



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Predicción en línea del módulo elástico de la cuajada

por

Daniel José Salvador Rodríguez

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos

Bellaterra, 2018



Manuel Castillo Zambudio, profesor agregado del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, de la Facultad de Veterinaria, de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Hace constar que Daniel José Salvador Rodríguez, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Monitorización en línea del módulo elástico de la cuajada” que presenta para optar el grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos.

Y para que así conste, firmamos conjuntamente con el doctorando el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 30 de Mayo del 2018.

---

Dr. Manuel Castillo Zambudio  
Director de tesis

---

Daniel José Salvador Rodríguez  
Doctorando

Esta tesis se ha realizado con el financiamiento de la Generalitat de Catalunya - Proyecto Valtec (VALTEC13-1-0141-00) y la beca del Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo de Perú (RJ-145-2017-MINEDU/VMGI-PRONABEC-OBPOST)

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento:

A mi director de tesis, Dr. Manuel Castillo Zambudio, por confiar en mí y aceptarme en su grupo de investigación, por sus valiosas orientaciones y por su disponibilidad de tiempo para atender mis consultas durante mi estancia en esta universidad.

Al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo de Perú (PRONABEC), por brindarme la beca de estudios de doctorado para poder contribuir al desarrollo de mi país y a la Generalitat de Catalunya - Proyecto Valtec.

A todo el personal docente y administrativo del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, los cuales me proporcionaron los recursos necesarios, orientaciones y ayudas durante la ejecución de la tesis.

A todo el personal de la planta piloto de tecnología de alimentos de la UAB, los cuales me proporcionaron los recursos necesarios, orientaciones y ayudas durante la ejecución de parte de la tesis.

A todos mis compañeros del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos y a los estudiantes que hicieron estancias, con los cuales tuve la oportunidad de interactuar y conocer un poco más de sus culturas.

Al personal administrativo y a los operarios de la empresa de productos lácteos por haberme dado todas las facilidades para desarrollar parte de mi tesis en sus instalaciones.

A toda mi familia en Perú, por su cariño, comprensión, paciencia y por su apoyo constante desde todo punto de vista, porque me alentaron a seguir preparándome y me dieron ánimos para seguir adelante.



## Resumen

El presente trabajo de investigación trata sobre el desarrollo, implementación, calibración y validación de un sistema que permite medir a tiempo real el módulo elástico de la cuajada,  $G'$ , utilizando la señal de un sensor de dispersión NIR, con la finalidad de determinar un tiempo de corte objetivo lo cual, a su vez, permitiría la automatización de esta parte del proceso de elaboración de queso.

Este trabajo se desarrolló en cinco fases. La primera consistió en la deducción de un modelo matemático para la predicción del módulo elástico de la cuajada, a temperatura y porcentaje de proteína variables, esta fase se llevó a cabo a nivel de laboratorio utilizando leche en polvo reconstituida y dos niveles de proteína y temperatura, encontrándose que un modelo en base a la señal del sensor y al porcentaje de proteína en la leche dio una buena calidad predictiva. La segunda fase consistió en la calibración y validación del modelo matemático a nivel de laboratorio, utilizando leche de vaca a tres temperaturas de coagulación, logrando una muy buena calidad predictiva del modelo. La tercera fase consistió en la implementación de un sistema de monitorización y adquisición de datos (hardware y software) que permitió la predicción del módulo elástico a tiempo real, realizándose posteriormente coagulaciones de leche de vaca para la validación del sistema. La cuarta fase consistió en la calibración y validación del sistema de monitorización del módulo elástico, a nivel de planta piloto, para esto se realizaron elaboraciones de queso fresco, utilizando para ello leche de vaca y una temperatura constante, encontrándose que, al utilizar el tiempo dado por el sistema de predicción, se reproducen rendimientos y características de textura y color de los quesos con respecto a los obtenidos al utilizar un tiempo de corte dado por el maestro quesero. La quinta fase consistió en la calibración y validación del modelo matemático a nivel de industria, para lo cual se utilizó el modelo para realizar el corte de la cuajada durante la elaboración de queso fresco, que es cortado por la empresa a tiempo fijo, existiendo evidencias de que la aplicación del tiempo de corte dado por el sistema incrementaría el rendimiento en aquellas producciones que realizan el corte a tiempo fijo.





## **Abstract**

The present research deals with the development, implementation, calibration and validation of a system for measuring at real time the elastic modulus of the curd,  $G'$ , using the signal of a NIR light backscatter sensor, to determine a target cutting time, which would allow the automation of this part of the cheese making process.

This work was performed in five phases. The first was devoted to obtaining a mathematical model to predict the elastic modulus of the curd, at various temperatures and percentages of protein. This phase was carried out at laboratory level using reconstituted skim milk powder and two protein and temperature levels. A model based on the sensor signal and the protein percentage in milk was found to have a good predictive quality. The second phase consisted in the mathematical model calibration and validation at a laboratory level using cow milk at three coagulation temperatures, and achieving also a very good predictive quality. The third phase was the implementation of a pilot plant/industrial monitoring and data acquisition (hardware and software) system that allowed the prediction of the elastic modulus at real-time in the cheese vat, which was also validated. The fourth phase involved the calibration and validation of the elastic modulus monitoring system, at pilot plant scale. Thus, cheese manufacturing was performed using cow milk at constant temperature. Using the cutting time set by the prediction system, made possible to replicate yields, texture characteristics and cheese colour with regard to those obtained using the cutting time estimated by the cheesemaker master. The fifth phase consisted of the mathematical model calibration and validation at industry level. The model was used to perform the curd cutting during fresh cheese manufacturing as an alternative procedure to the typical cutting methodology applied by the cheese plant consisting on cutting at a predetermined and constant time. Evidences show that cutting time set by the system would increase the yield in those cases where the cutting is performed at a fixed time.



## Índice general

|  |    |
|--|----|
| Resumen.....   | IV |
| Abstract.....  | V  |
| Índice general.....  | VI |
| Índice de tablas.....  | IX |
| Índice de figuras.....   | XI |
| Abreviaturas.....  | XV |
| Capítulo I. Interés del estudio.....   | 1  |
| Capítulo II. Revisión bibliográfica.....   | 3  |
| 2.1 Características de la leche para la elaboración de queso.....  | 3  |
| 2.1.1 Composición química.....   | 3  |
| 2.1.2 Estructura de las micelas de caseína.....  | 5  |
| 2.2 Etapas de elaboración de queso.....  | 9  |
| 2.3 Coagulación enzimática.....  | 13 |
| 2.4 Fases de formación de la cuajada.....  | 15 |
| 2.4.1 Fase de hidrólisis enzimática.....   | 17 |
| 2.4.2 Fase de agregación.....  | 19 |
| 2.4.3 Fase de endurecimiento.....  | 28 |
| 2.4.4 Factores que influyen en las diferentes fases de formación de la cuajada.....  | 36 |
| 2.5 Corte de la cuajada.....   | 41 |
| 2.6 Métodos ópticos de predicción del tiempo de corte.....   | 48 |
| Capítulo III. Objetivos y plan de trabajo.....   | 57 |
| 3.1 Objetivo General.....  | 57 |
| 3.2 Objetivos Específicos.....   | 57 |
| 3.3 Plan de trabajo.....   | 58 |
| Capítulo IV. Desarrollo de un modelo matemático para la predicción del módulo elástico, $G'$ , de la cuajada a temperatura y porcentaje de proteína variables..... | 65 |
| 4.1 Introducción.....  | 65 |
| 4.2 Materiales y métodos.....  | 70 |
| 4.2.1 Procedimiento experimental.....  | 70 |
| 4.2.2 Determinación del módulo elástico.....   | 72 |
| 4.2.3 Monitorización de la coagulación mediante dispersión de luz NIR ..   | 72 |
| 4.2.4 Análisis estadístico.....  | 74 |
| 4.3 Resultados y discusión.....  | 74 |

