factores estudiados. El efecto aleatorio ejercido sobre los parámetros estudiados por diversas variables no fijas se consideró mediante la inclusión de covariables en los modelos. Tras un análisis preliminar de los datos, se eliminaron todas aquellas interacciones y covariables que no contribuyeron significativamente a la variabilidad de los datos. Las medias de mínimos cuadrados (LSMEANS) y la significación de cada tratamiento se calcularon usando la suma de cuadrados tipo IV. Las diferencias entre las medias de los diversos tratamientos se consideraron significativamente diferentes cuando  $P < 0,05$ . Finalmente, también se evaluaron regresiones lineales de varios modelos diferentes utilizando los procedimientos GLM, NLIN y máximo  $R^2$  de SAS frente a los datos experimentales para la obtención de los modelos de predicción.



## Capítulo 5

# Estudio de la coagulación de geles enzimáticos bajos en grasa mediante un sensor óptico: efecto de temperatura, grasa e inulina

### Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la sustitución de grasa por inulina sobre las propiedades reológicas, la cinética de coagulación y la sinéresis de geles enzimáticos lácteos. Se utilizó un diseño factorial completamente aleatorio con tres niveles de inulina (0, 3 y 6%), dos niveles de grasa (< 0,2 y 1,5%) y tres niveles de temperatura de coagulación (27, 32 y 37 °C). El diseño experimental se repitió tres veces. El proceso de coagulación fue monitorizado utilizando un sensor óptico de dispersión de infrarrojo cercano, además de parámetros reológicos y visuales. La sinéresis se evaluó por métodos volumétricos. La adición de inulina produjo un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) en la velocidad de las reacciones de agregación y endurecimiento de los geles lácteos. Este efecto, que fue más evidente en la reacción de agregación, dependió de la concentración de inulina y de la temperatura de coagulación. La adición de inulina como sustituto de grasa en niveles del 6% produjo una disminución de ~36% en el tiempo de corte reológico, una reducción significativa en la sinéresis y un aumento de ~30% en el rendimiento de la cuajada, afectando así a la cinética de coagulación y al tiempo de corte. El sensor óptico puede ser útil para la monitorización de este tipo de geles lácteos y por tanto en el control de la gelificación de los mismos.

**Palabras clave:** Inulina, geles enzimáticos lácteos, dispersión de luz, sensor NIR, reología, sinéresis.

## 5.1 Introducción

Durante los últimos años se ha incrementado el conocimiento y la preocupación de los consumidores acerca de la relación entre dieta y salud, lo que ha originado una tendencia a reducir el consumo de alimentos ricos en grasa (Lashkari, et al, 2014). Muchos tipos de queso representan una fuente significativa de grasa dietética, pero la reducción de su contenido representa un reto tecnológico, ya que la fracción lipídica altera las propiedades reológicas y, por tanto, la textura y la funcionalidad del producto (Zhou y Mulvaney, 1998).

La inulina tiene propiedades tecnológicas y funcionales que han permitido su utilización como sustituto de grasa en productos lácteos, adicionalmente es fuente de fibra dietética y se han demostrado sus efectos benéficos sobre la salud (Meyer et al., 2011; Kalyani et al., 2010; Roberfroid, 2007; Kip et al., 2006).

Se han desarrollado varias investigaciones sobre el efecto de distintos biopolímeros y fuentes de fibra dietética en las propiedades reológicas y la microestructura de geles de caseína obtenidos por coagulación enzimática. Tan et al. (2007) indicaron que el incremento de  $\kappa$ -carragenina, goma guar y goma xantana produjo una disminución en los tiempos de agregación y de gelificación, y un incremento de la sinéresis en geles lácteos. Sin embargo, según dichos autores, la adición de pectina y gelatina produjo el efecto contrario, aumentando ambos tiempos y disminuyendo la sinéresis. Fagan et al. (2006) también estudiaron el efecto de la adición de distintos tipos de fibra en la cinética de coagulación de la leche encontrando que se requieren niveles de adición de inulina superiores al 2% para reducir los tiempos de gelificación y de coagulación.

Hennelly et al. (2006) estudiaron la sustitución de grasa por inulina en matrices imitación de queso encontrando que ésta puede reemplazar hasta un 63% de la grasa sin afectar las características de fusión del queso. La inulina ha sido usada exitosamente

como sustituto parcial de grasa en queso mozzarella (Pagliarini y Beatrice, 1994) y, cuando se adicionó en quesos frescos en niveles de hasta  $100 \text{ g kg}^{-1}$ , no afectó el aroma del producto (Gijs et al., 2000).

Como se ha mencionado, la adición de inulina modifica las características reológicas, microestructurales y texturales de los geles de caseína y, por lo tanto, también debe tener efecto sobre la sinéresis. La sinéresis es importante porque la humedad de la cuajada depende de la cantidad de suero expulsada, lo que afecta considerablemente al rendimiento, a los procesos de maduración y como consecuencia a las características sensoriales, las propiedades funcionales y texturales y la vida útil del queso (Calvo y Balcones, 2000). La sinéresis depende de factores como la composición de la leche, la firmeza del gel, las condiciones de corte y procesamiento, la temperatura y la acidificación, entre otros (Dejmek y Walstra, 2004; Pearse y Mackinlay, 1989). Por ello, para estandarizar la calidad del queso, todas las variables que afectan a la tasa de drenaje del suero deben ser controladas durante el proceso.

La tecnología de sensores ópticos ha sido probada como herramienta útil para monitorizar la coagulación de la leche. En particular, el sensor de fibra óptica de dispersión NIR CoAguLite™ es un sensor en línea que ha sido bien documentado para monitorizar la coagulación de la leche y predecir tiempos de gelificación y de corte (Castillo, 2001).

A pesar de que existen muchos estudios que evalúan cómo la inulina afecta las características reológicas y sensoriales de diferentes derivados lácteos, existe aún poca información acerca de la influencia de la inulina sobre diversos parámetros de interés en la elaboración de quesos como los tiempos de gelificación y de corte, la sinéresis y el rendimiento de la cuajada, razón por la que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la sustitución de grasa por inulina sobre las propiedades reológicas, la cinética de coagulación y la sinéresis de geles lácteos mediante el empleo de un sensor de dispersión de luz de infrarrojo próximo.

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental con 3 factores: temperatura de coagulación (27, 32 y 37 °C), concentración de inulina (0, 3 y 6%) y concentración de grasa (0,2 y 1,5%). El experimento se replicó 3 veces obteniendo un total de 54 ensayos que se realizaron de manera completamente aleatoria. Las concentraciones de proteína (3,3%), enzima (100  $\mu\text{L kg}^{-1}$ ), calcio (156  $\text{mg kg}^{-1}$ ) y el pH (6,6) se mantuvieron constantes con el fin de reducir la variabilidad y observar mejor el efecto de los factores principales. Los niveles de inulina se eligieron de acuerdo con resultados de estudios previos (Juan et al., 2013) y considerando que según la normativa europea, la inulina como fuente de fibra debe estar presente en el alimento en cantidades mayores o iguales a 3% (Regulation (EC) N° 1924/2006 of the European Parliament, of 20 December 2006).

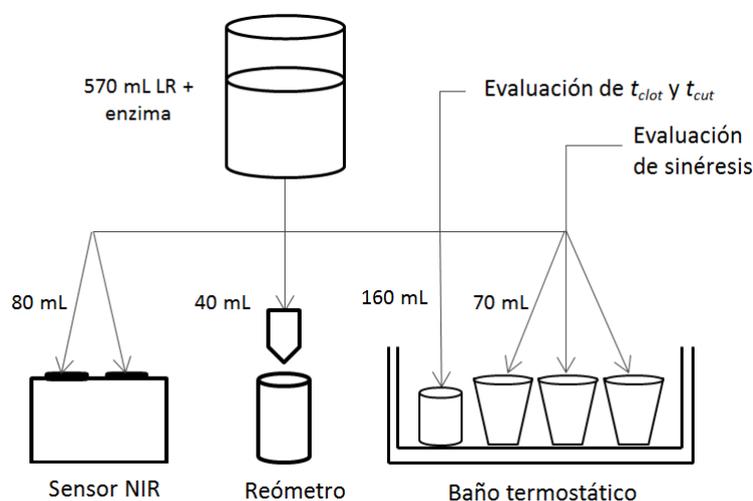
La coagulación se monitorizó utilizando parámetros visuales, parámetros ópticos (NIR) y parámetros reológicos. La cinética del proceso de desuerado fue determinada mediante ensayos de tipo volumétrico. Los diferentes tipos de ensayos realizados, incluyendo los de sinéresis, se desarrollaron en paralelo tomando como tiempo cero el momento en el cual se adicionó la enzima a la leche.

### 5.2.2 Procedimiento de los ensayos

En cada ensayo se utilizaron 570 mL de leche reconstituida (LR) (según procedimiento descrito en la sección 4.1 de Materiales y Métodos) con los niveles correspondientes de grasa, proteína e inulina, que se atemperó a la temperatura requerida en un baño termostático. El vaso de precipitados que contenía la leche se cubrió con *parafilm* para evitar la evaporación y el correspondiente enfriamiento superficial de la muestra. En la Figura 5.1 se presenta un esquema de la distribución de la muestra en los ensayos.

Una vez que la leche alcanzó la temperatura requerida se adicionó la enzima con una micropipeta y se agitó vigorosamente con una espátula durante 20 s. Inmediatamente, dos alícuotas de ~80 mL se depositaron en las cubetas del sensor

óptico y se dio inicio al programa de monitorización del ratio de dispersión NIR, y otra alícuota de 40 mL se depositó en el reómetro y se puso en marcha el programa de adquisición de datos respectivo.



**Figura 5.1** Distribución de la muestra en los ensayos.

Para realizar el seguimiento de los parámetros visuales de tiempo de coagulación ( $t_{clot}$ ) y de corte ( $t_{cut}$ ), otra alícuota de ~160 mL de leche con enzima se depositó rápidamente en un vaso de precipitado de 250 mL, que se mantuvo dentro del baño termostático cubierto con parafilm. Finalmente se tomaron 3 alícuotas de ~70 mL cada una y se depositaron en vasos plásticos que también se mantuvieron en el baño termostático a la temperatura del ensayo para realizar el corte de la cuajada y evaluar la sinéresis una vez que el gel alcanzara 30 Pa de dureza ( $G' = 30$  Pa medido mediante el reómetro). Todo el procedimiento de distribución de las muestras se llevó a cabo en un tiempo medio de ~2 min y se tuvo cuidado de minimizar las variaciones de temperatura.

### 5.2.3 Determinación de los parámetros visuales

La técnica empleada para evaluar el tiempo de coagulación visual ( $t_{clot}$ ) constituye una adaptación del tiempo de coagulación de Berridge (IDF, 2007). Se utilizó una espátula que se introdujo sucesivamente en el gel hasta el momento en el que fue perceptible visualmente la aparición de pequeños flóculos de caseína en la superficie de la espátula (Nicolau et al., 2011). El tiempo de corte visual ( $t_{cut}$ ) se determinó de

acuerdo con el procedimiento descrito por Castillo et al. (2000), utilizando una varilla de vidrio con bordes redondeados de 0,3 cm de diámetro y 15 cm de longitud que se introdujo repetidamente en el gel hasta el fondo del vaso hasta que se mantuvo de forma vertical por un tiempo de 3 s sin ser sostenida. A partir de este momento, para la confirmación del tiempo de corte se usó una espátula con la que se separó el gel de las paredes del vaso de precipitados, hasta que la separación era completamente limpia y el gel oponía una resistencia elástica sin llegar a romperse al ser forzado hacia el centro del vaso con la espátula.

#### 5.2.4 Evaluación de la sinéresis

En cada ensayo, la sinéresis se evaluó por triplicado utilizando 3 moldes empleados comercialmente para el desuerado de quesos frescos. Cada molde estaba compuesto por dos recipientes plásticos con forma de cono truncado. Las dimensiones del recipiente externo eran 117 mm de altura, 90 mm de diámetro en la base menor y 99 mm de diámetro en la base mayor. El recipiente interno consistió de una canastilla plástica perforada en toda su superficie con dimensiones: 88 mm de altura, 87 mm de diámetro en la base menor y 96 mm de diámetro en la base mayor. La canastilla ajustaba perfectamente dentro del recipiente externo y quedaba fija en un tope ubicado a 20 mm de la superficie, quedando una separación entre la base de ambos recipientes de aproximadamente 20 mm. Esta canastilla se utilizó para contener la cuajada con el fin de evitar su salida mientras se drenaba el suero (Fig. 5.2).

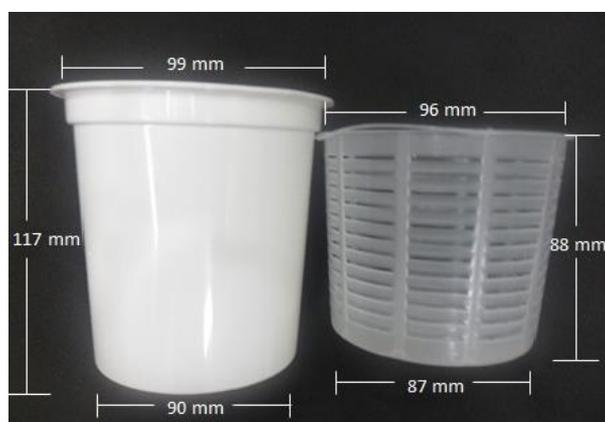


Figura 5.2 Moldes de queso usados para evaluar la cinética de la sinéresis.

Tres alícuotas de 70 mL de leche con enzima fueron depositadas en cada uno de los recipientes internos de los moldes, que se mantuvieron a la temperatura del ensayo en un baño termostático. Cuando el valor de  $G'$  de la muestra alcanzó 30 Pa se procedió a realizar cortes en la cuajada utilizando un "cutter" para obtener prismas de base cuadrada con aristas de aproximadamente 10 mm. El tiempo al cual se completa el corte de la cuajada fue establecido como el tiempo de inicio del desuerado ( $t = 0$  min). Al momento de realizar la primera medición, el recipiente con la cuajada se retiró del baño termostático, se invirtió en un ángulo de  $45^\circ$  y se dejó drenar el suero durante un tiempo de 30 s, recogiéndolo en un vaso de precipitados colocado sobre una balanza tarada. Inmediatamente tras la medición, el vaso se colocó nuevamente en el baño termostático hasta la siguiente medición. Las mediciones se hicieron de forma sucesiva cada 5 min hasta el tiempo  $t = 40$  min. A partir de este momento, las mediciones se realizaron cada 10 min hasta  $t = 90$  min, y posteriormente se realizaron 2 mediciones cada media hora hasta completar un periodo de tiempo de 150 min de drenado de suero.

Puesto que ha sido ampliamente confirmado en estudios previos que la expulsión del suero a partir del gel de coagulación enzimática sigue una cinética de primer orden (Marshall, 1982; Peri et al., 1985), es este estudio se asumió dicha cinética para describir los datos de sinéresis, que se ajustaron a la siguiente ecuación de primer orden:

$$W = W_\infty(1 - e^{-kt})$$

donde  $W$  es el peso del suero (g) a tiempo  $t$  (min),  $W_\infty$  es la masa de suero drenado (g) a tiempo infinito y  $k$  es la constante cinética del proceso de sinéresis. La masa total de suero drenado acumulado durante 150 min tras el corte de la cuajada fue definida como  $W_A$  (g). El rendimiento de la cuajada (sin agitación),  $R_c$ , fue calculado como el cociente entre el peso final de la cuajada tras 150 min de drenado y el peso inicial de la leche, expresado en porcentaje. Debido a que en este estudio la adición de inulina implicó retirar una proporción equivalente de agua en el proceso de reconstitución de la leche, se decidió calcular el suero expulsado respecto al contenido inicial de agua en la muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$W_E = \frac{W_A}{hm \times pm} \times 100$$

donde  $W_E$  es el porcentaje de suero expulsado,  $hm$  es la humedad inicial de la muestra (en tanto por uno) y  $pm$  es el peso de la muestra. Podría también considerarse que el inverso de  $W_E$  corresponde a la capacidad de retención de agua del gel ( $CRA$ ).

### 5.2.5 Monitorización de la coagulación de la leche

La metodología empleada para la monitorización de la coagulación mediante el sensor de dispersión de luz NIR y la determinación de los parámetros reológicos se describió en el capítulo 4, secciones 4.3 y 4.4 respectivamente.

### 5.3 Resultados y discusión

El proceso de coagulación de la leche reconstituida fue monitorizado simultáneamente mediante métodos ópticos y reológicos, así como por observación visual. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) preliminar para determinar las fuentes de variación principales en las variables dependientes. Los efectos principales seleccionados fueron la temperatura del ensayo ( $T$ ), el porcentaje de inulina adicionado ( $In$ ), la concentración de grasa en la leche ( $G$ ) y la réplica ( $Rep$ ). También se incluyeron las interacciones temperatura – inulina ( $TxIn$ ), temperatura – grasa ( $TxG$ ) e inulina – grasa ( $InxG$ ); mientras que la relación proteína–grasa ( $RPG$ ) y el pH se introdujeron como covariables (Tabla 5.1).

Se observaron efectos significativos ( $P < 0,05$ ) de la temperatura sobre todas las variables dependientes evaluadas con excepción de  $W_\infty$ , mientras que el efecto de la concentración de inulina fue significativo sobre todas las variables excepto  $W_\infty$ ,  $W_A$ ,  $t_{2max2}$ ,  $t_{2min2}$ ,  $t_{F60}$ ,  $tg \delta_{30Pa}$  y  $tg \delta_{60Pa}$ . La concentración de grasa sólo tuvo efecto significativo sobre  $t_{2max2}$ .

El efecto de la interacción  $TxIn$  fue significativo sobre las variables  $t_{clot}$ ,  $t_{cut}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{max2}$ ,  $t_{G'1}$ ,  $t_{G'30}$ ,  $t_{F30}$ ,  $tg \delta_{30Pa}$  y  $tg \delta_{60Pa}$ . La interacción  $TxG$  sólo tuvo efecto significativo sobre la variable  $tg \delta_{30Pa}$ . En cuanto a la réplica, ésta se mantuvo en el modelo debido a que se observaron efectos significativos sobre las variables  $k$ ,  $t_{cut}$ ,  $t_{2min}$ ,  $t_{G'1}$ ,  $t_{G'30}$  y  $t_{F30}$ , lo

que se atribuyó a una disminución de la actividad de la enzima coagulante a lo largo del experimento.

**Tabla 5.1** Análisis de la varianza y estadísticos F del efecto de la temperatura, la grasa, la inulina y sus interacciones sobre los parámetros ópticos, reológicos y de sinéresis.

Modelo	Fuente de variación								
		<i>T</i> ( <i>GL</i> =2)	<i>In</i> ( <i>GL</i> =2)	<i>G</i> ( <i>GL</i> =1)	<i>TxIn</i> ( <i>GL</i> =4)	<i>TxG</i> ( <i>GL</i> =2)	<i>InxG</i> ( <i>GL</i> =2)	<i>Rep</i> ( <i>GL</i> =2)	
Parámetros	R <sup>2</sup>	F	F	F	F	F	F	F	
<i>k</i>	0,907	20,8***	119***	47,4***	0,00 <sup>ns</sup>	0,55 <sup>ns</sup>	0,37 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>	6,94**
<i>R<sub>c</sub></i>	0,756	6,57***	39,8***	11,7***	0,29 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>	0,36 <sup>ns</sup>	0,69 <sup>ns</sup>	1,99 <sup>ns</sup>
<i>W<sub>∞</sub></i>	0,285	0,84 <sup>ns</sup>	0,98 <sup>ns</sup>	0,90 <sup>ns</sup>	0,97 <sup>ns</sup>	1,11 <sup>ns</sup>	2,23 <sup>ns</sup>	0,38 <sup>ns</sup>	0,76 <sup>ns</sup>
<i>W<sub>A</sub></i>	0,557	2,66*	15,2***	2,97 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	0,51 <sup>ns</sup>	2,56 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>
<i>W<sub>E</sub></i>	0,690	4,71***	15,0***	10,2**	0,66 <sup>ns</sup>	0,46 <sup>ns</sup>	2,41 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>
<i>t<sub>clot</sub></i>	0,977	88,0***	580***	126***	0,43 <sup>ns</sup>	14,9***	0,21 <sup>ns</sup>	0,40 <sup>ns</sup>	3,05 <sup>ns</sup>
<i>t<sub>cut</sub></i>	0,974	81,1***	541***	75,8***	0,11 <sup>ns</sup>	26,2***	1,79 <sup>ns</sup>	0,75 <sup>ns</sup>	5,14*
<i>t<sub>max</sub></i>	0,950	40,6***	269***	62,2***	0,00 <sup>ns</sup>	3,35*	0,20 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	2,56 <sup>ns</sup>
<i>t<sub>max2</sub></i>	0,911	15,8***	75,1***	10,1**	2,41 <sup>ns</sup>	2,84*	2,09 <sup>ns</sup>	0,42 <sup>ns</sup>	0,93 <sup>ns</sup>
<i>t<sub>2max</sub></i>	0,893	17,7***	129***	17,0***	0,06 <sup>ns</sup>	0,19 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>ns</sup>	1,79 <sup>ns</sup>
<i>t<sub>2min</sub></i>	0,951	41,7***	274***	66,3***	0,18 <sup>ns</sup>	2,30 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>	4,14*
<i>t<sub>2max2</sub></i>	0,652	2,22*	4,53*	1,48 <sup>ns</sup>	6,28*	0,20 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	1,66 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>ns</sup>
<i>t<sub>2min2</sub></i>	0,590	2,20*	8,61*	0,28 <sup>ns</sup>	0,79 <sup>ns</sup>	0,21 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>ns</sup>	0,78 <sup>ns</sup>
<i>t<sub>G'1</sub></i>	0,974	79,8***	474***	139***	0,09 <sup>ns</sup>	21,7***	0,91 <sup>ns</sup>	0,81 <sup>ns</sup>	3,64*
<i>t<sub>G'30</sub></i>	0,971	72,0***	476***	68,7***	0,02 <sup>ns</sup>	24,2***	1,33 <sup>ns</sup>	1,13 <sup>ns</sup>	3,86*
<i>t<sub>G'60</sub></i>	0,780	7,54***	51,4***	4,49*	1,21 <sup>ns</sup>	0,83 <sup>ns</sup>	0,36 <sup>ns</sup>	0,48 <sup>ns</sup>	2,76 <sup>ns</sup>
<i>t<sub>F30</sub></i>	0,965	58,3***	394***	45,2***	0,01 <sup>ns</sup>	21,7***	1,21 <sup>ns</sup>	1,43 <sup>ns</sup>	3,33*
<i>t<sub>F60</sub></i>	0,734	5,85***	39,8***	2,69 <sup>ns</sup>	1,26 <sup>ns</sup>	0,52 <sup>ns</sup>	0,41 <sup>ns</sup>	0,53 <sup>ns</sup>	2,62 <sup>ns</sup>
<i>tg δ<sub>30Pa</sub></i>	0,997	795***	6647***	1,17 <sup>ns</sup>	2,39 <sup>ns</sup>	39,8***	4,33*	1,68 <sup>ns</sup>	1,45 <sup>ns</sup>
<i>tg δ<sub>60Pa</sub></i>	0,956	44,7***	361***	2,09 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	2,96*	2,48 <sup>ns</sup>	1,89 <sup>ns</sup>	0,79 <sup>ns</sup>

*N* = 54; *T*, temperatura; *In*, porcentaje de inulina; *G*, porcentaje de grasa; *TxIn*, interacción temperatura-inulina; *TxG*, interacción temperatura-grasa; *InxG*, interacción inulina-grasa; *Rep*, réplica; *R*<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; *F*, estadístico del ANOVA; *GL*, grados de libertad; \**P*<0,05, \*\**P*<0,001, \*\*\**P*<0,0001; <sup>ns</sup>, no significativo. Para la definición de las variables dependientes véase el capítulo 4 (materiales y métodos generales) y la sección de materiales y métodos de éste capítulo.

### 5.3.1 Efecto de los factores experimentales sobre la coagulación y las propiedades reológicas del gel

#### 5.3.1.1 Efecto de la temperatura

En la Tabla 5.2 se puede observar que el incremento de la temperatura produjo una disminución significativa (*P* < 0,05) en todos los parámetros de dispersión (*t<sub>max</sub>*,

$t_{max2}$ ,  $t_{2max}$ ,  $t_{2min}$ ,  $t_{2max2}$ ,  $t_{2min2}$ ) analizados durante el proceso de coagulación de la leche reconstituída.

**Tabla 5.2** Influencia de los efectos principales (temperatura y concentración de inulina) sobre los parámetros ópticos, reológicos y de sinéresis<sup>1,2</sup>

	Efectos principales					
	Temperatura (°C)			Inulina (%)		
	27	32	37	0	3	6
$k$ (min <sup>-1</sup> )	0,024 <sup>a</sup>	0,029 <sup>b</sup>	0,035 <sup>c</sup>	0,033 <sup>a</sup>	0,029 <sup>b</sup>	0,025 <sup>c</sup>
$R_c$ (%)	31,5 <sup>a</sup>	29,1 <sup>b</sup>	25,8 <sup>c</sup>	27,3 <sup>a</sup>	28,7 <sup>b</sup>	30,4 <sup>c</sup>
$W_\infty$ (g)	50,3 <sup>a</sup>	49,6 <sup>a</sup>	50,3 <sup>a</sup>	50,0 <sup>a</sup>	50,0 <sup>a</sup>	50,2 <sup>a</sup>
$W_A$ (g)	47,4 <sup>a</sup>	48,2 <sup>a</sup>	49,9 <sup>b</sup>	49,1 <sup>a</sup>	48,5 <sup>ab</sup>	47,9 <sup>b</sup>
$W_E$ (%)	80,2 <sup>a</sup>	81,6 <sup>a</sup>	84,5 <sup>b</sup>	80,3 <sup>a</sup>	82,0 <sup>b</sup>	84,0 <sup>c</sup>
$t_{clot}$ (min)	17,2 <sup>a</sup>	11,6 <sup>b</sup>	9,36 <sup>c</sup>	14,8 <sup>a</sup>	12,4 <sup>b</sup>	11,0 <sup>c</sup>
$t_{cut}$ (min)	65,9 <sup>a</sup>	30,0 <sup>b</sup>	20,7 <sup>c</sup>	49,0 <sup>a</sup>	35,7 <sup>b</sup>	31,9 <sup>c</sup>
$t_{max}$ (min)	12,3 <sup>a</sup>	9,12 <sup>b</sup>	7,77 <sup>c</sup>	10,9 <sup>a</sup>	9,55 <sup>b</sup>	8,70 <sup>c</sup>
$t_{max2}$ (min)	20,6 <sup>a</sup>	13,4 <sup>b</sup>	7,94 <sup>c</sup>	15,8 <sup>a</sup>	13,4 <sup>b</sup>	12,8 <sup>b</sup>
$t_{2max}$ (min)	9,78 <sup>a</sup>	7,55 <sup>b</sup>	6,43 <sup>c</sup>	8,59 <sup>a</sup>	7,8 <sup>b</sup>	7,35 <sup>c</sup>
$t_{2min}$ (min)	14,0 <sup>a</sup>	10,6 <sup>b</sup>	8,91 <sup>c</sup>	12,6 <sup>a</sup>	11,0 <sup>b</sup>	9,98 <sup>c</sup>
$t_{2max2}$ (min)	-	11,5 <sup>a</sup>	6,51 <sup>b</sup>	-	10,9 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>
$t_{2min2}$ (min)	19,8 <sup>a</sup>	14,3 <sup>b</sup>	8,75 <sup>b</sup>	14,6 <sup>a</sup>	14,2 <sup>a</sup>	14,0 <sup>a</sup>
$t_{G'1}$ (min)	21,9 <sup>a</sup>	14,1 <sup>b</sup>	11,6 <sup>c</sup>	19,0 <sup>a</sup>	15,3 <sup>b</sup>	13,3 <sup>c</sup>
$t_{G'30}$ (min)	70,4 <sup>a</sup>	31,5 <sup>b</sup>	22,1 <sup>c</sup>	52,3 <sup>a</sup>	37,9 <sup>b</sup>	33,7 <sup>c</sup>
$t_{G'60}$ (min)	112 <sup>a</sup>	48,6 <sup>b</sup>	33,0 <sup>b</sup>	78,8 <sup>a</sup>	61,1 <sup>b</sup>	54,4 <sup>b</sup>
$t_{F30}$ (min)	48,5 <sup>a</sup>	17,4 <sup>b</sup>	10,5 <sup>c</sup>	33,3 <sup>a</sup>	22,4 <sup>b</sup>	20,5 <sup>b</sup>
$t_{F60}$ (min)	90,9 <sup>a</sup>	34,5 <sup>b</sup>	21,4 <sup>b</sup>	59,6 <sup>a</sup>	45,5 <sup>ab</sup>	40,8 <sup>b</sup>
$tg \delta_{30Pa}$ (adim)	0,244 <sup>a</sup>	0,262 <sup>b</sup>	0,291 <sup>c</sup>	0,265 <sup>a</sup>	0,265 <sup>a</sup>	0,265 <sup>a</sup>
$tg \delta_{60Pa}$ (adim)	0,241 <sup>a</sup>	0,255 <sup>b</sup>	0,283 <sup>c</sup>	0,262 <sup>a</sup>	0,258 <sup>a</sup>	0,260 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>LSM con las mismas letras no fueron significativamente diferentes (P<0,05); las comparaciones son solo para cada factor; número de réplicas = 3; número de observaciones, N = 27. <sup>2</sup>Para la definición de las variables dependientes ver la sección de materiales y métodos.

El mismo efecto fue observado sobre los parámetros visuales  $t_{clot}$  y  $t_{cut}$  y sobre los parámetros reológicos  $t_{G'1}$ ,  $t_{G'30}$ ,  $t_{F30}$ ,  $t_{F60}$  y  $t_{G'60}$ , pero en los dos últimos las diferencias solo fueron significativas entre 27 y 37 °C. Al incrementar la temperatura de coagulación de 27 a 37 °C se observó una reducción de 69% para el parámetro  $t_{cut}$  y de 37% para el parámetro  $t_{max}$ .

Dado que el parámetro óptico  $R'_{max}$  se define como el máximo valor de  $dR/dt$ , este se utilizó para calcular una aproximación de los coeficientes de temperatura ( $Q_{10}$ )

en las condiciones de este estudio (27 – 37 °C). Los valores aparentes de  $Q_{10}$  obtenidos en la leche con 0,2% de grasa fueron 3,1, 2,8 y 2,4 para las muestras con 0, 3 y 6% de inulina, respectivamente, observándose que la adición de inulina atenúa el efecto de la temperatura sobre la velocidad de coagulación. Castillo et al. (2003b) calcularon el valor de  $Q_{10}$  en el intervalo de temperatura de 25 – 35 °C, utilizando el mismo parámetro óptico, obteniendo un valor de 2,2, que es muy cercano a lo encontrado en el presente estudio. La diferencia puede atribuirse a que el intervalo de temperaturas evaluado en el estudio de Castillo et al. (2003b) fue inferior. También es necesario precisar que los valores de  $Q_{10}$  calculados a partir del parámetro óptico  $R'_{max}$  reflejan el efecto combinado de la fase de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína y el inicio de la fase de agregación.

Los indicadores de coagulación reológicos mostraron una reducción significativa con el incremento de la temperatura. Al incrementarse la temperatura de 27 a 37 °C el tiempo de gelificación ( $t_{G'1}$ ) y el tiempo que tarda  $G'$  en alcanzar 30 Pa ( $t_{G'30}$ ) disminuyeron 47 y 69%, respectivamente. La magnitud de  $G'$  depende del número y la fuerza de los enlaces entre las partículas de caseína y también de la estructura y distribución espacial de las cadenas de caseína en la red del gel (Tranchant, 2000). Se considera que la tasa de incremento en los valores de  $G'$  después de la gelificación se debe a la reorganización, la fusión y a la incorporación de más partículas de caseína a la red tridimensional proteica (Zoon et al., 1988a; van Vliet, 2000). Zoon et al. (1988b) observaron que la tasa de reorganización para geles formados a alta temperatura (p. ej., 40 °C) es mayor y las interacciones entre las partículas de caseína son más débiles. Algunos estudios también señalan que los geles lácteos formados a alta temperatura están menos interconectados y tienen “clusters” de agregados de caseína más densos posiblemente a causa de una mayor reorganización de las partículas (Lagoueyte et al., 1994; Lucey, et al., 1997b).

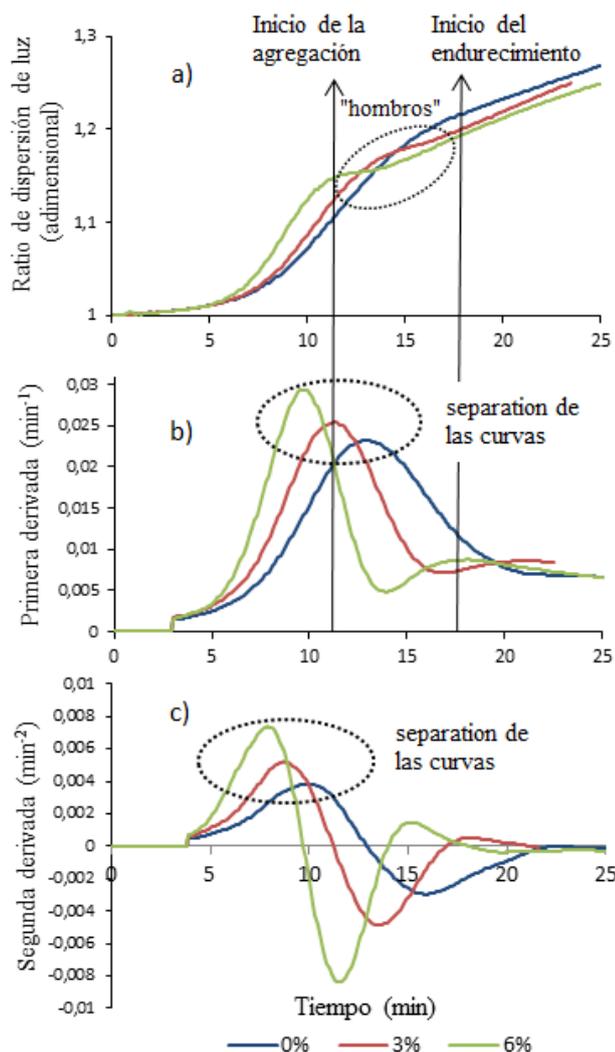
Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este estudio para los parámetros reológicos  $tg \delta_{30Pa}$  y  $tg \delta_{60Pa}$  los cuales incrementaron significativamente con la temperatura, lo que indica un comportamiento menos elástico del gel. El parámetro  $tg \delta$  está determinado por la estructura de las uniones o enlaces entre las partículas de caseína a escala molecular, y no por estructuras mesoscópicas o macroscópicas (Mellema et al., 2002). En geles lácteos un incremento en  $tg \delta$  está asociado con una

mayor capacidad de reorganización de la red y una mayor tendencia a la sinéresis (van Vliet et al., 1991). El incremento observado en los valores de  $tg \delta$  con la temperatura coincide con lo encontrado en los estudios de Castillo et al. (2006b) y Lucey et al. (1997b), quienes argumentaron que a mayor temperatura la coagulación transcurre más rápido, pero no se forman las grandes uniones entre las partículas de caseína, y las uniones más débiles que se forman tienen menos enlaces proteína – proteína. Como consecuencia de una mayor tasa de incremento en  $G'$ , los parámetros  $t_{F30}$  y  $t_{F60}$  (que representan tiempos de endurecimiento) a temperatura de 37 °C fueron menores (78 y 76% respectivamente) con relación a los valores alcanzados a temperatura de 27 °C.

### 5.3.1.2 Efecto de la concentración de inulina

Como se muestra en la Tabla 5.2, la adición de inulina a la leche reconstituida a niveles de 3 y 6% produjo una disminución significativa en los parámetros visuales de tiempo de coagulación y tiempo de corte ( $t_{clot}$  y  $t_{cut}$ ), así como en los parámetros de dispersión NIR  $t_{max}$ ,  $t_{max2}$ ,  $t_{2max}$  y  $t_{2min}$ . Con relación a los parámetros reológicos se observaron disminuciones significativas de  $t_{G'1}$  y  $t_{G'30}$  con el aumento de la concentración de inulina, si bien, en el caso de  $t_{G'60}$ ,  $t_{F30}$  y  $t_{F60}$ , la disminución de dichos parámetros producida por el aumento de la concentración de inulina de 3 a 6% no fue significativa. Castillo et al. (2003a) argumentaron que el primer máximo de la primera derivada del perfil de dispersión NIR con respecto al tiempo guarda relación con la cinética de agregación, mientras que el segundo máximo de dicha derivada contiene información sobre el endurecimiento.

En la Figura 5.3 se observa claramente que la adición de inulina produce un efecto de desdoblamiento en los perfiles de dispersión con la aparición de un “*hombro*” (Fig. 5.3a) poco después de  $t_{max}$ , que se va acentuando con la concentración de inulina y que induce la aparición de un segundo máximo en la primera derivada ( $t_{max2}$ , Fig. 5.3b), que a su vez repercute, de forma análoga, en la segunda derivada (Fig. 5.3c). El efecto de la inulina es especialmente evidente en la primera parte del perfil, donde al aumentar la concentración de inulina se incrementa la pendiente, reflejándose en una clara separación de las curvas en las correspondientes derivadas.

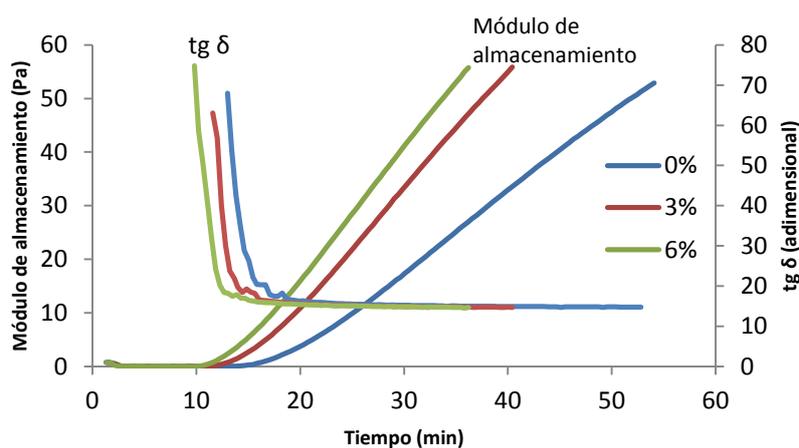


**Figura 5.3** Perfil del ratio de dispersión de luz (a), su primera derivada (b) y segunda derivada (c). Curvas obtenidas promediando los resultados de las tres réplicas del ensayo realizado a 27 °C con 0,2% de grasa y a distintas concentraciones de inulina.

El fenómeno observado se atribuye al efecto diferencial de la adición de inulina sobre las reacciones de agregación micelar y de endurecimiento de la cuajada. En otras palabras, la adición de inulina parece que favorece de forma más intensa los procesos de agregación micelar, lo que se manifiesta por un aumento evidente de la magnitud de  $R'_{\max}$  al aumentar la concentración de inulina, siendo su influencia sobre la reacción de endurecimiento del gel menos marcada en comparación con la agregación, que se evidencia por valores más similares de  $R'_{\max 2}$  independientemente de la concentración de inulina.

El efecto diferencial de la inulina sobre las fases de agregación y endurecimiento podría atribuirse a un aumento de concentración relativa de solutos en la matriz, debido a la reducción en el contenido de humedad de la muestra por la adición de inulina, sumado a una posible retención de humedad por parte de esta, lo que produciría una aceleración de la agregación. Por otro lado, aunque la inulina también aumenta la velocidad de endurecimiento, en la Figura 5.3 se puede ver que el cambio en la pendiente del perfil de  $R$  es menor comparado con el cambio ocasionado en la fase de agregación. Durante el proceso de endurecimiento se produce un aumento del número de enlaces y/o de la fuerza de estos dentro de la matriz del gel, lo que probablemente es independiente en gran medida de la concentración de inulina.

La Figura 5.4 muestra la evolución de  $G'$  y  $tg \delta$  durante la coagulación de leche desnatada (0,2% grasa) a 32 °C en presencia de diferentes concentraciones de inulina. Se observa que cuando se incrementa la adición de inulina la velocidad de endurecimiento también aumenta, lo que resulta en un menor tiempo de inicio de la gelificación y un mayor valor de  $G'$ . Es decir, que a un mismo tiempo de coagulación, los geles con mayor concentración de inulina son más firmes, o lo que es lo mismo, que un determinado nivel de firmeza, por ejemplo  $G' = 30$  Pa, se alcanza en menos tiempo en presencia de inulina.

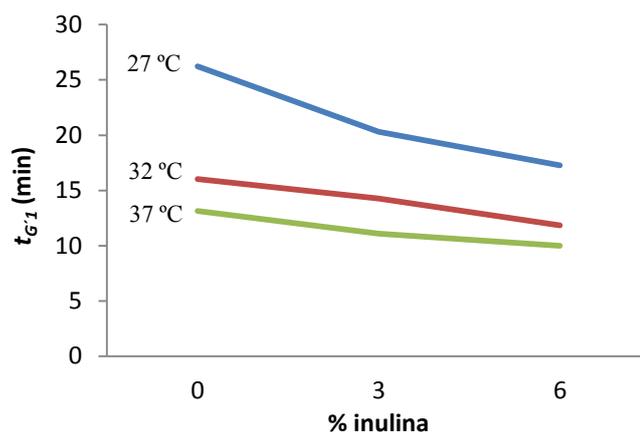


**Figura 5.4** Efecto de la concentración de inulina sobre el módulo de almacenamiento,  $G'$ , y el ángulo de fase,  $tg \delta$ . Ensayos realizados a 32 °C con 0,2% de grasa. Cada curva corresponde a la media de tres ensayos.

El tiempo necesario para que la firmeza del gel aumente de 1 a 30 Pa (representado en el parámetro  $t_{F30}$ ) tuvo una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) al añadir niveles de inulina de 3% y no hubo efecto de este factor sobre los parámetros  $t_g$   $\delta_{30Pa}$  y  $t_g$   $\delta_{60Pa}$ . Fagan et al. (2006) encontraron una disminución significativa en el tiempo de gelificación al adicionar inulina a concentraciones de 2 y 3% a leche pasteurizada descremada y un efecto limitado sobre  $t_F$ , lo cual fue atribuido a la inhabilidad de la inulina para formar geles de estructura compleja.

Micrografías realizadas mediante microscopía laser confocal a yogures con 3,5 y 0,2% de grasa y varios niveles de inulina no mostraron grandes diferencias entre las microestructuras de los geles con adición de inulina salvo una leve disminución en la cohesividad de la estructura proteica y poros más grandes (Guggisberg et al., 2009). Fagan et al. (2006) tampoco observaron diferencias significativas en la microestructura de geles lácteos con y sin inulina. Debido a que un aumento en  $t_g$   $\delta$  se corresponde con poros más grandes, mayor permeabilidad y mayor capacidad de cambios en el tipo o número de enlaces de la red del gel (Castillo et al., 2006b; van Vliet, 1991), la ausencia de efecto de la adición de inulina sobre  $t_g$   $\delta$  en este estudio sugiere que, efectivamente la inulina no afectó significativamente a la microestructura del gel.

La interacción entre la temperatura y la concentración de inulina tuvo efecto significativo sobre varios de los parámetros relacionados con el proceso de coagulación, entre ellos  $t_{clot}$ ,  $t_{cut}$ ,  $t_{G'1}$  y  $t_{G'30}$ . En la Figura 5.5 se muestra el efecto de la interacción  $T \times In$  sobre el tiempo de gelificación ( $t_{G'1}$ ). Se observa que a medida que aumenta la concentración de inulina disminuye  $t_{G'1}$ , pero el efecto es más pronunciado a temperaturas más bajas. En este caso predomina el efecto de la temperatura al cual se suma el efecto de la concentración de solutos ocasionado por la adición de inulina, cuyas partículas se aglomeran reteniendo agua en su interior e incrementando la firmeza del gel. El efecto es más pronunciado a temperatura de 27 °C, debido probablemente a que, a menor temperatura la velocidad de formación de los agregados de inulina es mayor.



**Figura 5.5** Efecto de la interacción temperatura × inulina sobre  $t_{G1}$ . Ensayos realizados con 0,2% de grasa. Cada curva corresponde a la media de tres ensayos.

### 5.3.1.3 Efecto de la concentración de grasa

La concentración de grasa en la leche reconstituida en los dos niveles evaluados en este estudio (0,2 y 1,5%) sólo tuvo efecto significativo sobre el parámetro óptico  $t_{2max2}$ . Sin embargo a pesar de que las diferencias no fueron significativas para los demás parámetros ópticos de tiempo evaluados, la tendencia observada fue consistente con aquella para  $t_{2max2}$ . Al reducir el nivel de grasa hubo un aumento consistente en los parámetros ópticos  $t_{2max}$ ,  $t_{2min}$ ,  $t_{max2}$  y  $t_{2min2}$ ; así como también en los parámetros reológicos  $t_{G1}$ ,  $t_{G30}$  y en los parámetros visuales  $t_{clot}$  y  $t_{cut}$  (los datos no fueron presentados en la Tabla 5.2 debido a que los efectos no fueron significativos), lo que indica que los geles coagularon más lentamente. La tendencia observada podría indicar que la coagulación enzimática de geles lácteos es más lenta cuando el contenido de grasa es menor.

En las condiciones experimentales de este estudio (nivel constante de proteína), la reducción de grasa está asociada con un aumento en el ratio proteína/grasa y un mayor contenido en agua, lo que probablemente origina un fenómeno de dilución micelar que disminuye la velocidad de los procesos de agregación y endurecimiento. Estos resultados son consistentes con los de Titapiccolo et al. (2010) y los de Fenelon y Guinee (1999), quienes observaron una reducción en el tiempo de gelificación y un incremento en la velocidad de endurecimiento y en la firmeza final de la cuajada al aumentar el contenido de grasa en la leche. Coincidiendo con nuestros resultados, Calvo

(2002) observó que el tiempo de coagulación fue significativamente más alto en leche de vaca desnatada que en leche entera. Guinee et al. (1997) comentaron que el incremento en la viscosidad con el contenido de grasa probablemente restringe el movimiento de los enlaces del gel y por consiguiente contribuye a una mayor rigidez del mismo.

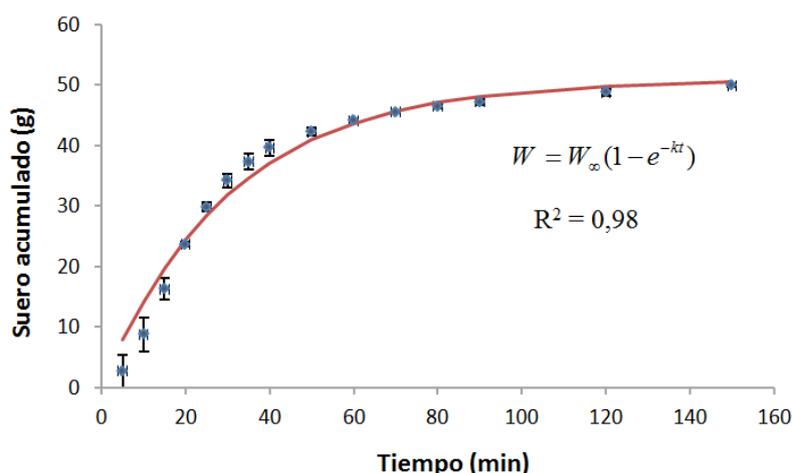
### **5.3.2 Efecto de los factores experimentales sobre la sinéresis y el rendimiento de la cuajada**

#### **5.3.2.1 Cinética de la sinéresis**

La expulsión de suero de la cuajada siguió una cinética de primer orden que se estimó apropiadamente mediante la ecuación presentada en la sección 5.2.4. Los valores de  $R^2$  y el error estándar de predicción (SEP) para la regresión entre los datos observados y estimados fueron  $0,980 \pm 0,002$  y  $2,75 \pm 0,18$  g respectivamente, siendo el promedio de la cantidad total de suero expulsada por las muestras de  $48,50 \pm 1,76$  g.

En la Figura 5.6 se muestra el peso acumulado del suero expulsado, en función del tiempo transcurrido desde el corte de la cuajada. En esta figura, el ajuste se realizó aplicando la ecuación mencionada en la sección 5.2.4 a los datos experimentales de muestras a 32 °C con 1,5% de grasa y sin adición de inulina. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 3 ensayos en cada uno de los cuales la sinéresis se evaluó por triplicado.

En todos los tratamientos, y tal y como se observa en la Figura 5.6, la masa de suero acumulado aumentó rápidamente durante los primeros 60 min después del corte, alcanzando valores entre 75 y 90% respecto de la masa total de suero drenado durante los 150 min que duró cada ensayo. La constante cinética para la expulsión del suero ( $k$ ) de los 54 ensayos estuvo en el rango de  $2,91 \times 10^{-2} \pm 6,07 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , encontrándose en el mismo orden de magnitud de los valores de  $k$  observados por Calvo y Balcones (2000) y por Kaytanli et al. (1993) para geles obtenidos por coagulación enzimática de leche vaca desnatada.



**Figura 5.6** Cinética de expulsión de suero en función del tiempo. El tiempo cero corresponde al momento de corte de la cuajada ( $G'=30$  Pa). Masa inicial de leche  $\sim 70$  g.  $k = 0,033$ ,  $W_{\infty} = 50,8$  g. Barras de error de  $\pm 1$  SD.

Con los datos de este estudio se calculó el coeficiente global de temperatura ( $Q_{10}$ ) para el proceso de drenaje del suero, obteniendo un valor de 1,46. Kaitanly et al. (1993) encontraron un valor  $Q_{10}$  de 1,8 para el mismo tipo de geles.

La Tabla 5.1 muestra que hubo efectos altamente significativos de la temperatura sobre la constante cinética de expulsión del suero ( $k$ ), el rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ), la masa de suero drenado acumulado ( $W_A$ ) y el porcentaje de suero expulsado ( $W_E$ ). También hubo efectos significativos de la concentración de inulina sobre  $k$ ,  $R_c$  y  $W_E$ . Estos efectos se analizarán con detalle a continuación.

### 5.3.2.2 Efecto de la temperatura

La Tabla 5.2 muestra las medias de mínimos cuadrados (LSM) para los parámetros de sinéresis  $k$ ,  $W_{\infty}$ ,  $W_A$ ,  $W_E$  y para el rendimiento de la cuajada  $R_c$ . Al aumentar la temperatura de coagulación y de desuerado se observó un incremento en la constante cinética de expulsión del suero ( $k$ ), en la masa de suero drenado ( $W_A$ ) y en el porcentaje de suero drenado respecto al contenido de humedad inicial de la muestra ( $W_E$ ), pero no se observó efecto de la temperatura sobre el peso del suero a tiempo infinito ( $W_{\infty}$ ) y en los parámetros  $W_A$  y  $W_E$  sólo se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de 27 y 37 °C.

La temperatura también afectó al rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ), el cual aumentó al disminuir la temperatura de coagulación y desuerado. Esto está relacionado con la reducción en el grado de sinéresis, lo que resulta en cuajadas con mayor contenido de humedad. Se obtuvo una alta correlación entre  $k$  y los parámetros  $R'_{max}$  y  $R'_{max2}$ , los cuales representan la velocidad de formación de la matriz proteica (agregación micelar y endurecimiento del gel), obteniéndose valores de  $r = 0,82$  y  $0,85$  ( $P < 0,0001$ ), respectivamente. Estos resultados, confirman que al acelerarse la reacción de coagulación también se incrementa la velocidad de sinéresis. Castillo *et al.* (2006a) observaron el mismo fenómeno al estudiar el efecto de la temperatura sobre geles mixtos (queso Cottage).

Diversos estudios han demostrado que tanto la temperatura de coagulación, como la temperatura a la que se desarrolla la reacción de sinéresis tienen efecto sobre la velocidad y el grado de sinéresis. La temperatura de coagulación afecta a la velocidad de formación de enlaces y su vida media, así como a la permeabilidad del gel ( $B$ ), condicionando su microestructura y comportamiento reológico (Mishra *et al.*, 2005; Lucey, 2002; Lagoueyte *et al.*, 1994; van Vliet *et al.*, 1991), todo lo cual ejerce un efecto indirecto sobre el drenado posterior de la cuajada tras el corte de la misma.

### 5.3.2.3 Efecto de la concentración de inulina

Como se observa en la Tabla 5.2, el incremento de la concentración de inulina en los niveles evaluados produjo una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en la constante cinética de expulsión del suero ( $k$ ) y un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) en el rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ). La tabla 5.1 muestra que la adición de inulina no tuvo efecto significativo sobre la masa de suero drenado a tiempo infinito ( $W_\infty$ ) y el efecto sobre la masa de suero drenado acumulado ( $W_A$ ) fue levemente superior al mínimo para obtener significación estadística, presentando una tendencia a disminuir con el aumento en la concentración de inulina, lo que significaría un aumento en la retención de agua. Sin embargo al analizar el porcentaje de suero expulsado respecto al contenido de humedad de la muestra ( $\%W_E$ ), se encontró que este aumentó significativamente con la adición de inulina. Como se muestra en la Figura 5.4, el valor de  $tg \delta_{30Pa}$ , cuando el gel alcanza una dureza  $\geq 12-15$  Pa, es aproximadamente constante e independiente de la

concentración de inulina, lo que indica que su presencia no afecta notoriamente a la capacidad de reorganización y contracción del gel.

En varios estudios donde se ha usado inulina como sustituto de grasa no se han encontrado diferencias en la sinéresis o en la *CRA* al incrementar la concentración de ésta (Srisuvor et al., 2013, Brenan y Tudorica, 2008; Ipsen et al., 2001), mientras que en otros trabajos se ha observado que la sinéresis aumentó con la adición de inulina (Guven et al., 2005; Rinaldoni et al., 2012). Existe muy poca información acerca de la manera como la inulina interfiere en la formación y en la microestructura final en geles de coagulación enzimática. Salvatore et al. (2014) investigaron mediante microscopía SEM la microestructura de quesos frescos elaborados con leche de cabra en la que se sustituyó de forma proporcional grasa por diferentes niveles de inulina. Las micrografías del queso control con grasa mostraron una estructura compacta y homogénea compuesta por una red de micelas de caseína y grasa, con una casi total ausencia de poros comparada con la de las muestras que contenían inulina, las cuales revelaron una estructura más abierta. La inulina apareció como estructuras de forma laminar embebidas en la matriz del gel, cuyo tamaño fue mayor al aumentar su concentración. Según Salvatore et al. (2014) la interrupción de la continuidad en la matriz de caseína por la presencia de los agregados de inulina produce un efecto de ablandamiento que explica los resultados de los análisis de textura de los geles con inulina. Guggisberg et al. (2009) también observaron que la inulina contribuyó a la formación de una estructura menos compacta y con grandes poros en yogur bajo en grasa. De otra parte, para que la inulina pueda formar un gel que retiene agua se requiere de una concentración mínima, que depende de varios factores como el tipo de inulina o la temperatura de preparación, pero que según Kim et al. (2001) debe ser >10%.

Considerando lo anterior se puede sugerir que, en los niveles utilizados en este estudio, la inulina no ejerce un efecto de aumento en la capacidad de retención de agua del gel, sino que, por el contrario, tiende a aumentar la expulsión del suero debido a la formación de una matriz más porosa.

#### **5.3.2.4 Efecto de la concentración de grasa**

A pesar de que los efectos no fueron estadísticamente significativos, al incrementar la concentración de grasa se pudo observar un ligera disminución en la constante de expulsión de suero ( $k$ ) y un aumento en el rendimiento, resultados que coinciden con investigaciones previas donde se ha encontrado que el volumen de suero producido se reduce con el incremento en la concentración de grasa de la leche (Mateo et al., 2009a; Johnston y Murphy, 1984; Marshall, 1982). A mayor contenido de grasa en la leche, menor capacidad de contracción de la cuajada, además la grasa impide el flujo de suero desde el interior, es decir, disminuye la permeabilidad de la cuajada, por lo que la grasa reduce la sinéresis (Walstra, 1999). El hecho de que en este estudio las diferencias observadas no resultaran significativas podría atribuirse a la escasa diferencia entre los niveles de grasa evaluados (0,2 y 1,5%). Si bien muchos autores han mencionado este efecto, en escasos trabajos se han demostrado resultados estadísticamente significativos.

#### **5.4 Conclusiones**

El aumento en la temperatura aceleró la coagulación de los geles con inulina, lo cual fue puesto de manifiesto por cambios en el ratio de dispersión de luz NIR que se reflejaron en una disminución significativa de los parámetros ópticos de tiempo, en concordancia con la reducción en los tiempos de gelificación y de corte reológicos. El incremento en la temperatura también ocasionó un aumento en la constante cinética de expulsión del suero y una disminución en el rendimiento de la cuajada. La adición de inulina aceleró las reacciones de coagulación e incrementó la firmeza de los geles sin afectar significativamente a la capacidad de reorganización de su estructura al inicio de la liberación del suero. El efecto de la inulina en las reacciones de coagulación y endurecimiento fue influenciado no solo por la concentración de ésta, sino también por la temperatura de coagulación, siendo mayor a menores temperaturas. El aumento en la concentración de inulina produjo una disminución significativa en la constante cinética de expulsión de suero y en el rendimiento de la cuajada, pero también un incremento en el suero expulsado respecto a la humedad inicial de la muestra, por lo que probablemente el mayor rendimiento de la cuajada se debe más al aumento de sólidos

totales en la muestra que a una posible retención de agua por parte de la inulina. Aunque los resultados de este estudio respecto al efecto de la grasa no fueron concluyentes, éstos sugieren que la reducción en la concentración de grasa de la leche podría aumentar los tiempos de coagulación y de corte, y disminuir la dureza del gel. Estos efectos podrían ser compensados por la adición de inulina, ya que ésta produce efectos contrarios.

## Capítulo 6

# Predicción de parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos con inulina como sustituto de grasa usando dispersión de luz infrarroja

### Resumen

La producción de quesos con bajo contenido en grasa usualmente requiere la introducción de modificaciones en el procesado tales como la utilización de sustitutos de grasa (p. ej. la inulina), con el fin de conseguir propiedades sensoriales aceptables. Actualmente la posibilidad de uso de sensores de fibra óptica para la monitorización de la coagulación en la elaboración del queso y la determinación de tiempos de corte óptimos, justifica el desarrollo de algoritmos de predicción de parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos con inulina con el fin de mejorar el rendimiento quesero, la homogeneidad y la calidad del producto. En este trabajo se utilizó un diseño factorial aleatorizado para estudiar el efecto de la concentración de inulina (0, 3 y 6%) y de grasa (<0,2 y 1,5%), y la temperatura (27, 32 y 37°C) sobre la coagulación de geles lácteos bajos en grasa y desarrollar modelos de predicción de indicadores de coagulación y sinéresis. El proceso de coagulación se monitorizó mediante espectrometría de infrarrojo cercano, reología oscilatoria de baja amplitud e índices visuales, mientras que la cinética y la magnitud de la sinéresis se evaluaron por métodos volumétricos. Se determinaron modelos de predicción de una, dos y tres variables para la constante cinética de expulsión del suero ( $k$ ), el rendimiento de la cuajada ( $Rc$ ) y los tiempos de coagulación y de corte tanto visuales ( $t_{clot}$  y  $t_{cut}$ ) como reológicos ( $t_{G'1}$  y  $t_{G'30}$ ). Los resultados demostraron que es posible obtener modelos con buen ajuste para

la predicción de parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos con adición de inulina como sustituto de grasa usando un sensor óptico de dispersión de luz.

**Palabras clave:** Coagulación enzimática, leche, inulina, tiempo de coagulación, tiempo de corte, dispersión de luz NIR, monitorización, predicción, modelización.

## **6.1 Introducción**

Las investigaciones médicas recientes señalan la creciente importancia de la dieta en la protección y mejora de la salud. Se ha demostrado que el consumo de grasa está asociado con el aumento en el riesgo de obesidad, aterosclerosis, enfermedad coronaria y elevada presión sanguínea entre otras enfermedades (El Khouri et al., 2012; Mallapa, et al., 2012; Lim et al., 2010). Muchos tipos de queso constituyen una fuente significativa de grasa dietética, pero la reducción de su contenido representa un reto tecnológico, ya que eliminar completa o parcialmente la fracción lipídica de la leche altera las propiedades reológicas y, por consiguiente, la textura, las propiedades organolépticas y la funcionalidad del producto final (Karaman y Akalin, 2013; Alnemr et al., 2013; Miočinović et al., 2011). Por ello, la producción de quesos bajos en grasa frecuentemente requiere la modificación del proceso de elaboración, utilizando ingredientes como los sustitutos de grasa, con el fin de lograr propiedades sensoriales aceptables.

La inulina es un carbohidrato de reserva en muchos vegetales que tiene propiedades funcionales y características tecnológicas que han permitido su uso como sustituto de grasa en productos lácteos. Adicionalmente, la inulina es fuente de fibra dietética y se han demostrado sus efectos beneficiosos sobre la salud humana (Kalyani et al., 2010; Roberfroid, 2007; Kip et al., 2006).

Se han utilizado diferentes instrumentos para monitorizar la coagulación de la leche y/o para determinar la dureza óptima para el corte de la cuajada en la elaboración de queso (Pais et al., 2015; Klandar et al., 2007; Castillo, 2006; O'Callaghan et al., 2002). Algunos de estos sensores emplean fibras ópticas para medir la dispersión de luz y han sido utilizados para determinar el tiempo de corte en leche de vaca (Payne et al.,

1993), cabra (Castillo et al., 2000), oveja (Nicolau et al., 2011) y mezclas de leches (Abdelgawad et al., 2014). Entre las ventajas que presentan los sensores ópticos frente a otros tipos de instrumentos podemos destacar, además de su pequeño tamaño, que son sistemas de medición en línea, no destructivos, simples pero robustos y precisos, con buenas características sanitarias, y que soportan los sistemas de limpieza y desinfección *in situ*. Dichas características junto a su comparativo bajo coste de instalación y mantenimiento hacen de los sensores ópticos una tecnología muy apropiada para la predicción de los tiempos de coagulación y de corte en la industria quesera. Un sensor para la determinación del tiempo de corte debería poder operar en un amplio intervalo de variación en las condiciones de producción, como p. ej., la introducción de nuevos ingredientes como sustitutos de grasa.

Castillo et al. (2003) utilizaron un sensor de fibra óptica para medir la dispersión de luz de infrarrojo cercano a 880 nm durante la coagulación de leche desnatada de cabra, con el propósito de predecir el tiempo de corte de la cuajada dentro de un amplio intervalo de condiciones de coagulación. Estos autores encontraron un algoritmo,  $t_{cut} = \beta_1 t_{2min} (1 + \gamma\% \text{ Proteína})$ , que incluyó el parámetro óptico  $t_{2min}$ , el tiempo transcurrido desde la adición de la enzima hasta el primer mínimo de la segunda derivada del ratio de dispersión de luz, y el contenido de proteína en la muestra, para predecir el tiempo de corte con un error estándar de predicción (SEP) de 2,42 min y un  $R^2$  de 0,98.

Castillo et al. (2006) estudiaron la predicción de los tiempos de gelificación y de corte bajo las condiciones de elaboración de queso tipo Cottage. El tiempo de gelificación se pudo predecir mediante la ecuación  $t_{gel} = \beta_1 t_{2min}$  ( $R^2 = 0,988$ , SEP = 11,3 min), y el tiempo de corte con la ecuación  $t_{cut} = \beta_0 + \beta_1 t_{2max2}$  ( $R^2 = 0,987$ , SEP = 14,7 min), donde  $\beta_0$  y  $\beta_1$  corresponden a coeficientes de regresión y  $t_{2max2}$  es el segundo máximo de la segunda derivada del ratio de dispersión de luz.

Con el propósito de poder monitorizar la sinéresis en la cuba quesera, Castillo et al. (2005a) diseñaron en la Universidad de Kentucky un sensor de dispersión de luz de campo de visión amplio (*Large Field View*) que permite obtener información relacionada con parámetros tales como el rendimiento de suero, la humedad de la cuajada y los niveles de grasa, proteína y sólidos en el suero. Posteriormente Fagan et

al. (2008) desarrollaron modelos de predicción que fueron validados por Mateo et al. (2009b y 2009c).

La demanda de productos lácteos, incluyendo la de quesos, y especialmente aquellos con contenido reducido en grasa está en aumento (Krystallis y Chrysochou, 2011), pero el efecto de sustitutos de grasa como la inulina, que influyen sobre la cinética de coagulación y, como resultado, sobre la predicción de los tiempos de coagulación y de corte, no ha sido investigado. En el Capítulo 5 de esta tesis se encontró que la adición de inulina acelera las reacciones de coagulación, aumenta la dureza del gel y produce un incremento significativo en el rendimiento de la cuajada. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue desarrollar modelos para la predicción en línea de los tiempos de gelificación y de corte así como de la constante cinética de expulsión del suero y de rendimiento de la cuajada en geles lácteos adicionados de inulina, usando un sensor óptico.

## 6.2 Materiales y métodos

Los datos analizados en este estudio corresponden al experimento descrito en el capítulo 5 de esta memoria, por lo que los materiales y métodos son aquellos descritos en dicho capítulo así como también los métodos generales presentados en el Capítulo 4.

### 6.2.1 Análisis estadístico

Se utilizó el procedimiento de máximo  $R^2$  (SAS version 9.2 2009, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) para obtener los mejores modelos de uno, dos y tres parámetros para la predicción de la constante cinética de expulsión del suero ( $k$ ), el rendimiento de la cuajada ( $Rc$ ), el tiempo de coagulación ( $t_{clot}$ ), el tiempo de corte visual ( $t_{cut}$ ), el tiempo de gelificación reológico ( $t_{G'1}$ ) y el tiempo de corte reológico ( $t_{G'30}$ ) de los geles lácteos con inulina coagulados enzimáticamente. Se evaluaron las variables independientes temperatura de coagulación ( $T$ ), concentración de inulina ( $In$ ) y concentración de grasa ( $G$ ) para obtener los mejores valores de  $R^2$ , junto con las variables ópticas dependientes  $t_{max}$ ,  $t_{2max}$ ,  $t_{2min}$ ,  $R'_{max}$  y  $R'_{2min}$ . Se realizaron análisis de regresión complementarios para obtener y seleccionar modelos más simples y efectivos usando los procedimientos de

regresión lineal y no lineal de SAS. Finalmente, se utilizó la opción “*influence*” de SAS para identificar observaciones influyentes (*outliers*) en el análisis de regresión y como resultado dos observaciones se eliminaron del análisis.

### 6.3 Resultados y discusión

En la Tabla 6.1 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson encontrados entre las variables independientes  $T$ ,  $In$  y  $G$ , y las variables dependientes ( $t_{max}$ ,  $t_{2max}$ ,  $t_{2min}$ ,  $R'_{max}$ ,  $R'_{2min}$ ,  $k$ ,  $R_c$ ,  $t_{clot}$ ,  $t_{cut}$ ,  $t_{G'1}$  y  $t_{G'30}$ ). Se observa que la temperatura fue el factor con efecto más significativo sobre los índices de coagulación y sinéresis. Los parámetros  $R'_{max}$  y  $R'_{2min}$  aumentaron significativamente con  $T$ , mientras que el resto de parámetros de tiempo ópticos, visuales y reológicos tuvieron correlación negativa con dicho factor, indicando un incremento en la velocidad de coagulación con el aumento de  $T$ . Estos resultados concuerdan con los observados en la monitorización de la coagulación de mezclas de leche (vaca, cabra y oveja) y leche de cabra, usando un sensor de dispersión de luz NIR, descritos en el trabajo de Abdelgawad et al. (2014) y Castillo et al. (2005b), respectivamente. La disminución en los parámetros de tiempo ópticos y el aumento en  $R'_{max}$  y  $R'_{2min}$  con el aumento de la temperatura se han atribuido al efecto de ésta sobre la fase de hidrólisis y, especialmente, sobre la fase de agregación durante la coagulación de la leche (Castillo, 2000). Respecto a los parámetros de sinéresis, el incremento en la temperatura de coagulación produjo un aumento en la constante de drenado del suero ( $k$ ) y una disminución en el rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ), coincidiendo con los resultados de Fagan et al. (2007b).

Las correlaciones entre la concentración de inulina y los parámetros ópticos y reológicos de tiempo tuvieron el mismo comportamiento que los observados con la temperatura, pero con relación a los índices de sinéresis, el incremento en la concentración de inulina ocasionó una reducción en  $k$  y un incremento en  $R_c$ . Estos resultados indican que aparentemente la inulina aumentó la velocidad de coagulación, redujo la sinéresis y aumentó el rendimiento.

**Tabla 6.1** Análisis de correlación entre las variables independientes  $T$ ,  $In$  y  $G$ , y las variables dependientes evaluadas: parámetros ópticos, reológicos y de sinéresis.

	$t_{max}$	$t_{2max}$	$t_{2min}$	$R'_{max}$	$R'_{2min}$	$k$	$R_c$	$t_{clot}$	$t_{cut}$	$t_{G'1}$	$t_{G'30}$
$T$	-0,84 <sup>***</sup>	-0,86 <sup>***</sup>	-0,84 <sup>***</sup>	0,97 <sup>***</sup>	0,96 <sup>***</sup>	0,79 <sup>***</sup>	-0,73 <sup>***</sup>	-0,84 <sup>***</sup>	-0,85 <sup>***</sup>	-0,81 <sup>***</sup>	-0,85 <sup>***</sup>
$In$	-0,37 <sup>**</sup>	-0,27	-0,38 <sup>**</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	-0,49 <sup>**</sup>	0,55 <sup>***</sup>	-0,38 <sup>**</sup>	-0,24	-0,40 <sup>**</sup>	-0,25
$G$	0,12 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>	-0,02 <sup>ns</sup>	-0,03 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>
$t_{max}$	-	0,98 <sup>***</sup>	0,99 <sup>***</sup>	-0,87 <sup>***</sup>	-0,79 <sup>***</sup>	-0,46 <sup>***</sup>	0,39 <sup>**</sup>	0,99 <sup>***</sup>	0,94 <sup>***</sup>	0,98 <sup>***</sup>	0,94 <sup>***</sup>
$t_{2max}$	-	-	0,97 <sup>***</sup>	-0,88 <sup>***</sup>	-0,83 <sup>***</sup>	-0,54 <sup>***</sup>	0,46 <sup>***</sup>	0,97 <sup>***</sup>	0,92 <sup>***</sup>	0,95 <sup>***</sup>	0,91 <sup>***</sup>
$t_{2min}$	-	-	-	-0,87 <sup>***</sup>	-0,81 <sup>***</sup>	-0,45 <sup>**</sup>	0,38 <sup>**</sup>	1,00 <sup>***</sup>	0,95 <sup>***</sup>	0,99 <sup>***</sup>	0,95 <sup>***</sup>
$R'_{max}$	-	-	-	-	0,98 <sup>***</sup>	0,68 <sup>***</sup>	-0,66 <sup>***</sup>	-0,87 <sup>***</sup>	-0,84 <sup>***</sup>	-0,84 <sup>***</sup>	-0,83 <sup>***</sup>
$R'_{2min}$	-	-	-	-	-	0,73 <sup>***</sup>	-0,71 <sup>***</sup>	-0,81 <sup>***</sup>	-0,79 <sup>***</sup>	-0,77 <sup>***</sup>	-0,78 <sup>***</sup>
$k$	-	-	-	-	-	-	-0,77 <sup>***</sup>	-0,47 <sup>***</sup>	-0,51 <sup>***</sup>	-0,42 <sup>**</sup>	-0,50 <sup>***</sup>
$R_c$	-	-	-	-	-	-	-	0,41 <sup>**</sup>	0,45 <sup>**</sup>	0,35 <sup>*</sup>	0,44 <sup>**</sup>
$t_{clot}$	-	-	-	-	-	-	-	-	0,95 <sup>***</sup>	0,99 <sup>***</sup>	0,95 <sup>***</sup>
$t_{cut}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97 <sup>***</sup>	1,0 <sup>***</sup>
$t_{G'1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97 <sup>***</sup>

N = 52; <sup>\*\*\*</sup>P < 0,001, <sup>\*\*</sup>P < 0,01, <sup>\*</sup>P < 0,05, <sup>ns</sup>no significativo. Para la definición de las variables dependientes véase la sección de materiales y métodos específica de este capítulo y las secciones 4.3 y 4.4 del capítulo de materiales y métodos generales.

Se encontraron correlaciones positivas muy significativas entre los parámetros ópticos  $t_{max}$ ,  $t_{2max}$ ,  $t_{2min}$  y los tiempos de gelificación y de corte visuales ( $t_{clot}$ ,  $t_{cut}$ ) y reológicos ( $t_{G'1}$ ,  $t_{G'30}$ ), y también se encontraron correlaciones fuertes entre  $R'_{max}$  y  $R'_{2min}$  con  $k$  (correlación positiva) y  $R_c$  (correlación negativa). Estas fuertes correlaciones podrían explicar su inclusión en los modelos de predicción como se describirá más adelante.

Para obtener los mejores modelos de predicción se utilizó en primer lugar el procedimiento de máximo  $R^2$  de SAS para evaluar si las diferentes variables independientes y dependientes tenían efecto en los parámetros de coagulación y sinéresis estudiados, con base en los mejores modelos de predicción de tres parámetros (Tabla 6.2). Posteriormente, usando esa información, se obtuvieron modelos más simples o más prácticos usando los procedimientos GLM, NLIN y máximo  $R^2$  de SAS.

La Tabla 6.2 muestra que parámetros ópticos como  $t_{2max}$ ,  $t_{max}$  y  $t_{2min}$  tuvieron un alto nivel de significación en la predicción de parámetros de coagulación y tiempos de corte, pero no en la predicción de la constante cinética de expulsión del suero y el rendimiento de la cuajada, con excepción del parámetro  $R'_{max}$  en el modelo de predicción de  $k$ . Esto significa que es posible obtener buenos modelos de predicción para el tiempo de coagulación ( $t_{clot}$ ), el tiempo de corte visual ( $t_{cut}$ ), y los tiempos de gelificación y de corte reológicos ( $t_{G'1}$  y  $t_{G'30}$ ), usando parámetros ópticos, pero para las predicciones de la constante de expulsión de suero ( $k$ ) y del rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ) se hace necesario incluir en el modelo variables independientes tales como la concentración de inulina, la temperatura o la interacción entre ambas.

También se observa en la Tabla 6.2 que el parámetro  $t_{2min}$  tuvo un alto nivel de significación con relación a los tiempos de coagulación ( $t_{clot}$  y  $t_{G'1}$ ) y de corte ( $t_{cut}$  y  $t_{G'30}$ ), lo que sugiere que es el mejor predictor para tales parámetros; que la interacción  $T \times In$  afecta a los modelos de predicción del tiempo de corte y que  $T^2$  tuvo un efecto muy significativo sobre  $k$  y  $R_c$ , coincidiendo con resultados del trabajo de Castillo et al. (2006b) donde se observó un efecto cuadrático de la temperatura sobre el drenado del suero.

**Tabla 6.2.** Niveles de significación de las variables independientes y dependientes en los modelos de predicción de tres parámetros para los diferentes índices de coagulación y sinéresis.

	$k$	$R_c$	$t_{clot}$	$t_{cut}$	$t_{G'1}$	$t_{G'30}$
Ordenada en el origen	*	***	***	***	***	***
$t_{2max}$	-	-	-	*	*	*
$t_{max}$	-	-	***	-	*	-
$t_{2min}$	-	-	***	***	***	***
$R'_{max}$	*	-	-	-	-	-
$T$	-	-	-	-	-	-
$In$	***	*	-	-	-	-
$TxIn$	-	-	-	***	-	***
$T^2$	***	***	-	-	-	-
$R^2$	0,863	0,707	0,985	0,941	0,978	0,933
SEP	0,002 min <sup>-1</sup>	1,82%	0,44 min	4,88 min	0,706 min	5,54 min

N = 52.  $T$ , temperatura;  $In$ , % de inulina;  $R^2$ , coeficiente de determinación; SEP, error estándar de predicción; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$ , \*\*\* $P < 0,0001$ . Para la definición de las variables dependientes véase la sección de materiales y métodos específica de este capítulo y las secciones 4.3 y 4.4 del capítulo de materiales y métodos generales.

### 6.3.1. Predicción de parámetros que caracterizan el proceso de coagulación

La Tabla 6.3 muestra los mejores modelos de una, dos y tres variables para la predicción de los parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos con inulina. Todos los modelos encontrados fueron altamente significativos ( $P < 0,0001$ ).

Para el tiempo de coagulación visual ( $t_{clot}$ ) se obtuvo un modelo de tres variables altamente significativo (modelo 1 en la Tabla 6.3), con  $R^2 = 0,985$  y  $SEP = 0,437$  min, pero debido a que el coeficiente de correlación para la grasa ( $G$ ) no fue significativo, ésta fue eliminada, obteniéndose el modelo 2, que posee dos parámetros ópticos de tiempo ( $t_{max}$  y  $t_{2min}$ ) como predictores de  $t_{clot}$ , sin casi ninguna variación relevante en los valores de  $R^2$  y SEP. En el mejor modelo de una variable para  $t_{clot}$  (modelo 3), el predictor incluido fue el parámetro óptico  $t_{max}$ ; al compararlo con los modelos 2 y 3 este modelo más simple tuvo también un buen ajuste, con casi el mismo valor de  $R^2$  (0,979) y un leve aumento en el SEP (de 0,448 a 0,508 min). Nicolau et al. (2011) y Castillo et al. (2000) encontraron que el tiempo de coagulación en leches de oveja y de cabra se pudo predecir con la misma ecuación ( $t_{clot} = \beta_0 + \beta_1 t_{max}$ ).

**Tabla 6.3.** Modelos para la predicción de parámetros relevantes de coagulación y sinéresis usando dispersión de luz NIR en geles enzimáticos con inulina.

	<b>Modelo</b>	$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$R^2$	<b>SEP</b>
1	$t_{clot}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{max} + \beta_2 t_{2min} + \beta_3 G$	-3,57 <sup>***</sup>	0,965 <sup>***</sup>	0,626 <sup>*</sup>	-0,183	0,985	0,437 min
2	$t_{clot}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{max} + \beta_2 t_{2min}$	-3,68 <sup>***</sup>	0,855 <sup>**</sup>	0,717 <sup>**</sup>		0,984	0,448 min
3	$t_{clot}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{max}$	-3,52 <sup>***</sup>	1,66 <sup>***</sup>			0,979	0,508 min
4	$t_{G'1}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2max} + \beta_2 t_{max} + \beta_3 t_{2min}$	-4,97 <sup>***</sup>	-0,933 <sup>*</sup>	1,17 <sup>*</sup>	1,49 <sup>***</sup>	0,977	0,706 min
5	$t_{G'1}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min} + \beta_2 T + \beta_3 t_{2min} T$	-28,8 <sup>***</sup>	3,96 <sup>***</sup>	0,733 <sup>***</sup>	-0,067 <sup>***</sup>	0,983	0,618 min
6	$t_{G'1}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min}$	-5,78 <sup>***</sup>	1,91 <sup>***</sup>			0,971	0,780 min
7	$t_{cut}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2max} + \beta_2 t_{2min} + \beta_3 T x In$	-60,0 <sup>***</sup>	-6,28 <sup>*</sup>	12,7 <sup>***</sup>	0,0558 <sup>***</sup>	0,938	4,88 min
8	$t_{cut}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min} + \beta_2 T + \beta_3 t_{2min} T$	-189 <sup>***</sup>	24,4 <sup>***</sup>	5,22 <sup>***</sup>	-0,607 <sup>***</sup>	0,963	3,81 min
9	$t_{cut}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min} + \beta_2 t_{2min} T$	-25,3 <sup>**</sup>	9,77 <sup>***</sup>	-0,132 <sup>***</sup>		0,928	5,17 min
10	$t_{cut}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min}$	-49,5 <sup>***</sup>	7,82 <sup>***</sup>			0,900	5,98 min
11	$t_{G'30}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2max} + \beta_2 t_{2min} + \beta_3 T x In$	-63,7 <sup>***</sup>	-7,07 <sup>*</sup>	13,8 <sup>***</sup>	0,058 <sup>***</sup>	0,930	5,54 min
12	$t_{G'30}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min} + \beta_2 T + \beta_3 t_{2min} T$	-211 <sup>***</sup>	26,7 <sup>***</sup>	5,83 <sup>***</sup>	-0,667 <sup>***</sup>	0,958	4,34 min
13	$t_{G'30}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min} + \beta_2 t_{2min} T$	-28,1 <sup>**</sup>	10,4 <sup>***</sup>	-0,137 <sup>**</sup>		0,920	5,84 min
14	$t_{G'30}^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min}$	-53,2 <sup>***</sup>	8,35 <sup>***</sup>			0,893	6,61 min
15	$k^{***} = \beta_0 + \beta_1 R'_{max} + \beta_2 In + \beta_3 T^2$	0,0076 <sup>*</sup>	-0,2138 <sup>*</sup>	-0,00099 <sup>***</sup>	-0,00003 <sup>***</sup>	0,842	0,00237 min <sup>-1</sup>
16	$k^{***} = \beta_0 + \beta_1 In + \beta_2 T^2$	0,0140 <sup>***</sup>	-0,0012 <sup>***</sup>	0,00002 <sup>***</sup>		0,822	0,00247 min <sup>-1</sup>
17	$k^{***} = \beta_1 T - \beta_2 In$		0,0010 <sup>***</sup>	-0,00124 <sup>***</sup>		0,800	0,00247 min <sup>-1</sup>
18	$R_c^{***} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min} + \beta_2 In + \beta_3 T^2$	42,0 <sup>***</sup>	-0,272 <sup>ns</sup>	0,42002 <sup>*</sup>	-0,01103 <sup>***</sup>	0,703	6,13%
19	$R_c^{***} = \beta_0 + \beta_1 In + \beta_2 T^2$	36,5 <sup>***</sup>	0,535 <sup>***</sup>	-0,00892 <sup>***</sup>		0,698	6,07%

N = 52.  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$ , coeficientes de regresión.  $R^2$ , coeficiente de determinación (corregido para las medias). SEP, error estándar de predicción. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$ , \*\*\* $P < 0,0001$ ; <sup>ns</sup>, no significativo.

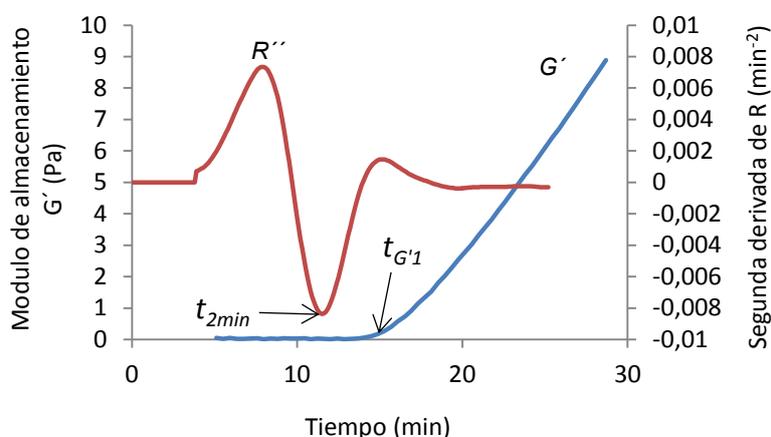
Castillo et al. (2003a) calcularon que el parámetro  $t_{max}$  constituye por término medio un 89% del tiempo de coagulación de Berridge, mientras que en este trabajo  $t_{max}$  fue 79% respecto a  $t_{clot}$  (media de los ensayos a 32 °C sin inulina), observándose también una fuerte correlación entre el parámetro óptico  $t_{max}$  y  $t_{clot}$  ( $r = 0,99$ , Tabla 6.1), lo que podría explicar porque  $t_{max}$  fue el mejor predictor de  $t_{clot}$ .

El tiempo de coagulación visual es una estimación del tiempo de coagulación real, definido como el instante en que se ha formado una red de partículas de caseína extendida en todo el espacio (McMahon et al., 1984). El tiempo de coagulación real se puede determinar por métodos no visuales, tales como, en el caso de este estudio, medidas reológicas. Se encontró una fuerte correlación lineal ( $r = 0,99$ ) entre el tiempo de coagulación visual ( $t_{clot}$ ) y el tiempo de gelificación reológico ( $t_{G'1}$ ) (Tabla 6.1).

Usando sólo parámetros ópticos y los factores experimentales (sin interacciones) en el procedimiento de regresión de SAS, el mejor modelo de tres parámetros para la predicción de  $t_{G'1}$  fue el modelo 4, con  $R^2 = 0,977$  y  $SEP = 0,706$  min, pero después de incluir como predictores la interacción entre  $t_{2min}$  y los factores experimentales, se obtuvo el modelo 5, con mejores valores de  $R^2$  y  $SEP$  (0,983 y 0,618 min respectivamente). Este modelo contiene una ordenada en el origen ( $\beta_0$ ) y los parámetros  $t_{2min}$ ,  $T$  y  $t_{2min}T$ ; sin embargo su aplicación podría resultar poco práctica debido al alto número de parámetros incluidos.

Debido a que se observó una fuerte correlación lineal entre el parámetro óptico  $t_{2min}$  y  $t_{G'1}$  ( $r = 0,99$ ,  $P < 0,0001$ ; Tabla 6.1), se evaluó el modelo  $t_{G'1} = \beta_0 + \beta_1 t_{2min}$  (modelo 6), el cual resultó altamente significativo ( $P < 0,0001$ ), con  $R^2 = 0,971$  y  $SEP = 0,780$  min, y mucho más apropiado para su aplicación en planta por su simplicidad. El mismo modelo para predicción de  $t_{G'1}$  usando parámetros ópticos fue encontrado en los trabajos de Nicolau et al. (2011) y Abdelgawad et al. (2014). Castillo et al. (2003a) asumieron una cinética de reacción de primer orden para el proceso de endurecimiento de la cuajada, usando el parámetro óptico  $t_{2min}$  como el momento de inicio de la reacción. Los resultados de este estudio confirman que el parámetro óptico  $t_{2min}$  se correlaciona fuertemente con el parámetro reológico  $t_{G'1}$  y que ambos determinan el inicio del proceso de endurecimiento de la cuajada.

La Figura 6.1 muestra la relación entre  $t_{G'1}$  y  $t_{2min}$ .



**Figura 6.1** Relación entre  $G'$  y el primer mínimo de la segunda derivada del ratio de dispersión con respecto al tiempo ( $t_{2min}$ ). Medias de los ensayos realizados a 27 °C con 0,2% de grasa y 6% de inulina.