|   |  |     |
|---|--|-----|
| 4.3.1   | Perfil de dsipersión.....  | 74  |
| 4.3.2   | Análisis de covarianza de los parámetros de tiempos ópticos y de corte .....   | 75  |
| 4.3.3   | Comparación de medias de mínimos cuadrados de los parámetros de tiempos ópticos y de corte .....                     | 77  |
| 4.3.4   | Ecuaciones para la monitorización de la dureza de la cuajada .....   | 79  |
| 4.4   | Conclusiones.....  | 81  |
| <b>Capítulo V. Calibración y validación a nivel de laboratorio de un modelo de predicción del módulo elástico, <math>G'</math>, de la cuajada, utilizando leche de vaca .....</b> |  |     |
| 5.1   | Introducción.....  | 83  |
| 5.2   | Materiales y métodos .....   | 88  |
| 5.2.1   | Procedimiento experimental .....   | 88  |
| 5.2.2   | Análisis estadístico .....   | 89  |
| 5.3   | Resultados y discusión .....   | 90  |
| 5.3.1   | Comparación de sensores .....  | 90  |
| 5.3.2   | Análisis de varianza de los parámetros ópticos y de corte .....  | 90  |
| 5.3.3   | Comparación de medias de mínimos cuadrados de los parámetros de tiempos ópticos y de corte .....                     | 93  |
| 5.3.4   | Calibración y validación a nivel de laboratorio del modelo de predicción a tres temperaturas de coagulación.....     | 96  |
| 5.4   | Conclusiones.....  | 99  |
| <b>Capítulo VI. Desarrollo e implementación de un sistema de predicción y adquisición de datos (hardware y software) a tiempo real.....</b>                                       |  |     |
| 6.1   | Introducción.....  | 101 |
| 6.2   | Materiales y métodos .....   | 102 |
| 6.2.1   | Implementación del sistema de predicción .....   | 102 |
| 6.2.2   | Materia prima e insumos .....  | 104 |
| 6.2.3   | Métodos .....  | 104 |
| 6.2.4   | Análisis estadístico .....   | 105 |
| 6.3   | Resultados y discusión .....   | 105 |
| 6.3.1   | Análisis de varianza de parámetros ópticos.....  | 105 |
| 6.3.2   | Comparación de medias de mínimos cuadrados de los parámetros ópticos .....   | 106 |
| 6.3.3   | Calibración y validación del modelo de predicción a tres temperaturas de coagulación, utilizando datos del DAS ..... | 107 |
| 6.4   | Conclusiones.....  | 108 |
| <b>Capítulo VII. Validación del modelo de predicción del módulo elástico, <math>G'</math>, de la cuajada a nivel de planta piloto.....</b>  |  |     |
|   |  | 109 |

|  |  |            |
|--|--|------------|
| 7.1  | Introducción.....  | 109        |
| 7.2  | Materiales y métodos.....  | 110        |
| 7.2.1  | Procedimiento experimental.....  | 110        |
| 7.2.2  | Análisis de textura.....   | 112        |
| 7.2.3  | Análisis de color.....   | 113        |
| 7.2.4  | Cálculo de rendimientos.....   | 113        |
| 7.2.5  | Análisis estadístico.....  | 114        |
| 7.3  | Resultados y discusión.....  | 114        |
| 7.3.1  | Calibración y validación del modelo de predicción a nivel de planta piloto.....                  | 114        |
| 7.3.2  | Análisis de covarianza de rendimientos, recuperaciones y pérdidas.....                           | 115        |
| 7.3.3  | Comparación de medias de mínimos cuadrados para los rendimientos, recuperaciones y pérdidas..... | 120        |
| 7.3.4  | Análisis de covarianza de las variables de textura y color.....                                  | 122        |
| 7.3.5  | Media de mínimos cuadrados de las variables de textura y color ..                                | 123        |
| 7.4  | Conclusiones.....  | 125        |
| <b>Capítulo VIII. Validación del modelo de monitorización de la dureza de la cuajada a nivel industrial.....</b> |  | <b>127</b> |
| 8.1  | Introducción.....  | 127        |
| 8.2  | Materiales y métodos.....  | 128        |
| 8.2.1  | Procedimiento experimental.....  | 128        |
| 8.2.2  | Cálculo de rendimientos.....   | 133        |
| 8.2.3  | Análisis estadístico.....  | 133        |
| 8.3  | Resultados y discusión.....  | 134        |
| 8.3.1  | Composición y formatos de quesos.....  | 134        |
| 8.3.2  | Calibración y validación de ecuaciones de predicción a nivel industrial.....                     | 135        |
| 8.3.3  | Análisis de covarianza para rendimientos, recuperaciones y pérdidas.....                         | 136        |
| 8.3.4  | Comparación de medias de mínimos cuadrados para los rendimientos, recuperaciones y pérdidas..... | 139        |
| 8.3.5  | Análisis de covarianza para los parámetros de textura y color.....                               | 141        |
| 8.3.6  | Comparación de medias de mínimos cuadrados para los parámetros de textura y color.....           | 142        |
| <b>Capítulo IX. Conclusiones por objetivos específicos.....</b>  |  | <b>145</b> |
| <b>Capítulo X. Referencias bibliográficas.....</b>   |  | <b>147</b> |