Para la predicción de los tiempos de corte visual ( $t_{cut}$ ) y reológico ( $t_{G'30}$ ), se obtuvieron modelos de tres parámetros idénticos y altamente significativos (modelos 7 y 11), pero al incluir como predictores la interacción entre  $t_{2min}$  y la temperatura, los modelos resultantes (modelos 8 y 12) tuvieron mejores valores de  $R^2$  y SEP (0,963 y 3,81 min para  $t_{cut}$  y 0,958 y 4,34 min para  $t_{G'30}$  respectivamente). En los modelos con 2 parámetros encontrados para la predicción de  $t_{cut}$  y  $t_{G'30}$  (modelos 9 y 13), todos los coeficientes de regresión fueron altamente significativos, pero aunque los valores de  $R^2$  y SEP fueron buenos, estos modelos se consideraron relativamente poco prácticos para la predicción en línea del tiempo de corte, como consecuencia de los dos coeficientes requeridos para su implementación.

Los mejores modelos de un parámetro obtenidos (modelos 10 y 14) contienen solo el parámetro óptico  $t_{2min}$ , el cual se relaciona con la fase de agregación y con el inicio del proceso de endurecimiento, pero en estos modelos simplificados los valores de  $R^2$  para  $t_{cut}$  y  $t_{G'30}$ , se redujeron a 0,900 y 0,893 respectivamente, mientras los valores de SEP aumentaron a 5,98 y 6,61 min para  $t_{cut}$  y  $t_{G'30}$ , respectivamente. Comparando los coeficientes de variación de los valores de SEP encontrados en este trabajo con los de Castillo et al. (2000), los nuestros fueron aproximadamente tres veces mayores,

posiblemente debido al fuerte efecto de las interacciones entre la inulina y la temperatura en los procesos de coagulación y endurecimiento.

### 6.3.2 Predicción de la constante cinética de drenado del suero ( $k$ ) y del rendimiento de la cuajada ( $R_c$ )

Se analizaron las variables independientes y dependientes para determinar si la constante cinética de drenado del suero ( $k$ ) y el rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ) podían predecirse a partir de parámetros que caracterizan el proceso de coagulación en geles lácteos enzimáticos con inulina. El mejor modelo de tres parámetros encontrado para la predicción de  $k$  fue el modelo 15 (Tabla 6.3), que incluyó un intercepto ( $\beta_0$ ) y los parámetros (predictores)  $R'_{max}$ , porcentaje de inulina ( $In$ ) y el cuadrado de la temperatura ( $T^2$ ). El intercepto y todos los predictores fueron significativos y el modelo explicó la variabilidad de  $k$  en un 84,2% con un SEP de  $0,00237 \text{ min}^{-1}$ . El modelo incluyó la variable concentración de inulina con un coeficiente de regresión negativo, como consecuencia del efecto aparente de este factor sobre la expulsión de suero del gel. La presencia de un término cuadrático para la temperatura con un coeficiente altamente significativo se atribuye al hecho de que las velocidades de reacción se incrementan exponencialmente con la temperatura (relación de Arrhenius) y concuerda con los resultados encontrados por Castillo et al. (2006b). El modelo también contiene el término  $R'_{max}$ , (i.e., valor máximo de la primera derivada de  $R$ ) que representa la máxima velocidad de incremento del ratio de dispersión con respecto al tiempo como consecuencia del proceso de coagulación y se relaciona con el inicio del proceso de agregación (Castillo et al., 2006a).

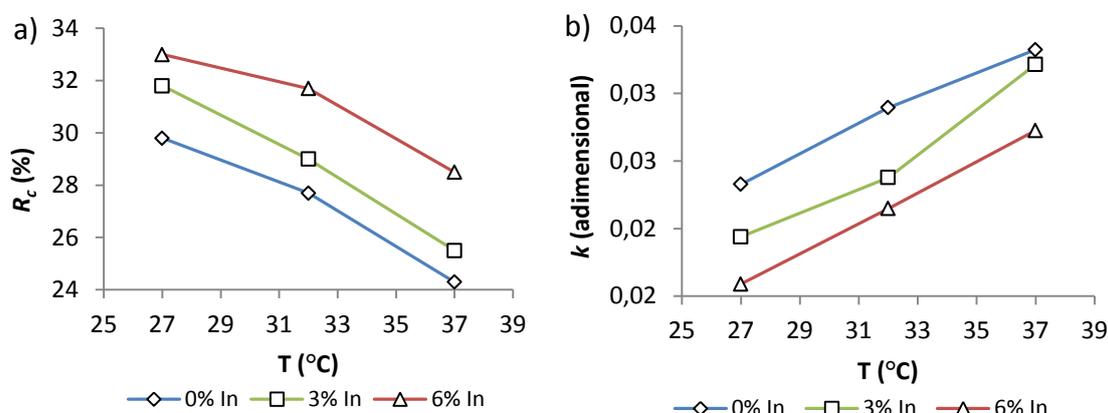
Aunque fue significativo, el coeficiente de regresión para  $R'_{max}$  tuvo un menor nivel de significación ( $P < 0,05$ ) que los coeficientes de los parámetros  $In$  y  $T^2$ , razón por la cual tal parámetro fue eliminado y se obtuvo el modelo 16, el cual fue altamente significativo ( $P < 0,0001$ ), con  $R^2 = 0,822$  y  $SEP = 0,00247 \text{ min}^{-1}$ . Sin embargo, como el valor de la ordenada en el origen en el modelo anterior para  $k$  fue muy pequeño, se decidió quitarlo, obteniendo el modelo simplificado  $k = \beta_1 T - \beta_2 In$ , con  $R^2 = 0,800$  y  $SEP = 0,00247 \text{ min}^{-1}$ .

Weber (1989) clasificó los factores que afectan a la sinéresis en tres grupos: directos, indirectos y ligados a la leche, siendo aquellos que influyen sobre la coagulación, como en este caso la inulina y la temperatura, factores indirectos. El modelo anterior muestra que  $k$  fue influida fuertemente por los factores experimentales que afectan al proceso de coagulación, debido a que la reacción de coagulación y su cinética tienen un efecto significativo en las propiedades físicas de los geles lácteos enzimáticos y, como consecuencia, un efecto indirecto en la expulsión de suero de la cuajada. En queso tipo Cottage (coagulación mixta) se observó una sinéresis más rápida al aumentar la temperatura de coagulación (Castillo et al., 2006b), y también se confirmó que reacciones de coagulación enzimática más rápidas incrementan la sinéresis (Fagan et al., 2007b).

En el mejor modelo de tres parámetros encontrado para la predicción del rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ) (modelo 18 en la Tabla 6.3) fueron incluidos como predictores el parámetro óptico  $t_{2min}$ , la concentración de inulina y un término cuadrático para la temperatura. Este modelo permitió predecir  $R_c$  con un SEP de 6,13% y  $R^2$  de 0,703. Nuevamente se observó la importancia del efecto de la temperatura y de la inulina sobre la cinética de coagulación, sobre la expulsión del suero y, por tanto, sobre el rendimiento de la cuajada. Eliminado el término  $t_{2min}$  en el modelo anterior, debido a que su coeficiente de regresión no fue significativo, se obtuvo el modelo 19, más simple y con casi los mismos valores de  $R^2$  y SEP.

Los modelos anteriores obtenidos para la predicción de  $k$  y  $R_c$  confirman que, en las condiciones de este experimento, los parámetros ópticos obtenidos durante la coagulación no resultaron ser buenos predictores para los índices de sinéresis, ya que éstos fueron afectados fuertemente por la temperatura de coagulación y la adición de inulina.

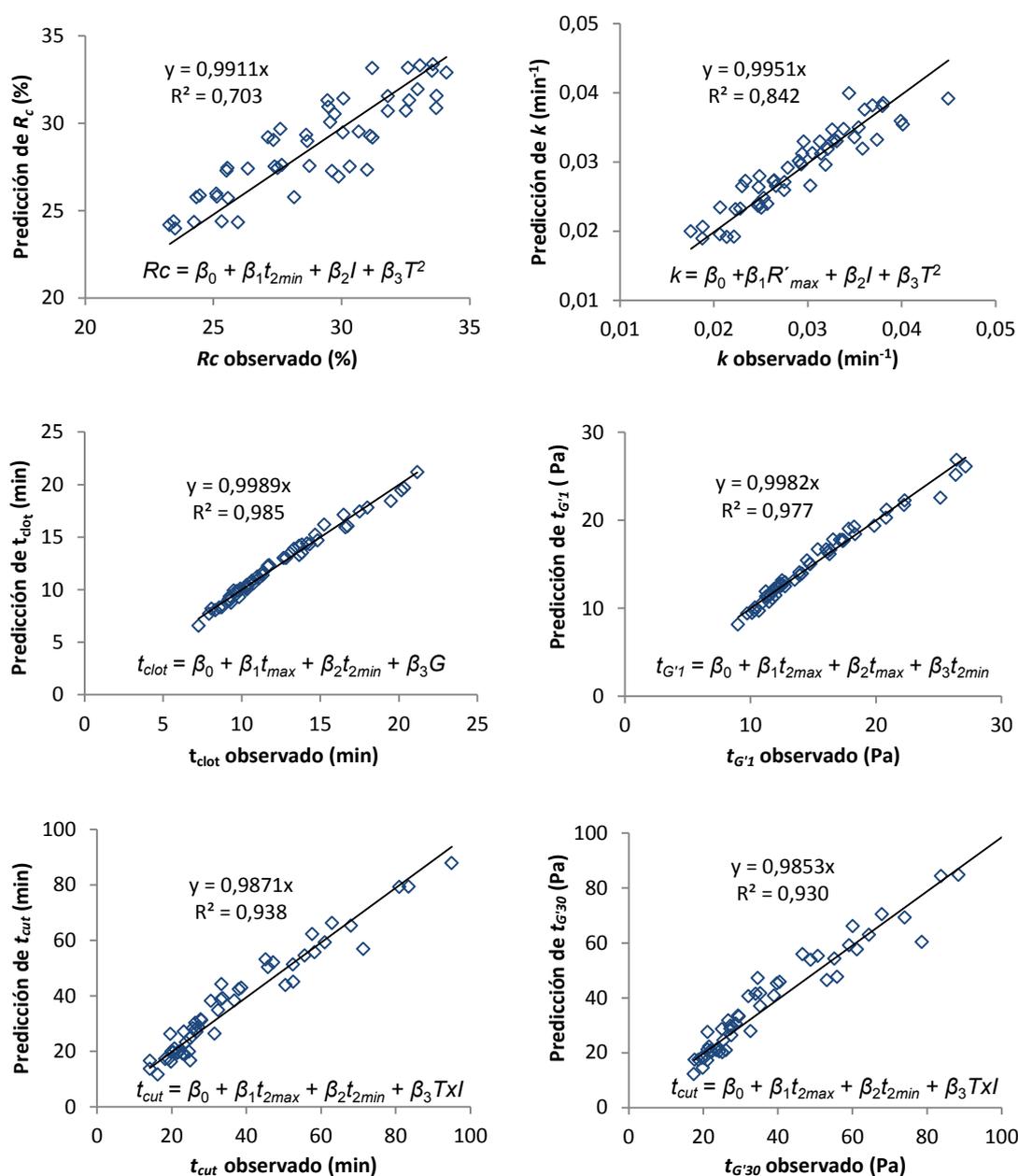
La Figura 6.2 muestra el efecto de la temperatura y la inulina sobre la constante cinética de expulsión del suero ( $k$ ) y el rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ). Se puede apreciar que  $k$  aumentó mientras que  $R_c$  disminuyó con el aumento de la temperatura, en concordancia con estudios previos donde a más alta temperatura la permeabilidad fue mayor, la reacción de sinéresis fue más rápida y la separación de suero aumentó (Fagan et al., 2007b; Castillo et al., 2006b).



**Figura 6.2** Efecto de la interacción temperatura – concentración de inulina ( $T \times In$ ) sobre: a) el rendimiento de la cuajada ( $R_c$ ) y b) la constante cinética de expulsión del suero ( $k$ ). Los datos corresponden al experimento presentado en el Capítulo 5 de la tesis.

Es importante resaltar que los parámetros ópticos que se usaron en este estudio fueron obtenidos solo durante la fase de coagulación, mientras que la mayoría de modelos publicados a la fecha para predecir índices de sinéresis han utilizado parámetros ópticos obtenidos después del corte de la cuajada. Tal como se mencionó en la revisión bibliográfica, existe otro sensor de dispersión de luz que posee un campo de visión amplio con relación al tamaño de la cuajada, que ha demostrado ser capaz de monitorizar la coagulación de la leche y la sinéresis de la cuajada simultáneamente (Castillo et al., 2005a; Fagan et al., 2007a y 2008). Probablemente al utilizar este tipo de sensor sería posible obtener predictores para los índices de sinéresis en geles lácteos suplementados con inulina sin necesidad de incluir un factor de corrección para la inulina.

En la Figura 6.3 se presenta el ajuste de las predicciones para  $k$ ,  $R_c$ ,  $t_{clot}$ ,  $t_{cut}$ ,  $t_{G'1}$  and  $t_{G'30}$  obtenidas con los mejores modelos de 3 variables encontrados en este estudio.



**Figura 6.3** Predicciones de  $k$ ,  $R_c$ ,  $t_{clot}$ ,  $t_{cut}$ ,  $t_{G'1}$  y  $t_{G'30}$  obtenidas con los mejores modelos de tres parámetros. N=52.  $R^2$ , coeficiente de determinación (corregido para las medias).

## 6.4 Conclusiones

Utilizando un sensor de dispersión de luz NIR fue posible obtener modelos para la predicción de parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos enzimáticos en los cuales se usó inulina como sustituto de grasa. Se determinaron modelos de

predicción con uno, dos y tres parámetros para: 1) el tiempo de coagulación visual ( $t_{clot}$ ) y el tiempo de gelificación reológico ( $t_{G'1}$ ) en los cuales los mejores predictores fueron los parámetros ópticos  $t_{max}$  y  $t_{2min}$  con valores de  $R^2$  de  $\sim 0,98$  y SEP menores de 1 min; 2) el tiempo de corte visual ( $t_{cut}$ ) y el tiempo de corte reológico ( $t_{G'30}$ ), con valores de  $R^2$  entre 0,89 y 0,96, donde fue necesario incluir la temperatura como un factor de corrección, y los cuales requerirían de una reducción de los SEP para su aplicación industrial; y 3) modelos de predicción para la sinéresis y el rendimiento de la cuajada, en los que se debe incluir la inulina y el cuadrado de la temperatura, y cuyo interés es la estimación de éstos parámetros de proceso críticos antes de realizar el corte de la cuajada.

## **Capítulo 7**

# **Estudio de la coagulación de geles lácteos bajos en grasa mediante un sensor óptico: efecto de la proteína, el calcio y la inulina**

### **Resumen**

Además de la temperatura y del nivel de sustitución de grasa por inulina, hay otros factores cuya variación a nivel industrial es común y de las cuales se requiere conocer su efecto sobre la coagulación para una adecuada monitorización y control en la elaboración de un queso bajo en grasa. En este trabajo se utilizaron simultáneamente un sensor de dispersión de luz NIR y reología oscilatoria de baja amplitud para monitorizar la coagulación de leche semidesnatada con variación en la concentración de inulina (2, 5 y 8%), de proteína (3, 4 y 5%) y de calcio (100, 200 mg L<sup>-1</sup>, equivalente a 0,90 y 1,80 mM). Este diseño se desarrolló por triplicado y de forma completamente aleatoria. A partir de parámetros ópticos y reológicos se pudieron diferenciar claramente los efectos de los factores estudiados sobre cada una de las tres fases del proceso de coagulación enzimática. La adición de inulina así como la de calcio en los niveles evaluados produjeron aumentos significativos en las velocidades de hidrólisis, agregación y endurecimiento. El aumento en la concentración de proteína fue el factor que tuvo mayor efecto en la cinética de coagulación, ocasionando una prolongación en la duración de la fase de hidrólisis y una reducción en la velocidad de las fases de agregación y endurecimiento, con un efecto neto de disminución del tiempo de corte. Para la predicción del tiempo de corte, definido como el momento en que el módulo

elástico alcanza una dureza de 30 Pa, se encontró el algoritmo  $t_{G'30} = \beta_1 t_{min}(1 + \beta_2 P + \beta_3 P^2)$  con  $R^2 = 0,94$  y  $SEP = 1,93$  min, demostrándose que los parámetros derivados del perfil de dispersión de luz NIR resultan útiles para la predicción del tiempo de corte en geles lácteos con inulina bajo distintas condiciones de procesamiento.

**Palabras clave:** Leche, inulina, coagulación enzimática, hidrólisis, agregación, endurecimiento, tiempo de coagulación, tiempo de corte, sensor óptico.

## 7.1 Introducción

En el Capítulo 5 de esta memoria se utilizó un sensor de dispersión de luz de infrarrojo cercano para evaluar el efecto de la temperatura y de la sustitución de grasa por inulina sobre las propiedades reológicas, la cinética de coagulación enzimática y la sinéresis de geles lácteos bajos en grasa. En el Capítulo 6 se demostró que, a partir de la información generada por el sensor óptico, es posible obtener modelos para la predicción de parámetros de coagulación y sinéresis en geles lácteos en los cuales se usó inulina como sustituto de grasa. Sin embargo, además de las evaluadas anteriormente, hay otras variables que afectan a la coagulación como la concentración de proteína y el nivel de cloruro de calcio añadido, de las cuales se requiere tener un buen entendimiento para lograr un control adecuado de etapas críticas en el proceso de elaboración del queso, como el tiempo de corte y el desuerado de la cuajada y, en consecuencia, mejorar el rendimiento y la calidad finales.

Un sensor óptico aplicado al control de la elaboración de queso debería funcionar sobre un rango de niveles de proteína, acorde con las variaciones que pueden presentarse a nivel de planta. La variación natural en la composición de la leche, especialmente en el contenido de grasa y caseína tiene gran influencia en el rendimiento y en muchos otros aspectos del queso incluyendo composición, microestructura, textura, propiedades reológicas, bioquímica de la maduración y propiedades funcionales (Hallén et al., 2010a; Guinee y McSweeney, 2006). De acuerdo con Johnson (2011), la variabilidad en el contenido de caseína resulta en diferencias en la velocidad de coagulación y la firmeza del coagulo; además está generalmente aceptado que la dureza

del gel aumenta con el nivel de proteína (Karlsson et al., 2007; Waungana et al. 1998; Guinee et al. 1997, 1996).

Durante la pasteurización de la leche se produce una precipitación parcial del fosfato de calcio (van Hooydonk et al., 1987) por lo que la adición de  $\text{CaCl}_2$  se ha constituido en una práctica común durante la elaboración de queso, no solo con el fin de compensar el calcio precipitado, sino también para superar las variaciones en el tiempo de coagulación de la leche, acelerar la reacción de coagulación y mejorar la textura y el rendimiento quesero (Hallén et al, 2010b, Landfield et al., 2002).

Esta práctica tiene el efecto de reducir el tiempo de coagulación enzimática, lo que ha sido atribuido en primer lugar, al descenso en el pH, que a su vez aumenta la velocidad de la reacción enzimática, y en segundo lugar, a la unión de los iones calcio con los residuos de aminoácidos cargados negativamente, reduciendo la carga negativa de la micela para permitir su acercamiento y, posiblemente, por la formación de puentes de calcio, incrementando así la velocidad de agregación y ocasionando la formación de geles más rígidos (Sandra et al., 2012; Lucey, 2011a).

Aunque los efectos generales de la adición de proteína y calcio sobre la coagulación enzimática son ampliamente conocidos, existen en la bibliografía contradicciones evidentes acerca de cómo la proteína y el calcio afectan a las fases de hidrólisis y de agregación, además el efecto de las interacciones entre la proteína y el calcio en presencia de inulina sobre tales fases no ha sido suficientemente estudiado. Las discrepancias mencionadas han sido parcialmente atribuidas por Sandra et al. (2011) entre otros factores a la falta de homogeneidad en la definición de los tiempos de agregación o coagulación y a las diferencias en los métodos empleados para medir tales tiempos.

En este trabajo se asume la hipótesis de que el sensor de dispersión de luz NIR permite detectar y diferenciar el efecto de la proteína, el calcio y la inulina sobre las fases de hidrólisis, agregación y endurecimiento en la coagulación enzimática. Los objetivos planteados en este estudio fueron: 1) evaluar el efecto de la concentración de proteína y de calcio sobre la coagulación de leche semidesnatada con adición de inulina y sobre los parámetros generados a partir del perfil de dispersión de luz NIR; 2)

determinar un modelo de predicción del tiempo de corte para geles lácteos bajos en grasa que pueda ajustarse a variaciones en los niveles de proteína, inulina y calcio.

## **7.2 Materiales y métodos**

En este experimento se utilizó un diseño factorial con 3 factores: concentración de inulina (2, 5 y 8%), concentración de proteína (3, 4 y 5%) y concentración de calcio (100, 200 mg L<sup>-1</sup>, equivalente a 0,90 y 1,80 mM). Este diseño se desarrolló por triplicado y de forma completamente aleatoria. La coagulación de la leche se realizó a 32 °C y se monitorizó simultáneamente mediante un sensor de dispersión de luz NIR y reología oscilatoria de baja amplitud, tal y como se describe en el Capítulo 4 de esta memoria. Para cada ensayo se reconstituyeron 300 mL de leche según el procedimiento descrito en la sección 4.2, al final del cual se adicionó la concentración de calcio requerida. Transcurrido un periodo de reposo de la leche de 1 h, se tomaron dos muestras de 50 mL cada una en envases plásticos que fueron guardados en congelación para posteriores análisis físico-químicos. Usando un vaso de precipitados de 400 mL la leche se dejó en un baño termostático hasta alcanzar la temperatura de coagulación de 32 °C; en ese momento se adicionó la enzima (100 μL L<sup>-1</sup> de quimosina), se agitó vigorosamente con una espátula y se tomaron con una probeta 2 alícuotas de ~80 mL cada una que se depositaron en las cubetas del sensor óptico (CoAguLab) y una tercera alícuota de ~40 mL que se llevó al reómetro.

La monitorización del proceso de coagulación en el reómetro se llevó a cabo hasta que el módulo elástico alcanzó 30 Pa, que fue el valor definido como tiempo de corte reológico. En este experimento no se hizo evaluación de parámetros visuales ni de sinéresis.

La descripción detallada del procedimiento de monitorización de la coagulación usando el CoAguLab y el reómetro y de los parámetros medidos con tales equipos, se puede consultar en el Capítulo 4, secciones 4.3 y 4.4 de esta memoria. El análisis estadístico de los datos de este experimento se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 4.5.

### 7.2.1 Relación entre parámetros ópticos y reológicos con las fases del proceso de coagulación enzimática

En estudios previos se ha establecido que existe una fuerte correlación lineal entre el parámetro óptico de tiempo correspondiente al punto de inflexión del perfil de dispersión/reflectancia de luz de infrarrojo cercano y el tiempo de coagulación (Castillo et al., 2000; Payne et al., 1993; López et al., 1997b). Del mismo modo, con datos del trabajo de Tabayehnejad et al. (2012) se determinó que  $t_{max}$  corresponde al 84% del tiempo de coagulación de Berridge, y en el experimento descrito en el Capítulo 5 de esta memoria se encontró que  $t_{max}$  corresponde al 79% del tiempo de coagulación visual ( $t_{clot}$ ). Por otra parte, Castillo (2000) realizó una estimación del grado de hidrólisis a tiempo  $t_{max}$ , en base a los resultados obtenidos por Saputra (1992), quien cuantificó la hidrólisis enzimática de la leche mediante determinación de la concentración del caseinomacropéptido, encontrando que  $t_{max}$  corresponde a un grado de hidrólisis ( $\alpha$ ) de 78%. Lo anterior significa que al momento en que aparece  $t_{max}$  está terminando la fase de hidrólisis y ha comenzado la fase de agregación.

Adicionalmente, al monitorizar el proceso de coagulación mediante reología oscilatoria, se definió el tiempo de gelificación ( $t_{G'1}$ ) como el momento en el cual el gel alcanza una dureza de 1 Pa (Hussain et al., 2011; Jaros et al., 2008; Mishra et al., 2005), indicando el inicio de la fase de endurecimiento, y se estableció que el tiempo de corte de la cuajada corresponde a aquel cuando ésta ha alcanzado una dureza de 30 Pa ( $t_{G'30}$ ) valor similar al usado en el estudio de Everard et al. (2008). Al calcular la diferencia entre  $t_{G'1}$  y  $t_{max}$  se obtiene entonces una estimación de la duración de la fase de agregación, que se ha simbolizado como  $t_{ag}$  y la diferencia entre  $t_{G'30}$  y  $t_{G'1}$  corresponde a la estimación de la duración de la fase de endurecimiento, que previamente se había definido como el parámetro  $t_{F30}$ .

Los parámetros descritos anteriormente han permitido estudiar los efectos de la concentración de inulina, proteína y calcio sobre cada una de las fases del proceso de coagulación, como se describirá a continuación.

### 7.3 Resultados y discusión

Para cada uno de los tres niveles de proteína establecidos en el diseño experimental, las concentraciones finales obtenidas fueron  $2,95\% \pm 0,05$ ,  $3,95 \pm 0,06$  y  $4,92 \pm 0,05$ , mientras que el contenido de grasa fue de  $1,57 \pm 0,09$ . Como era de esperar, la adición de calcio provocó una leve disminución en el pH de la leche, aunque la diferencia entre las medias no fue significativa. Para el nivel de calcio de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , el pH promedio final en las muestras fue  $6,64 \pm 0,06$ , mientras que para el nivel de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  fue  $6,61 \pm 0,05$ . En las Tablas 7.1 y 7.2 se presentan los resultados del análisis de varianza de los datos obtenidos. En un análisis preliminar se encontró que el efecto de la réplica no era significativo, por lo que no fue incluido en el modelo. Se observaron efectos significativos de la concentración de inulina, proteína y calcio sobre casi todas las variables dependientes evaluadas, con excepción de los parámetros ópticos  $R_{max}$ ,  $R_{2min}$  y  $tg \delta_{30Pa}$  donde no hubo efecto de la concentración de calcio. El efecto de la interacción  $PxCa$  también fue significativo sobre casi todos los parámetros de respuesta evaluados, mientras que las interacciones  $InxP$  e  $InxCa$  mostraron efectos significativos especialmente sobre los indicadores reológicos de endurecimiento.

**Tabla 7.1** Análisis de la varianza y estadísticos F del efecto de la inulina, proteína, calcio y sus interacciones sobre los parámetros ópticos, reológicos y la duración de las etapas de la coagulación.

Parámetros	Modelo		Fuente de variación					
	$R^2$	F	In (GL=2)	P (GL=2)	Ca (GL=1)	InxP (GL=4)	InxCa (GL=2)	PxCa (GL=2)
$t_{max}$	0,852	17,7***	29,3***	39,3***	61,5***	1,89 <sup>ns</sup>	0,58 <sup>ns</sup>	11,1***
$t_{2max}$	0,833	15,4***	17,9***	44,9***	48,5***	1,60 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	9,60**
$t_{2min}$	0,856	18,4***	35,0***	30,9***	70,7***	2,20 <sup>ns</sup>	1,16 <sup>ns</sup>	12,7***
$R_{max}$	0,930	41,0***	42,7***	210,4***	2,75 <sup>ns</sup>	2,10 <sup>ns</sup>	5,13*	2,95 <sup>ns</sup>
$R_{2max}$	0,914	32,6***	17,6***	161,6***	27,6***	3,36*	0,58 <sup>ns</sup>	11,3***
$R_{2min}$	0,900	27,8***	30,0***	139,4***	0,08 <sup>ns</sup>	2,39 <sup>ns</sup>	4,79*	1,49 <sup>ns</sup>
$t_{G'1}$	0,880	22,6***	54,9***	7,03*	102,9***	2,27 <sup>ns</sup>	5,41*	23,5***
$t_{og}$	0,913	32,3***	34,3***	107,4***	57,3***	3,73*	7,99*	24,2***
$t_{G'30}$	0,940	48,2***	31,8***	184,5***	79,9***	7,27**	9,28**	33,4***
$t_{F30}$	0,948	55,7***	20,3***	254,6***	58,7***	8,57***	8,95**	31,5***
$tg \delta_{30Pa}$	0,589	4,03**	4,67*	3,50*	9,85*	3,82*	1,57 <sup>ns</sup>	14,6***

$N = 54$ ; *In*, inulina; *P*, proteína; *Ca*, calcio; *InxP*, interacción inulina-proteína; *InxCa*, interacción inulina-calcio; *PxCa*, interacción proteína-calcio;  $R^2$ , coeficiente de determinación; *F*, estadístico del ANOVA; GL, grados de libertad; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$ , \*\*\* $P < 0,0001$ ; <sup>ns</sup>, no significativo. Para la definición de las variables dependientes véase la sección de materiales y métodos específica de este capítulo y las secciones 4.3 y 4.4 del capítulo de materiales y métodos generales.

### 7.3.1 Efecto de la adición de inulina

Como se puede observar en la Tabla 7.2, la adición de inulina en las tres concentraciones estudiadas produjo una disminución significativa en los tiempos a los cuales se alcanzan los máximos y mínimos de la primera y segunda derivadas del ratio de dispersión de luz ( $t_{max}$ ,  $t_{2max}$  y  $t_{2min}$ ), así como también una reducción en los valores de  $R$  correspondientes a los máximos y mínimos de tales derivadas ( $R_{max}$ ,  $R_{2max}$ ,  $R_{2min}$ ), lo que representa una mayor pendiente en el perfil del ratio de dispersión de luz y por tanto un aumento en la velocidad de la reacción de hidrólisis con la concentración de inulina, confirmando los resultados obtenidos en el Capítulo 5 de esta memoria de tesis. Como posible explicación a este fenómeno se sugiere que la reducción en el contenido de humedad en la muestra, sumado a una posible retención de agua por parte de la inulina ocasionaría un aumento de la concentración relativa de enzima en la solución, acelerando la reacción de hidrólisis.

**Tabla 7.2** Influencia de los efectos principales (inulina, proteína y calcio) sobre los parámetros de coagulación ópticos y reológicos<sup>1,2</sup>

	Efectos principales								
	Inulina (%)			Proteína (%)			Calcio (mg CaCl <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )		
	2	5	8	3	4	5	100	200	
$t_{max}$	10,4 <sup>a</sup>	9,23 <sup>b</sup>	8,66 <sup>c</sup>	8,38 <sup>a</sup>	9,50 <sup>b</sup>	10,4 <sup>c</sup>	10,1 <sup>a</sup>	8,69 <sup>b</sup>	
$t_{2max}$	8,36 <sup>a</sup>	7,56 <sup>b</sup>	7,11 <sup>c</sup>	6,62 <sup>a</sup>	7,79 <sup>b</sup>	8,62 <sup>c</sup>	8,28 <sup>a</sup>	7,08 <sup>b</sup>	
$t_{2min}$	12,0 <sup>a</sup>	10,6 <sup>b</sup>	10,1 <sup>c</sup>	9,93 <sup>a</sup>	11,0 <sup>b</sup>	11,8 <sup>c</sup>	11,7 <sup>a</sup>	10,1 <sup>b</sup>	
$R_{max}$	1,145 <sup>a</sup>	1,134 <sup>b</sup>	1,126 <sup>c</sup>	1,114 <sup>a</sup>	1,136 <sup>b</sup>	1,155 <sup>c</sup>	1,136 <sup>a</sup>	1,134 <sup>a</sup>	
$R_{2max}$	1,048 <sup>a</sup>	1,043 <sup>b</sup>	1,040 <sup>bc</sup>	1,030 <sup>a</sup>	1,044 <sup>b</sup>	1,055 <sup>c</sup>	1,046 <sup>a</sup>	1,040 <sup>b</sup>	
$R_{2min}$	1,230 <sup>a</sup>	1,216 <sup>b</sup>	1,206 <sup>bc</sup>	1,190 <sup>a</sup>	1,219 <sup>b</sup>	1,243 <sup>c</sup>	1,217 <sup>a</sup>	1,218 <sup>a</sup>	
$t_{ag}$	4,94 <sup>a</sup>	3,78 <sup>b</sup>	3,18 <sup>c</sup>	5,73 <sup>a</sup>	3,51 <sup>b</sup>	2,66 <sup>c</sup>	4,63 <sup>a</sup>	3,30 <sup>b</sup>	
$t_{G'1}$	15,3 <sup>a</sup>	13,0 <sup>b</sup>	11,8 <sup>c</sup>	14,1 <sup>a</sup>	13,0 <sup>b</sup>	13,0 <sup>bc</sup>	14,8 <sup>a</sup>	12,0 <sup>b</sup>	
$t_{G'30}$	34,3 <sup>a</sup>	27,3 <sup>b</sup>	24,9 <sup>bc</sup>	42,3 <sup>a</sup>	24,4 <sup>b</sup>	19,8 <sup>c</sup>	33,3 <sup>a</sup>	24,3 <sup>b</sup>	
$t_{F30}$	19,0 <sup>a</sup>	14,3 <sup>b</sup>	13,1 <sup>bc</sup>	28,1 <sup>a</sup>	11,4 <sup>b</sup>	6,8 <sup>c</sup>	18,6 <sup>a</sup>	12,3 <sup>b</sup>	
$tg \delta_{30Pa}$	0,273 <sup>a</sup>	0,270 <sup>b</sup>	0,270 <sup>bc</sup>	0,273 <sup>a</sup>	0,271 <sup>ab</sup>	0,270 <sup>b</sup>	0,272 <sup>a</sup>	0,270 <sup>b</sup>	

<sup>1</sup>LSM con las mismas letras no fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ), las comparaciones son solo para cada factor; número de réplicas = 3; número de observaciones,  $N = 54$ . <sup>2</sup>Para la definición de las variables dependientes véase la sección de materiales y métodos específica de este capítulo y las secciones 4.3 y 4.4 del capítulo de materiales y métodos generales.

La adición de inulina a la leche produjo también una disminución en el tiempo de agregación ( $t_{ag}$ ) y un aumento en la velocidad de endurecimiento de los geles ( $t_{F30}$ ),

especialmente al pasar de un nivel de 2 a 5%, razón por la cual se obtuvieron tiempos de gelificación y de corte reológicos más cortos. Lo anterior también podría atribuirse a la capacidad de retención de agua por parte de la inulina, que produciría un aumento relativo en la concentración de solutos y con ello una mayor interacción entre las micelas de caseína. Estos resultados confirman lo encontrado en el estudio presentado en el Capítulo 5 de esta memoria.

El aumento en la concentración de inulina de 2 a 5% produjo también una reducción significativa en el parámetro  $tg \delta_{30Pa}$  lo que probablemente se debe a un incremento en el módulo elástico, como consecuencia del aumento de la concentración de sólidos en la disolución y de la retención de agua por parte de la inulina.

### 7.3.2 Efecto de la concentración de proteína

La concentración de proteína, en los tres niveles evaluados, produjo diferencias significativas entre las medias de todos los parámetros de respuesta, con excepción del tiempo de gelificación ( $t_{G'}$ ), en el cual el efecto sólo fue significativo entre los niveles de 3 y 4% (Tabla 7.3). Los parámetros de tiempo ópticos ( $t_{max}$ ,  $t_{2max}$  y  $t_{2min}$ ) y los parámetros de respuesta del sensor ( $R_{max}$ ,  $R_{2max}$ ,  $R_{2min}$ ) aumentaron con la concentración de proteína, indicando por una parte, una disminución en la velocidad de la reacción de hidrólisis y, por otra parte, una mayor dispersión de luz en las redes tridimensionales que contienen una mayor concentración de proteína (Figura 7.1). Castillo et al. (2003b) encontraron un efecto similar y sugirieron dos posibles causas: 1) una disminución en la velocidad de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína como resultado del retraso en la velocidad de difusión de la enzima debido al aumento de sustrato, 2) una condición de saturación de enzima por el sustrato, bajo la cual se produciría un aumento en el tiempo necesario para completar el porcentaje de hidrólisis suficiente que permite dar inicio a la fase de agregación de las micelas. Sandra et al. (2011) evaluaron mediante DWS, reología oscilatoria y liberación de CMP, las diferencias en la cinética de coagulación de leche concentrada por UF en relaciones de volumen de 1x (control), 3x y 5x, coaguladas a 30 °C con quimosina (4,36  $\mu\text{L L}^{-1}$  leche). Los autores no encontraron diferencias en la cantidad de CMP liberado en el tiempo entre la leche concentrada 1x, 3x y 5x,

concluyendo que la velocidad de escisión de la quimosina no fue afectada por la concentración de proteína, lo que fue confirmado por la ausencia de diferencias en los tiempos requeridos para alcanzar 90% de escisión de la  $\kappa$ -caseína. Lo anterior sugiere que, en las condiciones de este estudio, al igual que en el estudio de Sandra et al. (2011), donde en ambos casos la concentración de enzima se mantuvo constante, el sistema estaría en una condición de saturación de enzima por el sustrato, en la cual la enzima estaría trabajando a velocidad máxima y la hidrólisis se produce a una velocidad constante.

Las medias de los tiempos de agregación ( $t_{ag}$ ) disminuyeron con el aumento en la concentración de proteína, pero el efecto fue más pronunciado entre los niveles de 3 a 4% donde la reducción fue de ~39%, mientras que de 4 a 5% fue solo de ~24%. Del mismo modo, el tiempo de gelificación ( $t_{G'}$ ) disminuyó significativamente al aumentar el nivel de proteína de 3 a 4%, sin embargo permaneció constante al pasar de 4 a 5% (Figura 7.1), lo que coincide con lo observado en el estudio de Guinee et al. (1997), donde tampoco hubo reducción del tiempo de gelificación a concentraciones de proteína superiores a 4%. Se debe considerar aquí que  $t_{G'}$  incluye todo el periodo de tiempo correspondiente a las fases de hidrólisis y de agregación sobre las cuales, como ya se ha visto, la proteína tiene efectos inversos, lo que puede causar que en determinadas condiciones no se observen efectos significativos de la proteína sobre  $t_{G'}$ .

El tiempo de corte reológico a 30 Pa ( $t_{G'30}$ ) así como el tiempo de endurecimiento de la cuajada ( $t_{F30}$ ) disminuyeron significativamente cuando aumentó la proteína, pasando la media de  $t_{F30}$  de 28,1 min a una concentración de proteína de 3% a tan solo 6,8 min con 5% de proteína. Contrario a lo encontrado en este estudio, Castillo et al. (2003b) observaron un aumento en el tiempo de corte con el aumento en la concentración de proteína. La contradicción en estos resultados podría deberse a la subjetividad en la determinación del tiempo de corte en aquel estudio, ya que se realizó de manera visual, mientras que en esta investigación los tiempos de corte se determinaron utilizando un reómetro. Dado que la micela de caseína es la estructura responsable de la formación de la red tridimensional en los geles lácteos, es de esperar que el aumento en su concentración ocasione un incremento en las velocidades de agregación y endurecimiento como consecuencia del aumento de colisiones y puntos de

contacto por unidad de área y del número y la fuerza de los enlaces entre las micelas de caseína coaguladas (Anema, 2008).

El parámetro reológico  $tg \delta_{30Pa}$  disminuyó significativamente con la concentración de proteína, indicando esto que a mayor concentración de proteína los geles fueron más firmes. A niveles bajos de proteína se obtuvieron los mayores valores para el parámetro  $tg \delta_{30Pa}$ , condición en la cual los geles son más débiles, menos elásticos y por tanto con una mayor tendencia a la sinéresis.

Varios autores han encontrado que la velocidad de endurecimiento aumenta con la concentración de proteína (Sandra et al., 2011; Mishra et al., 2005; Guinee et al., 1997; van Hooydonk y van den Berg, 1988), confirmando lo observado en este estudio. En la Figura 7.1 se muestra gráficamente el efecto de la concentración de proteína sobre algunos parámetros relacionados con la agregación y el endurecimiento del gel.

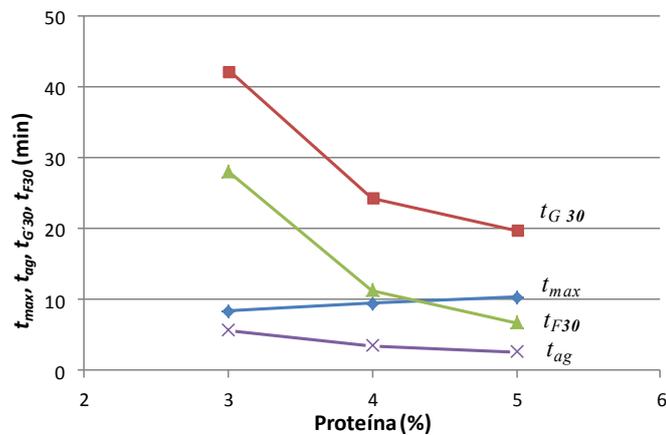
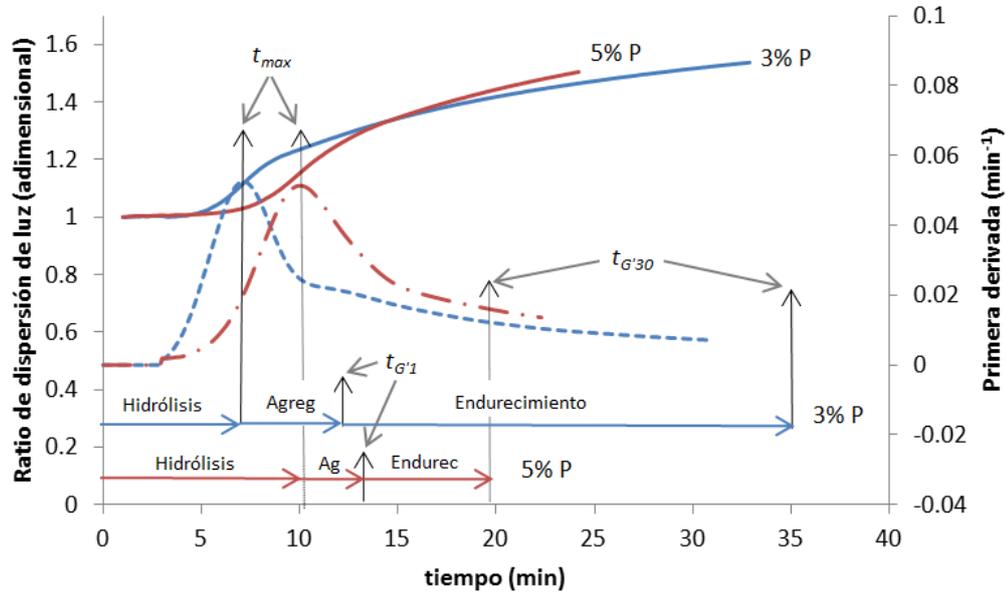


Figura 7.1 Efecto de la concentración de proteína en  $t_{max}$ ,  $t_{ag}$ ,  $t_{G30}$ ,  $t_{F30}$

En la Figura 7.2 se pueden comparar las diferencias entre los perfiles del ratio de dispersión de luz y su primera derivada así como también la duración estimada de las fases de hidrólisis, agregación y endurecimiento para las muestras con 3 y 5% de proteína, resaltando el fuerte efecto de la adición de proteína sobre la disminución de la fase de endurecimiento y por tanto del tiempo de corte. Como puede observarse claramente, el efecto de la proteína sobre las etapas de formación del gel (agregación y

endurecimiento) es opuesto al observado en la fase enzimática, ya que mientras aquellas disminuyen, la enzimática aumenta.



**Figura 7.2** Efecto de la concentración de proteína sobre las fases enzimática (hidrólisis) y no enzimática (agregación y endurecimiento) del gel. Datos promedio de los ensayos realizados con 2% de inulina, 200 ppm de  $CaCl_2$  y con 3 o 5% de proteína.

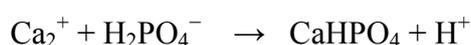
Si se considera que el tiempo de corte  $t_{G'30}$  representa la suma total de los tiempos de las fases de hidrólisis, agregación y endurecimiento, en la Figura 7.2 se puede ver que, conforme aumenta la concentración de proteína, la duración de fase de endurecimiento ( $t_{F30}$ ) tiene un peso relativo cada vez menor respecto a la duración total de las tres fases ( $t_{G'30}$ ), siendo la relación  $t_{F30}/t_{G'30}$  igual a 66,4, 46,7 y 34,3% para los niveles de proteína de 3, 4 y 5% respectivamente, siendo este descenso aparentemente lineal con una pendiente de -16 y  $R^2$  de 0,98.

### 7.3.3 Efecto de la adición de cloruro de calcio

Las medias de mínimos cuadrados de los parámetros ópticos  $t_{2max}$ ,  $t_{max}$ , y  $t_{2min}$  disminuyeron significativamente con la adición de cloruro de calcio, lo que significa que la fase de hidrólisis fue más rápida como consecuencia del aumento en la

concentración de  $\text{CaCl}_2$ . En este punto conviene señalar que en este estudio no se realizó ningún tipo de ajuste al pH de la leche posterior a la adición de  $\text{CaCl}_2$ .

Existen contradicciones en la literatura acerca del efecto de la adición de calcio sobre fase de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína. Sandra et al. (2012), mediante análisis de liberación de CMP, encontraron que la adición de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  a leche desnatada no afectó a la fase primaria (hidrólisis) de la reacción de coagulación. Este resultado coincide con el de otros estudios donde se ha observado que la adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche no afectó directamente a la fase enzimática de la coagulación (de Kruif, 1999; Mellema et al., 1999; van Hooydonk et al., 1986). Contrario a lo anterior Bringe y Kinsella (1986) argumentaron que la velocidad de la primera fase de la reacción catalizada por la quimosina aumentó con la adición de 3 a 10 mM de calcio, mientras que Famelart et al. (1999) observaron un descenso de la constante de velocidad de hidrólisis con el aumento de la concentración de  $\text{CaCl}_2$ . La ionización del  $\text{CaCl}_2$ , conlleva un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  soluble, que es capaz de desplazar un cierto número de protones por transformación de los iones  $\text{HPO}_4^-$  en fosfato cálcico, con aumento del calcio micelar y solubilización de iones  $\text{H}^+$ , que disminuye el pH de la leche (Castillo, 2001), de acuerdo con la siguiente reacción (Walstra et al., 2006):



Dado que la actividad de las enzimas coagulantes aumenta con el descenso del pH (Lucey, 2002; van Hooydonk et al., 1986a; Humme, 1972), entonces la adición de  $\text{CaCl}_2$  produce un efecto indirecto de aceleración de la fase de hidrólisis.

Coincidiendo con los resultados de este trabajo, Castillo et al. (2002) encontraron una reducción en  $t_{max}$  al aumentar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 1.38 a 3.22 mM, y de Kruif (1999) determinó que el tiempo de coagulación enzimático disminuyó cuando la adición de calcio aumentó de 0 a 25 mM.

Los efectos del calcio sobre el endurecimiento de geles lácteos se han atribuido a la reducción en el potencial  $\zeta$  global de las micelas de caseína y, por consiguiente, la disminución en la repulsión electrostática y el incremento de los enlaces entre las micelas (Choi et al., 2007; Udabage et al., 2001). En este estudio probablemente la

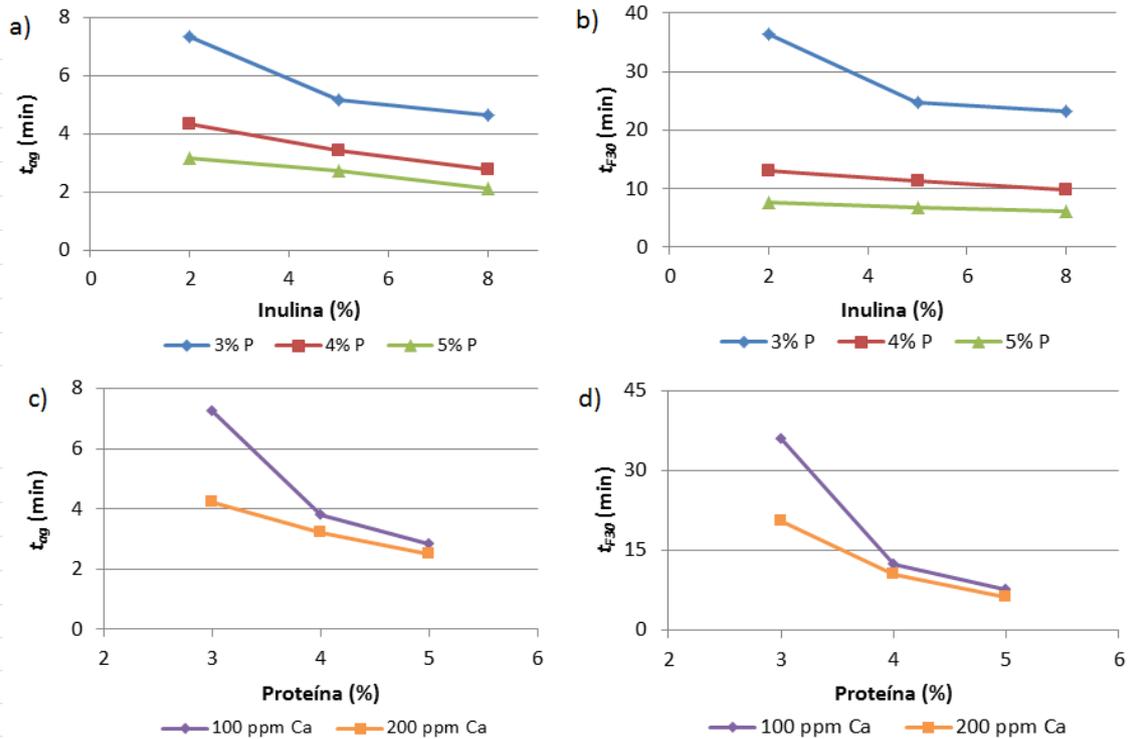
adición de  $\text{CaCl}_2$ , aumentó los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en solución, lo que disminuyó el pH y ocasionó una reducción significativa en los tiempos de agregación ( $t_{ag}$ ) y de gelificación ( $t_{G'1}$ ). Según Mishra et al. (2005), a medida que desciende el pH hay una reducción en la repulsión electrostática entre las micelas de caseína, debido a la disminución en la carga negativa neta en las caseínas por la captura de protones por parte de los residuos de aminoácidos con carga negativa. Esto causa un incremento en la atracción electrostática e interacciones hidrofóbicas y la floculación de las micelas de caseína ocurre a un menor grado de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína.

El tiempo de corte reológico a 30 Pa ( $t_{G'30}$ ) y el tiempo de endurecimiento desde 1 Pa hasta 30 Pa ( $t_{F30}$ ) disminuyeron  $\sim 27$  y  $\sim 34\%$  respectivamente con el aumento en la concentración de calcio (Tabla 7.2), lo que sugiere que las propiedades viscoelásticas del gel también se vieron afectadas por la adición de  $\text{CaCl}_2$ . El módulo elástico ( $G'$ ) se desarrolló más rápido, alcanzando valores de dureza mayores en menos tiempo. Estos resultados coinciden con lo encontrado en otros estudios (Sandra et al., 2012; Hallén et al., 2010; Nájera et al., 2003; Landfeld et al., 2002; Udabage et al., 2001, 2000). No se observaron diferencias entre las medias de  $tg \delta_{30Pa}$ , lo que sugiere que se formaron enlaces similares en la red proteica para los dos niveles de calcio evaluados, debido probablemente a que el calcio disponible al nivel inferior ya es suficiente para la formación del gel.

### 7.3.4 Efecto de las interacciones entre los factores experimentales

Algunas interacciones entre los factores experimentales tuvieron efectos significativos sobre las variables de coagulación estudiadas. Por ejemplo la interacción  $In \times P$  tuvo efecto significativo sobre el tiempo de agregación (Fig. 7.3 a), observándose una mayor disminución de éste con el aumento de la inulina al nivel más bajo de proteína. La explicación que se sugiere para el fenómeno anterior es que al aumentar la concentración de proteína la reacción de agregación se acelera por un incremento del número de colisiones entre las micelas de caseína, pero al añadir más inulina la disminución en el contenido de agua que produce hace que la velocidad de difusión de las micelas disminuya, con lo cual se acusa menos el efecto del aumento de proteína. La

explicación anterior sería también aplicable al efecto de la interacción  $InxP$  sobre el tiempo de endurecimiento ( $t_{F30}$ ), que mostró el mismo comportamiento (Fig. 7.3 b).



**Figura 7.3** Efecto de algunas interacciones sobre parámetros de coagulación. a) Interacción  $InxP$  sobre  $t_{ag}$ ; b) Interacción  $InxP$  sobre  $t_{F30}$ ; c) Interacción  $PxCa$  sobre  $t_{ag}$ ; d) Interacción  $PxCa$  sobre  $t_{F30}$ .

Al analizar el efecto de la interacción  $PxCa$  se observó que la disminución en las velocidades de agregación y de endurecimiento (Fig. 7.3 c y d) ocasionada por la disminución de proteína es más fuerte cuando la concentración de calcio es más baja (100 mg L<sup>-1</sup>). A concentración de 100 ppm de calcio, un aumento de proteína de 3 a 4% produce un marcado descenso los tiempos de agregación y endurecimiento, pero cuando el nivel de proteína es mayor, el calcio parece actuar como un factor limitante sobre capacidad de agregación de la proteína.

### 7.3.5 Predicción de los tiempos de gelificación y de corte reológicos

Utilizando los procedimientos de máximo  $R^2$  y NLIN de SAS se seleccionaron los mejores modelos de una, dos y tres variables para la predicción de los tiempos de gelificación y de corte reológicos ( $t_{G'1}$  y  $t_{G'30}$ ), que se presentan en la Tabla 7.3.

**Tabla 7.3** Algoritmos para la predicción de los tiempos reológico de gelificación ( $t_{G'1}$ ) y de corte ( $t_{G'30}$ ).

	Modelo	Coefficientes	$R^2$	SEP (min)
1	$t_{G'1}^{***} = \beta_1 t_{2min}$	$\beta_1 = 1,192$	0,626	1,23
2	$t_{G'1}^{***} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma P)$	$\beta_1 = 1,7271$ $\gamma = -0,0737$	0,871	0,58
3	$t_{G'1}^{***} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma P) + \beta_2 InxCa$	$\beta_1 = 1,782$ $\gamma = -0,1331$ $\beta_2 = -0,000456$	0,919	0,53
4	$t_{G'30}^{***} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma P)$	$\beta_1 = 6,7429$ $\gamma = -0,1546$	0,781	3,50
5	$t_{G'30}^{***} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma P) + \beta_2 t_{max}$	$\beta_1 = -6,303$ $\gamma = 11,80$ $\beta_2 = -0,9458$	0,792	3,43
6	$t_{G'30}^{***} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma_1 P + \gamma_2 P^2)$	$\beta_1 = 15,584$ $\gamma_1 = -0,3573$ $\gamma_2 = -0,0358$	0,939	1,93

N = 51.  $\beta_1, \beta_2, \gamma_1, \gamma_2$ , coeficientes de regresión.  $R^2$ , coeficiente de determinación (corregido para las medias). SEP, error estándar de predicción. \*\*\* P < 0,0001.

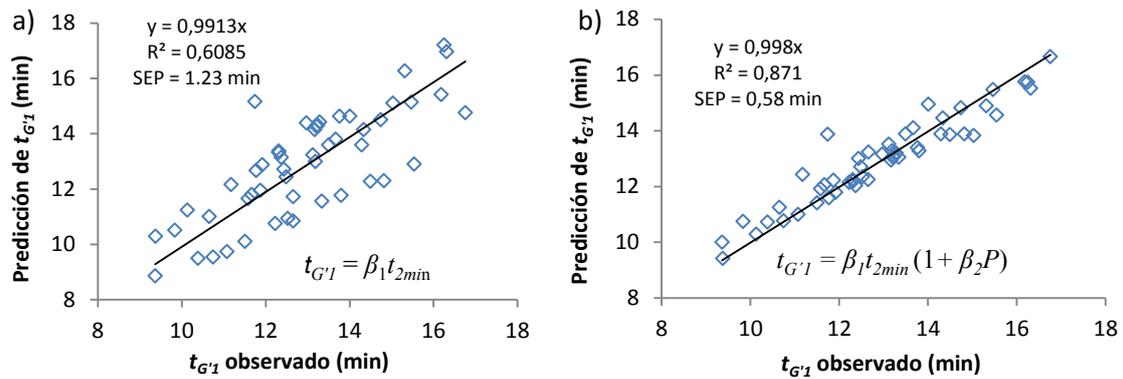
El mejor predictor para el tiempo de gelificación reológico ( $t_{G'1}$ ) fue el parámetro  $t_{2min}$ , aunque cuando éste se usó como única variable explicativa, el modelo obtenido (modelo 1 en la Tabla 7.3) tuvo un  $R^2$  de solo 0,626, debido posiblemente a que la variación en  $t_{2min}$  no es suficiente para contabilizar el efecto de todos los factores experimentales sobre el tiempo de gelificación en presencia de inulina. Lo anterior se comprobó al analizar el mejor modelo de dos variables encontrado (modelo 2 en la Tabla 7.3), el cual incluyó el efecto de la proteína, lo que resultó en una notable mejoría en la predicción, al reducirse el valor de SEP a menos de la mitad (0,58 min) y aumentar el valor de  $R^2$  a 0,871. La incorporación en el algoritmo anterior de la interacción  $InxCa$  permitió obtener el mejor modelo de 3 variables, con valores de  $R^2$  y SEP de 0,919 y 0,53 min respectivamente, reflejando el efecto observado de estos dos factores sobre los

tiempos de hidrólisis y de agregación. Sin embargo este modelo resulta poco práctico dado el número de coeficientes que incluye.

Al comparar los algoritmos de predicción para el tiempo de gelificación obtenidos en este experimento con los que se presentaron en el Capítulo 6 de esta memoria y otros encontrados en la bibliografía se pueden hacer algunas consideraciones importantes. En primer lugar señalar que el punto de gelificación teórico durante la coagulación enzimática de la leche, fue definido por McMahon et al. (1984) como el momento en el que se constituye la red tridimensional primaria e infinita de caseína y la leche deja de comportarse como un líquido. Dicho punto puede determinarse de diversas formas, habiéndose utilizado en esta tesis dos de ellas: 1) la observación visual del inicio de la floculación ( $t_{clot}$ ) y 2) el tiempo al cual el módulo de almacenamiento de gel alcanza una dureza de 1 Pa ( $t_{G'1}$ ), representando ambos métodos grados de coagulación diferentes, siendo  $t_{clot}$  anterior a  $t_{G'1}$ . Esta diferencia en el grado de coagulación podría explicar el hecho de que en los algoritmos para la predicción de  $t_{clot}$  y  $t_{G'1}$  los mejores predictores hayan sido los parámetros  $t_{max}$  y  $t_{2min}$ , respectivamente, ya que  $t_{2min}$  es posterior en el tiempo a  $t_{max}$  y se acerca más a  $t_{G'1}$  (ver Fig. 6.1).

Una segunda consideración sobre los modelos presentados en la Tabla 7.3 es que para mejorar la bondad de la predicción de  $t_{G'1}$  fue necesario incluir la proteína en el algoritmo, a diferencia de los modelos de predicción del tiempo de gelificación (que han utilizado parámetros derivados del perfil de dispersión de luz NIR) publicados hasta la fecha (Castillo et al., 2006a; Castillo et al., 2000), los cuales tuvieron buenos ajustes sin incluir la proteína. En este trabajo se utilizaron 3 concentraciones de proteína (3, 4 y 5%), por lo que la necesidad de su presencia en los modelos se debe probablemente al pronunciado efecto de este factor sobre las fases de hidrólisis y de agregación micelar, como se comentó en la sección 7.3.2, mientras que en los trabajos anteriormente citados, los modelos fueron obtenidos a partir de un nivel de proteína constante. Otro factor al cual pueden atribuirse las diferencias de los modelos obtenidos en este trabajo, frente a los encontrados en estudios anteriores, es la presencia de la inulina y sus posibles interacciones con la proteína y el calcio.

En la Figura 7.4 se pueden comparar los ajustes de los algoritmos para la predicción de  $t_{G'1}$  sin y con la inclusión de proteína.

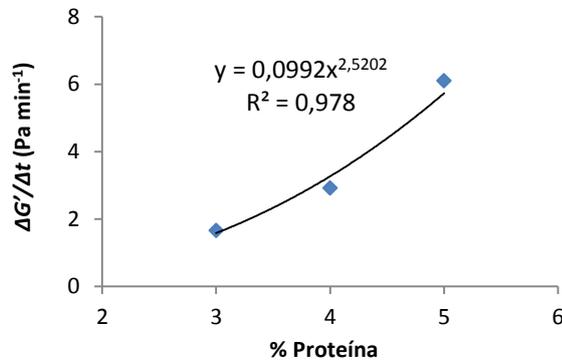


**Figura 7.4** Ajuste de los modelos para la predicción de  $t_{G'1}$  sin a) y con b) ajuste para la concentración de proteína. N=51.  $R^2$ , coeficiente de determinación (corregido para las medias); SEP, error estándar de predicción.

Para la predicción del tiempo de corte a 30 Pa no fue posible obtener un modelo de un solo parámetro con valores aceptables de  $R^2$  y SEP. El modelo número 4 de la Tabla 7.3 fue el mejor modelo de 2 parámetros obtenido, con valores de  $R^2$  y SEP de 0,781 y 3,50 min respectivamente, siendo idéntico al encontrado para  $t_{G'1}$ . Al introducir el parámetro óptico  $t_{max}$  en el algoritmo anterior se obtuvo el mejor modelo de 3 parámetros para la predicción de  $t_{G'30}$ , pero la mejora en los valores de  $R^2$  y SEP fue leve; sin embargo al incluir el efecto cuadrático de la proteína se obtuvo el modelo 6, el cual permitió predecir el tiempo de corte reológico con un  $R^2$  de 0,939 y un SEP de 1,93 min, valores aceptables si se considera que los otros dos factores experimentales (inulina y calcio) también ejercen efectos significativos sobre las distintas fases del proceso de coagulación.

Como se había observado antes en la Figura 7.1, el tiempo de endurecimiento ( $t_{F30} = t_{G'30} - t_{G'1}$ ) decrece más que proporcionalmente con el incremento en la concentración de proteína; adicionalmente, al analizar los datos reológicos se encontró que la velocidad de aumento del módulo elástico ( $\Delta G'/\Delta t$ ) parece ajustarse a una

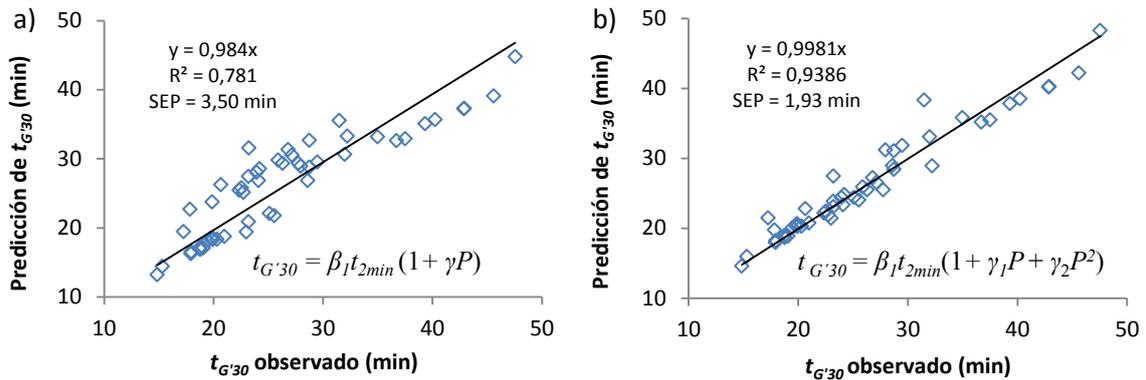
función potencial con  $n$  entre 2,5 y 4,1 según las concentraciones de inulina y calcio, como se muestra en la Figura 7.5.



**Figura 7.5** Efecto de la concentración de proteína sobre la velocidad de incremento del módulo elástico. Los datos corresponden a las medias de los ensayos realizados con 2% de inulina y 200 ppm de  $\text{CaCl}_2$ .

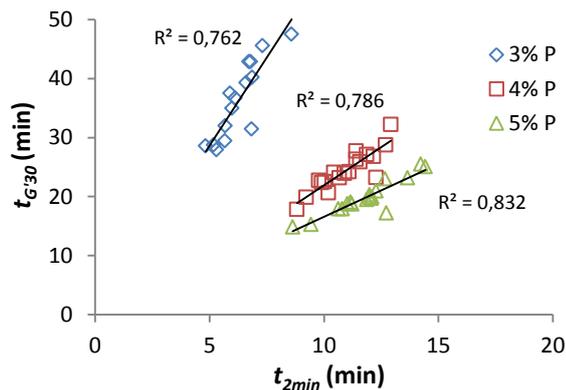
Coincidiendo con este resultado, Guinee et al. (1997) tras estudiar, mediante reología oscilatoria, las propiedades de coagulación de la leche bajo diferentes condiciones de procesamiento tales como tratamiento térmico, homogeneización, variaciones en los niveles de proteína y grasa y la adición de proteínas del suero, encontraron que el tiempo de gelificación ( $> 0,2$  Pa) y el tiempo de corte a 20 Pa aumentaron con la concentración de proteína, en una relación directamente proporcional a  $P^n$ , siendo  $P$  la concentración de proteína y  $n > 1,0$ . Lo anterior justificaría la inclusión de una corrección para el cuadrado de la proteína en el modelo de predicción del tiempo de corte reológico.

Con la inclusión de una corrección para el cuadrado de la proteína en el modelo de predicción del tiempo de corte reológico, se obtuvo una reducción en el SEP de  $\sim 45\%$  y un incremento en  $R^2$  de  $\sim 20\%$ . En la Figura 7.6 se puede observar el efecto comparativo de la inclusión de  $P^2$  en el ajuste del modelo para la predicción de  $t_{G'30}$ .



**Figura 7.6** Predicciones de  $t_{G'30}$  versus valores observados con a) y sin b) corrección para el cuadrado de la proteína... N=51.  $R^2$ , coeficiente de determinación (corregido para las medias).

En la Figura 7.7 se representa la relación lineal entre la variable predictora  $t_{2min}$  y  $t_{G'30}$ , donde se puede ver que la variación en la concentración de proteína tiene un marcado efecto en la pendiente de la relación entre ambas variables. Es así como el aumento en  $t_{2min}$  con un nivel bajo de proteína (3%) ocasiona un incremento en  $t_{G'30}$  mucho mayor que el observado a niveles más altos de proteína. A pesar de que en este estudio todas las muestras contenían inulina (2, 5 y 8%), su presencia parece no haber afectado al comportamiento de la relación entre tiempo de corte y variables predictoras como  $t_{2min}$  y  $t_{max}$ .



**Figura 7.7** Efecto de la concentración de proteína sobre la relación  $t_{2min}$  vs  $t_{G'30}$ .

Castillo et al. (2003) utilizaron el mismo tipo de sensor óptico para monitorizar la coagulación de leche de cabra desnatada sin inulina, con ajuste de los niveles de

proteína a 3, 5 y 7%, encontrando el siguiente modelo para la predicción del tiempo de corte visual,  $t_{cut} = \beta_0 t_{2min}(1 + \gamma\% \text{ Proteína})$ , con  $R^2 = 0,98$  y  $SEP = 2,42$  min. El modelo anterior es igual al modelo 4 (Tabla 7.3) del presente estudio, donde los valores de  $R^2$  y  $SEP$  del ajuste fueron 0,78 y 3,50 min respectivamente, habiendo sido necesario incluir en tal modelo un término cuadrático para la proteína con el fin de mejorar la bondad del ajuste (modelo 6 en la Tabla 7.3). Dado que las diferencias básicas entre este trabajo y el de Castillo et al. (2003) fueron el tipo de leche (vaca y cabra), la determinación del tiempo de corte (reológico y visual) y la adición o no de inulina, esto significa que probablemente sea la presencia de inulina lo que hace necesario incluir en el modelo un término cuadrático para la proteína con el fin de lograr un buen ajuste en la predicción del tiempo de corte.

#### 7.4 Conclusiones

Utilizando parámetros generados a partir del perfil de dispersión de luz NIR y parámetros reológicos fue posible evaluar el efecto de las variaciones en la concentración de inulina, calcio y proteína sobre las distintas fases del proceso de coagulación enzimática de leche semidesnatada. Se determinó que la duración de las fases de hidrólisis, agregación y endurecimiento se reducen de forma significativa con el aumento tanto en la concentración de inulina como de calcio. La proteína fue el factor que mayor efecto tuvo sobre el proceso de coagulación; su aumento produjo un alargamiento en la fase de hidrólisis (fase enzimática) pero al mismo tiempo una disminución en las fases de agregación y de endurecimiento (fase no enzimática o de ensamblado del gel), con un efecto global de reducción significativa en el tiempo de corte. Se determinó una ecuación para la predicción del tiempo de corte con un  $R^2 = 0,94$  y  $SEP = 1.93$  min, que incluye como predictores la concentración de proteína y un parámetro óptico, demostrándose la viabilidad y el potencial de obtener buenas predicciones del tiempo de corte en geles lácteos con inulina a partir de parámetros ópticos.

## Capítulo 8

# Validación de modelos de predicción de tiempos de gelificación y de corte en geles lácteos con inulina

### Resumen

Con el propósito de validar los modelos de predicción de los tiempos de coagulación y de corte reológico desarrollados en el Capítulo 7 de esta memoria, se llevó a cabo un diseño experimental compuesto central con tres factores: inulina (en un rango de 0 a 6%), proteína (2,7 a 3,9%) y calcio (50 a 250 ppm), para evaluar el efecto sobre parámetros derivados del perfil de dispersión de luz NIR y sobre los parámetros reológicos, durante la coagulación enzimática de leche reconstituida con 1,5% de grasa. Adicionalmente se evaluó la capacidad de retención de agua de los geles a tiempo de corte mediante centrifugación. En este trabajo se verificó que la adición de inulina acelera significativamente la fase de hidrólisis enzimática. Aunque los efectos no resultaron significativos, se observó que el aumento en proteína tiende a retrasar la fase de hidrólisis y que la adición de calcio tiende a reducir la duración de dicha fase. También se constató que el aumento en las concentraciones de inulina, proteína y calcio aceleran las reacciones de agregación y endurecimiento, sin embargo el efecto de la adición de calcio sobre la fase de endurecimiento no fue significativo. Las diferencias encontradas respecto a los resultados previos se atribuyeron al menor rango de

concentraciones de proteína evaluado en este experimento, en las cuales el calcio añadido no constituyó un factor limitante para los procesos de agregación y endurecimiento. El aumento en los niveles de inulina y proteína produjo una disminución en la cantidad de suero separado por centrifugación, pero al evaluar la capacidad de retención de agua (*CRA*) como porcentaje de agua retenida respecto al contenido de agua inicial de la muestra, sólo la proteína tuvo efecto significativo, observándose un aumento en *CRA* con la concentración de proteína. Se validó el modelo de predicción del tiempo de coagulación:  $t_{G'1} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma P)$ , con  $R^2 = 0,936$  y  $SEP = 0,47$  min y el modelo para la predicción del tiempo de corte reológico a 30 Pa:  $t_{G'30} = \beta_1 t_{2min}(1 + \beta\gamma_1 P + \beta\gamma_2 P^2)$ , con  $R^2 = 0,884$  y  $SEP = 2,1$  min.

**Palabras clave:** Leche, inulina, hidrólisis, agregación, endurecimiento, tiempo de coagulación, tiempo de corte, capacidad de retención de agua, sinéresis, sensor óptico, validación.

## 8.1 Introducción

En el capítulo anterior de esta memoria se desarrollaron modelos para la predicción de los tiempos de gelificación y de corte en geles lácteos bajos en grasa con adición de inulina y distintas concentraciones de proteína y de calcio utilizando como predictores parámetros obtenidos de la monitorización en línea del proceso de coagulación con el sensor de dispersión de luz de infrarrojo cercano. Para la predicción del tiempo de gelificación el mejor modelo de dos variables obtenido fue  $t_{G'1} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma P)$ , con  $R^2 = 0,871$  y  $SEP = 0,58$  min, mientras que para la predicción del tiempo de corte reológico el mejor modelo fue  $t_{G'30} = \beta_1 t_{2min}(1 + \beta\gamma_1 P + \beta\gamma_2 P^2)$ , con  $R^2 = 0,939$  y  $SEP = 1,93$  min. Sin embargo debido a que el ajuste de los modelos se realizó con el mismo conjunto de datos a partir de los cuales fueron desarrollados, se hace necesario llevar a cabo un proceso de validación de la bondad de ajuste de tales modelos con un nuevo conjunto de datos (i.e., set de calibración independiente). En este capítulo se describe un experimento llevado a cabo con el objetivo de validar los efectos de la inulina, la proteína y el calcio sobre las fases del proceso de coagulación y los modelos de predicción de los tiempos de coagulación y de corte obtenidos previamente.

## 8.2 Materiales y métodos

Se desarrolló un diseño compuesto central (CCD) sin repeticiones, con el cual se evaluaron los mismos factores que en el experimento presentado en el capítulo anterior, es decir inulina, proteína y calcio, pero con una ligera modificación en los niveles experimentales, los cuales se presentan en la Tabla 8.1. El diseño CCD consistió de un factorial  $2^k$  ( $k = 3$ ) con  $2k$  puntos axiales y 4 ensayos en el punto central para un total de 18 ensayos. El diseño experimental y el análisis estadístico de los datos se llevaron a cabo usando el programa Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Warrenton, USA).

**Tabla 8.1** Diseño central compuesto usado en el experimento.

Factores	Niveles			Puntos axiales	
	Bajo	Central	Alto		
<b>Inulina (%)</b>	1,5	3,0	4,5	0,0	6,0
<b>Proteína (%)</b>	3,0	3,3	3,6	2,7	3,9
<b>Calcio (ppm)</b>	100	150	200	50	250

La preparación de las muestras y la monitorización con el Coagulab y el reómetro se realizaron exactamente de la misma manera que se describió en la sección 7.2 del Capítulo 7. Adicionalmente en este experimento se evaluó la capacidad de retención de agua (*CRA*) de los geles lácteos mediante centrifugación. Tras la adición de la enzima se envasaron y pesaron con una precisión de 0,001 g alícuotas de ~1,3 g en tubos eppendorf de 1,5 mL de capacidad. Éstos se dispusieron en una gradilla y se dejaron en un baño termostático a la temperatura de coagulación de 32 °C. Una vez alcanzado el tiempo de corte reológico de 30 Pa, los tubos eppendorf se retiraron rápidamente del baño, se pusieron en una centrífuga (Hettich Micro 12-24, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemania) e inmediatamente se centrifugaron a 6200 rpm durante 15 min, finalizado este tiempo se pesó el suero sobrenadante expulsado (SE). La *CRA* se calculó con base en el contenido inicial de humedad de cada muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$CRA = \frac{(pm * hm) - W_E}{pm * hm} * 100$$

dónde:  $pm$  = peso inicial de la muestra (g);  $hm$  = humedad de la muestra (tanto por uno);  $W_E$  = peso del suero expulsado por el gel tras la centrifugación (g).

### 8.3 Resultados y discusión

#### 8.3.1 Efecto de los factores evaluados sobre la coagulación y la capacidad de retención de agua del gel

La Tabla 8.2 muestra el efecto de los factores estudiados sobre los parámetros ópticos, reológicos, los tiempos de agregación y endurecimiento y sobre la capacidad de retención de agua de los geles lácteos con inulina. En el análisis de varianza se incluyeron los factores experimentales  $In$ ,  $P$  y  $Ca$ , las interacciones  $InxP$ ,  $InxCa$  y  $PxCa$  y, además, los efectos cuadráticos para  $In$ ,  $P$  y  $Ca$ , aunque estos no se incluyeron en la tabla por cuestión de espacio.

**Tabla 8.2** Análisis de la varianza y estadísticos F del efecto de la inulina, la proteína, el calcio y sus interacciones sobre los parámetros ópticos, reológicos, de sinéresis, la duración de las etapas de la coagulación y la  $CRA$  del gel.

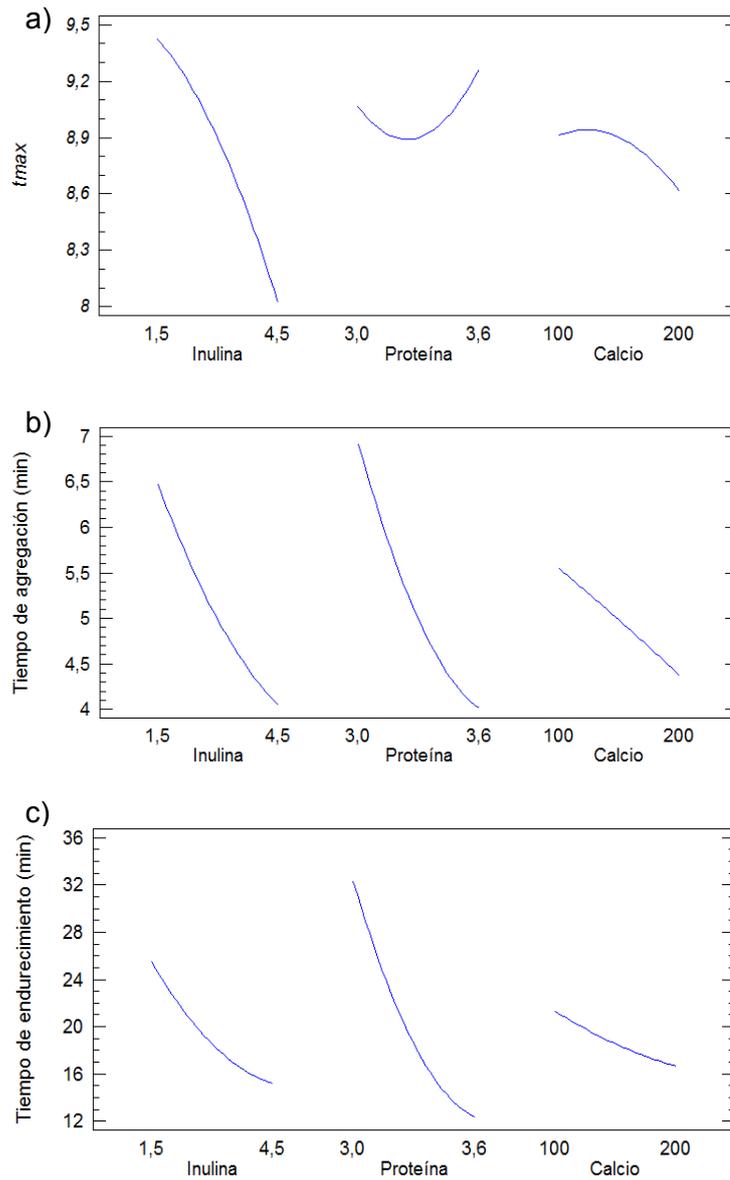
Modelo	$R^2$	Fuente de variación					
		$In$ (GL=1)	$P$ (GL=1)	$Ca$ (GL=1)	$InxP$ (GL=1)	$InxCa$ (GL=1)	$PxCa$ (GL=1)
Parámetros		F	F	F	F	F	F
$t_{max}$	0,894	32,3**	0,66 <sup>ns</sup>	1,48 <sup>ns</sup>	1,01 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	16,2*
$t_{2max}$	0,854	11,2 <sup>ns</sup>	4,13 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	1,32 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	9,99*
$t_{2min}$	0,907	46,3***	0,60 <sup>ns</sup>	5,01 <sup>ns</sup>	1,79 <sup>ns</sup>	0,53 <sup>ns</sup>	10,8*
$R_{max}$	0,848	13,9*	22,3*	0,73 <sup>ns</sup>	2,98 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>
$R_{2max}$	0,676	0,69 <sup>ns</sup>	6,13*	0,31 <sup>ns</sup>	1,34 <sup>ns</sup>	0,65 <sup>ns</sup>	0,37 <sup>ns</sup>
$R_{2min}$	0,932	77,5***	6,54*	10,9*	4,88 <sup>ns</sup>	2,38*	0,16 <sup>ns</sup>
$t_{G'1}$	0,937	56,8***	28,3**	8,45*	0,82 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	9,40*
$t_{ag}$	0,905	24,7**	35,3**	5,79*	2,10 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	1,34 <sup>ns</sup>
$t_{G'30}$	0,902	16,2*	41,5**	3,05 <sup>ns</sup>	1,02 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	2,08 <sup>ns</sup>
$t_{F30}$	0,891	11,0*	41,1**	2,25 <sup>ns</sup>	0,99 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	1,28 <sup>ns</sup>
$tg \delta_{30min}$	0,832	16,3*	9,05*	4,46 <sup>ns</sup>	1,39 <sup>ns</sup>	0,66 <sup>ns</sup>	2,37 <sup>ns</sup>
$CRA$	0,886	2,65 <sup>ns</sup>	36,7**	0,15 <sup>ns</sup>	2,18 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>ns</sup>	0,59 <sup>ns</sup>

$N = 18$ ;  $In$ , inulina;  $P$ , proteína;  $Ca$ , calcio;  $InxP$ , interacción inulina-proteína;  $InxCa$ , interacción inulina-calcio;  $PxCa$ , interacción proteína-calcio;  $R^2$ , coeficiente de determinación;  $F$ , estadístico del ANOVA; GL, grados de libertad; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$ , \*\*\* $P < 0,0001$ ; <sup>ns</sup>no significativo. Para la definición de las variables dependientes véase la sección de materiales y métodos específica de este capítulo y las secciones 4.3 y 4.4 del capítulo de materiales y métodos generales.

Confirmando los resultados del experimento presentado en el capítulo anterior, se observó una disminución significativa en la duración de las fases de hidrólisis (reducción en  $t_{max}$  como parámetro indicador de la duración de la fase de hidrólisis), de agregación ( $t_{ag}$ ) y de endurecimiento ( $t_{F30}$ ) con el aumento en la concentración de inulina (Fig. 8.1 a, b y c).

En el caso de la proteína, contrario a lo encontrado en el experimento anterior, esta no tuvo efecto significativo sobre la fase de hidrólisis (delimitada por el parámetro  $t_{max}$ ), debido probablemente a que la variabilidad entre los ensayos, a los niveles estudiados en este experimento, ha impedido que el resultado fuera significativo, sin embargo, confirmando lo observado antes, tal como se aprecia en la Figura 8.1 a, el parámetro  $t_{max}$  tiende a aumentar con la proteína, lo que sugiere un retraso en la fase de hidrólisis. Coincidiendo con resultados del experimento anterior (Capítulo 7), también se observó un aumento significativo en la velocidad de las fases de agregación y de endurecimiento del gel con el aumento en la concentración proteína (Fig. 8.1 b y c).

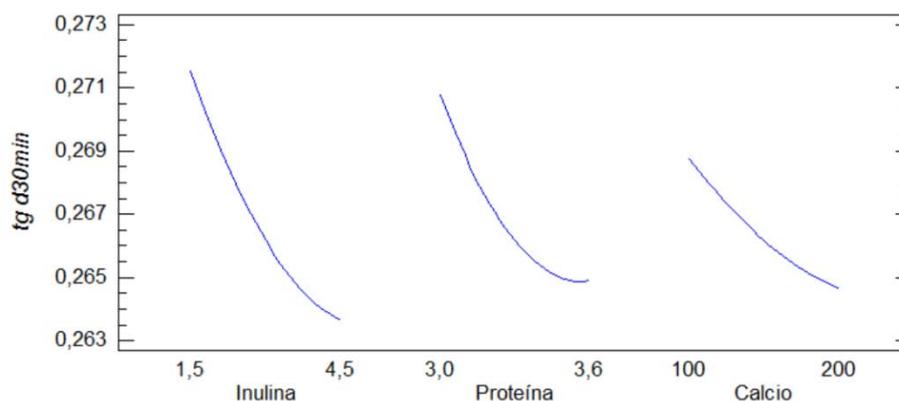
En cuanto a la adición de calcio se corroboró que este tiende a acelerar las fases de hidrólisis, agregación y endurecimiento (Fig. 8.1 a, b y c), aunque el efecto solo fue estadísticamente significativo en la fase de agregación (Tabla 8.2). Lo anterior podría atribuirse al hecho de que en el experimento actual los niveles de proteína evaluados fueron menores, lo que explica no sólo las variaciones en el efecto de la proteína, sino también en las del calcio, debido a la interrelación y efecto conjunto de ambas variables sobre el proceso de coagulación de la leche. Al parecer, a los niveles de proteína evaluados en este experimento, los niveles de calcio no constituyeron un factor limitante para los procesos de agregación y endurecimiento.



**Figura 8.1** Efecto de las concentraciones de inulina, proteína y calcio sobre los tiempos de a) hidrólisis, b) agregación y c) endurecimiento.

El valor de tangente de pérdida ( $tg \delta = G''/G'$ ) medida a los 30 min después de la adición de la enzima ( $tg \delta_{30min}$ ) se vio afectado significativamente tanto por la variación en la concentración de inulina como de proteína, produciendo el aumento en los niveles de ambos factores una reducción en  $tg \delta_{30min}$ , tal como se puede apreciar en la Figura 8.2. Con la adición de calcio también se observó una tendencia a disminuir los valores de  $tg \delta_{30min}$ , pero el efecto no fue significativo. Valores menores en  $tg \delta$  se corresponden con geles más firmes, más elásticos, con mayores valores de  $G'$  y  $G''$  y que tienen menor tendencia a expulsar agua (Logan et al., 2014; Liu et al., 2014; Lucey,

2002; Van Vliet et al., 1991). El incremento en las concentraciones de inulina y de proteína produce un aumento de  $G'$  proporcionalmente mayor que el de  $G''$ , con lo cual el efecto global es una reducción de  $tg \delta$ .

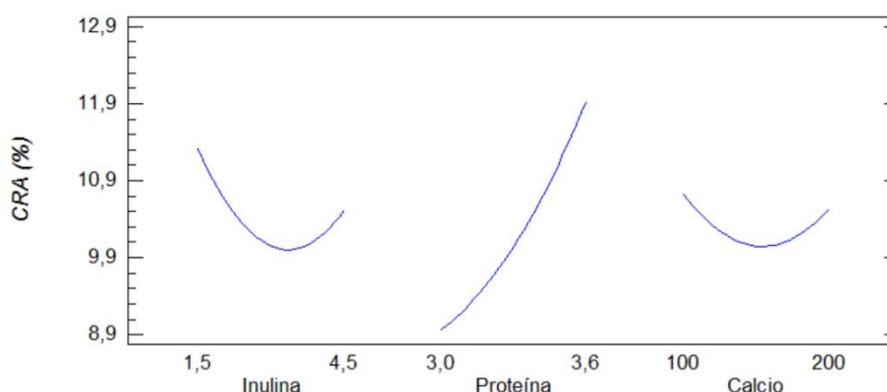


**Figura 8.2** Efecto de las concentraciones de inulina, proteína y calcio sobre  $tg \delta_{30min}$ .

Los resultados encontrados respecto a  $tg \delta$  son consistentes con los de Mishra et al. (2005) quienes también encontraron una disminución en  $tg \delta$  durante la coagulación enzimática al aumentar el contenido de sólidos lácteos no grasos. En los estudios de Sandra et al. (2011) y Karlsson et al. (2007) los valores de  $G'$  y  $G''$  obtenidos durante la coagulación enzimática de leche concentrada fueron mayores comparados con los de la leche sin concentrar, y de sus datos se puede deducir que los valores de  $tg \delta$ , antes que la curva de esta alcanzara la meseta final, fueron menores en los geles preparados con leche concentrada.