## Índice de tablas

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Composiciones típicas (%) de las leches de las principales especies lecheras .....   | 4   |
| <b>Tabla 2.</b> Contenido proteico (%) en la leche de algunas especies .....   | 5   |
| <b>Tabla 3.</b> Variación del pH y fracción volumétrica de caseína ( $\Phi$ ) a diferentes concentraciones de NaCl y KCl en leche UF. ....   | 39  |
| <b>Tabla 4.</b> Análisis de covarianza de los parámetros de tiempos ópticos y de corte, obtenido de la coagulación de leche en polvo reconstituida. ....   | 76  |
| <b>Tabla 5.</b> Medias de mínimos cuadrados de parámetros ópticos y de corte en función del porcentaje de proteína y temperatura, obtenido de la coagulación de leche en polvo reconstituida. ....                         | 78  |
| <b>Tabla 6.</b> El pH de leche a varias temperaturas. ....   | 85  |
| <b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza de parámetros de tiempos ópticos y de corte, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de laboratorio. ....  | 92  |
| <b>Tabla 8.</b> Análisis de correlación entre valores de las variables independientes y dependientes, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de laboratorio. ...   | 92  |
| <b>Tabla 9.</b> Medias de mínimos cuadrados de parámetros ópticos, visuales y reológicos en función de la temperatura y el lote, obtenidas de la coagulación de leche de vaca a nivel de laboratorio. ....                 | 94  |
| <b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza para los parámetros ópticos .....  | 106 |
| <b>Tabla 11.</b> Media de mínimos cuadrados de parámetros ópticos en función del sistema de adquisición de datos (DAS). ....   | 107 |
| <b>Tabla 12.</b> Variables dependientes de elaboración (VDE) de queso fresco <sup>1</sup> . ....   | 113 |
| <b>Tabla 13.</b> Análisis de covarianza de tiempo de corte, rendimientos, recuperaciones y pérdidas, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto. ....   | 117 |
| <b>Tabla 14.</b> Análisis de correlaciones entre variables dependientes e independientes de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto. ....   | 118 |
| <b>Tabla 15.</b> Comparación de medias de mínimos cuadrados de tiempos de corte, rendimientos y recuperaciones en función del método de corte, obtenidas de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto. .... | 120 |
| <b>Tabla 16.</b> Análisis de covarianza de parámetros de textura y color, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto. ....  | 123 |
| <b>Tabla 17.</b> Análisis de correlaciones entre las variables de composición y las de textura y color del queso. ....   | 123 |
| <b>Tabla 18.</b> Comparación de medias de mínimos cuadrados de parámetros de textura y color en función del método de corte, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto. ....                   | 124 |
| <b>Tabla 19.</b> Variables dependientes de elaboración (VDE) de queso fresco. ....   | 133 |
| <b>Tabla 20.</b> Formatos y composición de queso producidos por la empresa láctea. ....  | 134 |
| <b>Tabla 21.</b> Análisis de covarianza de rendimientos y recuperaciones, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel industrial. ....  | 137 |
| <b>Tabla 22.</b> Análisis de correlaciones entre variables independientes y dependientes, obtenidas en la coagulación de leche de vaca a nivel industrial. ....  | 138 |
| <b>Tabla 23.</b> Comparación de medias de mínimos cuadrados de las variables de elaboración en función del método de corte, obtenidas de la coagulación de leche de vaca a nivel industrial. ....                          | 140 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 24.</b> Análisis de covarianza de parámetros de textura y color, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel industrial. ....                     | 142 |
| <b>Tabla 25.</b> Análisis de correlaciones entre las variables de composición y las de textura y color del queso. ....  | 142 |
| <b>Tabla 26.</b> Comparación de medias de mínimos cuadrados de parámetros de textura y color, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel industrial. .... | 143 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> A) Modelo de submicela según Schmit (1982). B) Modelo de submicela según Walstra et al. (1999). Reproducido de De Kruif et al. (2012).....  | 6  |
| <b>Figura 2.</b> A) crio-TEM de micelas de caseína. Reproducido de Corredig y Salvatore (2016). B) SEM de micelas de caseína. Reproducido de Dalglish y Corredig (2012). C) Modelo de doble enlace de Horne (1998). Reproducido de Fox et al. (2015).....  | 7  |
| <b>Figura 3.</b> Representación del tomograma de la micela nativa de caseína, mostrada en 5 ángulos. La superficie azul muestra nanoagregados de proteína, mientras que la superficie rosa los nanogrupos de fosfato de calcio coloidal. Reproducido de Trejo et al. (2011).....   | 8  |
| <b>Figura 4.</b> Imagen hipotética de las interacciones entre dos micelas de caseína. (A) Capas pilosas superpuestas y cargas electrostáticas. Reproducido de Walstra et al. (2006).....   | 9  |
| <b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo de la elaboración de queso. ....  | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Nivel de proteína en suero: sérica (símbolos sólidos) y $\kappa$ -caseína (símbolos vacíos), en muestras de leche calentadas durante 15 min a diferentes temperaturas. Las muestras de leche se ajustaron a pH 6,5 (●,○), pH 6,7 (▲,△) y pH 6,9 (■,□) antes de calentar. Las barras de error representan las desviaciones estándar de las mediciones triplicadas. Reproducido de Anema (2008). .... | 12 |
| <b>Figura 7.</b> El complejo de quimosina- $\kappa$ -caseína después de 17 ns de simulación de dinámica molecular. Reproducido de Palmer et al. (2010). ....   | 14 |
| <b>Figura 8.</b> Proceso de coagulación de la leche. Reproducido de Lucey (2011). ....   | 16 |
| <b>Figura 9.</b> Curvas de coagulación de leche entera pasteurizada. R es la ratio de reflectancia, R' y R'' son la primera y segunda derivada de R respectivamente. ....  | 17 |
| <b>Figura 10.</b> Cambio en el diámetro aparente de las micelas de caseína en función del tiempo, medida por dispersión de luz dinámica. La fase correspondiente a la eliminación de la capa pilosa de $\kappa$ -caseína se indica con la flecha. Reproducido de Gaygadzhiev et al. (2012). ....   | 18 |
| <b>Figura 11.</b> Liberación de macropéptidos (●) y cambios en la viscosidad relativa (■) durante el curso de la coagulación del cuajo. Adaptado de Fox et al. (2017).....   | 20 |
| <b>Figura 12.</b> Liberación de caseinmacropéptido durante la coagulación de la leche a diferentes valores de pH. Reproducido de Corredig y Salvatore (2016).....  | 21 |
| <b>Figura 13.</b> Viscosidad relativa de leche descremada durante el proceso de coagulación. La línea dibujada representa el cálculo teórico en el que las micelas se consideran esferas duras adhesivas. Adaptado de De Kruif (1999). ....  | 25 |
| <b>Figura 14.</b> La formación de un gel débil en el que la mayoría de las partículas están ligadas débilmente a la red. Los círculos más grandes representan el concepto fractal 'blob'. Reproducido de Horne y Bank (2004). ....   | 26 |
| <b>Figura 15.</b> Reordenamiento a corto plazo. (a) Reordenamiento de partículas. (b) Grupo fractal en dos dimensiones, donde se ha producido un reordenamiento a corto plazo. Reproducido de Walstra (2003). ....   | 27 |
| <b>Figura 16.</b> Niveles de reordenamiento durante las fases de agregación y endurecimiento. Adaptado de Horne y Bank (2004). ....  | 28 |