La  $CRA$  se vio influida significativamente sólo por la proteína, aumentando con la concentración de ésta (Fig. 8.3), lo cual es consistente con el efecto observado de la proteína sobre  $tg \delta_{30min}$ , y podría atribuirse a la conformación de un entramado proteico más denso y fuerte, con menor capacidad de reorganización y, por tanto, con menor tendencia a la sinéresis. Por otro lado, aunque el efecto no fue significativo, en la Figura 8.3 se aprecia que la  $CRA$  tiende a disminuir con la adición de inulina, lo que implicaría que la cantidad de suero expulsado aumenta o se mantiene constante al aumentar la concentración de inulina en la leche, coincidiendo con lo encontrado en el Capítulo 5 de esta memoria y, como se verá más adelante, con los resultados del Capítulo 9.

En varios estudios donde se ha utilizado inulina en geles lácteos bajos en grasa, principalmente en yogur, tampoco se han encontrado diferencias en la *CRA*, o en la sinéresis, o incluso se ha visto un aumento de estos parámetros al aumentar la concentración de inulina (Srisuvor et al., 2013; Brenan y Tudorica, 2008; Guven et al., 2005; Ipsen et al., 2001).



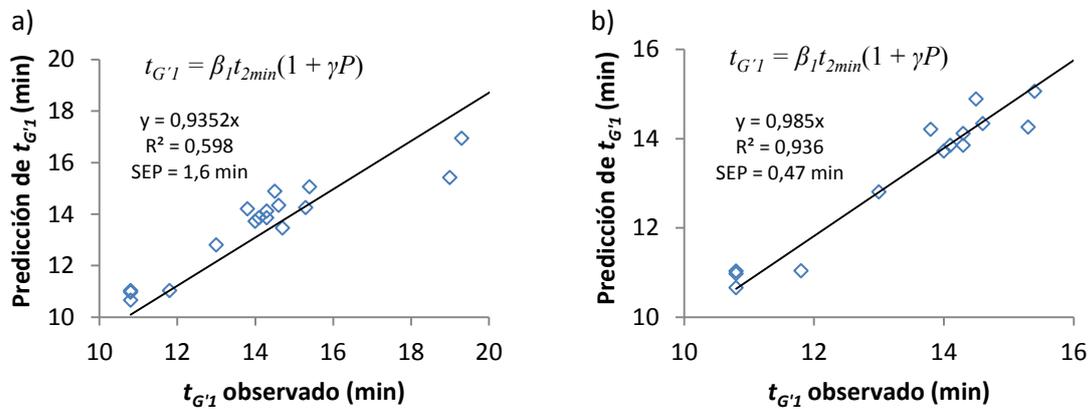
**Figura 8.3** Efecto de las concentraciones de inulina, proteína y calcio sobre la capacidad de retención de agua del gel.

Se encontraron efectos significativos del cuadrado de la concentración de inulina y de calcio sobre la *CRA* (datos no mostrados en la Tabla 5.2), según se podría deducir por la forma de las curvas en la Figura 8.3, aunque este resultado no concuerda con la tendencia observada para la inulina en el experimento presentado en el Capítulo 5 de esta memoria, donde la *CRA* disminuyó de forma aproximadamente lineal con la adición de hasta 6% de inulina.

### 8.3.2 Validación de los algoritmos de predicción de los tiempos de gelificación y de corte reológico

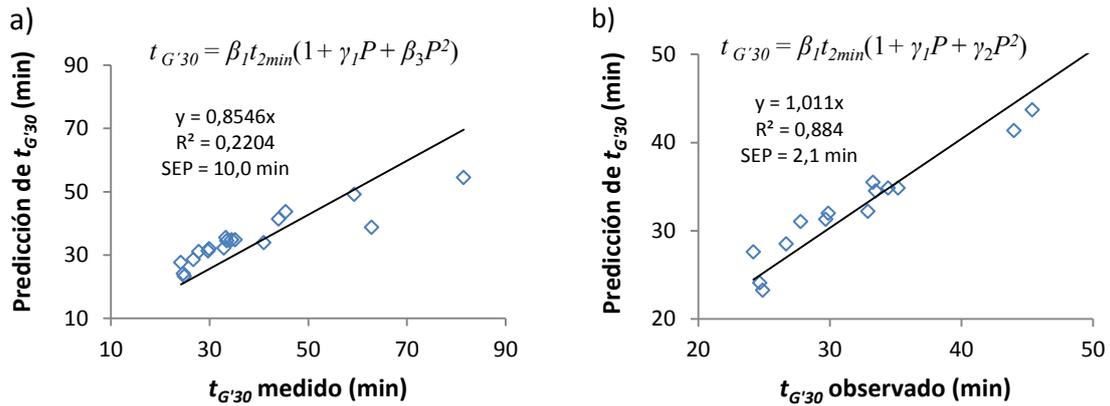
Se comprobó el ajuste de los mejores modelos para la predicción de los tiempos de gelificación y de corte reológico encontrados en el capítulo anterior de esta memoria, con los datos resultantes del experimento descrito en la sección de materiales y métodos del presente capítulo.

En el Capítulo 7 se encontró que el mejor modelo, basado en el compromiso entre sencillez y calidad de ajuste, para la predicción del tiempo de gelificación fue  $t_{G'1} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma P)$ , con  $R^2 = 0,871$  y  $SEP = 0,58$  min. Al ajustar este modelo a los nuevos datos experimentales, los valores de  $R^2$  y  $SEP$  obtenidos fueron 0,598 y 1,60 min respectivamente (Fig. 8.4 a). Sin embargo se observó que el ajuste sólo era deficiente en aquellas condiciones experimentales extremas, con las menores concentraciones de inulina, proteína y calcio, que originaban tiempos de coagulación muy largos. Tras eliminar los datos extremos (4 en total), el ajuste mejoró sustancialmente, obteniendo valores de  $R^2 = 0,936$  y  $SEP = 0,47$  min (Figura 8.4 b), con lo que se ha validado la bondad de ajuste de este modelo para la predicción del tiempo de gelificación.



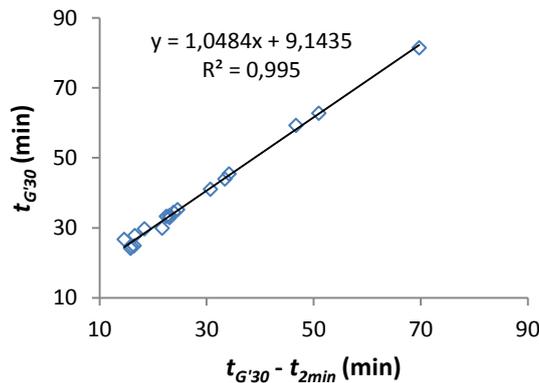
**Figura 8.4** Validación del modelo de predicción del tiempo de gelificación: a) ajuste con todos los datos (N=18), b) ajuste tras eliminar valores extremos (N=14).

Para la predicción del tiempo de corte a 30 Pa, el mejor modelo obtenido en el Capítulo 7 fue  $t_{G'30} = \beta_1 t_{2min}(1 + \gamma_1 P + \gamma_2 P^2)$ , con un  $R^2 = 0,939$  y  $SEP = 1,93$  min. El ajuste de tal modelo a los nuevos datos experimentales no fue bueno, pues se obtuvo  $R^2 = 0,22$  y  $SEP = 10$  min, debido al efecto de los mismos valores extremos comentados en el caso de la validación del modelo del tiempo de gelificación (Figura 8.5 a). Al evaluar el modelo excluyendo los valores extremos la mejora en el ajuste fue evidente, con  $R^2 = 0,884$  y  $SEP = 2,1$  min (Figura 8.5 b).



**Figura 8.5** Validación del modelo de predicción del tiempo de corte reológico a 30 Pa, a) ajuste con todos los datos (N=18), b) ajuste tras eliminar valores extremos (N=14).

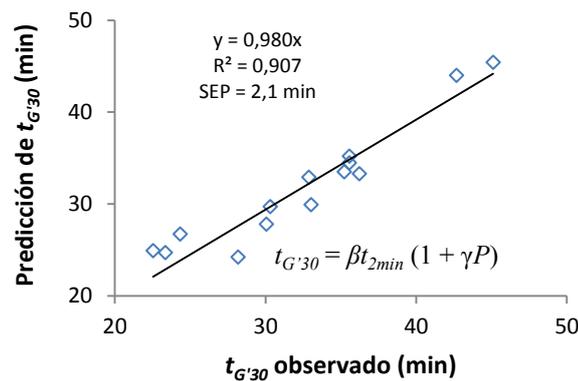
Con los datos de este experimentos y de otros anteriores se ha comprobado que existe una correlación lineal entre  $t_{G'30}$  y  $(t_{G'30} - t_{2min})$  tal como se aprecia en la Figura 8.6.



**Figura 8.6** Correlación entre  $t_{G'30}$  y  $(t_{G'30} - t_{2min})$ , N = 18.

Por tanto, mientras que la relación entre  $t_{G'30}$  y  $t_{2min}$  depende de la concentración de proteína, esta no se ve casi afectada en el caso de  $t_{G'30}$  y  $(t_{G'30} - t_{2min})$ . Esto significa que  $t_{G'30} = \beta t_{2min}$ , donde  $\beta$  es la relación  $t_{G'30} / t_{2min}$ , la cual es función de todos aquellos factores que afectan a la fase de endurecimiento del gel como la temperatura y las concentraciones de proteína, inulina, grasa y calcio. Considerando un proceso industrial de producción de queso que opere bajo condiciones constantes de todos los factores anteriores, con excepción de la proteína, para la predicción del tiempo de corte reológico mediante el sensor óptico solo sería necesario conocer la función que caracteriza el efecto de la proteína sobre  $\beta$ . Con los datos experimentales disponibles se

determinó que  $\beta$  varía de forma aproximadamente lineal ( $R^2 = 0,98$ ) en un rango de concentración de proteína de 3,0 a 3,9%, por lo que el tiempo de corte reológico podría predecirse con la siguiente expresión:  $t_{G'30} = \beta t_{2min} (1 + \gamma P)$ , cuya ventaja es una mayor simplicidad, requiriendo un menor esfuerzo de calibración para su implementación a nivel de planta. El ajuste de este modelo a los datos de este experimento se puede ver en la Figura 8.8.



**Figura 8.8** Predicción de  $t_{G'30}$  vs datos reales obtenidos en este experimento utilizando el modelo:  $t_{G'30} = \beta t_{2min} (1 + \gamma P)$ . N = 14.

El modelo  $t_{G'30} = \beta t_{2min} (1 + \gamma P)$  es el mismo encontrado por Castillo et al. (2003) para la predicción del tiempo de corte visual en la coagulación de leche de cabra con distintos niveles de proteína. Merece la pena señalar que con este modelo se consiguió un buen ajuste, sin necesidad de incluir un término cuadrático para la proteína, como fue el caso del modelo para  $t_{G'30}$  obtenido en el Capítulo 7 de esta tesis, lo que probablemente se debe a que en este experimento el rango de variación de proteína fue más estrecho (3,0 – 3,9%).

## 8.4 Conclusiones

Con este experimento se confirmó el efecto de la inulina de acelerar cada una de las tres fases del proceso de coagulación. En el caso de la proteína se determinó que al aumentar su concentración, la duración de la fase de hidrólisis tiende a disminuir, aunque, dentro de un rango de variación normal para leche de vaca (3,0 – 3,9%), este efecto no fue significativo. También se confirmó que la adición de calcio tiende a

acelerar las fases de hidrólisis, agregación y endurecimiento, aunque su efecto se ve influido por la concentración de proteína. La capacidad de retención de agua (*CRA*) evaluada considerando la variación en el contenido inicial de humedad en las muestras, aumentó significativamente con el incremento en la concentración de proteína, pero no se encontró efecto significativo de la adición de inulina sobre este parámetro. Sin embargo se observó que la *CRA* tiende a disminuir al aumentar la inulina, lo que implica que la cantidad de suero expulsado permanece constante o tiende a aumentar.

Se validaron con éxito un modelo para la predicción del tiempo de gelificación:  $t_{G'1} = \beta_1 t_{2min}(1 + \beta_2 P)$ , con  $R^2 = 0,936$  y  $SEP = 0,47$  min y un modelo para la predicción del tiempo de corte reológico a 30 Pa:  $t_{G'30} = \beta_1 t_{2min}(1 + \beta_2 P + \beta_3 P^2)$ , con  $R^2 = 0,884$  y  $SEP = 2,1$  min; además se encontró un modelo simplificado para la predicción del tiempo de corte cuando el contenido de proteína oscila en un rango de 3,0 – 3,9  $t_{G'30} = \beta t_{2min} (1 + \gamma P)$ , que se ajustó a los datos de este experimento con  $R^2 = 0,907$  y  $SEP = 2,1$  min.

## Capítulo 9

# Monitorización de la fermentación de yogur con inulina usando un sensor de dispersión de luz NIR

### Resumen

A nivel industrial, la incubación del yogur generalmente se controla mediante la medición del pH en muestras tomadas de forma sucesiva cerca del punto final del proceso, debido a que la monitorización en línea mediante electrodos de pH presenta inconvenientes como la adhesión de proteínas que afectan la sensibilidad de la sonda. El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización de un sensor de dispersión NIR como método alternativo a las sondas de pH para el control de la fermentación del yogur. Para ello se utilizaron simultáneamente un sensor de dispersión de luz a 880 nm, potenciometría y reología oscilatoria para estudiar el efecto del contenido de grasa de la leche (0,4, 1,6 y 3,6%) y la adición de inulina (0, 1,6 y 3,2%), sobre el proceso de fermentación, la formación del gel, la firmeza final, la sinéresis espontánea y la capacidad de retención de agua en la elaboración de yogur firme. Los yogures se elaboraron con leche comercial UHT sometida a tratamiento térmico adicional de 90 °C por 5 min. El contenido de proteína se estandarizó a 4% por adición de leche en polvo. La inoculación se hizo con 2% de cultivo de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* y se incubó a 43 °C hasta un pH final de 4,6. El aumento en el contenido de grasa de la leche hizo que el desarrollo de la acidificación hasta pH = 4,8 fuera más lento, retrasando el inicio de la gelificación, además produjo un aumento en la

firmeza del gel y disminuyó la sinéresis espontánea. Contrario a la grasa, la inulina aceleró la acidificación hasta  $\text{pH} = 4,8$ , anticipó la gelificación y aumentó la sinéresis espontánea, sin embargo también incrementó la firmeza final del gel. Los parámetros derivados del perfil de dispersión de luz sugieren la existencia de dos etapas en la coagulación del yogur, la formación de una red primaria entre complejos de proteínas del suero desnaturalizadas y caseína a  $\text{pH} \sim 5,4$  y posteriormente la agregación de las micelas a  $\text{pH} \sim 5,2$ , momento a partir del cual inicia el endurecimiento del gel. El ratio de dispersión de luz NIR evolucionó en función de la curva de acidificación, lo que hizo posible el desarrollo de modelos matemáticos que permitieron predecir con éxito no sólo el  $\text{pH}$ , sino también la viscoelasticidad del gel, lo que sugiere que el sensor óptico podría utilizarse para la monitorización en línea del proceso de elaboración de yogur, conociendo en tiempo real tanto el  $\text{pH}$  como la firmeza del gel y su tendencia al desuerado.

**Palabras clave:** yogur, fermentación, coagulación ácida, inulina, sensor óptico, monitorización, sinéresis, reología.

## 9.1 Introducción

Actualmente se ofrecen en el mercado gran variedad de yogures para todos los paladares y ocasiones, con diferentes texturas, sabores y, más recientemente, con contenido reducido de grasa y atributos saludables. Esta versatilidad, junto con su aceptación como producto altamente nutritivo han permitido que el yogur tenga una amplia aceptación entre todos los grupos de población a nivel mundial (Mckinley, 2005). El proceso de fermentación es la etapa más importante en la elaboración del yogur. Durante esta etapa se forma el gel de yogur y se desarrollan las características de aroma y sabor distintivas (Tamine y Robinson, 2007). La determinación del tiempo de incubación es un parámetro técnico de control esencial en la producción industrial de yogur. Debido a la complejidad del proceso de fermentación y al gran número de factores involucrados, la predicción del punto final de la etapa de incubación es difícil, por lo que la práctica habitual es realizar un control empírico (Soukoulis et al, 2007). Usualmente el punto final del proceso de fermentación se define por medio del valor de  $\text{pH}$  (en algunas industrias también se mide la acidez), para lo cual primero se debe

determinar el pH final deseado de acuerdo con el perfil de calidad del producto y el cumplimiento de regulaciones que, en la mayoría de los casos, establecen para este tipo de productos un pH menor o igual a 4,6 por razones de seguridad alimentaria.

A nivel industrial el control del pH en la elaboración de productos lácteos fermentados generalmente se lleva a cabo de forma discontinua porque las proteínas de la leche se adhieren a los electrodos de pH y causan distorsión en las medidas. De acuerdo con Brabandere y de Baerdemaeker (1999) las sondas de pH son sensibles a deriva y a la acumulación de depósitos de proteína, por lo que se requiere realizar labores regulares e intensivas de limpieza de las sondas; esto sumado a la necesidad de recalibración al inicio de cada nueva producción hacen que la medida del pH sea una técnica inconveniente para la monitorización en línea del proceso de fermentación del yogur en plantas industriales.

La toma manual de muestras y la medición del pH y la acidez titulable en laboratorio es el método más común de monitorización del proceso de fermentación del yogur y otras bebidas lácteas fermentadas a nivel industrial, a pesar de que ello representa empleo adicional de mano de obra, consumo de tiempo, riesgo de contaminación del producto y posibilidad de error en las mediciones.

Debido al riesgo de ruptura, las sondas de vidrio para el control del pH no son aceptables en el procesamiento de alimentos. En respuesta a ello se han desarrollado sondas con otros materiales inertes basadas en la tecnología ISFET (*ion selective field effect transistor*), sin embargo tales sondas son sensibles a las condiciones extremas de pH que se producen durante las operaciones de limpieza *in-situ*, en particular, la exposición a soluciones cáusticas y elevadas temperaturas reduce la vida útil de este tipo de sensores de pH. Para superar este problema, algunas compañías han desarrollado sensores de pH basados en la tecnología ISFET que pueden ser retraídos durante la limpieza *in-situ*, mientras que al mismo tiempo la sonda es limpiada y calibrada de forma automática (Wesstrom, 2001), aunque son sistemas complejos y costosos.

En varios estudios se ha tratado de encontrar nuevos métodos para monitorizar la fermentación del yogur (y otros productos similares) y determinar el punto final de la misma. Cimander et al. (2002) monitorizaron la fermentación de yogur a escala de laboratorio utilizando una nariz electrónica (EN), espectrometría de infrarrojo cercano y

sondas estándar de biorreactores (sonda de temperatura, pH y oxígeno disuelto). Las señales de los sensores fueron fusionadas usando una red neuronal en cascada para predecir variables cuantitativas de proceso (incluyendo lactosa, galactosa y lactato) y variables cualitativas que describen fases críticas del estado del proceso tales como el inicio de la coagulación y el punto final de la misma. Según los autores, la predicción de la red neuronal fue aceptable para las variables cuantitativas, en comparación con el error de medición de los análisis de referencia, sin embargo la predicción del punto final del proceso fue bastante pobre.

En otra investigación similar a la anterior se utilizó espectrometría NIR y datos de una nariz electrónica (EN) para monitorizar la fermentación de yogur (Navrátil et al., 2004). Se utilizó la técnica de análisis de componentes principales para estudiar las respuestas de ambos sensores y reducir la gran cantidad de datos obtenidos de los espectros de reflectancia. Las señales de espectrometría NIR (en un rango de 400 – 2500 nm) se utilizaron para establecer modelos de predicción del pH del cultivo y su acidez titulable, encontrando un modelo de 5 factores con el cual se logró predecir el pH con  $R^2 = 0,990$  y  $SEP = 0,35$  unidades de pH. Aquí se debe considerar que un modelo de predicción con 5 factores resultaría muy complicado de calibrar para su implementación a nivel de planta y que un error de predicción de 0,35 unidades de pH no podría ser aceptable para definir el punto final del proceso de fermentación.

En la industria de productos lácteos fermentados la determinación del tiempo óptimo de incubación es de suma importancia, no solo para lograr las características de calidad apropiadas en el producto final, sino también para reducir costes de fabricación y cumplir con las regulaciones establecidas. Desafortunadamente, en la actualidad no existe una técnica de monitorización aplicable al control en línea del proceso que sea rápida, confiable y robusta, que evite los problemas relacionados con el uso de sondas de pH y que permita la determinación del punto óptimo de fermentación de forma precisa y reproducible. Por este motivo, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la aplicabilidad del sensor de dispersión de luz a 880 nm para la monitorización del proceso de fermentación de yogur firme con inulina como sustituto de grasa y la obtención de un modelo para la predicción en línea del pH.

## 9.2 Materiales y métodos

### 9.2.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial aleatorizado con tres réplicas para estudiar el efecto de la adición de inulina (0; 1,6 y 3,2%) y la concentración de grasa de la leche (0,4; 1,6 y 3,6%) sobre el proceso de fermentación del yogur y las características finales del gel. Con este diseño se realizaron un total de 27 ensayos. El proceso de coagulación ácida se monitorizó utilizando el sensor de dispersión de luz NIR (CoAguLab), potenciometría y reología oscilatoria de baja amplitud. Todos los ensayos se llevaron a cabo en paralelo tomando como tiempo cero el momento de adición del inóculo.

### 9.2.2 Preparación de la leche

Se trabajó con leche comercial UHT entera, semidesnatada y desnatada, habiéndose adquirido un solo lote de cada tipo de leche para todo el experimento, con el fin de minimizar el error experimental. La leche estaba envasada en envases multicapa de Tetra Brik® con volumen de 1 L y se mantuvo almacenada a temperatura ambiente (~21 °C) hasta su uso a lo largo del experimento. La composición de la leche UHT se muestra en la tabla 9.1.

**Tabla 9.1** Composición (%) de la leche comercial UHT usada en el experimento \*

Leche UHT	Proteína (%)	Grasa (%)	Carbohidratos (%)	Cenizas (%)
Entera	3,0	3,6	4,5	0,5
Semidesnatada	3,05	1,55	4,55	0,5
Desnatada	3,1	0,3	4,6	0,5

\* Información tomada de la etiqueta del producto.

Se utilizó leche en polvo desnatada deshidratada a baja temperatura (Chr Hansen, Barcelona, España) para elevar el contenido de sólidos y estandarizar el contenido de proteína de todas las muestras a 4,0%. El contenido de grasa requerido se ajustó mediante la adición de nata comercial homogeneizada (18% de materia grasa, 2,5% de proteína y 3,5% de carbohidratos). Las cantidades de leche en polvo, inulina y grasa a adicionar se calcularon por medio de balances de masa, usando un sistema de ecuaciones que se resolvió utilizando la herramienta *solver* de Microsoft Excel (2010),

de tal forma que el cálculo permitiera minimizar el contenido de sólidos totales en la muestra.

Para cada ensayo se prepararon 1400 g de muestra de la siguiente manera: se pesó la cantidad de leche UHT requerida en un vaso de precipitados de 2 L y se llevó hasta una temperatura de ~40 °C en una placa de calefacción con agitación y con control automático de la temperatura de la muestra. En este momento, se añadió la leche en polvo y después la inulina (Frutafit® TEX, Brenntag Química S.A., Barcelona) dispersándola lentamente para evitar formación de grumos. La nata se pesó en un vaso de precipitados y se agregó haciendo un doble enjuague con parte de la leche para arrastrar cualquier cantidad de nata remanente. Se llevó la muestra hasta 90 °C y se dejó a esta temperatura durante 5 min, al cabo de los cuales se enfrió por inmersión en agua con hielo hasta ~45 °C. Posteriormente se pesó nuevamente la muestra y se añadió agua destilada para reponer el agua evaporada durante el tratamiento térmico; luego se dejó en un baño termostático a 43 °C hasta que se alcanzó el equilibrio térmico y se inició el ensayo.

### 9.2.3 Preparación del inóculo

Con el fin de reducir la variabilidad que pudiera originarse por la reducción de la actividad del inóculo durante el periodo experimental, se preparó un cultivo madre suficiente para todo el experimento que se almacenó en congelación a -80 °C. Se reconstituyó leche desnatada con 12% de sólidos la cual se sometió a tratamiento térmico de 90 °C por 5 min, se enfrió en agua con hielo hasta 43 °C y se adicionaron 130 mg L<sup>-1</sup> de inóculo comercial liofilizado de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (YO-MIX 496 LYO 100 DCU, DANISCO, Sassenage, France). La leche se incubó en un baño termostático a 43 °C hasta pH = 5,0, luego se llevó a una cámara de flujo laminar donde se envasaron asépticamente alícuotas de aproximadamente 2 g en viales estériles que se almacenaron en congelación a -80 °C. El día del ensayo se prepararon 100 mL de leche reconstituida con 12% de sólidos, tal como se describe en el punto 9.2.2, y se inoculó con 2% del cultivo madre previamente descongelado a 43 °C durante 20 min. Se dejó incubar a 43

°C hasta pH 5,0 y este cultivo de trabajo se usó como inóculo en la preparación del yogur.

#### 9.2.4 Procedimiento de los ensayos

Para cada ensayo se prepararon 1400 g de leche según el procedimiento descrito anteriormente, se tomaron dos muestras de ~50 mL que se llevaron a congelación para posteriores análisis físico químicos. La leche se dejó atemperar en un baño termostático hasta 43 °C, y se añadieron 26 g (2%) de cultivo de trabajo, se agitó con espátula durante 30 s y se tomaron dos alícuotas de aproximadamente 80 mL cada una que se depositaron en ambas cubetas del sensor óptico (Fig. 9.1), cuyo sistema de control de temperatura se había fijado previamente en 43 °C, poniéndose en marcha inmediatamente el sistema de toma de datos del ratio de dispersión de luz y del pH.



**Figura 9.1** Adición de la muestra en el sensor de dispersión de luz con electrodos de pH.

Otra alícuota de ~40 mL se depositó en la sonda cilíndrica del reómetro, cuyo sistema de control de temperatura había sido fijado previamente en 43 °C y se inició la medición de los parámetros reológicos. Se midió con un cronómetro el tiempo de retraso desde la adición del inóculo hasta la puesta en marcha de los sistemas de captura de datos del sensor óptico y del reómetro, con el fin de corregir posteriormente los datos obtenidos con ambos equipos.

### 9.2.5 Evaluación de la sinéresis espontánea

La sinéresis espontánea (*SinE*) se determinó según el método propuesto por Lucey et al. (1998). Se pesaron 5 alícuotas de 90 g de leche inoculada en matraces volumétricos de 100 mL y se dejaron incubar en el baño termostático a 43 °C hasta pH = 4,60. El suero liberado de forma espontánea durante la incubación del yogur se drenó cuidadosamente inclinando el matraz en ángulo de 45°, se recogió en un vaso de precipitados y se pesó en una balanza con precisión de 0,001 g. La operación se repitió tras ~2 min de reposo para decantar el suero adicional liberado por el gel. Se determinó el peso promedio de suero recogido y se dividió entre el contenido de humedad inicial de la muestra, expresándose el resultado en porcentaje.

### 9.2.6 Determinación de la capacidad de retención de agua (*CRA*)

Se pesaron 4 alícuotas de 40 g de leche inoculada en tubos de centrífuga de 50 mL y se incubaron hasta pH 4,60 en el baño termostático, después se almacenaron a ~4 °C durante ~20 h, y finalmente se centrifugaron a 4200 g durante 15 min a 10 °C (Lunardelo et al., 2012). Después de la centrifugación se drenó el suero sobrenadante a través de un tamiz, manteniendo los tubos inclinados en ángulo de 45° hasta que no se observó más salida de líquido en un lapso de 10 s. En los trabajos consultados donde se evaluó la *CRA*, ésta se calculó bien sea como el porcentaje de suero drenado o como el peso del sólido remanente tras la expulsión del suero, respecto al peso inicial de la muestra, sin considerar que la adición de inulina implica un aumento en el contenido de sólidos y una disminución en el contenido inicial de humedad de la muestra. Por tal razón en este trabajo la *CRA* se determinó según el contenido inicial de agua en la muestra de la siguiente manera:

$CRA (\%) = [(\text{contenido de agua de la muestra} - \text{peso del suero drenado}) / \text{contenido de agua de la muestra}] \times 100.$

### 9.2.7 Evaluación de la firmeza del gel

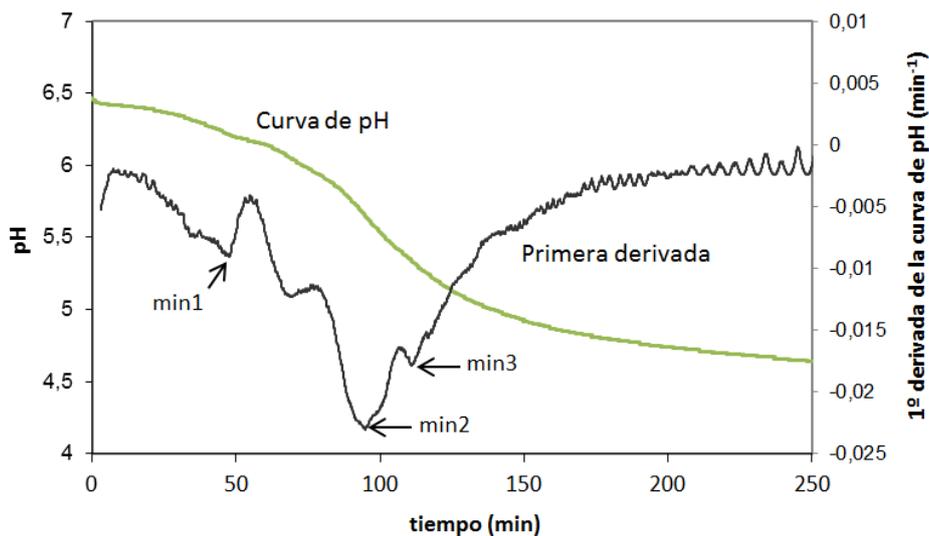
Se depositaron 5 muestras de ~48 mL de leche inoculada en contenedores plásticos de forma cilíndrica (36 mm diámetro interno, 64 mm altura) y se incubaron hasta pH 4,60 en baño termostático a 43 °C. El análisis de textura se realizó tras ~24 h de almacenamiento en refrigeración (~4°C), mediante un test de penetración con un equipo Texture Analyser TA.TX2 (Stable Micro Systems, Surrey, UK) equipado con un sensor de 500 N de fuerza y una sonda cilíndrica de acrílico de 10 mm de diámetro. Las curvas de fuerza - distancia se obtuvieron a velocidad constante de 2 mm s<sup>-1</sup> y la profundidad de penetración fue de 20 mm. La firmeza (*Firm*) se definió como la fuerza máxima en el punto más alto de la curva fuerza - distancia (Srisuvor et al., 2013).

### 9.2.8 Medidas de dispersión de luz, reología y pH

La dispersión de luz NIR a 880 nm durante el proceso de fermentación del yogur se monitorizó por duplicado utilizando el mismo equipo y el mismo método descritos en la sección 4.3 de esta memoria. La formación del gel de yogur también se monitorizó mediante reología oscilatoria de baja amplitud tal como se describió en la sección 4.4. Las medidas de pH se tomaron por duplicado usando electrodos (8102 BN, Orion Research Inc., Beverly, MA, USA) ubicados en la parte superior de las cubetas del sensor óptico (como se puede observar en la Fig. 9.1) y conectados al sistema de detección y procesamiento de señales del mismo equipo.

Antes de cada ensayo los electrodos se calibraron con soluciones tamponadas de pH = 7,0 y pH = 4,01 atemperadas a 43 °C en el baño termostático. Después de finalizar un ensayo los electrodos se limpiaron cuidadosamente con agua destilada y se mantuvieron en inmersión en solución de almacenamiento de KCl recomendadas por el fabricante. Después de cada 3 ensayos los electrodos fueron sometidos a un procedimiento especial de limpieza con soluciones para la remoción de proteína y depósitos de sales que precipitan en el interior de los mismos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las medidas de pH durante el proceso de acidificación se adquirieron cada 6 s.

Se calculó la primera derivada de la curva de pH vs tiempo usando 60 puntos de datos para suavizar el perfil de la primera derivada (Fig. 9.2). La pendiente de cada subconjunto de datos se calculó por el método de regresión lineal de mínimos cuadrados y se asignó al punto central del subconjunto de datos.



**Figura 9.2** Curva típica de variación del pH con el tiempo y su primera derivada. Datos pertenecientes a un ensayo realizado con 3,6 de grasa y 1,6% de inulina.

Para estudiar el proceso de coagulación ácida del yogur, además de los parámetros derivados del ratio de dispersión de luz se definieron otros parámetros a partir del perfil de acidificación y de su relación con los parámetros ópticos y reológicos, los cuales se presentan en la Tabla 9.2.

**Tabla 9.2** Definición de los parámetros utilizados para estudiar la fermentación del yogur mediante dispersión de luz NIR, potenciometría y reología.<sup>a</sup>

Parámetro	Unidades	Definición
Parámetros derivados del perfil de dispersión de luz		
$t_{max}$	min	Tiempo al primer máximo de $R'$
$t_{max2}$	min	Tiempo al segundo máximo de $R'$
$t_{2min}$	min	Tiempo al primer mínimo de $R''$
$t_{2max}$	min	Tiempo al primer máximo de $R''$
$t_{2max2}$	min	Tiempo al segundo máximo de $R''$
$R_{max}$	Ad.	Valor de $R$ a $t_{max}$
$R_{2max}$	Ad.	Valor de $R$ a $t_{2max}$
$R_{2min}$	Ad.	Valor de $R$ a $t_{2min}$
$R_{2max2}$	Ad.	Valor de $R$ a $t_{2max2}$
$R_{2min2}$	Ad.	Valor de $R$ a $t_{2min2}$
Parámetros relacionados con el proceso de acidificación		
$t_{pH5,0}$	min	Tiempo a pH = 5,0
$t_{pH4,8}$	min	Tiempo a pH = 4,8
$t_{pH4,6}$	min	Tiempo a pH = 4,6
$t_{acmin1}$	min	Tiempo al primer mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo (Fig. 9.2)
$t_{acmin2}$	min	Tiempo al segundo mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo (Fig. 9.2)
$t_{acmin3}$	min	Tiempo al tercer mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo (Fig. 9.2)
$pH_{acmin1}$	Unidades de pH	Valor de pH al primer mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo
$pH_{acmin2}$	Unidades de pH	Valor de pH al segundo mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo
$pH_{acmin3}$	Unidades de pH	Valor del pH al tercer mínimo de la primera derivada de la curva de pH vs tiempo
$V_{max}$	Unidades de pH min <sup>-1</sup>	Velocidad máxima de acidificación, máxima pendiente de la curva pH vs tiempo
Parámetros reológicos		
$G'_{pH4,8}$	Pa	Valor del módulo elástico a pH = 4,8
$G'_{pH4,6}$	Pa	Valor del módulo elástico a pH = 4,6
$tg \delta_{pH4,6}$	Ad.	Valor de tangente $\delta$ a pH = 4,6
Parámetros mixtos		
$pHt_{max}$	Unidades de pH	Valor de pH a tiempo $t_{max}$
$pHt_{max2}$	Unidades de pH	Valor de pH a tiempo $t_{max2}$
$pHt_{2min}$	Unidades de pH	Valor de pH a tiempo $t_{2min}$
$pHt_{G'1}$	Unidades de pH	Valor de pH al tiempo de gelificación
$R_{pH4,8}$	Unidades de pH	Valor de $R$ a pH = 4,8
$R_{pH4,6}$	Unidades de pH	Valor de $R$ a pH = 4,6

<sup>a</sup>  $R$ , ratio de dispersión de luz;  $R'$ , primera derivada de  $R$ ;  $R''$ , segunda derivada de  $R$ ; Ad., adimensional

**9.2.9 Análisis estadístico.** El procesamiento y análisis de los datos se llevó a cabo según lo descrito en la sección 4.5 de esta memoria.

## 9.3 Resultados y discusión

### 9.3.1 Composición de las muestras

En la Tabla 9.3 se presenta la composición de las muestras de leche correspondientes a los distintos tratamientos. El contenido de inulina es el que se adicionó durante la preparación de las muestras, ya que no se hizo determinación posterior de esta sustancia. Las concentraciones de grasa, proteína y sólidos totales se midieron según los métodos descritos en el Capítulo 4 de esta memoria.

**Tabla 9.3** Composición de las muestras correspondientes a cada tratamiento\*

Tratamiento	In (%)	G (%)	P (%)	ST (%)
1	0	3,58 ± 0,03	3,95 ± 0,04	14,19 ± 0,05
2	1,6	3,63 ± 0,02	3,98 ± 0,03	15,63 ± 0,04
3	3,2	3,52 ± 0,01	4,01 ± 0,03	17,07 ± 0,04
4	0	1,58 ± 0,00	4,02 ± 0,02	12,21 ± 0,03
5	1,6	1,60 ± 0,01	4,00 ± 0,02	13,65 ± 0,06
6	3,2	1,60 ± 0,02	3,96 ± 0,04	15,09 ± 0,04
7	0	0,35 ± 0,04	4,03 ± 0,01	11,11 ± 0,05
8	1,6	0,38 ± 0,03	4,01 ± 0,02	12,56 ± 0,03
9	3,2	0,35 ± 0,04	3,97 ± 0,03	14,0 ± 0,02

\* G, grasa; P, proteína, ST, sólidos totales. Los resultados están expresados como media ± desviación estándar de 3 muestras.

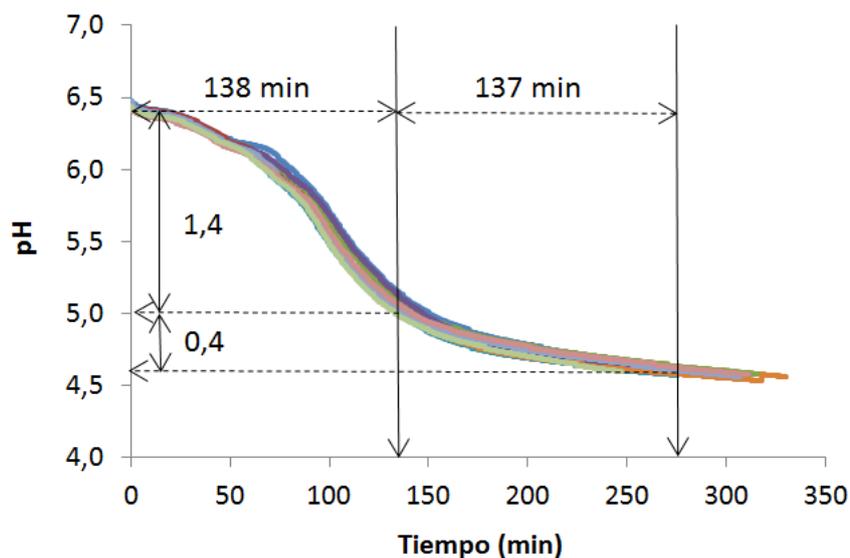
### 9.3.2 Efecto de los factores experimentales sobre el proceso de fermentación del yogur

El proceso de fermentación del yogur se monitorizó simultáneamente mediante dispersión de luz, reología y potenciometría. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) donde se seleccionaron la concentración de grasa, la concentración de inulina, la interacción entre las dos anteriores y la variable categórica “réplica” (*rep*) como efectos principales en el modelo del ANOVA preliminar. La variable *rep* fue incluida debido a que, como se había comentado antes, se adquirió un solo lote de leche UHT para todo el experimento y la realización del mismo se prolongó por un periodo de 4 meses, tiempo durante el cual se produjeron cambios en la leche UHT que tuvieron

efecto sobre el proceso de acidificación y sobre algunos parámetros de respuesta del sensor óptico.

En términos generales se presentó una alta variabilidad en la duración del proceso de fermentación; los tiempos a los cuales el pH llegó a 4,6 tuvieron una media de 277 min y una desviación estándar de 33,7 min. Según Lucey (2004) en bebidas fermentadas por bacterias ácido lácticas e incubadas a temperaturas entre 40 – 45 °C, el proceso tarda usualmente entre 3 y 6 h. Peng et al. (2009) obtuvieron tiempos de fermentación hasta pH = 4,6 entre 231 y 348 min para muestras de leche fortificadas con diferentes tipos de proteína e incubadas a 40 °C.

En la Figura 9.3 se puede observar que la forma de las curvas de acidificación fue idéntica para todos los tratamientos, pero los tiempos hasta alcanzar un pH de 4,6 fueron distintos. El descenso de pH desde 6,4 hasta 5,0 (1,4 unidades de pH) tomó un tiempo promedio de 138 min, mientras que el descenso desde pH = 5,0 hasta pH = 4,6 (0,4 unidades de pH) tardó en promedio casi el mismo tiempo (137 min).



**Figura 9.3** Curvas de pH vs tiempo para los 9 ensayos de la primera réplica.

El análisis de varianza se presenta en las Tablas 9.4 y 9.5. Por cuestión de espacio no se muestra la variable *rep* en las tablas, aunque esta tuvo efecto significativo sobre  $pH_{acmin3}$ ,  $V_{max}$ ,  $V_0$ ,  $R_{pH4,8}$  y  $R_{pH4,6}$ , lo que se discutirá en la sección 9.3.4.

**Tabla 9.4** Análisis de la varianza y estadísticos F del efecto de la grasa y la inulina sobre los parámetros ópticos, reológicos, de acidificación, sinéresis y firmeza del gel.

Parámetros	Modelo		Fuente de variación		
	R <sup>2</sup>	F	G GL= 2	In GL= 2	GxIn GL= 4
<i>t</i> <sub>pH5,0</sub>	0,773	5,44*	8,22*	10,4*	3,57*
<i>t</i> <sub>pH4,8</sub>	0,648	2,95*	10,1*	0,95 <sup>ns</sup>	1,51 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>pH4,6</sub>	0,529	1,80 <sup>ns</sup>	6,07*	0,34 <sup>ns</sup>	0,43 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>G'1</sub>	0,788	5,95**	3,36 <sup>ns</sup>	25,3***	0,43 <sup>ns</sup>
<i>G'</i> <sub>pH4,8</sub>	0,948	29,2***	115***	18,9***	5,95*
<i>G'</i> <sub>pH4,6</sub>	0,908	15,8***	60,9***	11,8**	3,15*
<i>tg</i> $\delta$ <sub>pH4,6</sub>	0,946	28,3***	122***	8,86*	4,99*
<i>pHt</i> <sub>G'1</sub>	0,689	3,55*	4,22*	9,20*	1,28 <sup>ns</sup>
<i>pHt</i> <sub>max</sub>	0,629	2,71*	0,16 <sup>ns</sup>	11,1**	0,72 <sup>ns</sup>
<i>pHt</i> <sub>max2</sub>	0,811	6,88**	17,6***	8,07*	3,28*
<i>pHt</i> <sub>2min</sub>	0,788	5,95**	0,87 <sup>ns</sup>	22,1***	2,08 <sup>ns</sup>
<i>pHt</i> <sub>2max</sub>	0,516	1,71 <sup>ns</sup>	1,73 <sup>ns</sup>	2,50 <sup>ns</sup>	0,65 <sup>ns</sup>
<i>pHt</i> <sub>2max2</sub>	0,765	5,21*	1,40 <sup>ns</sup>	20,6***	1,42 <sup>ns</sup>
<i>pH</i> <sub>acmin1</sub>	0,708	3,87*	6,90*	6,80*	0,32 <sup>ns</sup>
<i>pH</i> <sub>acmin2</sub>	0,490	1,54 <sup>ns</sup>	3,89*	1,29 <sup>ns</sup>	0,78 <sup>ns</sup>
<i>pH</i> <sub>acmin3</sub>	0,761	5,09*	2,98 <sup>ns</sup>	12,4**	3,20*
<i>SinE</i>	0,879	11,6***	44,8***	4,69*	1,77 <sup>ns</sup>
<i>CRA</i>	0,939	24,8***	115***	1,72 <sup>ns</sup>	2,31 <sup>ns</sup>
<i>Firm</i>	0,867	10,4***	42,0***	8,55**	0,71 <sup>ns</sup>
<i>V</i> <sub>0</sub>	0,998	990***	4913***	28,7***	1,64 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>max</sub>	0,758	5,01*	9,57*	11,1**	1,43 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>max2</sub>	0,689	3,54*	1,19 <sup>ns</sup>	12,6**	1,38 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>2min</sub>	0,797	6,29**	10,4*	16,1***	1,64 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>2max</sub>	0,700	3,73*	9,13*	5,83*	0,94 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>2max2</sub>	0,812	6,93**	12,7**	17,0***	1,90 <sup>ns</sup>
<i>R</i> <sub>pH4,8</sub>	0,984	96,8***	475***	0,25 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>
<i>R</i> <sub>pH4,6</sub>	0,990	159***	786***	0,31 <sup>ns</sup>	0,56 <sup>ns</sup>
<i>R</i> <sub>max</sub>	0,979	73,6***	363***	2,76 <sup>ns</sup>	0,92 <sup>ns</sup>
<i>R</i> <sub>2max</sub>	0,940	24,9***	118***	3,90*	1,35 <sup>ns</sup>
<i>R</i> <sub>2min</sub>	0,987	121***	596***	5,02*	0,56 <sup>ns</sup>
<i>R</i> <sub>2max2</sub>	0,979	73,3***	358***	4,45*	0,83 <sup>ns</sup>
<i>R</i> <sub>2min2</sub>	0,926	19,9***	97,8***	0,06 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>acmin1</sub>	0,832	2,68*	3,20 <sup>ns</sup>	3,65*	2,89 <sup>ns</sup>
<i>t</i> <sub>acmin2</sub>	0,626	3,49*	5,49*	5,22*	3,14*
<i>t</i> <sub>acmin3</sub>	0,832	7,95**	8,33*	24,1***	2,13 <sup>ns</sup>
<i>V</i> <sub>max</sub>	0,560	2,03 <sup>ns</sup>	1,26 <sup>ns</sup>	1,62 <sup>ns</sup>	1,08 <sup>ns</sup>

*N* = 27; *G*, grasa; *In*, inulina; *GxIn*, interacción grasa por inulina; *R*<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; *F*, estadístico del ANOVA; GL, grados de libertad; \**P*<0,05, \*\**P*<0,001, \*\*\**P*<0,0001; <sup>ns</sup>, no significativo. Para la definición de las variables dependientes véase la sección de materiales y métodos de este capítulo y la sección 4.3 de la tesis.

Dado que no hubo efecto significativo de los factores experimentales sobre el tiempo total de incubación hasta  $\text{pH} = 4,6$ , las diferencias no significativas observadas en este tiempo podrían atribuirse a dos causas: 1) la variación en el número de microorganismos viables en el inóculo inicial y en su actividad metabólica y 2) la deriva o fluctuación en las medidas de  $\text{pH}$ . La primera causa es muy difícil de controlar y siempre estará presente en este tipo de procesos, mientras que la segunda se pudo identificar claramente en este experimento, ya que el equipo utilizado posee dos cubetas con sendos sensores ópticos y electrodos de  $\text{pH}$  que permitieron monitorizar dos muestras iguales de forma paralela e independiente. A pesar de calibrar ambos electrodos de  $\text{pH}$  al inicio de cada ensayo, a medida que transcurría la fermentación las lecturas entre ellos se iban distanciando, pudiendo llegar a diferencias finales de 0.05 unidades de  $\text{pH}$ , es decir que mientras uno indicaba un  $\text{pH}$  de, p. ej. 4,60, el otro registraba 4,65 y esta pequeña diferencia de  $\text{pH}$  podía equivaler, en la etapa final del proceso de fermentación, a una diferencia en tiempo de hasta 40 min.

Muy probablemente este mismo tipo de error o deriva en la medición del  $\text{pH}$  está presente en la práctica industrial habitual, con el consiguiente efecto sobre las características finales del producto, especialmente en cuanto a la firmeza del mismo. De hecho, en dos industrias lácteas consultadas manifestaron tener una variabilidad en el tiempo total de fermentación hasta  $\text{pH} 4,6$  de alrededor de 30 min.

Hubo un efecto significativo del contenido de grasa de la leche sobre la velocidad de acidificación hasta  $\text{pH} = 4,8$ . Los tiempos a los cuales se alcanzaron los mínimos de la primera derivada de la curva de  $\text{pH}$  vs tiempo  $t_{acmin1}$ ,  $t_{acmin2}$  y  $t_{acmin3}$  (Fig. 9.2) fueron mayores al aumentar la concentración de grasa de 0,4 a 3,6%, además los valores de  $\text{pH}$  correspondientes a estos mínimos ( $\text{pH}_{acmin1}$ ,  $\text{pH}_{acmin2}$  y  $\text{pH}_{acmin3}$ ) fueron más altos y los parámetros  $t_{\text{pH}5,0}$  y  $t_{\text{pH}4,8}$  aumentaron con la grasa (Tabla 9.5). Todo lo anterior indica que la duración del proceso de acidificación hasta  $\text{pH} = 4,8$  fue mayor al aumentar la concentración de grasa.

**Tabla 9.5** Influencia de los efectos principales (grasa e inulina) sobre los parámetros ópticos, reológicos, de acidificación, sinéresis y firmeza del gel.

Parámetros	Efectos principales					
	Grasa (%)			Inulina (%)		
	0,4	1,6	3,6	0	1,6	3,2
$t_{pH5,0}$ (min)	135 <sup>a</sup>	140 <sup>b</sup>	142 <sup>bc</sup>	144 <sup>a</sup>	136 <sup>b</sup>	136 <sup>bc</sup>
$t_{pH4,8}$ (min)	177 <sup>a</sup>	170 <sup>a</sup>	188 <sup>b</sup>	181 <sup>a</sup>	177 <sup>a</sup>	176 <sup>a</sup>
$t_{G'1}$ (min)	115 <sup>a</sup>	120 <sup>b</sup>	118 <sup>bc</sup>	124 <sup>a</sup>	117 <sup>b</sup>	112 <sup>c</sup>
$G'_{pH4,8}$ (Pa)	132 <sup>a</sup>	121 <sup>a</sup>	192 <sup>b</sup>	141 <sup>a</sup>	138 <sup>a</sup>	166 <sup>b</sup>
$G'_{pH4,6}$ (Pa)	278 <sup>a</sup>	278 <sup>a</sup>	358 <sup>b</sup>	285 <sup>a</sup>	303 <sup>b</sup>	325 <sup>c</sup>
$tg \delta_{pH4,6}$	0,30 <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,26 <sup>c</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,28 <sup>ac</sup>
$pHt_{G'1}$	5,18 <sup>a</sup>	5,18 <sup>a</sup>	5,23 <sup>b</sup>	5,16 <sup>a</sup>	5,19 <sup>ab</sup>	5,24 <sup>c</sup>
$pHt_{max}$	5,43 <sup>a</sup>	5,42 <sup>a</sup>	5,42 <sup>a</sup>	5,39 <sup>a</sup>	5,43 <sup>b</sup>	5,46 <sup>c</sup>
$pHt_{max2}$	5,14 <sup>a</sup>	5,20 <sup>b</sup>	5,21 <sup>bc</sup>	5,16 <sup>a</sup>	5,19 <sup>b</sup>	5,20 <sup>bc</sup>
$pHt_{2min}$	5,37 <sup>a</sup>	5,37 <sup>a</sup>	5,38 <sup>a</sup>	5,34 <sup>a</sup>	5,38 <sup>b</sup>	5,39 <sup>bc</sup>
$pHt_{2max2}$	5,27 <sup>a</sup>	5,25 <sup>a</sup>	5,25 <sup>a</sup>	5,21 <sup>a</sup>	5,27 <sup>b</sup>	5,29 <sup>bc</sup>
$pH_{acmin1}$	6,18 <sup>ab</sup>	6,20 <sup>ab</sup>	6,17 <sup>bc</sup>	6,20 <sup>a</sup>	6,18 <sup>ab</sup>	6,17 <sup>b</sup>
$pH_{acmin2}$	5,49 <sup>a</sup>	5,52 <sup>ab</sup>	5,55 <sup>bc</sup>	5,52 <sup>a</sup>	5,54 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>
$pH_{acmin3}$	5,29 <sup>a</sup>	5,29 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>	5,26 <sup>a</sup>	5,30 <sup>b</sup>	5,35 <sup>c</sup>
$SinE$ (%)	5,89 <sup>a</sup>	4,03 <sup>b</sup>	2,35 <sup>c</sup>	3,56 <sup>a</sup>	4,01 <sup>ab</sup>	4,70 <sup>b</sup>
$CRA$ (%)	24,8 <sup>a</sup>	32,2 <sup>b</sup>	49,0 <sup>c</sup>	33,6 <sup>a</sup>	36,0 <sup>a</sup>	36,4 <sup>a</sup>
$Firm$ (N)	0,085 <sup>a</sup>	0,089 <sup>a</sup>	0,131 <sup>b</sup>	0,092 <sup>a</sup>	0,098 <sup>a</sup>	0,115 <sup>b</sup>
$V_0$ (V)	1,03 <sup>a</sup>	1,41 <sup>b</sup>	2,03 <sup>c</sup>	1,53 <sup>a</sup>	1,49 <sup>b</sup>	1,45 <sup>c</sup>
$t_{max}$ (min)	103 <sup>a</sup>	107 <sup>ab</sup>	109 <sup>bc</sup>	110 <sup>a</sup>	105 <sup>b</sup>	103 <sup>bc</sup>
$t_{max2}$ (min)	121 <sup>a</sup>	121 <sup>a</sup>	124 <sup>a</sup>	127 <sup>a</sup>	121 <sup>b</sup>	119 <sup>bc</sup>
$t_{2min}$ (min)	106 <sup>a</sup>	110 <sup>b</sup>	113 <sup>bc</sup>	114 <sup>a</sup>	108 <sup>b</sup>	107 <sup>bc</sup>
$t_{2max}$ (min)	98 <sup>a</sup>	101 <sup>a</sup>	105 <sup>b</sup>	105 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	99 <sup>bc</sup>
$t_{2max2}$ (min)	112 <sup>a</sup>	117 <sup>b</sup>	121 <sup>bc</sup>	122 <sup>a</sup>	115 <sup>b</sup>	113 <sup>bc</sup>
$R_{pH4,8}$	1,98 <sup>a</sup>	1,63 <sup>b</sup>	1,32 <sup>c</sup>	1,63 <sup>a</sup>	1,65 <sup>a</sup>	1,65 <sup>a</sup>
$R_{pH4,6}$	2,04 <sup>a</sup>	1,67 <sup>b</sup>	1,33 <sup>c</sup>	1,68 <sup>a</sup>	1,69 <sup>a</sup>	1,68 <sup>a</sup>
$R_{max}$	1,30 <sup>a</sup>	1,25 <sup>b</sup>	1,12 <sup>c</sup>	1,23 <sup>a</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	1,21 <sup>b</sup>
$R_{2max}$	1,22 <sup>a</sup>	1,17 <sup>b</sup>	1,09 <sup>c</sup>	1,17 <sup>a</sup>	1,15 <sup>b</sup>	1,17 <sup>ac</sup>
$R_{2min}$	1,35 <sup>a</sup>	1,28 <sup>b</sup>	1,14 <sup>c</sup>	1,27 <sup>a</sup>	1,25 <sup>b</sup>	1,25 <sup>b</sup>
$R_{2max2}$	1,44 <sup>a</sup>	1,35 <sup>b</sup>	1,18 <sup>c</sup>	1,34 <sup>a</sup>	1,32 <sup>ab</sup>	1,31 <sup>b</sup>
$R_{2min2}$	1,80 <sup>a</sup>	1,53 <sup>b</sup>	1,26 <sup>c</sup>	1,53 <sup>a</sup>	1,53 <sup>a</sup>	1,52 <sup>a</sup>
$t_{acmin1}$ (min)	44,0 <sup>a</sup>	43,6 <sup>a</sup>	48,4 <sup>b</sup>	44,4 <sup>a</sup>	45,7 <sup>b</sup>	46,0 <sup>b</sup>
$t_{acmin2}$ (min)	98,8 <sup>a</sup>	101 <sup>ab</sup>	103 <sup>b</sup>	103 <sup>ac</sup>	99,4 <sup>b</sup>	100 <sup>bc</sup>
$t_{acmin3}$ (min)	110 <sup>a</sup>	115 <sup>b</sup>	115 <sup>bc</sup>	119 <sup>a</sup>	112 <sup>b</sup>	108 <sup>c</sup>
$V_{max}$ (min <sup>-1</sup> x 10 <sup>-3</sup> )	20,3 <sup>a</sup>	20,5 <sup>a</sup>	20,9 <sup>a</sup>	20,0 <sup>a</sup>	20,9 <sup>a</sup>	20,7 <sup>a</sup>

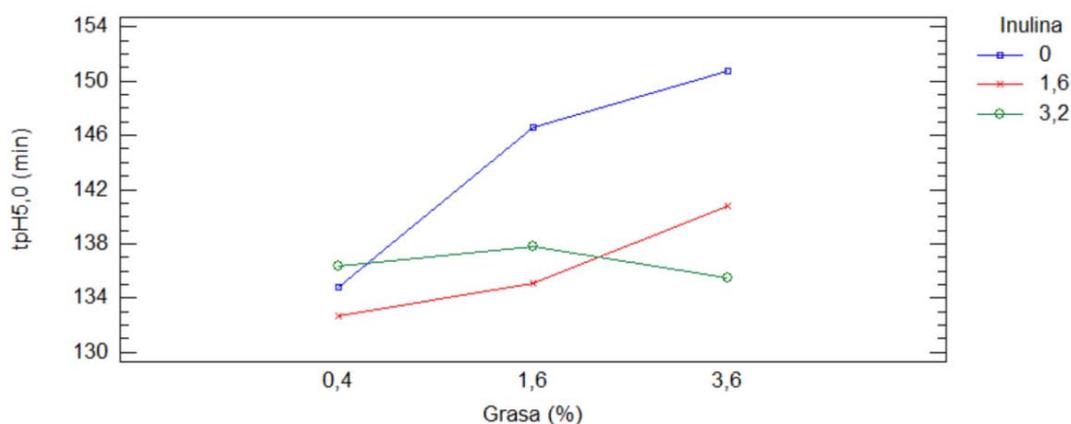
$N = 27$ ; LSM con las mismas letras no fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Para la definición de las variables dependientes véase la sección de materiales y métodos de éste capítulo y la sección 4.3 de la tesis.

Son escasos los trabajos publicados en los cuales se ha analizado el efecto del contenido de grasa en la leche sobre la curva de acidificación en geles ácidos. Gün y Devely (2007) estudiaron el efecto de la adición de grasa y sólidos no grasos (SNG) sobre la variación de la viscosidad durante la coagulación de yogur, encontrando que tanto el aumento en el contenido de grasa, como de SNG en la leche produjeron un aumento significativo en los valores de pH a los cuales se presentó el pico máximo de viscosidad (alrededor de pH = 5,0), que fue relacionado con el inicio de la coagulación del yogur, mencionando que las causas de este fenómeno permanecen sin aclarar. Damini et al. (2009) encontraron que el aumento en el contenido de sólidos prolongó el tiempo de incubación hasta pH = 5,0 en yogures sin grasa, lo que es acorde con los resultados de este experimento, ya que las muestras con mayor contenido de grasa tenían también un mayor contenido de sólidos. Mahdian et al. (2007) encontraron una alta correlación entre los recuentos de *Streptococcus thermophilus* y la acidez del yogur a lo largo de la fermentación y además observaron que el tiempo de la fase de latencia (fase lag) fue mayor al aumentar el contenido de sólidos totales en la leche (incluyendo el contenido de grasa). Probablemente el aumento en la viscosidad de la leche producido por el incremento en la concentración de sólidos ralentiza la etapa inicial del desarrollo de los microorganismos del inóculo, lo que en parte podría explicar el aumento del tiempo de acidificación.

Una hipótesis adicional que ayudaría a justificar un desarrollo más lento de la acidificación debida a la presencia de grasa, estaría relacionada con la afinidad de algunas bacterias, entre ellas las ácido lácticas, para adherirse a la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM). Se ha demostrado que algunas proteínas que componen esta membrana, tales como la xantina oxidasa poseen actividad antimicrobiana o inhibidora del crecimiento de algunas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, entre ellas *Streptococcus thermophilus* (Jiménez-Flores y Brisson, 2008; Dewettinck et al., 2008), lo que provocaría una disminución en la actividad inicial del inóculo y un retraso en la primera fase de la acidificación. Le et al. (2011) utilizaron material de la MFGM como suplemento en la producción de yogur; aunque en el artículo no se presentan datos numéricos que permitan evaluar en detalle las diferencias en los tiempos de acidificación, al analizar las curvas de pH de los diferentes tratamientos se observa que aquellos adicionados de MFGM tuvieron un proceso de fermentación más lento.

En cuanto a la inulina, su adición a la leche produjo una disminución en los parámetros  $t_{pH5,0}$ ,  $t_{pH4,8}$ ,  $t_{acmin2}$  y  $t_{acmin3}$ , así como también un aumento en el valor del parámetro  $pH_{acmin3}$ , indicando un aumento en la velocidad de acidificación. Este resultado coincide con el obtenido por Oliveira et al. (2011a y 2009) y por Donkor (2007), quienes atribuyeron este efecto a la reconocida actividad prebiótica de la inulina debida a su hidrólisis parcial y posterior fermentación, potenciando así la actividad del inóculo.

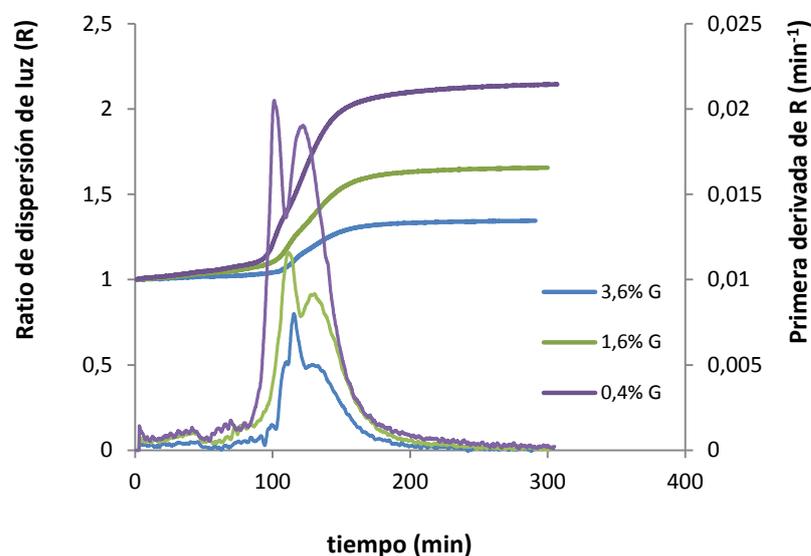
El análisis estadístico mostró que hubo un efecto significativo de la interacción  $G \times In$  sobre el tiempo de fermentación hasta  $pH = 5,0$ . En la Figura 9.4 se puede observar que en ausencia de inulina  $t_{pH5,0}$  aumentó de forma marcada con el contenido de grasa en la leche, por razones que fueron comentadas antes; sin embargo al aumentar la concentración de inulina, el incremento en  $t_{pH5,0}$  se hizo menos evidente, debido probablemente a que la inulina ejerce un efecto contrario al de la grasa, estimulando la actividad del inóculo y haciendo que se alcance un  $pH = 5,0$  en un menor tiempo.



**Figura 9.4** Efecto de la interacción  $G \times In$  sobre el parámetro  $t_{pH5,0}$

En la Figura 9.5 se presentan los perfiles del ratio de dispersión de luz con su primera derivada para las muestras con los tres niveles de grasa evaluados y sin inulina. Se observa que en presencia de más grasa el aumento del ratio de dispersión de luz ( $R$ ) fue menor. La grasa dispersa mayor cantidad de luz, lo que origina un voltaje inicial ( $V_0$ ) significativamente más alto (según se puede ver en la Tabla 9.3), por tanto, dado que  $R$  se calcula como el voltaje a tiempo  $t$  sobre el voltaje inicial (correspondiente al valor de dispersión de luz sin muestra), en las muestras con más grasa el aumento relativo del ratio de dispersión de luz durante la fermentación es menor. Contrario a lo

que sucedió con la grasa, la adición de inulina provocó una leve pero significativa disminución en  $V_0$ , lo que significa una menor dispersión de luz a mayor concentración de inulina. La dispersión de luz se debe a las partículas cuyo índice de refracción ( $IR$ ) es diferente al medio que las rodea (Walstra et al. 2006), por tanto, si la variación o diferencia entre el  $IR$  del medio o solución y el  $IR$  de las partículas (especialmente de caseína) aumenta, también lo hará la dispersión de luz. Dado que la inulina es soluble, su adición debe producir un aumento en  $IR$  de la solución, lo que conlleva una disminución en el gradiente o diferencia con el  $IR$  de las partículas y, por lo tanto, a una menor dispersión de luz.



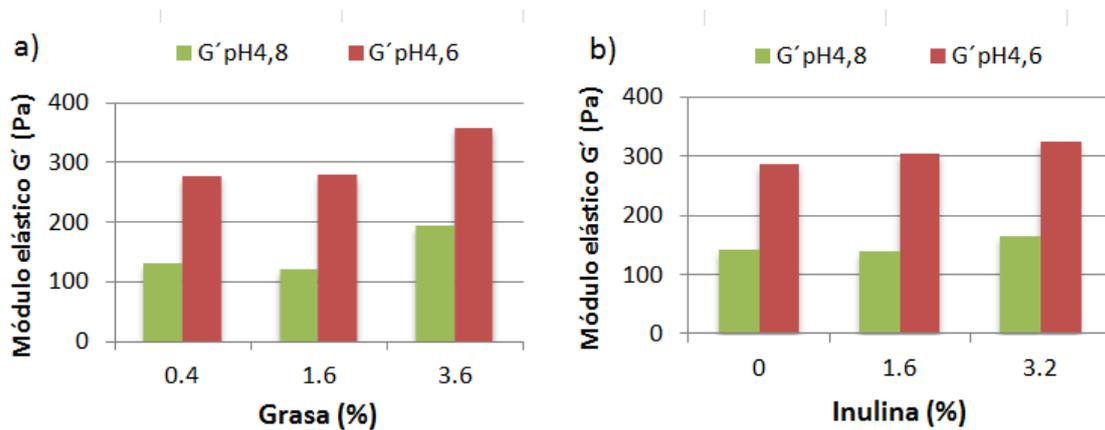
**Figura 9.5** Perfil del ratio de dispersión de luz y su primera derivada para los ensayos con distintos niveles de grasa y sin inulina.

Como se puede ver en la Figura 9.5, la primera derivada del perfil de dispersión de luz se caracterizó por presentar un segundo máximo claramente diferenciado ( $t_{max2}$ ), el cual, en apariencia, se hace menos pronunciado a medida que aumenta el contenido de grasa en la leche. Este fenómeno se debe a que la grasa produce una alta dispersión de luz y por consiguiente los cambios ocasionados en  $R$  debidos a la coagulación se evidencian menos; adicionalmente al ser mayor la pendiente de  $R$  en las muestras con menos grasa, los máximos en la primera derivada se hacen más pronunciados. Por lo anterior, es probable que la atenuación en los máximos de la primera derivada de  $R$ , especialmente en  $t_{max2}$ , se deba más al efecto de la grasa sobre la dispersión de luz que a los efectos de ésta sobre la cinética de coagulación.

El aumento en la concentración de grasa de 0,4 a 3,6% ocasionó un incremento significativo en los parámetros ópticos de tiempo  $t_{2min}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{2max}$ ,  $t_{max2}$  y  $t_{2max2}$ , lo que se debe a un retraso en el inicio de la coagulación, siendo esto consistente con el efecto comentado antes de alargamiento del tiempo de acidificación hasta  $pH = 4,8$  debido al incremento en la concentración de grasa en la leche. El tiempo de gelificación ( $t_{G'1}$ ) también aumentó al cambiar la concentración de grasa de 0,4 a 3,6%, indicando un retraso en el inicio de la coagulación del yogur, resultado que fue contrario al encontrado por Xu et al. (2008) y por Lucey et al. (1998c). Sin embargo, en el presente trabajo el aumento observado en  $t_{G'1}$  fue consistente con el incremento en los parámetros ópticos de tiempo que marcan el inicio de la coagulación, con valores más altos de  $pH$  a  $t_{G'1}$  y con tiempos de acidificación más largos, de manera que los resultados de la monitorización con tres sistemas diferentes e independientes (dispersión de luz, reología y potenciometría) fueron consistentes y demostraron que el aumento en la concentración de grasa en la leche prolongó la duración del proceso de fermentación hasta  $pH \sim 4,8$ .

Contrario al efecto de la grasa, la adición de 3,2% de inulina a la leche produjo un inicio anticipado de la coagulación, que se evidenció por una disminución en los parámetros ópticos de tiempo  $t_{2min}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{2max}$ ,  $t_{max2}$  y  $t_{2max2}$ , un aumento en los valores de  $pH$  correspondientes a algunos de estos parámetros ( $pHt_{max}$ ,  $pHt_{2min}$  y  $pHt_{2max2}$ ) y una disminución en el tiempo de gelificación ( $t_{G'1}$ ), conforme con el efecto observado (y discutido antes) de aceleración de la primera etapa de la acidificación.

La concentración de grasa tuvo un efecto directamente proporcional sobre el valor del módulo elástico del yogur a  $pH = 4,8$  y  $pH = 4,6$  ( $G'_{pH4,8}$  y  $G'_{pH4,6}$  respectivamente) y un efecto inversamente proporcional sobre  $tg \delta$ . El valor de  $G'_{pH4,6}$  aumentó 28,8% al pasar del nivel de grasa inferior al superior (Fig. 9.6 a), resultados que concuerdan con los trabajos de Xu et al. (2008) y Lucey et al. (1998c) donde el valor final de  $G'$  también aumentó con la concentración de grasa. Nótese que el aumento del valor de  $G'$  al disminuir el  $pH$  de 4,8 a 4,6 fue de aproximadamente 100% en todos los casos (Fig. 9.6 a y b), lo que da una idea del efecto que puede tener la variabilidad en la determinación del  $pH$  final de la fermentación sobre la dureza del gel.

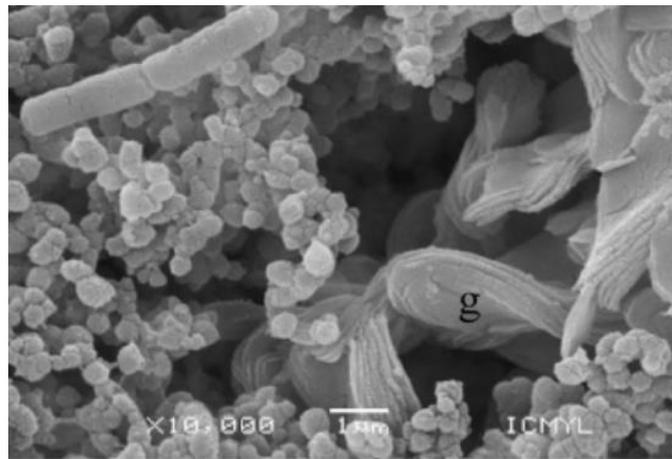


**Figura 9.6** Efecto de la concentración de grasa a) y de inulina b) sobre el valor del módulo elástico a pHs 4,8 y 4,6.

Durante la homogeneización de la leche se produce la ruptura de los glóbulos grasos causando la formación de un número mucho mayor de pequeños glóbulos que durante el proceso han unido a su superficie caseínas y proteínas del suero, de tal forma que pueden actuar de forma similar a las micelas, participando de forma activa en la estructuración del gel al aumentar la densidad de puntos de enlace, lo que ocasiona un aumento del módulo elástico (Lee y Lucey, 2010; Lucey et al. 1998c).

La adición de inulina a la leche también tuvo un efecto directamente proporcional sobre  $G'_{pH4,8}$  y  $G'_{pH4,6}$ , como se muestra en la Figura 9.6 b, mientras que el efecto sobre  $tg \delta_{pH4,6}$  no fue claro, ya que entre los niveles de 0 y 3,2% de inulina no hubo diferencia, pero con 1,6% de inulina hubo un aumento en  $tg \delta_{pH4,6}$ . En las muestras con 3,6% de inulina el valor de  $G'_{pH4,6}$  fue 14% mayor que en aquellas sin inulina. En concordancia con estos resultados, Brennan y Tudorica (2008) notaron un incremento en la viscosidad, en  $G'$  y en  $tg \delta$  en yogures bajos en grasa al aumentar la concentración de inulina y en comparación con el control bajo en grasa sin inulina. Estos autores comentaron que en las muestras con inulina al parecer se formó una estructura tipo gel junto con la matriz de caseína. En el trabajo de Guggisberg et al. (2009) el límite elástico y la viscosidad de yogures con distintos niveles de grasa aumentaron con la adición de inulina. Crispin-Isidro et al. (2015) utilizando reología oscilatoria identificaron un incremento en los valores de  $G'$  y  $G''$  y una disminución en  $tg \delta$  al aumentar la concentración de inulina en yogures reducidos en grasa (1,3% de grasa), observando que las muestras cuyo comportamiento reológico fue más semejante al

control elaborado con leche entera (2,6% de grasa) fueron aquellas que contenían 6% de inulina. El análisis de la microestructura de los yogures mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió a los autores antes mencionados observar que la inulina formó partículas gelificadas con forma de láminas, localizadas entre los agregados de proteínas, convirtiéndose estos agregados en parte estructural de la red y actuando mecánicamente de forma similar a la grasa (Fig. 9.7).

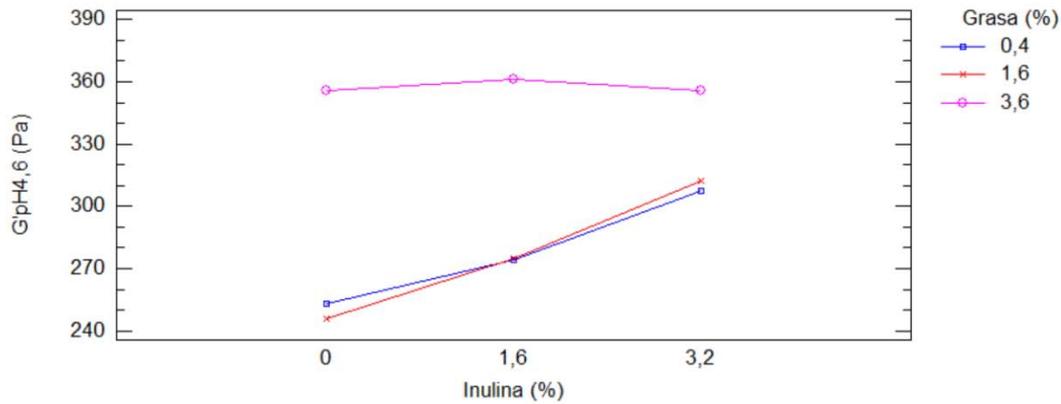


**Figura 9.7** Micrografía SEM de un yogur reducido en grasa con 4% de inulina, donde se observan las estructuras gelificadas de inulina (g). Reproducido de Crispin-Isidro et al. (2015).

La formación de agregados de inulina de tamaño similar al de los glóbulos de grasa y embebidos en la matriz proteica también ha sido observada en otros trabajos (Meyer et al., 2011). En términos generales los efectos de la inulina en el yogur han sido atribuidos a su capacidad de formar agregados de partículas que retienen agua y que entran a formar parte de la red estructural del producto (Srisuvor et al., 2013; Guggisberg et al., 2009; Kip et al., 2006). Sin embargo, en las condiciones experimentales de este estudio, también se debe considerar el efecto del aumento en el contenido de sólidos en las muestras y, por consiguiente, la reducción en contenido de agua que se produce con la adición de inulina.

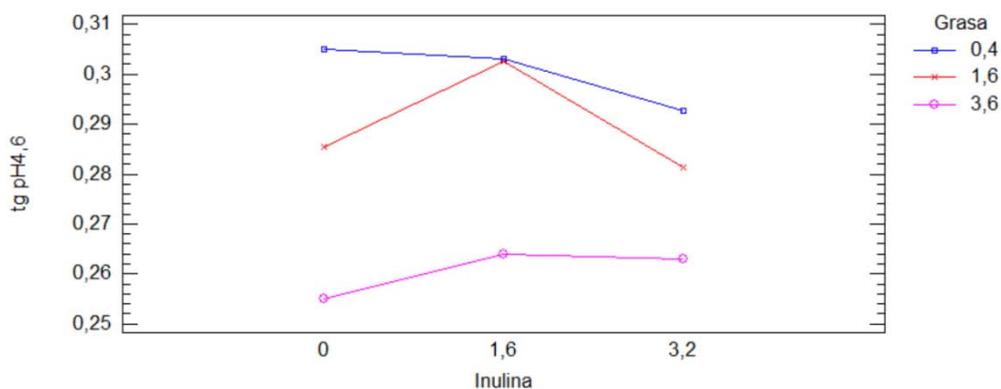
La interacción  $GxIn$  tuvo efecto significativo sobre  $G'_{pH4,6}$  (Fig. 9.8). El aumento en  $G'_{pH4,6}$  producido por la adición de inulina fue aproximadamente lineal y

prácticamente igual a niveles de grasa de 0,4 y 1,6%, pero cuando la concentración de grasa fue de 3,6% la adición de inulina no tuvo efecto sobre  $G'_{pH4,6}$ .



**Figura 9.8** Efecto de la interacción  $GxIn$  sobre el parámetro  $G'_{pH4,6}$ .

El parámetro  $tg \delta$  es la relación entre el módulo viscoso y el módulo elástico ( $G''/G'$ ). Valores altos indican que los enlaces en el gel son más propensos a la relajación y facilitan la reestructuración (Liu et al., 2014). La interacción  $GxIn$  afectó significativamente  $tg \delta_{pH4,6}$ , observándose que este parámetro disminuyó con el aumento en la concentración de grasa (Fig. 9.9), significando esto que los yogures con más grasa fueron más elásticos, menos propensos a la reestructuración y a la sinéresis. A concentraciones de grasa de 0,4 y 3,6% no hubo efecto de la adición de inulina sobre  $tg \delta_{pH4,6}$ , sin embargo con 1,6% de grasa en la leche, la adición de 1,6% de inulina produjo un incremento en  $tg \delta_{pH4,6}$ , situación en la cual los enlaces en el gel son más susceptibles a la relajación y se favorece la sinéresis.



**Figura 9.9** Efecto de la interacción  $GxIn$  sobre el parámetro  $tg \delta_{pH4,6}$ .

En concordancia con lo observado en relación a los parámetros reológicos, la firmeza de los yogures aumentó de forma directamente proporcional tanto con la grasa como con la inulina, coincidiendo con los resultados de Oliveira et al. (2011b), Guggisberg et al. (2009), Kusuma et al. (2009) y Brennan y Tudorica (2008). En todos los casos los yogures bajos en grasa suplementados con inulina tuvieron una textura que se asemejó más a la de las muestras control elaboradas con leche entera. El efecto de la inulina sobre la textura ha sido justificado en la literatura por diferentes causas, entre ellas el aumento en el contenido de sólidos, posibles interacciones con las proteínas de la leche y el estímulo a la producción de exopolisacáridos (Oliveira et al., 2011b).

Un defecto relevante en la calidad del yogur es la sinéresis o separación espontánea de suero. Adicionalmente, la capacidad de retención de agua (*CRA*) es una propiedad física importante que se relaciona con la estabilidad del gel (Srisuvar et al., 2013). El aumento en la concentración de grasa en la leche tuvo un efecto positivo, al disminuir la sinéresis espontánea (*SinE*) y aumentar la *CRA*. Brennan y Tudorica (2008) también observaron que los yogures elaborados con leche entera tuvieron menos sinéresis (evaluada como % de suero expulsado por centrifugación a 222 g, por 10min a 4 °C), que aquellos elaborados con leche desnatada. Los autores explicaron este resultado por la presencia de glóbulos de grasa que limitan la agregación de la caseína y reducen capacidad de reestructuración y contracción de la red tridimensional.

En la tabla 9.5 se puede ver que la media de mínimos cuadrados de la sinéresis espontánea para 0,4% de grasa fue mayor que las medias de las muestras con los tres niveles de inulina, pero éstas fueron más altas comparadas con la media de las muestras con leche entera (3,6% grasa). En la tabla 9.5 también se observa que la *SinE* disminuyó al aumentar la concentración de grasa y aumentó con la adición de inulina, lo que fue consistente con valores más altos de  $tg \delta_{pH4,6}$  observados con el incremento de inulina, indicando que estos geles son más propensos a la sinéresis. En concordancia con este resultado, Guven et al. (2005) obtuvieron un aumento en la sinéresis de los yogures al adicionar 1, 2 y 3% de inulina a la leche desnatada, sin embargo en ese experimento los niveles de proteína de la leche disminuyeron (4,37; 4,09 y 3,94%) al aumentar la concentración de inulina, lo que seguramente provocó un aumento en la sinéresis de las muestras, haciendo que el efecto real de la inulina no pudiera conocerse (*confounding effect*).

Los resultados de este estudio también concuerdan con los de Srisuvor et al. (2013), quienes no encontraron diferencias significativas en la sinéresis (medida como % de suero expulsado por una muestra esparcida sobre papel filtro tras 5 h en refrigeración), entre muestras de yogur elaborado con leche reconstituida (1,5% de grasa y 4,5% de proteína) y suplementada con 1, 2 y 3% de inulina, ni tampoco respecto al control sin suplementación. En ese mismo estudio no se encontraron diferencias significativas en la *CRA* (medida como % de yogur remanente tras centrifugación a 3500 g, por 10 min a 4 °C), entre las muestras suplementadas con inulina, pero éstas tuvieron una *CRA* significativamente menor que el control sin inulina.

En consonancia con los resultados del presente estudio, Brennan y Tudorica (2008) encontraron que las muestras de yogur con inulina tuvieron significativamente mayor y menor sinéresis, que las muestras control elaboradas con leche entera (3,2% grasa) y desnatada (0,1% grasa) respectivamente; sin embargo no observaron diferencias significativas en la sinéresis al aumentar los niveles de inulina en 2, 4 y 6%. Ipsen et al. (2001) elaboraron yogures variando de forma inversa los contenidos de grasa y de inulina en niveles de 0 a 3% y evaluaron el efecto sobre la permeabilidad, la sinéresis (% de suero liberado por una muestra de yogur depositada en una bolsa de té), las curvas de flujo y la microestructura mediante microscopía de barrido laser confocal. Los autores encontraron un aumento en la permeabilidad y la sinéresis con la disminución en el contenido de grasa sin importar el nivel de inulina añadido. La adición de 3% de inulina en la muestra con 0,1% de grasa redujo el coeficiente de permeabilidad comparado con la muestra control sin grasa y sin inulina, lo que fue atribuido a un posible aumento en la viscosidad de la fase dispersa o a un taponamiento parcial de los poros, sin embargo el efecto de la adición de inulina sobre la sinéresis no fue comentado. El análisis de la microestructura realizado en el trabajo citado anteriormente mostró que la sustitución de grasa por inulina resultó en una estructura más fuerte, basta o abigarrada (*coarser structure*), con poros más grandes, lo que a la vez fue correlacionado con un incremento en la permeabilidad y en la sinéresis respecto al control con 3,1% de grasa y sin inulina.

Según lo comentado anteriormente, los resultados del efecto de la sustitución de grasa por inulina sobre la sinéresis en los geles ácidos no son claros y resultan contradictorios, lo que en parte puede atribuirse a la variabilidad en las metodologías

empleadas para evaluar la sinéresis, ya que la mayoría de ellas dan lugar a una expulsión forzada del suero, fenómeno que no corresponde a la expulsión espontánea que constituye el problema de desuerado en el yogur firme. En este trabajo, la sinéresis espontánea aumentó con el contenido de inulina, lo que podría explicarse por los cambios en la microestructura observados por Guggisberg et al. (2009) y por Ipsen et al. (2001), que ocasionan un incremento en la permeabilidad del gel. Al evaluar la *CRA* de los mismos geles mediante centrifugación no se encontraron diferencias significativas entre las muestras con y sin inulina, lo que concuerda con el efecto de la inulina sobre la *CRA* en geles de coagulación enzimática encontrado en el Capítulo 8 de esta tesis. De acuerdo con la ecuación utilizada para calcular la *CRA* si el resultado fue aproximadamente constante a los tres niveles de inulina evaluados, implica que la cantidad de suero expulsado también fue constante o aumentó en cada uno de ellos.

Aquí vale la pena señalar que al calcular la *CRA* sin considerar el contenido de humedad inicial de la muestra, es decir, como el porcentaje de suero expulsado respecto al peso inicial de la muestra, se obtiene 58, 55 y 54% (diferencias significativas) con 0, 1,6 y 3,2% de inulina respectivamente, es decir, a más inulina menos suero expulsado, lo que llevaría a concluir que a mayor contenido de inulina mayor *CRA*.

### **9.3.3 Caracterización de la coagulación del yogur en función del ratio de dispersión de luz y su relación con la curva de pH y los parámetros reológicos**

En la Tabla 9.5 se aprecia que los valores de pH correspondientes a los máximos de la primera derivada del perfil de dispersión de luz ( $t_{max}$  y  $t_{max2}$ ) ocurrieron alrededor de 5,4 y 5,2 respectivamente, para las muestras con distintas concentraciones de grasa y de inulina. La presencia de dos máximos en la primera derivada del perfil de dispersión de luz es una indicación de que el proceso de coagulación del yogur se desarrolló en dos etapas claramente diferenciadas, lo que coincide con los resultados de otros estudios donde también se ha monitorizado la coagulación ácida de la leche utilizando métodos ópticos.