| <b>Figura 17.</b> Cambios en los gels de cuajo a diversos valores de pH (indicados) en función del tiempo después de la adición del cuajo, a 30°C. (A) Permeabilidad B. (b) Presión de sinéresis endógena $p_{syn}$ . Reproducido de Walstra (2003). ....  | 29 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 18.</b> Traza típica del Lactodinamógrafo. *, punto de adición de cuajo, RCT, es el tiempo de coagulación y $a_{30}$ , medida de bifurcación 30 min después de la adición de cuajo. Adaptado de Fox et al. (2017).   | 32 |
| <b>Figura 19.</b> Representación esquemática de un aparato de transmisión de presión para medir el tiempo de coagulación de la leche y la firmeza del gel resultante. Reproducido de Fox et al. (2000).  | 33 |
| <b>Figura 20.</b> Cambios en la viscoelasticidad y microestructura durante la gelificación de la leche inducida por el cuajo. Agregación de micelas de caseína hidrolizada observada por microfotografía confocal de barrido láser. Adaptado de Fox y Guinee (2013) y de Gunasekaran y Mehmet (2003).  | 34 |
| <b>Figura 21.</b> Cambios en el tiempo de coagulación (●), firmeza de la cuajada (▲) medida como porcentaje de luz transmitida relativa (RET), utilizando un gelógrafo. Las curvas se ajustaron a partir de ecuaciones de regresión simple. Reproducido de Nájera et al. (2003).   | 36 |
| <b>Figura 22.</b> Representaciones de estructuras de micelas de caseína a diversos valores de pH. Las cadenas indican moléculas de caseína. Los pequeños círculos negros son los nanogrupos de fosfato de calcio que se solubilizan cuando el pH se reduce. El círculo exterior es indicativo del intervalo de repulsión estérica generado entre las micelas. Reproducido de Horne (2014). | 37 |
| <b>Figura 23.</b> Cambios en el tiempo de coagulación del cuajo (●) y firmeza de la cuajada (▲), medida como porcentaje transmisión relativa (RET), utilizando un gelógrafo. Reproducido de Nájera et al. (2003).  | 38 |
| <b>Figura 24.</b> Cambios en el tiempo de coagulación (●) y la firmeza del coágulo (■) con respecto a la concentración de $\text{CaCl}_2$ (Ca), medidas como porcentaje de transmisión relativa (RET), utilizando un gelógrafo. Adaptado de Nájera et al. (2003).  | 40 |
| <b>Figura 25.</b> Efecto del aumento del nivel de proteína (●) en la leche desnatada, o grasa (○) en las leches que contienen 3,3% de proteína, sobre las propiedades de coagulación del cuajo: A) Firmeza de la cuajada a 40 min de la adición de cuajo. B) Tiempo de corte con una firmeza de 20 Pa. Adaptado de Guinee et al. (1997).   | 41 |
| <b>Figura 26.</b> Cabeza de medición del dispositivo de soplo de aire. La distancia entre la boquilla de aire y la superficie de la leche y la presión de aire se mantienen constantes. Reproducido de Bamelis y De Baerdemaeker (2006).   | 44 |
| <b>Figura 27.</b> A) Diagrama esquemático de la técnica de eco de pulso para medir la velocidad o atenuación ultrasónica. B) Atenuación ultrasónica medida a 14,5 MHz en la leche durante el proceso de coagulación a 30°C. Reproducido de Mohammadi et al. (2014) y Dwyer et al., (2005).   | 45 |
| <b>Figura 28.</b> Concepto de sonda vibratoria: A) en modo torsional y B) en modo acústico. C) Viscosidad compleja ( $\mu^*$ ) en función del tiempo. Reproducido de O'Callaghan et al. (2002) y Sharma y Hill (1993).   | 47 |
| <b>Figura 29.</b> Relación ilustrativa entre el $\mu\text{V}$ del alambre caliente y el tiempo durante el tratamiento del cuajo de la leche. Reproducido de Sbodio et al. (2002).  | 48 |
| <b>Figura 30.</b> Tres modos de detección comúnmente utilizados en la medición espectroscópica del visible y del infrarrojo cercano: (a) reflexión, (b) transmisión, y (c) dispersión. Reproducido de Lu (2016).   | 49 |
| <b>Figura 31.</b> A) Dispersión Rayleigh. B) Dispersión Mie. Reproducido de Abdulsalam y Khaleel (2014).   | 51 |
| <b>Figura 32.</b> Funcionamiento de un sensor de dispersión, que muestra la cantidad relativa de luz transmitida y dispersada en leche antes de la coagulación y en gel de leche después de la coagulación.  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 33.</b> Un esquema del sistema de medición utilizado para determinar el tiempo de coagulación de Berridge y los parámetros de tiempo ópticos. R1 = sensor de dispersión de luz para la cuba 1; R2 = sensor de dispersión de luz para la cuba 2; T1 = termistor para la cuba 1; T2 = termistor para la cuba 2; Tw = termistor para circulación de agua dentro de la cuba de la coagulación. Reproducido de Tabayehnejad et al. (2012)..... | 53 |
| <b>Figura 34.</b> Diseño experimental para la determinación de la ecuación de monitorización del módulo elástico ( $G'$ ) de la cuajada. ....   | 58 |
| <b>Figura 35.</b> Diseño experimental para la comparación de sensores.....  | 59 |
| <b>Figura 36.</b> Diseño experimental para la calibración y validación a nivel de laboratorio, de la ecuación de predicción de $G'$ de la cuajada.....  | 59 |
| <b>Figura 37.</b> Flujograma para la implementación del sistema de adquisición de datos (DAS).....  | 60 |
| <b>Figura 38.</b> Diseño experimental para la validación del DAS. ....  | 61 |
| <b>Figura 39.</b> Diseño experimental para la validación del modelo de monitorización de la dureza de la cuajada a nivel de planta piloto. $t_{cutG'}$ , tiempo de corte en base a un valor predeterminado del módulo elástico de la cuajada. $t_{cut}$ , tiempo de corte visual. ....  | 62 |
| <b>Figura 40.</b> Diseño experimental para la validación de la ecuación de predicción de la dureza de la cuajada a nivel industrial. $t_{cutG'}$ , tiempo de corte en base a un valor predeterminado del módulo elástico de la cuajada. $t_{cufijo}$ , tiempo de corte fijo. ....   | 63 |
| <b>Figura 41.</b> Perfil de luz dispersa o ratio de reflectancia (R) versus tiempo. R', primera derivada de R. R'', segunda derivada de R. Los significados de los parámetros ópticos están explicados en el texto y en la sección 4.2.3. ....  | 67 |
| <b>Figura 42.</b> Diagrama de flujo para la coagulación de las muestras de leche en polvo reconstituida. ....   | 70 |
| <b>Figura 43.</b> A) Atemperado de leche reconstituida. B) determinación visual del tiempo de coagulación. C) Determinación visual del tiempo de corte. ....  | 71 |
| <b>Figura 44.</b> Reómetro con sensor de cilindros concéntricos utilizado en los experimentos. ....   | 72 |
| <b>Figura 45.</b> Equipo de monitorización de la coagulación CoAguLab. Prototipo instalado en el laboratorio de análisis instrumental de la Facultad de Veterinaria de la UAB.....  | 73 |
| <b>Figura 46.</b> Perfil de la ratio de dispersión de luz a diferentes niveles de temperatura y proteína, durante la coagulación de leche en polvo reconstituida. Las líneas negras verticales indican el valor de $t_{max}$ para cada curva. Medias de tres replicas por tratamiento.....  | 75 |
| <b>Figura 47.</b> Efecto de interacción entre la temperatura y el contenido de proteína (P) sobre $t_{gel}$ (líneas grises) y $t_{G'30}$ (líneas negras). ....  | 77 |
| <b>Figura 48.</b> Variabilidad de datos experimentales de $t_{G'30}$ y $t_{cut}$ . Se muestra el promedio con rangos de variación de desviación estándar (DS). ....   | 79 |
| <b>Figura 49.</b> Calibración del modelo de monitorización de la dureza de la cuajada, $G' = f(R, P)$ . A) 30 °C y B) 40 °C. A dos niveles de proteínas (3,4 y 5,1%). Los términos de la ecuación están explicados en el texto. ....  | 80 |
| <b>Figura 50.</b> Ajuste de la ecuación de monitorización $G' = f(R, P, T)$ a dos niveles de temperatura (30 y 40 °C) y de proteína (3,4 y 5,1%). ....  | 81 |
| <b>Figura 51.</b> Efecto de la temperatura de pasteurización, durante 15 s. (a) Nivel de desnaturalización de la proteína de suero. (b) Firmeza de la cuajada 60 min después de la adición del cuajo en función de la concentración de la proteína del suero desnaturalizada. Adaptado de Fox et al. (2017). ....   | 84 |
| <b>Figura 52.</b> Efecto de la temperatura de cuajado en el tiempo de coagulación por cuajo (RCT). Reproducido de Fox et al. (2015).....  | 86 |