Alexander y Dalglish (2004) estudiaron la coagulación de leche desnatada durante la acidificación con glucono- $\delta$ -lactona (GDL) utilizando espectrometría de

dispersión difusa múltiple (diffusing wave spectrometry – DWS) con lo que se midió el parámetro  $l^*$ , el transporte de fotones de recorrido libre medio, relacionado con el recorrido libre medio ( $l$ ) de los fotones entre los eventos de dispersión:

$$l^* = \frac{l}{(1 - \cos\theta)}$$

donde  $\theta$  es el ángulo de dispersión y  $(1 - \cos\theta)$  indica la media del conjunto sobre muchos eventos de dispersión. Adicionalmente fue calculado el radio promedio de las partículas usando la relación de Stokes-Einstein. Se observó un aumento pronunciado en el parámetro  $1/l^*$  a un pH cercano a 5,8 seguido de una meseta entre pH 5,6 y 5,4 después del cual los valores de  $1/l^*$  aumentan nuevamente. El radio aparente de las partículas disminuyó desde la adición de GDL hasta pH de 5,8 (debido al colapso gradual de la  $\kappa$ -caseína en la superficie de las micelas), luego aumentó de forma constante y relativamente lenta hasta pH de 5,4, a partir del cual hubo un rápido aumento en el tamaño aparente hasta pH de 5,2, donde no fue posible hacer medidas debido a la formación de un gel rígido que anula la suposición de que las partículas están difundiendo aleatoriamente. En un trabajo donde se utilizó una metodología idéntica a la anterior (Dalglish et al., 2004), los resultados mostraron que, incluso para la leche sin tratamiento térmico, la agregación de las micelas de caseína comenzó alrededor de pH = 5,5. Adicionalmente, hubo una pequeña disminución en el radio aparente de las micelas hasta un pH de 5,5, después del cual se presentó una agregación extensiva que continuó hasta un pH alrededor de 5,0. Los autores concluyeron que la precipitación ácida de la leche, especialmente de aquella tratada térmicamente, no debe considerarse como un efecto que se produce en un intervalo estrecho de pH, sino como el resultado de una tendencia creciente de las partículas de interactuar a medida que el pH disminuye. Un estudio posterior del mismo grupo (Donato et al., 2007) mostró resultados coincidentes con los dos anteriores.

Moitzi et al. (2011) utilizando una combinación de métodos de dispersión de luz y de rayos X observaron la evolución del tamaño y de la estructura interna de las micelas en función del pH durante las primeras etapas de los procesos de acidificación y gelificación en muestras de leche diluidas y sin diluir. Los autores monitorizaron la intensidad de dispersión  $I(0)$ , el radio hidrodinámico  $R_H$  y el radio de giro  $R_G$  relacionando estas medidas con la masa molar media de las micelas, con su tamaño,

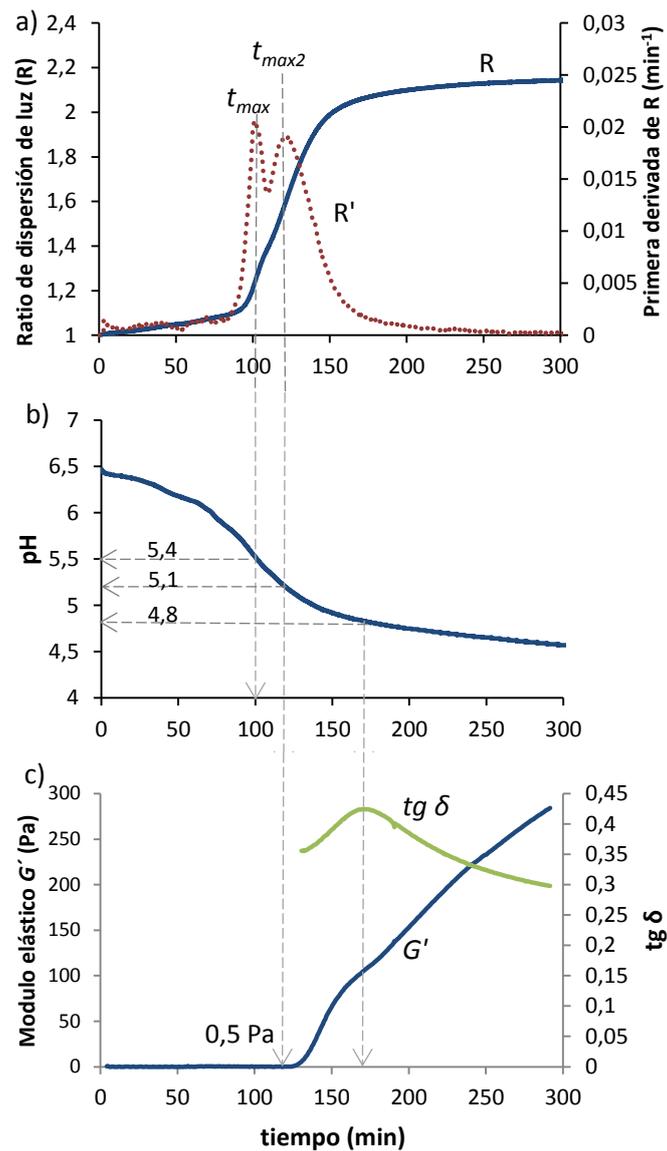
estructura y con efectos de interacción, observando una disminución de la masa y del radio micelar medios y una redistribución de la masa dentro de las micelas durante la acidificación de leche desnatada hasta el momento de inicio de la agregación. Estos resultados fueron interpretados como la consecuencia de la pérdida parcial de la integridad de las micelas debido a la disolución del fosfato de calcio coloidal, seguido de un reensamblaje ocasionado por disminución en la carga de las proteínas de caseína individuales que forman los componentes de las micelas. Al alcanzar un pH alrededor de 5,5  $I(0)$  empezó a incrementar hasta que se presentó una desestabilización y agregación a pH  $\sim 5,1$ .

En este punto se debe recordar que en este trabajo la leche utilizada para la elaboración del yogur fue sometida a un tratamiento térmico de 90 °C durante 5 min, lo que según está establecido en la literatura (Lucey, 2002), causa cambios en la estructura y las propiedades funcionales de las micelas de caseína como resultado de la desnaturalización de las proteínas del suero, que forman complejos entre sí mismas y con la caseína, localizándose una parte en la superficie de las micelas y la otra en el suero como pequeñas partículas dispersas denominadas complejos o agregados solubles (Donato et al., 2007). Los geles ácidos obtenidos a partir de leche tratada térmicamente tienen un pH de gelificación más alto, los geles son más firmes y presentan menor sinéresis (Anema et al., 2004; Lucey et al., 1998b).

De acuerdo con Guyomarc'h et al. (2003), los puntos isoeléctricos (PI) de las proteínas que constituyen los agregados son  $\beta$ -lactoglobulina (5,3),  $\kappa$ -caseína (5,4) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (4,8), por lo que se espera que los agregados tenga un PI global de  $\sim 5,3$ ; adicionalmente, dependiendo de la cantidad y del tamaño de los agregados de proteínas del suero desnaturalizadas unidas a las micelas, el PI de las micelas de caseína puede pasar de 4,7 en leche normal, a 5,1 en leche tratada térmicamente.

Relacionando la información anterior con el perfil de dispersión de luz y su primera derivada se puede deducir que a  $\text{pH} \leq 5,5$  se inició una primera fase del proceso de coagulación ácida de la leche, que se identificó por el inicio del incremento de  $R$  y la aparición de un primer máximo en su primera derivada ( $t_{max}$ ) a un pH  $\sim 5,4$  (Fig. 9.10 a) y 9.10 b). Según Donato et al. (2007), la presencia de complejos solubles en el suero, permite la formación de cadenas de complejos que unen las micelas de caseína a través

de las proteínas del suero que se han adherido a su superficie, lo que resulta en una red intermedia constituida por agregados de partículas solubles y entre estos agregados y las micelas de caseína a través de proteínas del suero que se han adherido a ellas. Esta red no es detectable en los ensayos reológicos, pero si por medios ópticos como DWS y también, en el caso de este experimento, por un aumento en el ratio de dispersión de luz.



**Figura 9.10** Relación entre las curvas a) óptica, b) de pH y c) reológica. Los datos corresponden a un ensayo con 0,4% de grasa y sin inulina.

Una vez formada la red proteica preliminar, el incremento en  $R$  se mantuvo constante, mientras que el pH continuó descendiendo. Cuando el pH de la leche se acercó al PI de las caseínas unidas a proteínas del suero ( $\sim 5,1$ ), probablemente se produjo una disminución en la carga negativa neta y en la repulsión electrostática entre las moléculas de caseína, al tiempo que aumentó la atracción debida a interacciones electrostáticas, produciéndose la agregación de las micelas (Lee y Lucey, 2010), lo que fue detectado por un nuevo incremento en  $R$  y la aparición del segundo máximo en la primera derivada ( $t_{max2}$ ). A partir de este punto el incremento continuado en  $R$  reflejó el proceso de endurecimiento del gel, que según Lucey (2004) se debe a la formación de enlaces adicionales entre las partículas de caseína, la reorganización de la red proteica y la posible incorporación de nuevos filamentos libres.

En la Figura 9.10 c) se observa un máximo en  $tg \delta$  que coincide con una momentánea disminución en la velocidad de aumento de  $G'$ , fenómeno que se presentó a valores de pH alrededor de 4,8 y 4,9 para las muestras sin y con grasa, respectivamente.

Dicho máximo en  $tg \delta$  ha sido descrito en trabajos anteriores (Xu et al., 2008; Dubert-Ferrandon et al., 2006; Lucey et al., 1998b) y se ha interpretado como una pérdida parcial de enlaces dentro y entre las moléculas de caseína debido a la solubilización del fosfato de calcio coloidal, lo que perturba el delicado balance de atracción y repulsión que gobierna la integridad micelar, ocasionando un debilitamiento en la estructura interna de las micelas, aunque la red del gel permanece intacta debido a la presencia interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Lucey, 2002). Castillo et al. (2006b) al monitorizar la coagulación de un gel mixto (ácido y enzimático) usando el mismo tipo de sensor de este estudio, observaron un mínimo en la curva de  $R$  a pH  $\sim 5,0$ , que fue concomitante con un máximo en  $tg \delta$  y un mínimo o allanamiento en la curva de  $G'$ . Tal fenómeno fue atribuido por los autores a la solubilización del CCP.

Anteriormente se describió que el parámetro óptico  $t_{max2}$  demarca el inicio del proceso de endurecimiento del gel, lo que se confirma a su vez por el inicio en el aumento de  $G'$  tal y como se muestra en la Fig. 9.7 c), de modo que el parámetro  $t_{max2}$  podría utilizarse como un buen indicador del tiempo de gelificación en la elaboración de yogur.

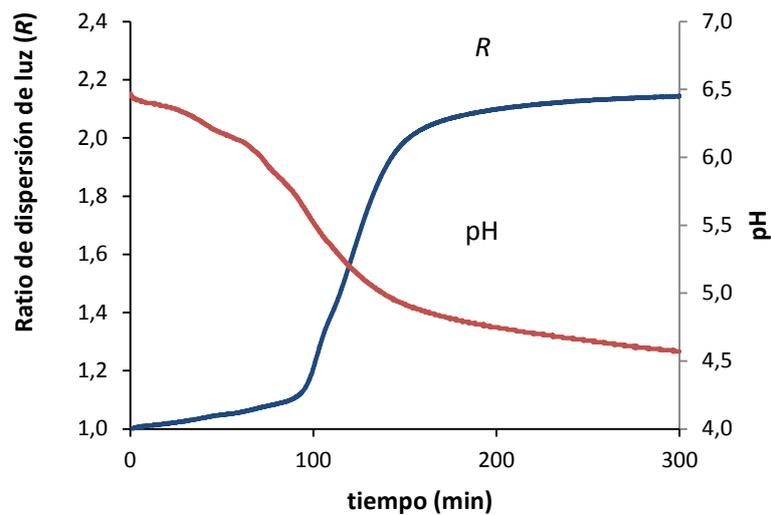
### 9.3.4 Detección de cambios en la leche debidos al tiempo de almacenamiento

Como se había comentado previamente, se encontraron efectos significativos de las réplicas (*rep*) sobre algunas de las variables de respuesta, que fueron atribuidas a las diferencias en el tiempo de almacenamiento de la leche a lo largo del experimento. Se debe resaltar que los valores iniciales de pH fluctuaron entre 6.46 y 6.40 para todos los ensayos, pero no hubo diferencias significativas en el pH inicial debido al tiempo de almacenamiento (en adelante *rep*). El aumento en *rep* produjo un descenso en la velocidad de acidificación que se evidenció por un aumento en  $pH_{acmin3}$  y una disminución en  $V_{max}$ . Adicionalmente se observó que el voltaje inicial ( $V_0$ ) aumentó significativamente de *rep* 1 a *rep* 2, pero no varió de *rep* 2 a *rep* 3, quizás debido a que el tiempo transcurrido entre la adquisición de la leche y la culminación de *rep* 1 fue mucho mayor que el transcurrido entre *rep* 2 y *rep* 3. Conforme con lo anterior, el valor de  $R$  a pH 4,8 y 4,6 disminuyó significativamente de *rep* 1 a *rep* 2 y no varió entre *rep* 2 y *rep* 3.

Los cambios en  $V_0$  y  $R$  con el tiempo de almacenamiento de la leche sugieren que el sensor óptico utilizado en el experimento podría tener aplicaciones en aspectos de investigación o control de calidad relacionados con la vida útil y los cambios que suceden a lo largo del tiempo en leches procesadas tipo UHT, pero se requiere confirmar este hallazgo y profundizar en el estudio de su aplicabilidad.

### 9.3.5 Aplicación del sensor óptico para el control del proceso de fermentación del yogur y la determinación del punto final

El principal objetivo de este experimento fue evaluar la aplicabilidad del sensor óptico para monitorizar el proceso de acidificación del yogur y determinar su punto final, convirtiéndose en una alternativa al uso de electrodos de pH debido a los numerosos inconvenientes que estos presentan. Como se ha descrito anteriormente,  $R$  evoluciona en función del proceso de coagulación de la leche y la coagulación a su vez se desarrolla en relación al descenso del pH (Fig. 9.11).

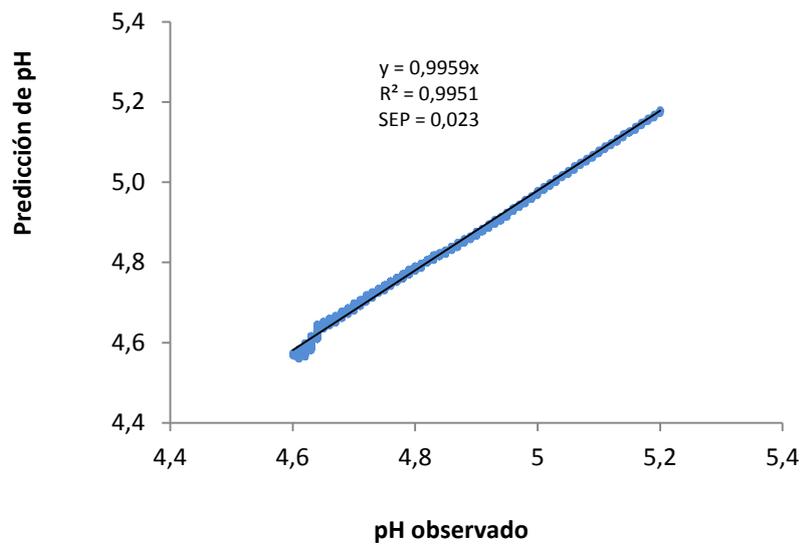


**Figura 9.11** Evolución de R y pH durante la fermentación del yogur. Los datos corresponden a un ensayo con 0,4% de grasa y sin inulina.

Considerando estos aspectos se logró desarrollar un modelo matemático que correlaciona  $R$  con pH, mediante el cual el sensor de dispersión de luz NIR a 880 nm podría utilizarse para la monitorización en línea de la acidificación del yogur, prescindiendo del uso de electrodos de pH.

Este hallazgo constituye uno de los principales aportes de esta tesis, pero no es posible ampliar la descripción debido a que actualmente se está tramitando una solicitud de patente para proteger el uso industrial potencial de los resultados obtenidos.

En la Figura 9.12 se presenta el ajuste del modelo desarrollado a los datos de un ensayo elegido de forma aleatoria. Nótese que el ajuste del modelo a los datos reales tuvo un  $R^2$  de 0,995 y un SEP de 0,0023 unidades de pH.



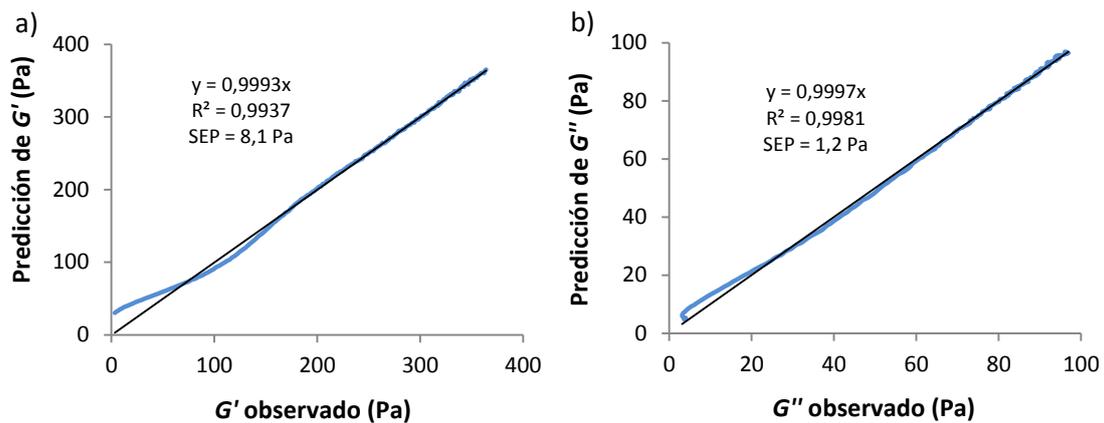
**Figura 9.12** Ajuste del modelo para la predicción del pH a los datos del ensayo con 3,6% de grasa y 1,6% de inulina. N = 2024.  $R^2$ , coeficiente de determinación (corregido para las medias); SEP, error estándar de predicción.

### 9.3.6 Aplicación del sensor óptico para la determinación de la firmeza y la tendencia al desuerado del yogur

A partir de un desarrollo conceptual previo que se encuentra actualmente en proceso para la obtención de una patente (Castillo y Arango, 2015), en el cual se estableció un método para determinar valores de firmeza de geles lácteos sin inulina a partir de medidas ópticas, se decidió buscar modelos matemáticos que permitieran predecir los valores de  $G'$  y  $G''$  del yogur en función de  $R$ .

En la Figura 9.13 se puede apreciar que el ajuste de ambos modelos tuvo una ligera desviación al inicio de la curva de endurecimiento, pero en el tramo final, que es el más importante, los modelos predijeron con bastante precisión los datos medidos. Al poder predecir los parámetros  $G'$  y  $G''$  también se conocería el valor de  $tg \delta$ , el cual se relaciona con la tendencia al desuerado, un parámetro de calidad muy importante en la elaboración del yogur.

El sensor óptico permitiría entonces monitorizar a tiempo real durante la incubación del yogur no solo el pH, sino además su viscoelasticidad, de tal manera que al alcanzar el pH final deseado se conocería la firmeza alcanzada y la tendencia al desuerado del producto.



**Figura 9.13** Ajuste de los modelos para la predicción de a)  $G'$  y b)  $G''$ , a los datos promedio de los ensayos con 3,6% de grasa y los tres niveles de inulina.  $N = 2024$ .  $R^2$ , coeficiente de determinación (corregido para las medias); SEP, error estándar de predicción.

## 9.4 Conclusiones

En este trabajo se estudió el efecto de sustituir grasa por inulina sobre la cinética de acidificación y las características de calidad de un yogur firme, evaluando al mismo tiempo la aplicabilidad de un sensor óptico para monitorizar el proceso de fermentación. El aumento en la concentración de grasa en la leche ocasionó una prolongación en el tiempo de acidificación hasta  $\text{pH} = 4,8$  y un retraso en el inicio de la coagulación, mientras que la adición de inulina tuvo un efecto opuesto al anterior, anticipando el inicio de la coagulación de la leche. La adición de inulina produjo un aumento del módulo elástico y la firmeza final de los yogures acercando sus valores a los obtenidos con leche entera, sin embargo aumentó la sinéresis espontánea en correspondencia con un incremento en el valor de  $\text{tg } \delta$ , mientras que no hubo efecto sobre la  $\text{CRA}$ . La presencia de dos máximos en la primera derivada del perfil de dispersión de luz ( $R$ ) permitió identificar que el proceso de coagulación del yogur, en las condiciones de este estudio, se desarrolló en dos etapas. La primera consiste en la formación de una red proteica preliminar a  $\text{pH} \sim 5,4$  constituida por agregados de partículas desnaturalizadas del suero que se unen también a las micelas de caseína. En la segunda etapa se produce la agregación de las micelas de caseína debido a la disminución de la carga negativa neta y el aumento de la atracción electrostática, momento a partir del cual se inicia el proceso de endurecimiento del gel. Se sugiere que el segundo máximo de la primera

derivada de  $R(t_{max2})$  puede usarse como un buen indicador del momento de inicio de la coagulación del yogur. El sensor óptico usado en este experimento permitió detectar algún tipo de cambio sucedido en las características de la leche UHT como consecuencia de un tiempo de almacenamiento prolongado, lo que abre nuevas posibilidades de aplicación para esta tecnología. Se desarrollaron modelos con los que se obtuvieron ajustes de predicción del pH ( $R^2 = 0,995$  y SEP = 0,023 unidades de pH), de  $G'$  ( $R^2 = 0,994$  y SEP = 8,1 Pa) y  $G''$  ( $R^2 = 0,998$  y SEP = 1,2 Pa) con base en medidas ópticas, lo que significa que el sensor de luz de infrarrojo cercano a 880 nm podría utilizarse como método alternativo a los electrodos de pH para la monitorización en línea del proceso de incubación del yogur, permitiendo conocer además la firmeza y la tendencia al desuerado del producto al momento de alcanzar el punto final de acidificación deseado. Lo anterior constituye un hallazgo de gran relevancia dada su aplicabilidad a nivel industrial.



## Capítulo 10

### Conclusiones finales

1. La monitorización mediante dispersión de luz de infrarrojo próximo en combinación con reología oscilatoria de baja amplitud (SAOR) permiten el estudio y la caracterización de la coagulación enzimática de geles lácteos con inulina como sustituto de grasa y la determinación de los efectos que sobre ella tienen otros factores como la temperatura, la concentración de proteína y la adición de calcio. En este sentido se estableció que:
  - ✓ El aumento en la temperatura de coagulación incrementa la velocidad de reacción en cada una de sus etapas, pero este efecto se ve atenuado por la adición de inulina. Una mayor temperatura durante la coagulación y el drenado del suero aumenta el suero expulsado y reduce el rendimiento de la cuajada
  - ✓ La adición de inulina acelera las fases de hidrólisis enzimática, agregación y endurecimiento, dependiendo este efecto no solo de la concentración de inulina, sino también de su interacción con la temperatura de coagulación, siendo mayor a temperatura más baja.
  - ✓ El aumento en la concentración de proteína incrementa la duración de la fase de hidrólisis enzimática, lo que podría atribuirse a la saturación de enzima por el sustrato, pero al mismo tiempo acelera la agregación y el endurecimiento del gel, ocasionando en consecuencia efectos variables sobre el tiempo de gelificación y una reducción en el tiempo de corte.

- ✓ La velocidad de las fases del proceso de coagulación aumenta con la concentración de calcio y este puede actuar como factor limitante del efecto de la proteína sobre la agregación y el endurecimiento.
- 2. La adición de inulina produce una disminución en la constante cinética de expulsión de suero y un aumento aparente en el rendimiento de la cuajada. Tanto en los geles de coagulación enzimática, como en los de coagulación ácida (yogur), la adición de inulina no tiene efecto sobre la capacidad de retención de agua (*CRA*), cuando ésta se calcula considerando el contenido inicial de humedad en la muestra. El efecto aparente de reducción en la cantidad de suero expulsado por el gel y de aumento en el rendimiento de la cuajada, se producen debido a un menor contenido de humedad en la muestra, cuando se añade inulina sin retirar una proporción equivalente de otro sólido lácteo. En el yogur la sinéresis espontánea aumenta con la concentración de inulina debido posiblemente a la formación de una microestructura con poros más grandes.
- 3. Utilizando como predictor el parámetro óptico  $t_{2min}$ , que corresponde al tiempo desde la adición de la enzima hasta el primer mínimo de la segunda derivada del ratio de dispersión de luz, se obtienen modelos que permiten la predicción en línea de los tiempos de gelificación y de corte en geles lácteos de coagulación enzimática con adición de inulina. En presencia de inulina, para obtener una buena predicción es necesario incluir la proteína en el modelo con un coeficiente de ajuste, cuando su concentración varía en un intervalo normal para leche de vaca (3,0 a 3,6%). Sin embargo, si varía en un intervalo más amplio (3,0 a 5,0%) es necesario además añadir al algoritmo un término cuadrático para la proteína. Cuando hay variación en la temperatura de coagulación, la inclusión de la interacción entre  $t_{2min}$  y la temperatura mejora el ajuste de los modelos de predicción.
- 4. Los parámetros ópticos obtenidos durante la coagulación no son buenos predictores para los índices de sinéresis, debido a que estos resultan fuertemente afectados por las variables que influyen en el proceso de coagulación, por lo que para la predicción de parámetros de sinéresis se requiere el uso de otro tipo de sensor óptico que se adapte mejor a las condiciones de esa etapa de proceso.

5. La adición de inulina a la leche para la elaboración de yogur acelera la acidificación hasta pH 4,8 y anticipa el inicio de la coagulación, mientras que el aumento en la concentración de grasa produce el efecto opuesto. Al añadir inulina a leche con contenido reducido de grasa se produce un aumento en el módulo elástico y en la firmeza final del yogur, acercando sus valores a los del yogur obtenido con leche entera.
6. El ratio de dispersión de luz de infrarrojo próximo ( $R$ ) evoluciona en función de los cambios que el descenso del pH va ocasionando en las características de la leche y que van conduciendo gradualmente a la coagulación de la misma. Por tal motivo, se pudo determinar que el segundo máximo de la primera derivada de  $R$  ( $t_{max2}$ ) constituye un indicador del momento de inicio de la coagulación del yogur y se obtuvieron modelos de predicción que permiten la monitorización en línea del pH a partir del inicio de la gelificación. Adicionalmente, dado que  $R$  se correlaciona con el proceso de endurecimiento del gel, también se encontraron modelos para conocer, en tiempo real, la evolución del módulo elástico ( $G'$ ), el módulo viscoso ( $G''$ ) y  $tg \delta$  del gel.
7. El sensor de dispersión de luz NIR a 880 nm permite detectar los efectos de la adición de inulina en geles lácteos enzimáticos bajos en grasa y, por tanto, constituye una herramienta que puede contribuir no solo al desarrollo de productos de este tipo con atributos de calidad homogéneos, sino también a la posterior monitorización y control de los procesos de elaboración de los mismos.
8. Con el sensor óptico de infrarrojo próximo es posible realizar la monitorización en línea del proceso de incubación del yogur, permitiendo no solo la determinación del punto final de la misma, sino además conocer la firmeza y la tendencia al desuerado del producto.



## Capítulo 11

### Referencias

Abdelgawad A. R., Guamis, B., Castillo, M. 2014. Using a fiber optic sensor for cutting time prediction in cheese manufacture from a mixture of cow, sheep and goat milk. *Journal of Food Engineering*, 125: 157–168.

Abd El-Gawad, M.A.M., Ahmed, N.S. 2011. Cheese yield as affected by some parameters review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 10(2): 131–153.

Afonso, I.M., Hes, L., Maia, J.M., Melo, L.F. 2003. Heat transfer and rheology of stirred yoghurt during cooling in plate heat exchanger. *Journal of Food Engineering*, 57: 179–187.

Alexander, M., Dalgleish, D.G. 2005. Interactions between denatured milk serum proteins and casein micelles studied by diffusing wave spectroscopy. *Langmuir* 21: 1380–1386.

Alexander, M., Dalgleish, D.G. 2004. Application of transmission diffusing wave spectroscopy to the study of gelation of milk by acidification and rennet. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 38: 83–90.

Alnemr, T.M., Abd El-Razek, A.M., Hasan, H.M.A., Massoud, M.I. 2013. Improving of Karish cheese by using enhanced technological texturizing inulin. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 58(2): 173-181.

American Dietetic Association (ADA). 2005. Position of the American Dietetic Association: Fat replacers. *Journal of the American Dietetic Association*, 105: 266–275.

Anema, S.G. 2008. Effect of milk solids concentration on the gels formed by the acidification of heated pH-adjusted skim milk. *Food Chemistry*, 108: 110–118.

Anema, S.G., Lee, S. K., Lowe, E. K., Klostermeyer, H. 2004. Rheological properties of acid gels prepared from heated pH-adjusted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 337–343.

- Anema, S.G., Li, Y. 2003. Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1640–1646.
- Anon. 2003. Dairy Processing Handbook, Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA., USA.
- Araújo, E.A., de Carvalho, A.F., Leandro, E.S., Furtado, M.M., de Moraes, C.A. 2010. Development of a symbiotic Cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin. *Journal of Functional Foods*, 2: 85–89.
- Aryana, K.J., Plauche, S., Rao, R.M., McGrew, P., Shah, P.H. 2007. Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, 72: M79–M84.
- Astrup, A. 2013. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(suppl): 1235S–1242S.
- Awad, S., Hassan, A.N., Muthukumarappan, K. 2005. Application of exopolysaccharide producing cultures in reduced-fat cheddar cheese: texture and melting properties. *Journal of Dairy Science*, 88: 4204–4213.
- Banks, J.M. 2004. The technology of low-fat cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 57: 199–207.
- Banks, J.M., Brechany, E., Christie, W.W. 1989. The production of low fat Cheddar type cheeses. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42: 6–9.
- Barclay, T., Ginic-Markovica, M., Cooper, P., Petrovsky, N. 2010. Inulin – a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1(3): 27–50.
- Barros, C.M., Ribeiro, A.C., Viotto, W. H. 2006. Impact of low concentration factor ultrafiltration on the composition and yield of reduced fat Prato cheese. *Desalination*, 200: 555–556.
- Beal, P., Mittal, G.S. 2000. Vibration and compression responses of Cheddar cheese at different fat content and age. *Milchwissenschaft*, 55:139–42.
- Benatar, J.R., Sidhu, K., Stewart, R.A.H. 2013. Effects of high and low fat dairy food on cardio-metabolic risk factors: a meta-analysis of randomized studies. *PLoS ONE*, 8(10): e76480. doi:10.1371/journal.pone.0076480.
- Biedrzycka, E., Bielecka, M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 170–175.

- Bittante, G., Penasa, M., Cecchinato, A. 2012. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 95: 6843–6870.
- Bot, A., Erle, U., Vreeker, R., Agterof, W. 2004. Influence of crystallisation conditions on the large deformation rheology of inulin gels. *Food Hydrocolloids*, 18: 547–556.
- Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J., Cabane, B. 2010. How to squeeze a sponge: casein micelles under osmotic stress, a SAXS study. *Biophysics Journal*, 99: 3754–3762.
- Brennan, C.S., Tudorica, C.M. 2008. Carbohydrate-based fat replacers in the modification of the rheological, textural and sensory quality of yoghurt: comparative study of the utilization of barley beta-glucan, guar gum and inulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 824–833.
- Brighenti, F. 2007. Dietary fructans and serum triacylglycerols: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Nutrition*, 11: S2552–S2556.
- Bringe, N.A., Kinsella, J.E. 1986. Influence of calcium chloride on the chymosin-initiated coagulation of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 53: 371–379.
- Calvo, M.M. 2002. Influence of fat, heat treatments and species on milk rennet clotting properties and glycomacropeptide formation. *European Food Research Technology*, 214: 182–185.
- Calvo, M.M., Balcones, E. 2000. Some factors influencing the syneresis of bovine, ovine, and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83: 1733–1739.
- Camire, M., Cho, S., Craig, S., Devrie, J., Gordon, D., Jones, J., Li, B., Lineback, D., Prosky, L., Tunland, B. 2001. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46: 112–126.
- Cani, P.D., Joly, E., Horsmans, Y., Delzenne, N.M. 2006. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60: 567–572.
- Canigova, M., Benczova, E., 2001. The microflora changes of raw milk during its refrigerated storage. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 4: 104–106.
- Cardarelli, H.R., Buriti, F.C.A., de Castro, I.A., Saad, S.M.I. 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic *Petit-suisse* cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 41: 1037–1046.
- Caron, A., Pouliot, Y., StGelais, D. 2001. Whey syneresis differs from curd made with ultrafiltered or microfiltered milk retentate powders. *Milchwissenschaft*, 56: 387–391.
- Cassandro, M., Comin, A., Ojala, M., Dal Zotto, R., De Marchi, M., Gallo, L., Carnier, P., Bittante, G. 2008. Genetic parameters of milk coagulation properties and their

relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 371–376.

Castillo, M., Arango, O. 2015. A method and a system for determining gel firmness values from inline optical measurements. International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT). World Intellectual Property Organization. International Publication Date: 8 January 2015. International Publication Number: WO 2015/000395 A1.

Castillo, M. 2006. Cutting time prediction methods in cheese making. In: Heldman, D., (Ed.) *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*. Vol. 1, pp. 1–7. Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Castillo, M., Payne, F.A., Wang, T., Lucey, J.A. 2006a. Effect of temperature and inoculum concentration on prediction of both gelation time and cutting time. *Cottage cheese-type gel*. *International Dairy Journal*, 16: 147–152.

Castillo, M., Lucey, J.A., Wang, T., Payne, F.A., 2006b. Effect of temperature and inoculum concentration on gel microstructure, permeability and syneresis kinetics cottage cheese type gels. *International Dairy Journal*, 16: 153–163.

Castillo, M., Payne, F.A., Shea, A. 2005a. Development of a combined sensor technology for monitoring coagulation and syneresis operations in cheese making. In: *Proceedings of ADSA Annual Meeting*, Cincinnati, Ohio, USA.

Castillo, M., González, R., Payne, F.A., Laencina, J., López, M.B. 2005b. Optical monitoring of milk coagulation and inline cutting time prediction in Murcian al Vino cheese. *Applied Engineering in Agriculture*, 21: 465–471.

Castillo, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., Laencina, J.S., Lopez, M.B. 2003a. Modeling casein aggregation and curd firming in goats' milk from backscatter of infrared light. *Journal of Dairy Research*, 70: 335–348.

Castillo, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., Laencina, J.S., López, M.B. 2003b. Effect of protein and temperature on cutting time prediction in goats' milk using an optical reflectance sensor. *Journal of Dairy Research*, 70: 205–215.

Castillo, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., Laencina, J., López, M.B. 2002. Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goats' milk using a light scattering sensor. *International Dairy Journal*, 12: 1019–1023.

Castillo, M. 2001. Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo. Tesis doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Universidad de Murcia, España.

Castillo, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., López, M.B. 2000. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 10: 551–562.

- Castillo, M., Jordán, M.J., Godoy, A., Laencina, J., López, M.B. 2000a. Kinetics of syneresis in fresh goat cheese. *Milchwissenschaft*, 55: 566–569.
- Chiavaro, E., Vittadini, E., Corradini, C. 2007. Physicochemical characterization and stability of inulin gels. *European Food Research and Technology*, 225: 85–94.
- Choi, J., Horne, D.S., Lucey, J.A. 2007. Effect of insoluble calcium concentration on rennet coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 2612–2623.
- Cipolat–Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., Penasa, M., Bittante, G. 2012. Comparison between mechanical and near–infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 95(11): 6806–6819.
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., Knight, R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148: 1258–1270.
- Coussement, P.A. 1999. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *Journal of Nutrition*, 129 (Suppl.), 1412S–1417S.
- Creamer, L.K., Matheson, A.R. 1980. Effect of heat treatment on the proteins of pasteurized skim milk, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15: 37–49.
- Crispín–Isidro, G., Lobato–Calleros, C., Espinosa–Andrews, H., Alvarez–Ramirez, J., Vernon–Carter, E.J. 2015. Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced–fat stirred yogurt. *LWT – Food Science and Technology*, 62(1): 438–444.
- Croguennec, T., O’Kennedy, B.T., Mehra, R. 2004. Heat induced denaturation/aggregation of  $\beta$ –lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14: 399–409.
- Cummings, J.H., Christie, S., Cole, T.J. 2001. A study of fructo oligosaccharides in the prevention of travellers’ diarrhoea. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 15, 1139–1145.
- Dabour, N., Kheadr, E., Benhamou, N., Fliss, I., LaPointe, G. 2006. Improvement of texture and structure of reduced–fat cheddar cheese by exopolysaccharide–producing lactococci. *Journal of Dairy Science*, 89: 95–110.
- Dalgleish, D.G., Corredig, M. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3: 449–67.
- Dalgleish, D.G. 2011. On the structural models of casein micelles: review and possible improvements. *Soft Matter*, 7: 2265–2272.
- Dalgleish, D., Alexander, M., Corredig, M. 2004. Studies of the acid gelation of milk using ultrasonic spectroscopy and diffusing wave spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 18: 747–755.

- Dalgleish, D.G. 1992. The enzymatic coagulation of milk. in: *Advanced Dairy Chemistry: 1. Proteins*, Fox, P.F. (Ed.). Elsevier Applied Science, London. pp. 579–619.
- Dalgleish, D.G., Horne, D.S., Law, A.J.R. 1989. Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 991: 383–387.
- Dalgleish, D. G. 1984. Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using laser doppler electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, 51: 425-438.
- Dalgleish, D.G. 1983. Coagulation of renneted bovine casein micelles: Dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 50: 331–340.
- Dalgleish, D.G. 1979. Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin. *Journal of Dairy Research*, 46: 653–661.
- Dal Zotto, R., De Marchi, M., Cecchinato, A., Penasa, M., Cassandro, M., Carnier, P., Gallo, L., Bittante, G. 2008. Reproducibility and repeatability of measures of milk coagulation properties and predictive ability of mid-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 91: 4103–4112.
- Damin, M.R., Alcântara, M.R., Nunes, A.P., Oliveira, M.N. 2009. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. *LWT – Food Science and Technology*, 42: 1744–1750.
- Daviau, C., Famelart, M.H., Pierre, A., Gougedranche, H., Maubois, J. L. 2000. Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Lait*, 397–415.
- Debon, J., Prudencio, E.S., Petrus, J.C. 2010. Rheological and physico-chemical characterization of probiotic microfiltered fermented milk. *Journal of Food Engineering*, 99: 128–135.
- de Brabandere, A., de Baerdemaeker, J. 1999. Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of Food Engineering*, 41: 221–227.
- de Castro, F.P., Cunha, T.M., Barreto, P.L.M., Camboni, R.D., Prudêncio, E. 2009. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 62: 68–74.
- de Kruif, C.G. 2014. The structure of casein micelles: a review of small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*, 47: 1479–1489.
- de Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S., Petukhov, A.V. 2012. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171–172: 36–52.

- de Kruif, C.G., Holt, C. 2003. Casein micelle structure, function and interactions. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. eds. *Advanced Dairy Chemistry-1. Proteins*. New York: Kluwer Academic/Plenum Press. pp. 233 – 276.
- de Kruif, C.G. 1999. Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9: 183-188.
- de Kruif, C.G. 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *Journal of Dairy Science*, 81: 3019–3028.
- de Kruif, C.G. 1992. Casein micelles: diffusivity as a function of renneting time. *Langmuir*, 8: 2932–2937.
- de Marchi, M., Fagan, C.C., O'Donnell, C.P., Cecchinato, A., Dal Zotto, R., Cassandro, M., Penasa, M., Bittante, G. 2009. Prediction of coagulation properties, titratable acidity, and pH of bovine milk using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 92: 423–432.
- Delacroix-Buchet, A., Lefier, D., Nuits-Petit, V. 1993. Polymorphisme de la caséine  $\kappa$  de trois races bovines francaises et aptitude a la coagulation. *Lait*, 7: 61–72.
- Dejmek P., Walstra P. 2004. The syneresis of rennet-coagulated curd. In: P. F. Fox (Ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3 ed. vol 1, pp. 71–101.
- Dewettincka, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Trung, T.L., Messens, K., Van Camp, J. 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18: 436–457.
- Dickinson, E. 1992. *An Introduction to Food Colloids*, Ed. Oxford University Press, Oxford. 216 p.
- Donato, L., Dalgleish, D.G. 2006. Effect of the pH of heating on the qualitative and quantitative compositions of the sera of reconstituted skim milks and on the mechanisms of formation of soluble aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7804–7811.
- Donato, L., Alexander, M., Dalgleish, D. 2007a. Acid Gelation in heated and unheated milks: Interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4160–4168.
- Donato, L., Guyomarc'h, F., Amiot, S., Dalgleish, D.G. 2007b. The mechanism of interaction of  $\kappa$ -casein and whey protein in heated milks. *International Dairy Journal*, 17:1161–1167.
- Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2007. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17 (6): 657–665.
- Douillard, R. 1973. Rheological analysis of curd formation. *Journal of Texture Studies*, 4: 158–165.

- Dubert–Ferrandon, A., Niranjana, K., Grandison, A.S. 2006. A novel technique for differentiation of proteins in the development of acid gel structure from control and heat treated milk using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Research*, 73: 423–430.
- Dumais, R., Blais, J.A. Conrad, F. 1991. Queso. En: *Ciencia y Tecnología de la Leche*, Amiot, J., (Ed.). Acribia, S. A., Zaragoza, pp. 249–296.
- El Khoury, D., Cuda, C., Luhovyy, B.L., Anderson, G.H. 2012. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 28. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/851362>.
- Englyst, H., Hudson, G. 1996. The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry*, 57: 15–21.
- Erdem, Y.K. 1997. The effect of calcium chloride concentration and pH on the clotting time during the renneting of milk. *Gida*, 22(6): 449–455.
- European Parliament. 2006. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European parliament and of the council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Union*, 404: 9–25.
- Everard, C.D., O'Callaghan, D.J., Mateo, M.J., O'Donnell, C.P., Castillo, M., Payne, F. A. 2008. Effects of cutting intensity and stirring speed on syneresis and curd losses during cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 91: 2575–2582.
- Everett, D.W., Auty, M.A. E. 2008. Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18: 759–73.
- Fagan, C.C., Castillo, M., O'Donnell, C.P., O'Callaghan, D.J., Payne, F.A. 2008. On-line prediction of cheese making indices using backscatter of near infrared light. *International Dairy Journal*, 18: 120–128.
- Fagan, C.C., Leedy, M., Castillo, M., Payne, F.A., O'Donnell, C.P., O'Callaghan, D.J. 2007a. Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *Journal of Food Engineering*, 83: 61–67.
- Fagan, C. C., Castillo, M., Payne, F. A., O'Donnell, C. P., O'Callaghan, D. J. 2007b. 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: 4499–4512.
- Fagan, C.C., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., Brennen, C.S., 2006. The effect of dietary fiber inclusion on milk coagulation kinetics. *Journal of Food Engineering*, 77: 261–268.
- Famelart, M.H., Le Graet, Y., Raulot, K. 1999. Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl<sub>2</sub>: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. *International Dairy Journal*, 9: 293–297.