|  |  |
|--|--|
| <b>Figura 53.</b> Evaluación reológica del proceso enzimático de coagulación de la leche con diferentes concentraciones de enzimas y proteínas. Los valores son medias de las repeticiones (N = 6). EN: Enzima; Ptn: Proteína. Reproducido de Leite et al. (2017). ...87   |  |
| <b>Figura 54.</b> Diagrama de flujo para la coagulación enzimática de leche de vaca. Parámetros descritos en el texto. ....88  |  |
| <b>Figura 55.</b> Comparación de calibraciones de las ecuaciones de monitorización, coagulando leche de vaca a 31 °C. A) sensor sin ventana de zafiro, B) sensor con ventana de zafiro. N = 12. ....90   |  |
| <b>Figura 56.</b> Medias de $V_0$ , pH <sub>p</sub> , pH <sub>c</sub> , P, G y G/P en función del lote. El significado de los parámetros está explicado en el texto.....95   |  |
| <b>Figura 57.</b> Calibración y validación de la ecuación de predicción de la coagulación de leche de vaca a A) 30 °C, B) 31 °C y C) 32 °C. N = 36. ....97   |  |
| <b>Figura 58.</b> Calibración y validación de la ecuación de monitorización de la coagulación de leche de vaca a valores próximos a $t_{G30}$ a A) 30 °C, B) 31 °C y C) 32 °C.....98   |  |
| <b>Figura 59.</b> Efecto de la temperatura en la predicción a A) 30 °C y B) 32 °C, utilizando los valores de calibración a 31 °C. ....99   |  |
| <b>Figura 60.</b> Sistema de adquisición de datos. A) Esquema del PLC y módulos de procesamiento de datos. B) Imagen del PLC y módulo de procesamiento de datos. C) Pantalla de resultados. D) Pantalla de parámetros. ....103   |  |
| <b>Figura 61.</b> Conexión del PLC con la cubeta 2 mediante el PCB. ....104  |  |
| <b>Figura 62.</b> A) Comparación gráfica de las señales de los sistemas de adquisición de datos. B) Vista de la señal obtenida mediante PLC y visualización a través de página web.....105   |  |
| <b>Figura 63.</b> Calibración y validación de la ecuación de monitorización de la coagulación de leche de vaca, utilizando el DAS a A) 30 °C, B) 31 °C y C) 32 °C. N = 36.....107  |  |
| <b>Figura 64.</b> Diagrama de flujo de elaboración de queso fresco a nivel de planta piloto. ....110   |  |
| <b>Figura 65.</b> Sistema de medida de la dureza de la cuajada acoplado a la cuba de 10 L. ....111   |  |
| <b>Figura 66.</b> A) Desuerado de la cuajada. B) Obtención de finos. C) Queso fresco prensado.....112  |  |
| <b>Figura 67.</b> Calibración y validación de los dos modelos de predicción para realizar el corte a 32 Pa: A) modelo $G'$ , B) modelo $t_{G32}$ .....115  |  |
| <b>Figura 68.</b> Diagrama de flujo de la elaboración de queso fresco a nivel industrial. ....129  |  |
| <b>Figura 69.</b> PLC conectado a sensor a nivel industrial. A) Perforación practicada en pared de cuba quesera, a través de la doble camisa, para alojar el sensor de dispersión de luz NIR. B) Detalle del sensor instalado en pared de cuba, sujeto con <i>tri-clamp</i> . C) Cuba quesera durante el desuerado, donde se observa el sensor con cable de conexión <i>-water-proof-</i> a PLC <i>-esquina superior izquierda-</i> . D) PLC mostrando pantalla de parámetros (parámetros han sido ocultados por motivos de confidencialidad). ....130 |  |
| <b>Figura 70.</b> A) Corte de la cuajada. B) Envasado mecanizado. C) Quesos en cámara de preenfriamiento. D) Quesos tipo Burgos en cámara de almacenamiento. ....132   |  |
| <b>Figura 71.</b> Calibración y validación de los dos modelos de predicción para realizar el corte a 87 Pa: A) modelo $G'$ , B) modelo $t_{G87}$ .....135  |  |

## Abreviaturas

|                   |  |
|-------------------|--|
| Fi                | : Finos  |
| G                 | : Porcentaje de grasa en leche   |
| G'                | : Módulo de almacenamiento o módulo elástico                               |
| G''               | : Módulo de pérdida o módulo viscoso                                       |
| G' <sub>∞</sub>   | : Valor máximo del módulo de almacenamiento o módulo elástico              |
| Gq                | : Porcentaje de grasa en queso   |
| Gs                | : Porcentaje de grasa en suero   |
| MSq               | : Materia seca en queso  |
| MSs               | : Materia seca en suero  |
| P                 | : Porcentaje de proteína en leche  |
| Pq                | : Porcentaje de proteína en queso  |
| Ps                | : Porcentaje de proteína en suero  |
| R                 | : Ratio de dispersión de luz   |
| R'                | : Primera derivada de la ratio de dispersión de luz con respecto al tiempo |
| R' <sub>max</sub> | : Ratio de dispersión de luz a tiempo t <sub>max</sub>                     |
| R''               | : Segunda derivada de la ratio de dispersión de luz con respecto al tiempo |
| R <sup>2</sup>    | : Coeficiente de determinación   |
| Rc                | : Rendimiento de cuajada   |
| RG                | : Recuperación de grasa  |
| RMS               | : Recuperación de materia seca   |
| RP                | : Recuperación de proteína   |
| Rp                | : Rendimiento de queso prensado  |
| Rs                | : Rendimiento de queso salado  |
| t <sub>gel</sub>  | : Tiempo de gelificación reológico   |
| t <sub>G'</sub>   | : Tiempo de corte reológico  |
| t <sub>cut</sub>  | : Tiempo de corte visual   |
| t <sub>max</sub>  | : Tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo valor de R'            |
| V <sub>0</sub>    | : Voltaje inicial  |
| L*                | : Luminosidad (oscuro (0) a luminoso (100))                                |
| a*                | : color verde (-) a rojo (+)   |
| b*                | : color azul (-) a amarillo (+)  |
| C*                | : Saturación = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$                                   |
| h°                | : Tonalidad = $\arctan(b^* / a^*)$   |
| σ <sub>f</sub>    | : Tensión a la fractura  |
| ε <sub>f</sub>    | : Deformación a la fractura  |



## Capítulo I. Interés del estudio

Según la OCDE y la FAO (2015), la producción de quesos es una de las principales actividades de la industria láctea, teniendo la producción mundial buenas perspectivas de crecimiento para los próximos siete años (1,5% anual), estimándose un incremento del consumo per cápita del 1,4% anual en los países en desarrollo y del 1% en los países desarrollados. La Unión Europea, que es el principal exportador, representará el 38% del total de exportaciones para el 2024, estimándose un crecimiento del 4% anual para los próximos siete años, siendo este superior a los demás países productores. La Federación Rusa y Japón son los principales países importadores. En España, la producción de quesos es también una de las principales actividades del sector lácteo, representando el queso de vaca el 15,7% del total de la producción de los principales derivados lácteos (nata de consumo directo, leches acidificadas, mantequilla y queso de vaca) y el 41,6% del total de queso producido según el tipo de leche (vaca, oveja, cabra y mezclas). Por otro lado, el queso fresco representa el 35,2% del total de quesos producidos según el tipo de queso (fresco, madurado y fundido) (MAGRAMA, 2014).

La producción de queso se realiza de forma artesanal o industrial, caracterizándose la producción industrial por el uso de maquinarias y un mejor control de los procesos productivos, estando en algunos casos casi completamente automatizada. Sin embargo, existe un punto del proceso que impiden esta total automatización como la elección del momento adecuado para realizar el corte de la cuajada, una vez que ésta alcanza la dureza suficiente para realizar esta operación (Lyndgaard et al., 2012). En la industria quesera actual, el corte se realiza a un tiempo fijo estandarizando la leche a un contenido constante de proteína y grasa o se delega al juicio subjetivo del maestro quesero; estas prácticas han demostrado ser funcionales, pero no son óptimas, ya que en el primer caso la composición y los factores de coagulación de la leche pueden variar de lote a lote y en el segundo caso el proceso de selección del tiempo de corte estaría supeditado a la experiencia del maestro quesero (Abdelgawad et al., 2014).



La elección del momento de corte puede afectar al resto del proceso, debido a que, si se elige un tiempo de corte anticipado, cuando la cuajada no está lo suficientemente firme, provocará una mayor producción de finos y mayores pérdidas de grasa en suero afectando al rendimiento y a la calidad del queso. Por otro lado, un tiempo de corte demorado, cuando la dureza de la cuajada es excesiva, provocará un incremento en el contenido de humedad de la misma generando un aparente incremento del rendimiento y afectando a la etapa posterior de maduración del queso. Por tanto, existe una dureza óptima para el corte en el que las características del gel determinan un máximo rendimiento, homogeneidad y calidad (Castillo, 2006).

Por lo descrito anteriormente, la industria quesera actual busca un método “*in-line*” que permita monitorizar la coagulación de la leche y determinar la dureza óptima de la cuajada para proceder a su corte. En las últimas décadas se han propuesto numerosos instrumentos basados en la medición del cambio de propiedades reológicas (gelógrafo, formógrafo, viscosímetro, reómetro, etc.). Sin embargo, no se ha generalizado su uso pues ocasionan deformación y ruptura del gel en formación (Abdelgawad et al., 2016), por lo que se han propuesto otros métodos de medida no destructivos como los eléctricos, térmicos, ultrasónicos y ópticos (Cipolat-Gotet et al., 2012), siendo los métodos ópticos los que están despertando grandes expectativas por la gran evolución de los sistemas de fibra óptica y de procesado automático (Payne y Castillo, 2007). Hasta la fecha, no se ha conseguido un sistema completamente eficaz y fiable para determinar, de forma objetiva, el tiempo óptimo de corte de la cuajada, aunque el sensor óptico de dispersión de luz CoAguLite, que utilizaremos en este trabajo, ha demostrado ser capaz de reproducir fielmente el tiempo de corte establecido por el maestro quesero (Arango et al., 2015). Sin embargo, un nuevo método de predicción basado en algoritmos que traducen la señal óptica del sensor CoAguLite en medidas de módulo elástico del gel (Pa) y que ha sido desarrollado por la UAB y patentado recientemente, permite por primera vez utilizar un sistema contrastado y no destructivo de monitorización de la coagulación para la determinación de la dureza del gel en tiempo real, lo que permitirá al productor cortar el gel al alcanzar la dureza deseada sin necesidad de intervención humana.

## Capítulo II. Revisión bibliográfica

### 2.1 Características de la leche para la elaboración de queso

La elaboración del queso data de hace muchos siglos, encontrándose restos de este producto en cerámicas hacia el año 6000 A.C. Las formas de elaboración han evolucionado a tal punto que ahora existen más de 2000 variedades de queso en todo el mundo (Tunick, 2014). Este producto puede ser obtenido por un proceso de coagulación de la leche utilizando enzimas proteolíticas provenientes de los estómagos de rumiantes y también de vegetales como las flores de cardo o el látex de la higuera entre otros, que también puede ser acompañado por acidificación provocada por bacterias lácticas (Walstra et al., 2006). A continuación, se describirá tanto la composición química de la leche utilizada para la elaboración de queso, como la estructura básica de la micela de caseína por su implicación funcional en la evolución de la coagulación enzimática de la leche.

#### 2.1.1 Composición química

Los quesos se pueden elaborar a partir de diferentes tipos de leche ya sea de vaca, oveja o cabra, teniendo la leche de oveja mayor contenido en sólidos y caseína. Por otro lado, a la leche de cabra se le han atribuido algunos beneficios terapéuticos en los últimos años por un menor contenido de caseína y lactosa (Fox et al., 2015). Sin embargo debido a la falta de un suministro regular durante todo el año a las plantas de procesado, se prefiere la leche de vaca para la elaboración de quesos (Temizkan et al., 2014). La **Tabla 1** muestra la composición media de las leches de las diferentes especies productoras. La caseína, que es el principal tipo de proteína en la leche, forma la estructura del queso que atrapa la grasa, la cual contribuye a la textura y *flavor* de los quesos. Por otro lado, la lactosa, que es el carbohidrato de la leche, será importante durante la etapa de maduración formando ácido láctico. Además de las diferencias entre especies, la composición de la leche de una especie en particular variará también con la individualidad del animal, raza, estado nutricional, estado de lactancia, edad, intervalo entre ordeños, salud (mastitis y otras enfermedades) y la etapa de lactancia (McSweeney, 2007).

**Tabla 1.** Composiciones típicas (%) de las leches de las principales especies lecheras

| <b>Especie</b> | <b>Sólidos<br/>totales</b> | <b>Grasa</b> | <b>Proteína</b> | <b>Lactosa</b> | <b>Cenizas</b> |
|----------------|----------------------------|--------------|-----------------|----------------|----------------|
| <b>Vaca</b>    | 12,7                       | 3,7          | 3,4             | 4,8            | 0,7            |
| <b>Cabra</b>   | 12,3                       | 4,5          | 2,9             | 4,1            | 0,8            |
| <b>Oveja</b>   | 19,3                       | 7,4          | 4,5             | 4,8            | 1,0            |
| <b>Búfala</b>  | 16,0                       | 3,7          | 6,9             | 5,2            | 0,8            |

Reproducido de Fox et al. (2015).