- Farrell, H.M.Jr., Malin, E.L., Brown, E.M., Qi, P. X. 2006. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11: 135–47.
- FDA. 2008. 21 CFR, Part 101.62. Nutrient content claims for fat, fatty acid, and cholesterol content of foods. Washington, DC: Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services.
- Fenelon, M.A., Guinee, T.P. 1999. The effect of milk fat on Cheddar cheese yield and its prediction, using modifications of the Van Slyke cheese yield formula. *Journal of Dairy Science*, 82: 2287–2299.
- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., Roberfroid, M. 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41: 353–362.
- Foltmann, B. 1959. On the enzymatic and the coagulation stages of the renneting process. *Proceedings of 15<sup>th</sup> International Dairy Congress*, London 2: 655–661.
- Fox, P.F. Cheese overview. 2011. In: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences 2<sup>nd</sup> Edition*, Four-Volume set, 534–543.
- Fox, P.F., Brodtkorb, A. 2008. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18: 677–84.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. 2004. Cheese: an overview. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1 General Aspects, 3<sup>th</sup> edition. Elsevier Academic Press. 1 – 18.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen, Gaithersburg; MD. 588 p.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic and Professional Publishers, London, 478 p.
- Fox, P.F., Mulvihill, D.M. 1990. Casein. In: Harris, P. (Ed.). *Food Gels*. Elsevier Science Publishers, London. 121–173.
- Franck, A. 2006. Inulin. In: Stephen A. (Ed.). *Food Polysaccharides and Their Applications*. 2<sup>nd</sup>. New York, USA: Marcel Dekker; 733 p.
- Franck, A., de Leenheer, L. 2005. Inulin. *Biopolymers online*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Franck, A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(Suppl. 2), S287–S291.
- Frederiksen, P.D., Andersen, K.K., Hammershøj, M., Poulsen, H.D., Sørensen, J., Bakman, M., Qvist, K.B., Larsen, L.B. 2011. Composition and effect of blending of

noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 4787–4799.

Gibson, G.R., Probert, H.M., van Loo, J., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17:259–275.

Gidding, S.S., Lichtenstein, A.H., Faith, M.S., Karpyn, A., Mennella, J.A., Popkin, B., Rowe, J., Van Horn, L., Whitsel, L. 2009. Implementing American Heart Association pediatric and adult nutrition guidelines: a scientific statement from the American heart association nutrition committee of the council on nutrition, physical activity and metabolism, council on cardiovascular disease in the young, council on arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, council on cardiovascular nursing, council on epidemiology and prevention, and council for high blood pressure research. *Circulation* 119: 1161–1175.

Gijs, L., Piraprez, G., Perete, P., Spinnler, S., Collin, S. 2000. Retention of sulphur flavours by food matrix and determination of sensorial data dependant of the medium composition. *Food Chemistry*, 69: 319–330.

Giroux, H.J., Bouchard, C., Britten, M. 2014. Combined effect of renneting pH, cooking temperature, and dry salting on the contraction kinetics of rennet-induced milk gels. *International Dairy Journal*, 35: 70–74.

Glantz, M., Devold, T.G., Vegarud, G.E., Lindmark Månsson, H., Stålhammar, H., Paulsson, M. 2010. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *Journal of Dairy Science*, 93: 1444–1451.

Glibouski, P., Pikus, S. 2011. Amorphous and crystal inulin behavior in a water environment. *Carbohydrate Polymers*, 83: 635–639.

Glibowski, P., Bukowska, A. 2011. The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stability. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 10(2): 189–196.

Glibowski, P. 2010. Effect of thermal and mechanical factors on rheological properties of high performance inulin gels and spreads. *Journal of Food Engineering*, 99: 106–113.

Glibowski, P. 2009. Rheological properties and structure of inulin—whey protein gels. *International Dairy Journal*, 19: 443–449.

Glibowski, P., Wasko, A. 2008. Effect of thermochemical treatment on the structure of inulin and its gelling properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 2075–2082.

Green, M.L., Hobbs, D.G., Morant, S.V., Hill, V.A. 1978. Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk II. Process of gel assembly. *Journal of Dairy Research*, 45: 413–422.

- Grundelius, A.U., Lodaite, K., Ostergren, K., Paulsson, M., Dejmek, P. 2000. Syneresis of submerged single curd grains and curd rheology. *International Dairy Journal*, 10: 489–496.
- Grundy, S.M. 2008. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 28: 629–636.
- Guggisberg, D., Cuthbert–Steven, J., Piccinah, P., Buetikofer, U., Eberhard, P. 2009. Rheological, microstructural and sensory characterization of low–fat and whole milk set yogurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal*, 19: 107–115.
- Guinee, T.P., Sutherland, B.J. 2011. Salting cheese. In: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2<sup>nd</sup> Edition, Four–Volume set, 595–606.
- Guinee, T.P., McSweeney, P.L. 2006. Significance of milk fat in cheese. In Fox, P.F. and McSweeney, P.L. (Eds.): *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 2: Lipids*. Springer, NY. pp. 377–440.
- Guinee, T.P., Fenelon, M.A., Mulholland, E.O., O’Kennedy, B.T., O’Brien, N., Reville, W.J. 1998. The influence of milk pasteurization temperature and pH at curd milling on the composition, texture and maturation of reduced fat Cheddar cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 50: 510–511.
- Guinee, T.P., Gorry, C., O’callaghan, D., O’kennedy, B., O’brien, N., Fenelon, A. 1997. The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 50: 99–106.
- Guinee, T.P., O’Callaghan, D.J., Pudja, P.D., O’Brien, N. 1996. Rennet coagulation properties of retentates obtained by ultrafiltration of skim milks heated to different temperatures. *International Dairy Journal*, 6: 581–596.
- Gün, Ö, Develi, N. 2007. Effect of fat and non–fat dry matter of milk, and starter type, on the rheological properties of set during the coagulation process. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 352–358.
- Guven, M., Yasar, K., Karaca, O.B., Hayaloglu, A.A. 2005. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set–type low–fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 58(3): 180–184.
- Guyomarc’h, F., Queguiner, C., Law, A.J.R., Horne, D., Dalgleish, D.G. 2003. Role of the soluble and micelle–bound heat–induced protein aggregates on network formation in acid skim milk gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7743–7750.
- Hallén, E., Lundén, A., Allmere, T., Andrén, A. 2010a. Casein retention in curd and loss of casein into whey at chymosin–induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, 77: 71–76.
- Hallén, E., Lundén, A., Tyrisevä, A.M., Westerlind, M., Andrén, A. 2010b. Composition of poorly and non–coagulating bovine milk and effect of calcium addition. *Journal of Dairy Research*, 77: 398–403.

- Hallén, H. 2008. Coagulation Properties of Milk Association with Milk Protein Composition and Genetic Polymorphism. Doctoral Thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Hassan, A.N., Awad, S. 2005. Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced fat cheddar cheese: cryo-scanning electron microscopy observations. *Journal of Dairy Science*, 88: 4214–4220.
- Hébette, C.L.M., Delcour, J.A., Koch, M.H.J., Booten, K., Kleppinger, R., Mischenkod, N. 1998. Complex melting of semi-crystalline chicory (*Cichorium intybus* L.) root inulin. *Carbohydrate Research*, 310: 65–75.
- Hemar, Y., Singh, H., Horne, D.S. 2004. Determination of early stages of rennet induced aggregation of casein micelles by diffusing wave spectroscopy and rheological measurements. *Current Applied Physics*, 4: 362–365.
- Hennelly, P.J., Dunne, P.G., O’sullivan, M., O’Riordan, E.D. 2006. Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. *Journal of Food Engineering*, 75: 388–395.
- Holt, C., Horne, D.S. 1996. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50: 85–111.
- Holt, C. 1995. The biological function of casein micelles?. *HRI Year-book 1994*, pp. 60–69, Hannah Research Institute, Ayr.
- Horne, D.S. 2008. Casein micelle structure and stability. In: *Milk Proteins: From Expression to Food*. Thompson, A., Boland, M., Singh, H. (Ed.). pp. 133–62. New York: Academic.
- Horne, D.S. 2006. Casein micelle structure: models and muddles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11: 148–53.
- Horne, D.S., Banks, J.M. 2004. Rennet-induced Coagulation of Milk. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1 General Aspects*, 3<sup>th</sup> edition. Elsevier Academic Press.
- Horne, D.S. 1998. Casein interaction – casting light on the Black Boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8: 171–177.
- Humme, H.E. 1972. The optimum pH for the limited specific proteolysis of  $\kappa$ -casein by rennin (primary phase of milk clotting). *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 26: 180–185.
- Hussain, I., Bell, A.E., Grandison, A.S. 2011. Comparison of the rheology of mozzarella-type curd made from buffalo and cows’ milk. *Food Chemistry*, 128: 500–504.

- Hyldig, G. 1993. Rennet coagulation. Effect of technological parameters on the enzymatic reaction and gel formation in milk and UF concentrates. Doctoral Thesis. Thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- IDF. 2007. Determination of the total milk clotting activity of bovine rennets. International IDF Standard 157. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.
- IDF. 2002. Milk and milk products. Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to the Dumas principle. IDF Standard 185. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.
- IDF. 1987. Milk, cream and evaporated milk. Determination of total solids content. IDF Standard 21B: 1987. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.
- Ikonen, T., Morri, S., Tyrisevä, A.M., Ruottinen, O., Ojala, M. 2004. Genetic and phenotypic correlations between milk coagulation properties, milk production traits, somatic cell count, casein content, and pH of milk. *Journal of Dairy Science*, 87: 458–467.
- Ipsen, R.H., Otte, J., Lozahic, G., Qvist, K.B. 2001. Microstructure and viscosity of yoghurt with inulin added as a fat-replacer. *Annual transactions of the Nordic Rheology Society*. 9: 59–62.
- Jakob, M., Jaros, D., Rohm, H. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64: 14–33.
- Jaros, D., Seitler, K., Rohm, H. 2008. Enzymatic coagulation of milk: animal rennets and microbial coagulants differ in their gelation behaviour as affected by pH and temperature. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 1721–1727.
- Jeurnink, T.J.M., de Kruif, C.G. 1993. Changes in milk on heating: viscosity measurements. *Journal of Dairy Research*, 60: 139–150.
- Jiménez–Glores, R., Brisson, G. 2008. The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when? *Dairy Science and Technology*, 88: 5–18.
- Johnson, M.E. 2011. Preparation of cheese milk. In: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2<sup>nd</sup> ed. Four–Volume set, 544–551.
- Johnson, M.E., Kapoor, R., McMahon, D.J., McCoy, D.R., Narasimmon, R.G. 2009. Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: scientific and technological aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8: 252–268.
- Johnson, M.E., Chen, C.M., Jaeggi, J.J. 2001. Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced–fat cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 84: 1027–1033.

Johnson, M.E., Steele, J.L., Broadbent, J., Weimer, B.C. 1998. Manufacture of Gouda and flavour development in reduced fat cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2: 67–69.

Johnson, M.E., Chen, C.M. 1995. Technology of manufacturing reduced fat cheddar cheese. In Malin, E.L. and Tunick, M.H., (Eds.). *Chemistry of Structure–Function Relationships in Cheese*, pp 331–338. New York: Plenum Press.

Johnston, D.E., Murphy, R.J., 1984. Effects of fat content on properties of rennet–induced milk–gels. *Milchwissenschaft*, 39: 585–587.

Joshi, N.S., Muthukumarappan, K., Dave, R.I. 2004a. Effects of reduced–calcium, test temperature and storage on stretchability of part–skim mozzarella cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59: 60–5.

Joshi, N.S., Muthukumarappan, K., Dave, R.I. 2004b. Viscoelastic properties of part–skim mozzarella cheese: effect of calcium, storage, and test temperature. *International Journal of Food Properties*, 7: 239–52.

Jõudu, I., Henno, M., Kaart, T., Püssa, T., Kärt, O. 2008. The effect of milk proteins contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal*, 18: 964–967.

Juan, B., Zamora, A., Quintana, F., Guamis, B., Trujillo, A.J. 2013. Effect of inulin addition on the sensorial properties of reduced–fat fresh cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 66(4): 478–483.

Karaman, A.D., Akalın, A.S. 2013. Improving quality characteristics of reduced and low fat Turkish white cheeses using homogenized cream. *LWT – Food Science and Technology*, 50: 503–510.

Karlsson, A.O., Ipsen, R., Ardo, Y. 2007. Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal*, 17: 674–682.

Kaytanli, M., Erdem, Y.K., Tamer, I.M. 1993. Factors affecting whey drainage rate of renneted skim milk gels: A kinetic approach. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 21: 185–191.

Keceli, T., Sahan, N., Yasar, K. 2006. The effect of pre–acidification with citric acid on reduced–fat Kashar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61: 32–6.

Kelly, A.L., Huppertz, T., Sheehan, J.J. 2008. Pre–treatment of cheese milk: principles and developments. *Dairy Science and Technology*, 88: 549–572.

Kethireddipalli, P., Hill, A.R., Dalgleish, D.G. 2011. Interaction between casein micelles and whey protein/ $\kappa$ –casein complexes during renneting of heat–treated reconstituted skim milk powder and casein micelle/serum mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 1442–1448.

- 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: 1151–1160.
- Kim, Y., Faqih, M.N., Wang, S.S. 2001. Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 46: 135–145.
- Kip, P., Meyer, D., Jellema, R.H. 2006. Inulins improve sensoric and textural properties of low–fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 16: 1098–1103.
- Koca, N., Metin, M. 2004. Textural, melting and sensory properties of low–fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14: 365–373.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003. Yogurt from UHT milk: a review. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58: 26–29.
- Kratz, M., Baars, T., Guyenet, S. 2013. The relationship between high–fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *European Journal of Nutrition*, 52: 1–24.
- Krystallis, A., Chrysochou, P. 2011. Health claims as communication tools that enhance brand loyalty: The case of low-fat claims within the dairy food category. *Journal of Marketing Communications*, 17(3): 213–228.
- Kübarssepp, I., Henno, M., Kart, O., Tupasela, T., 2005. A comparison of the methods for determination of the rennet coagulation properties of milk. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A*, 55: 145–148.
- Lagoueyte, N., Lablee, J., Lagaude, A., Tarodo de la Fuente, B. 1994. Temperature affects microstructure of renneted milk gel. *Journal of Food Science*, 59: 956–959.
- Landfeld, A., Novotna, P., Houska, M. 2002. Influence of the amount of rennet, calcium chloride addition, temperature, and high–pressure treatment on the course of milk coagulation. *Czech Journal of Food Science*, 20: 237–244.
- Lashkari, H., Khosrowshahi, A., Madadlou, A., Alizadeh, M. 2014. Chemical composition and rheology of low–fat Iranian white cheese incorporated with guar gum and gum arabic as fat replacers. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10): 2584–2591.
- Lawrence, R. C., 1993. Processing conditions. In: Emmons, D.B. (Ed.). *Factors affecting the yield of cheese*. International Dairy Federation, Brussels, pp. 64–78.
- Le Graët, Y., Gaucheron, F. 1999. pH–induced solubilization of minerals from casein micelles: influence of casein concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 66: 215–224.

- Le, T.T., van Camp, J., Anthony, P., Pascual, L., Meesen, G., Thienpont, N., Messens, K., Dewettinck, K. 2011. Physical properties and microstructure of yoghurt enriched with milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 21: 798–805.
- Lee, W.J., Lucey J.A. 2010. Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian–Aust. Journal of Animal Science*, 23: 1127–1136.
- Lee, W., Lucey, J.A. 2004. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. *Journal of Dairy Science*, 87: 3153–3164.
- Lee, W., Lucey, J.A. 2003. Rheological properties, whey separation and microstructure in set–style yoghurt: effects of heating temperature and gelation temperature. *Journal of Texture Studies*, 34: 515–536.
- Lehninger, A. L. 1987. *Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*, Ed. Omega, S. A., Barcelona.
- Li, J., Dalgleish, D.G. 2006. Mixed coagulation of milk: gel formation and mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4687–4695
- Lim, J., Ingletti, G.E., Lee, S. 2010. Response to Consumer Demand for Reduced–Fat Foods; Multi–Functional Fat Replacers. *Japan Journal of Food Engineering*, 11(4): 163–168.
- Little, E.M., Holt, C. 2004. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides. *European Biophysics Journal*, 33: 435–47.
- Liu, X.T., Zhang, H., Wang, F., Luo, J., Guo, H.Y, Ren, F.Z. 2014. Rheological and structural properties of differently acidified and renneted milk gels. *Journal of Dairy Science*, 97: 3292–3299.
- Logan, A., Day, L., Pin, A., Auld, M., Leis, A., Puvanenthiran, A., Augustin, M. 2014. Interactive effects of milk fat globule and casein micelle size on the renneting properties of milk. *Food and Bioprocess Technology*, 7: 3175–3185.
- Lomax, A., Calder, P.C. 2009. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *British Journal of Nutrition*, 101: 633–658.
- Lomholt, S.B. 1996. The kinetics of the aggregation of casein micelles by rennet. Doctoral Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- López, M.B., Jordán, M.J., Hellín, P., Castillo, M. Laencina, J. 1997a. Kinetics of  $\kappa$ -casein hydrolysis by different rennet and coagulant enzymes in murcianogranadina goat milk. *Milchwissenschaft*, 52(7): 370–373.
- López, M.B., Jordan, M.J., Luna, A., Banon, S., Garrido, M.D., Laencina, J., 1997b. Diffuse reflectance profiles of goat's milk during coagulation by various enzymes. *Food Science and Technology International*, 3: 299–301.

- López, M.B. 1993. Cuajos y enzimas coagulantes en la elaboración de queso de cabra en la región de Murcia. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.
- Lucey, J.A. 2011a. Renned-induced coagulation of milk. In: Fuquay, J. (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2<sup>nd</sup> Edition, Four-Volume set, 579–584.
- Lucey, J.A. 2011b. Curd syneresis. In: Fuquay, J. (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2<sup>nd</sup> Edition, Four-Volume set, 591–594.
- Lucey, J.A. Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. 2004. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1 General Aspects*, 3<sup>th</sup> edition. Elsevier Academic Press.
- Lucey, J.A. 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2): 281–294.
- Lucey, J.A., Munro, P.A., Singh, H. 1998a. Whey separation in acid skim milk gels made with glucono- $\delta$ -lactone: Effects of heat treatment and gelation temperature. *Journal of Texture Studies*, 29: 413–426.
- Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Munro, P. A. 1998b. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65: 555–567.
- Lucey, J.A., Munro, P. A., Singh, H. 1998c. Rheological properties and microstructure of acid milk gels as affected by fat content and heat treatment. *Journal of Food Science*, 63: 660–664.
- Lucey, J.A., van Vliet, T., Grolle, K., Geurts, T., Walstra, P. 1997a. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono-d-lactone. Syneresis, permeability and microstructural properties. *International Dairy Journal*, 7: 389–397.
- Lucey, J.A., Teo, C.T., Munro, P.A., Singh, H. 1997b. Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research*, 64: 591–600.
- Lucey, J.A., Fox, P.F. 1993. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *Journal of Dairy Science*, 76: 1714–1724.
- Lucisano, M., Peri, C., Donati, E. 1985. Studies on the coagulation of milk ultrafiltration retentates. 1. Coagulation kinetics. *Milchwissenschaft*, 40(10): 600–604.
- Lunardello, K.A., Yamashita, F., De Toledo, B.M., De Rensis, C.M. 2012. The physicochemical characteristics of nonfat set yoghurt containing some hydrocolloids. *International Journal of Dairy Technology*, 65(2): 260–267.
- McMahon, D., Oomen, B.S. 2008. Supramolecular structure of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 91: 1709–1721.

- McMahon, D.J., Alleyne, M.C., Fife, R.L., Oberg, C.J. 1996. Use of fat replacers in low-fat mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 79: 1911–21.
- Mallappa, R.H., Rokana, N., Duary, R.K., Panwar, H., Batish, V.K., Grover, S. 2012. Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian Journal of Endocrinology Metabolism*, 16(1): 20–27.
- Mahdian, Elham, Mazaheri, T.M. 2007. Evaluation the effect of milk total solids on the relationship between growth and activity of starter cultures and quality of concentrated yoghurt. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 2 (5): 587–592.
- Marchin, S., Putaux, J-L., Pignon, F., Léonil, J. 2007. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small angle X-ray scattering/ultrasmall angle X-ray scattering. *Journal of Chemical Physics*, 126: 045–101.
- Marshall, R. J. 1982. An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *Journal of Dairy Research*, 49: 329–336.
- Martin, B., Chamba, J.F., Coulon, J.B., Perreard, E. 1997. Effect of milk chemical composition and clotting characteristics on chemical and sensory properties of Reblochon de Savoie cheese. *Journal of Dairy Research*, 64: 157–162.
- Mateo, M.J., O'Callaghan, D.J., Everard, C.D., Fagan, C.C., O'Donnell, C.P., Castillo, M., Payne, F.A. 2009a. Effect of milk fat concentration and gel firmness on syneresis during cheeses-making. *International Dairy Journal*, 19: 264–268.
- Mateo, M.J., O'Callaghan, D.J., Everard, C.D., Castillo, M., Payne, F.A., O'Donnell, C. P. 2009b. Evaluation of online optical sensing techniques for monitoring curd moisture content and solids in whey during syneresis. *Food Research International*, 43: 177–182.
- Mateo, M.J., O'Callaghan, D.J., Everard, C.D., Castillo, M., Payne, F.A., O'Donnell, C. P. 2009c. Validation of a curd-syneresis sensor over a range of milk composition and process parameters. *Journal of Dairy Science*, 92: 5386–5395.
- Mayes, J. J., Sutherland, B. J., 1989. Further notes on coagulum firmness and yield in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*, 44: 47–48.
- McMahon, D.J., Brown, R.J. 1982. Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. *Journal of Dairy Science*, 65: 1639–1642.
- McMahon, D.J., Richardson, G.H., Brown, R.J. 1984. Enzymatic milk coagulation: Role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *Journal of Dairy Science*, 67: 1185–1193.
- Mehaia, M.A., Cheryan, M. 1983. The secondary phase of milk coagulation: Effect of calcium, pH and temperature on clotting activity. *Milchwissenschaft*, 38: 137–140.

- Mellema, M., Walstra, P., van Opheusden, J.H.J., van Vliet, T. 2002. Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98: 25–50.
- Mellema, M. 2000. Scaling relations between structure and rheology of ageing casein particle gels. Doctoral thesis. Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Mellema, M., Leermakers, F.A.M., Kruif, C.G. 1999. Molecular mechanism of the renneting process of casein micelles in skim milk, examined by viscosity and light-scattering experiments and simulated by model SCF calculations. *Langmuir*, 15(19): 6304–6313.
- Metzger, L.E, Barbano, D.M., Rudan, M.A., Kindstedt, P.S. 2000. Effect of milk preacidification on low-fat mozzarella cheese. I. Composition and yield. *Journal of Dairy Science*, 83: 648–58.
- Meyer, D., Bayarri, S., Tárrega, A., Costell, E. 2011. Inulin as texture modifier in dairy products, *Food Hydrocolloids*, 25(8): 1881–1890.
- Meyer, D., Blaauwhoed, J.P. 2009. Inulin. In: Phillips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), *Handbook of hydrocolloids*, 2nd ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing and CRC Press, pp. 829–848.
- Meyer, D., Stasse-Wolthuis, M. 2009. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63: 1277–1289.
- Meyer, D., Stasse-Wolthuis, M. 2006. Inulin and bone health. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 4: 211–226.
- Miočinović, J., Puđa, P., Radulović, Z., Pavlović, V., Miloradović, Z., Radovanović, M., Paunović, D. 2011. Development of low fat UF cheese technology. *Mljekarstvo*, 61(1): 33–44.
- Mishra, R., Golvindasamy-Lucey, S., Lucey, J.A. 2005. Rheological properties of rennet-induced gels during the coagulation and cutting process: impact of processing conditions. *Journal of Texture Studies*, 36: 190–212.
- Mistry, V. V. 2001. Low fat cheese technology. *International Dairy Journal*, 11: 413–422.
- Modzelewska-Kapitula, M., Klebukowska, L. 2009. Investigation of the potential for using inulin HPX as a fat replacer in yoghurt production. *International Journal of Dairy Technology*, 62: 209–214.
- Nair, K.K., Kharb, S., Thompkinson D.K. 2010. Inulin dietary fiber with functional and health attributes. A review. *Food Reviews International*, 26: 189–203.
- Nateghi, L., Roohinejad, S., Totosaus, A., Mirhosseini, H., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., Omidizadeh, A., Abd Manap, M. Y. 2012. Optimization of textural

properties and formulation of reduced fat Cheddar cheeses containing fat replacers. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10(2): 46–54.

Nicolau, N., Castillo, M., Buffa, M., O’Callaghan, D. J., Guamis, B. 2011. Light scatter estimation of clotting and cutting time in sheep cheese manufacture. *International Conference on Engineering and Food, ICEF 11*. Athens, Greece.

Niness, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? 1999. *Journal of Nutrition*, 129: S1402–S1406.

Nonglass–ph–electrode. Disponible en: <http://www.all–about–ph.com/nonglass–ph–electrode>. Consultado en 4 de junio de 2015.

Nornberg, M.F., Friedrich, R.S., Weiss, R.D., Tondo, E.C., Brandelli, A., 2010. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1): 41–46.

O’Callaghan, D.J., O’Donnell, C.P., Payne, F.A. 2002. Review of systems for monitoring curd setting during cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology*, 55: 65–74.

Oliveira, R.P.S., Perego, P., Nogueira, M.N., Converti, A., 2011a. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. *LWT–Food Science and Technology*, 44 (2): 520–523.

Oliveira, R.P.S., Perego, P., Nogueira, M.N., Converti, A., 2011b. Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering*, 107: 36–40.

Oliveira, R.P.S., Peregro, P., Converti, A., Nogueira, M.N. 2009. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co–culture with *Streptococcus thermophilus*: the effect of inulin. *LWT – Food Science and Technology*, 42: 1015–1021.

Ong, L., Dagastine, R.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. 2010. The effect of milk processing on the microstructure of the milk fat globule and rennet induced gel observed using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Food Science*, 75, 135–145.

Pais, V.F., Veríssimo, M.I.S., Oliveira, J.A.B., Gomes, M.T. 2015. Using acoustic wave sensors to follow milk coagulation and to separate the cheeses according to the milk origin. *Sensors and Actuators, B* 207: 1121–1128.

Pagliarini, E., Beatrice, N. 1994. Sensory and rheological properties of low–fat “pasta filata” cheese. *Journal of Dairy Research*, 61: 299–304.

Parnell, J.A., Reimer, R. A. 2009. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in over–weight and obese adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89: 1751–1759.

- Pasephol, T., Small, D.M., Sherkat, F. 2008. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. *Journal of Texture Studies*, 39: 617–634.
- 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., Castillo, M. 2007. Light backscatter sensor applications in milk coagulation. In: Heldman, D. (Ed). *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*. Vol. 1, Edition 1. Taylor & Francis Group, Boca Raton. pp. 1–5.
- Payne, F.A., Hicks, C.L., Shen, P.S. 1993. Predicting optimal cutting time of coagulating milk using diffuse reflectance. *Journal of Dairy Science*, 76: 48–61.
- Pearse, M.J., Mackinlay, A.G., 1989. Biochemical aspects of syneresis: a review. *Journal of Dairy Science*, 72: 1401–1407.
- Peng, Y., Serra, M., Horne, D.S., Lucey, J. A. 2009. Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt. *Journal of Food Science*, 74(9): 666–673.
- Peri, C., Pagliarini, E., Iametti, S., Bonomi, F. 1990. A study of surface hydrophobicity of milk proteins during enzymic coagulation and curd hardening. *Journal of Dairy Research*, 57: 101–108.
- Peri, C., Lucisano, M., Donati, E. 1985. Studies on coagulation of milk ultrafiltration retentates II. Kinetics of whey syneresis. *Milchwissenschaft*, 40: 650–652.
- Perry, D., McMahon, D.J., Oberg, C.J. 1997. Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low-fat mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 80: 799–805.
- Perry, D., McMahon, D.J., Oberg, C.J. 1998. Manufacture of low-fat mozzarella cheese using exopolysaccharide-producing starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 81: 563–566.
- Pietro, A., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K., Paglienari, M., Caderni, G. 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 23: 1953–1960.
- Phillips, C.M., Dillon, C., Harrington, J.M., McCarthy, V.J.C., Kearney, P.M., Fitzgerald, A.P., Perry, I.J. 2013. Defining Metabolically Healthy Obesity: Role of dietary and lifestyle factors. *PLoS ONE*, 8(10): e76188. doi:10.1371/journal.pone.0076188.
- Pimenta, A.M., Toledo, E., Rodriguez-Diez, M.C., Gea, A., Lopez-Iracheta, R., Shivappa, N., Hébert, J.R., Martinez-Gonzalez, M.A. 2015. Dietary indexes, food

- patterns and incidence of metabolic syndrome in a Mediterranean cohort: The SUN project. *Clinical Nutrition*, 34: 508–514.
- Pinheiro, R., Pergo, P., Converti, A., Nogueira, M. 2009. The effect of inulin as a prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milk. *International Journal of Dairy Technology*, 62: 195–203.
- Pinheiro, M.V., Penna, A.L. 2004. Substitutos de gordura: tipos e aplicações em produtos lácteos. *Alimentos e Nutrição*, 15(2): 175–186.
- Powell, I.B., Broome, M.C., Limsowtin, G.K. Y. 2011. Starter Cultures: General Aspects. In: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2<sup>nd</sup> ed. Four-Volume set, 552–558.
- Pretto, D., Kaart, T., Vallas, M., Jõudu, I., Henno, M., Ancilotto, L., Cassandro, M., Pärna, E. 2011. Relationships between milk coagulation property traits analyzed with different methodologies. *Journal of Dairy Science*, 94: 4336–4346.
- Rao, A. 1999. Dose response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. *Journal of Nutrition*, 129: 1442–1445.
- Rashidi, H., Mazaheri-Tehrani, M., Razavi, S.M.A., Ghods-Rohany, M. 2015. Improving Textural and Sensory Characteristics of Low-Fat UF Feta Cheese Made with Fat Replacers. *Journal of Agricultural Science Technology*, 17: 121–132.
- Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. *Boletín Oficial del Estado*, 28 de abril de 2014, núm. 102, pp. 33154–33157.
- Rinaldoni, A.N., Campderrós, M.E., Pérez Padilla, A. 2012. Physico-chemical and sensory properties of yogurt from ultrafiltered soy milk concentrate added with inulin. *LWT - Food Science and Technology*, 45: 142–147.
- Roberfroid, M.B., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Leotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A. M., Meheust, A. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104: S1–63.
- Roberfroid, M.B. 2007. Inulin- type fructans: functional food ingredients. *Journal of Nutrition*, 137: 2493–2502.
- Roberfroid, M.B. 2005. *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. Boca Raton, USA: CRC Press. 370 pp.
- Roberfroid, M.B., Cumps J., Devogelaer J. 2002. Dietary chicory inulin increases whole-body mineral density in growing male rats. *Journal of Nutrition*, 132: 3599–3602.

- Roberfroid, M.B. 2000. Non digestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 461–480.
- Roberfroid, M.B. 1999a. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, 129: 1398–1401.
- Roberfroid, M.B. 1999b. Caloric value of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, 129: 1436–1437.
- Robinson, R.K. 2000. Yogurt. In: Robinson, R.K. (Ed.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, Vol. 2. Academic Press: London, U. K. pp 784–791.
- Rodriguez del Angel, C., Dalglish, D.G. 2005. Structures and some properties of soluble protein complexes formed by the heating of reconstituted skim milk powder. *Food Research International*, 39: 472–479.
- Rogers, N.D., McMahon, J., Daubert, C.R., Berry, T.K., Foegeding, E.A. 2010. Rheological properties and microstructure of Cheddar cheese made with different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 93: 4565–4576.
- Ronkart, S.N., Blecker, C., Fougnes, C., van Herck, J.C., Wouters, J., Paquot, M. 2006. Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An Xray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study. *Carbohydrate Polymers*, 63: 210–217.
- Salvatore, E., Pes, M., Mazzarello, V., Pirisi, A. 2014. Replacement of fat with long-chain inulin in a fresh cheese made from caprine milk. *International Dairy Journal*, 34: 1–5.
- Sandra, S., Alexander, M.Ho., Corredig, M. 2012. Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 95 (1): 75–82.
- Sandra, S., Cooper, C., Alexander, M., Corredig, M. 2011. Coagulation properties of ultrafiltered milk retentates measured using rheology and diffusing wave spectroscopy. *Food Research International*, 44:951–956.
- Sandra, S., Alexander, M., Dalglish, D.G. 2007. The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 308: 364–373.
- Sandra, S., Alexander, M., Dalglish, D.G. 2006. The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 308: 364–373.
- Saputra, D. 1992. Analysis of enzymatic hydrolysis of milk using diffuse reflectance of near infrared radiation. Ph.D. Thesis, University of Kentucky, Kentucky.
- Sayadi, A., Madarlou, A., Khosrowshahi, A. 2013. Enzymatic cross-linking of whey proteins in low fat Iranian white cheese. *International Dairy Journal*, 29: 88–92.

- Schaafsma, G., Slavin, J.L. 2015. Significance of Inulin Fructans in the Human Diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14: 37–47.
- Schmidt, D.G. 1982. Association of caseins and casein micelle structure. In: Fox, P. F. (ed ). *Developments in Dairy Chemistry*, 1: 61–86. London: Appl. Sci. Publ.
- Schneeman, B. 1999. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. *Journal of Nutrition*, 129: 1424–1427.
- Scott–Blair, G.W., Burnett, J. 1963. An equation to describe the rate of setting of blood and milk. *Biorheology*, 1: 183–191.
- Sharma, S.K., Hill, A.R., Mittal, G.S. 1993. Effect of milk concentration, pH and temperature on aggregation kinetics and coagulation properties of ultrafiltered (UF) milk. *Food Research International*, 26: 81–87.
- Sharma, S.K., Hill, A.R., Goff, H.D., Yada, R. 1989. Measurement of coagulation time and curd firmness of renneted milk using a Nametre viscometer. *Milchwissenschaft* 44: 682–685.
- Singh, H., Waungana, A. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal*, 11: 543–551.
- Slavin, J. 2003. Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrients data bases. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16: 287–291.
- Sodini I., Remeuf F., Haddad S., Corrieu G. 2004. The relative effect of milk base, starter and process on uogurt texture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 113–137.
- Sołowiej, B., Glibowski, P., Muszyński, S., Wydrych, J., Gawron, A., Jeliński, T. 2015. The effect of fat replacement by inulin on the physicochemical properties and microstructure of acid casein processed cheese analogues with added whey protein polymers. *Food Hydrocolloids*, 44: 1–11.
- Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R., Tzia, C. 2007. Industrial yogurt manufacture: Monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *Journal of Dairy Science*, 90: 2641–2654.
- Srisuvor, N., Chinprahast, N., Prakitchaiwattana, C., Subhimaros, S. 2013. Effects of inulin and polydextrose on physicochemical and sensory properties of low-fat set yoghurt with probiotic-cultured banana purée. *LWT – Food Science and Technology*, 51: 30–36.
- Stanton, C., Desmond, C., Coakley, M., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R.P. 2003. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In *Handbook of Fermented Functional Foods*. Farnworth, E. R. (Ed.). CRC Press: New York, U. S. A. pp 27–58.

- Stryer, L. 1988. *Bioquímica*, Ed. Reverté. S. A., Barcelona.
- Swaigood, H.E. 2003. Chemistry of the caseins. In: Fox, P.F., Sweeney, P.L.H., editors. *Advanced Dairy Chemistry—1, Proteins*. 3<sup>rd</sup> edition. New York: Kluwer Academic/Plenum; p. 139–201. Part A.
- Tabayehnejad, N., Castillo, M., Payne, F.A. 2012. Comparison of total milk-clotting activity measurement precision using the Berridge clotting time method and a proposed optical method. *Journal of Food Engineering*, 108: 549–556.
- Tamime, A. Y. 2006. *Fermented Milks*. 1<sup>st</sup> ed. Wiley–Blackwell Science, Oxford, UK.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K. 1999. *Yoghurt Science and Technology*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tan, Y.L., Ye, A., Singh, H., Hemar Y. 2007. Effects of Biopolymer Addition on the Dynamic Rheology and Microstructure of Renneted Skim Milk Systems. *Journal of Texture Studies*, 38: 404–422.
- Taper, H., Roberfroid, M. 1999. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. *Journal of Nutrition*, 129: 1488–1491.
- Tárrega, A., Rocafull, A., Costell, E. 2010. Effect of blends of short and long-chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low-fat custards. *LWT—Food Science and Technology*, 43: 556–562.
- Titapiccolo, G., Alexander, M., Corredig, M. 2010. Rennet-induced aggregation of homogenized milk: impact of the presence of fat globules on the structure of casein gels. *Dairy Science and Technology*, 90: 623–639.
- Tokita, M.K., Kikichi, R., Niki, R., Arima, S. 1982. Dynamic viscoelastic studies on the mechanism of milk clotting process. *Biorheology*, 19: 209–219.
- Thomann, S., Schenkel, P., Hinrichs, J. 2008. Effect of homogenization, microfiltration and pH on curd firmness and syneresis of curd grains. *LWT e Food Science and Technology*, 41: 826–835.
- Tokita, M., Hikichi, K., Niki, R., Arima, S. 1982. Dynamic viscoelastic studies on the mechanism of milk clotting process. *Biorheology*, 19: 209–219.
- Tranchant, C. C. 2000. Coagulation behaviour of differently acidified and renneted milk and the effects of pre-treatment of milk. Doctoral Thesis, Faculty of graduate Studies, The University of Guelph.
- Trejo, R., Dokland, T., Jurat-Fuentes, J. Harte, F. 2011. Cryo-transmission electron tomography of native casein micelles from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 93(6): 2338–2343.
- Tudorica, C.M., Jones, T.E., Kuri, V., Brennan, C.S. 2004. The effects of refined barley  $\beta$ -glucan on the physico-structural properties of low-fat dairy products: curd yield,

- microstructure, texture and rheology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1159–1169.
- Tunier, R., de Kruif, C.G. 2002. Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*, 117: 1290–1295.
- Udabage, P., McKinnon, I.R., Augustin, M.A. 2001. Effects of mineral salts and calcium–chelating agents on the gelation of renneted skim milk. *J. Dairy Sci.* 84: 1569–1575.
- Udabage, P., McKinnon I.R., Augustin, M.A. 2000. Mineral and casein equilibria in milk: Effects of added salt and calcium chelating agents. *J. Dairy Res.* 67:361–370.
- Vallas, M., Bovenhuis, H., Kaart, T., Parna, K., Kiiman, H., Pärna, E. 2010. Genetic parameters for milk coagulation properties in Estonian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 93: 3789–3796.
- van den Bijgaart, H.J.C.M. 1988. Syneresis of rennet–induced milk gels as influenced by cheesemaking parameters. Doctoral Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands.
- van Hooydonk, A.C., van den Berg, G. 1988. Control and determination of the curd–setting during cheesemaking. Brussels: International Dairy Federation. (IDF B–DOC 225).
- van Hooydonk, A.C., Walstra, P. 1987. Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41: 19–47.
- van Hooydonk, A.C., Hagedoorn, H.G., Boerrigter, I. J. 1986. The effect of various cations on the renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40: 369–390.
- van Hooydonk, A.C., Boerrigter, I.J., Hagedoorn, H.G. 1986a. pH–induced physicochemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40: 297–313.
- van Hooydonk, A.C., Olieman, C. Hagedoorn, H.G. 1984. Kinetics of the chymosin–catalysed proteolysis of  $\kappa$ –casein in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 37: 207–222.
- van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregs, H., Smits, G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews on Food Science and Nutrition*, 35(6): 525–552.
- van Marle, M.E., Zoon, P. 1995. Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim–milk gels. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 49: 47–65.
- van Vliet T. 2000. Structure and rheology of gels formed by aggregated protein particles. In K. Nishinari (Ed.), *Hydrocolloids Part 1. Physical chemistry and industrial*

application of gels, polysaccharides, and proteins. pp. 367–377. Amsterdam: Elsevier Science.

van Vliet, T., van Dijk, H.J.M., Zoon, P., Walstra, P. 1991. Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid and Polymer Science*, 269:620–627.

Vasbinder, A.J., Rollema, H.S., de Kruif, C.G. 2003. Impaired Rennetability of Heated Milk; Study of Enzymatic Hydrolysis and Gelation Kinetics. *Journal of Dairy Science*, 86: 1548–1555.

Vasbinder, A. J., Alting, A. C., de Kruif, K. G. 2003a. Quantification of heat-induced casein–whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloid Surfaces B: Biointerfaces*, 31: 115–123.

Von Smoluchowski, M. 1917. Research on a mathematical theory of the kinetics of coagulation of colloidal suspensions. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 92: 129–168.

Vyletelova, M., Hanus, O., Urbanova, E. Kopunecz, P., 2000. The occurrence and identification of psychrotrophic bacteria with proteolytic and lipolytic activity in bulk samples on storage in primary production conditions. *Czech Journal of Animal Science*, 45: 373–383.

Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. 2006. *Dairy Science and Technology*. CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, 782pp.

Walstra, P. 2004. The syneresis of curd. in: Fox, P. F. (ed). *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology*. Vol. 1. General Aspects. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman and Hall, London, UK. p. 141-191.

Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. 1999. *Dairy Technology: principles of milk properties and processes*. Marcel Dekker, Inc. New York, 753 pp.

Walstra, P. 1996. Dispersed systems: basic considerations. En *Food Chemistry*, pp. 95–155, Ed. Fennema, O. R., Marcel Dekker, Inc., New York.

Walstra, P., van Vliet, T. 1986. The physical chemistry of curd making. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40: 241–259.

Waugh, D.F. 1958. The interaction of  $\alpha_s$ ,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in micelle formation. *Faraday Society Discuss* , 25: 186–192.

Waugana, A., Singh, H., Bennet, R. J. 1998. Rennet coagulation properties of skim milk concentrated by ultrafiltration: Effects of heat treatment and pH adjustment. *Food Research International*, 31(9): 645–651.

Weber, F. 1989. El desuerado del coágulo. En: *El Queso*, Eck, A. (Ed). Omega, S. A., Barcelona, pp. 21–33.

Wedholm, A., Larsen, L. B., Lindmark-Månsson, H., Karlsson, A. H., Andrén, A. 2006. Effect of protein composition on the cheesemaking properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89: 3296–3305.

Wesstrom, O. 2001. Inline pH measurement for the food/dairy and beverage industry Endress+Hauser, Inc. white paper.

WHO/FAO. 2002. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, Geneva. WHO technical report series, 916.

Xu, Z.-M., Emmanouelidou, D.G., Raphaelides, S.N., Antoniou, K.D. 2008. Effects of heating temperature and fat content on the structure development of set yogurt. *Journal of Food Engineering*, 85: 590–597.

Zhou, N., Mulvaney, S.J. 1998. The Effect of Milk Fat, the Ratio of Casein to Water, and Temperature on the Viscoelastic Properties of Rennet Casein Gels. *Journal of Dairy Science*, 81: 2561–2571.

Zisu, B., Shah, N.P. 2007. Texture characteristics and pizza bake properties of low-fat mozzarella cheese as influenced by pre-acidification with citric acid and use of encapsulated and ropy exopolysaccharide producing cultures. *International Dairy Journal*, 17: 985–97.

Zoon, P., Van Vliet T., Walstra P. 1988a. Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 1. Introduction. *Neth. Milk Dairy J.* 42: 249–269.

Zoon, P., van Vliet, T., & Walstra, P. 1988b. Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 2. Effect of temperature. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42: 271–294.