### **Grasa**

La grasa existe en la leche natural en forma de pequeños glóbulos rodeados por proteínas de membrana y en un rango de tamaños dependiente de la raza, el estado de lactancia y la dieta de la vaca (Walstra, 2006). La grasa en la leche contribuye a generar sabor, aroma y cuerpo en el queso maduro. Los glóbulos de grasa quedan físicamente atrapados en la red de proteínas creada durante la formación del gel. Por otro lado, los glóbulos de grasa desempeñan un papel de relleno inerte al influir en las propiedades reológicas de la cuajada, pero no desempeñan un rol activo en la formación de gel (Horne y Banks, 2004).

### **Proteínas de la micela**

Las caseínas son la clase más importante y abundante de proteínas de la leche y se utilizan ampliamente como ingredientes alimentarios, debido principalmente a su capacidad hidratante, emulsionante, espumante, gelificante y espesante. En la leche, las caseínas están agrupadas en estructuras esféricas denominadas micelas. Las micelas contienen  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína, en proporciones de ~4,3: 1: 4,4: 1,6 en peso respectivamente para leche de vaca Holstein (De Vries et al., 2015). Las  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - y  $\beta$ -caseínas son altamente fosforiladas y sensibles al calcio y la  $\kappa$ -caseína insensible al calcio. En general, se considera que la  $\kappa$ -caseína está presente en la superficie de las micelas mientras  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -caseínas constituyen el núcleo hidrófobo interior (Dalglish y Corredig, 2012). La estructura de la micela de caseína será estudiada con más detalle en la sección 2.1.2.

## Proteínas del suero

Las proteínas del suero se definen como el grupo de proteínas de la leche que permanecen solubles en el suero de leche después de la precipitación de la caseína a pH 4,6 y 20 °C. Las aplicaciones más habituales se dan en productos de panadería, carnes procesadas, pastas, helados, confitería, alimentos infantiles, productos para untar, salsas y bebidas. Las proteínas del suero se componen de dos fracciones principales:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) y  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -La) que representan, respectivamente, 54% y 21% de la masa de proteínas de suero. Tanto la  $\beta$ -Lg como la  $\alpha$ -La son proteínas globulares que consisten respectivamente en 162 y 123 residuos de aminoácidos (Hussain et al., 2012). En la **Tabla 2** se muestran los contenidos proteicos de algunas especies.

**Tabla 2.** Contenido proteico (%) en la leche de algunas especies

| Espece | Caseína | Proteínas del suero | Total |
|--------|---------|---------------------|-------|
| Vaca   | 2,8     | 0,6                 | 3,4   |
| Cabra  | 2,5     | 0,4                 | 2,9   |
| Oveja  | 4,6     | 0,9                 | 5,5   |
| Búfala | 3,8     | 0,9                 | 4,7   |

Reproducido de Fox, et al. (2017).

## Calcio

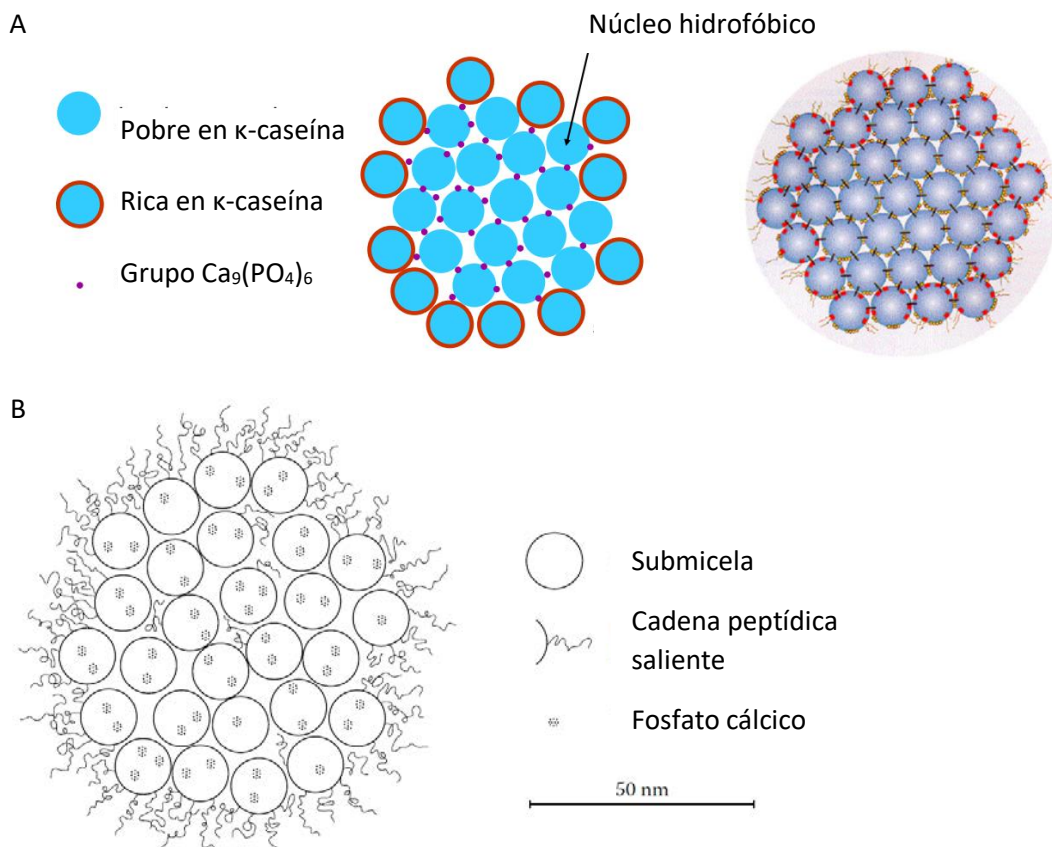
El calcio en la leche está en equilibrio entre las fases micelar y sérica. En la fase sérica, el calcio se encuentra principalmente libre o asociado al citrato y, en menor grado, al fosfato inorgánico, al cloruro y a la  $\alpha$ -La. En la fase micelar, el calcio está presente como fosfato de calcio coloidal (CCP), unido a las micelas de caseína (Koutina et al., 2015). Se sugiere que el CCP, de carga positiva, está enlazado a residuos de serina fosforilados cargados negativamente en las micelas de caseína, neutralizando así su carga y proporcionándole cierta estabilidad y estructura (Horne, 2006).

### 2.1.2 Estructura de las micelas de caseína

Las micelas tienen un diámetro que va de 100 a 300 nm, aunque algunas partículas pueden ser tan pequeñas como 50 nm en leche reconstituida a partir de leche desnatada en polvo (Udabage et al., 2003). Recientemente, se ha

afirmado que una población de minimicelas con diámetros de 20 a 40 nm, observadas por métodos de dispersión de luz, coexiste con las partículas más grandes, sin embargo, estas partículas no han sido separadas y analizadas (Müller-Buschbaum et al., 2007).

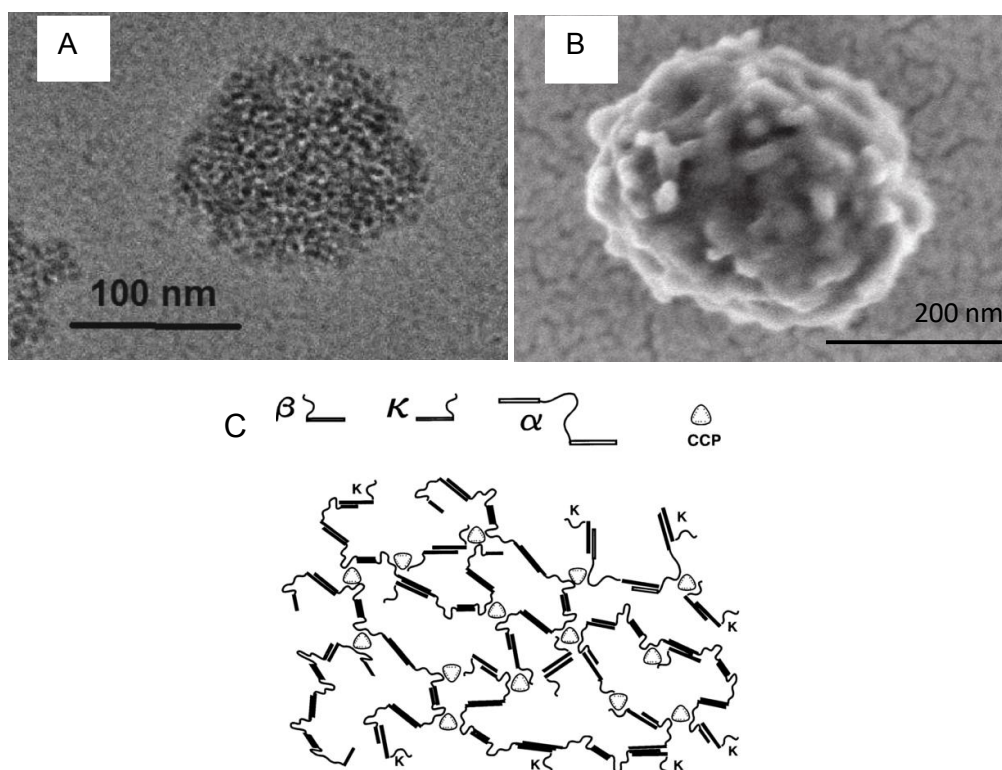
La estructura y las propiedades de las micelas de caseína se han estudiado durante décadas. Inicialmente, se consideró que las micelas se componían de subunidades discretas llamadas submicelas, unidas entre sí por pequeños dominios de fosfato de calcio (Schmidt, 1982). Una mejora a este modelo menciona que los grupos fosfato están en el interior de los núcleos hidrofóbicos y que no solo están constituidos por fosfato de calcio inorgánico, sino que contienen también fosfato orgánico de los residuos de SerP y probablemente algunos residuos de ácido glutámico (Walstra et al., 2006). La **Figura 1** muestra los dos modelos principales del tipo submicela.



**Figura 1.** A) Modelo de submicela según Schmit (1982). B) Modelo de submicela según Walstra et al. (1999). Reproducido de De Kruif et al. (2012).

Para estudiar la estructura de la micela de caseína se han utilizado las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM). La

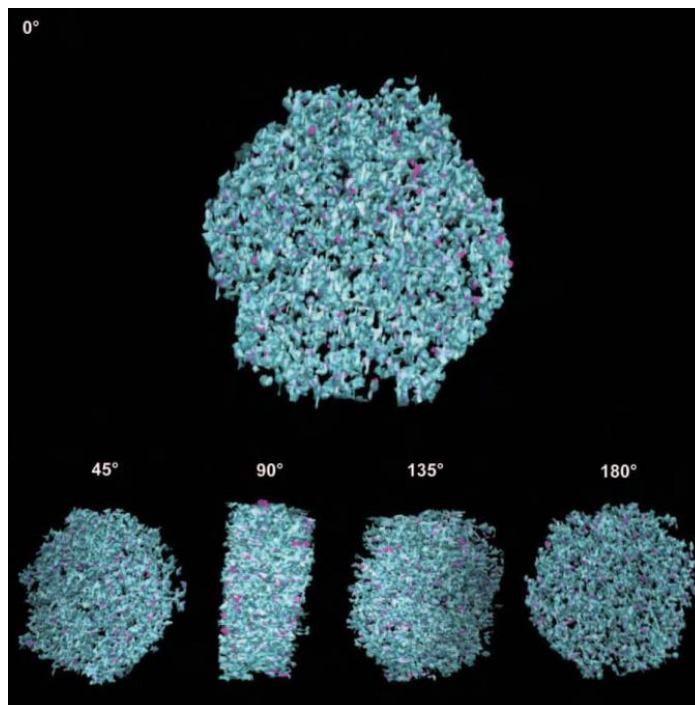
microscopía electrónica de transmisión (TEM) parecía sugerir que el interior micelar era de una apariencia granular consistente con la presencia de submicelas (McMahon y Oommen, 2008). Sin embargo la microscopía electrónica de cryo-transmisión (crio TEM) no mostró una estructura submicelar (Trejo et al., 2011). Modelos recientes sugieren que las micelas se forman mediante la agregación de caseínas como resultado de las interacciones caseína-caseína y fosfato de calcio coloidal (CCP) (Horne, 2014). Según el modelo de doble enlace de Horne (1998), ampliamente aceptado actualmente,  $\alpha_s$ - y  $\beta$ -caseína interactúan primero a través de regiones hidrofóbicas entre sí; a continuación, los restos de fosfoserina hidrófilos de  $\alpha_s$  y  $\beta$ -caseínas forman grupos de fosfoserina, estabilizados mediante la incorporación de fosfato de calcio coloidal (CCP). El crecimiento de la micela se termina por la glicoproteína  $\kappa$ -caseína situada en la superficie de las micelas ya sea como una capa pilosa o en forma de cepillo (Dalgleish y Corredig, 2012). La **Figura 2** muestra la morfología y tamaño de las micelas de caseína utilizando las técnicas crio-TEM y SEM, así como su posible configuración teórica siguiendo el modelo de Horne (1998).



**Figura 2.** A) crio-TEM de micelas de caseína. Reproducido de Corredig y Salvatore (2016). B) SEM de micelas de caseína. Reproducido de Dalgleish y Corredig (2012). C) Modelo de doble enlace de Horne (1998). Reproducido de Fox et al. (2015).

Aunque la naturaleza exacta de la micela de caseína sigue siendo controvertida, todos los modelos están de acuerdo en que el CCP juega un papel crítico en la formación y la estabilidad micelar (Choi et al., 2011). Por ahora la mayoría de los investigadores están usando el modelo de doble enlace de Horne (1998) como el enfoque más realista (Lucey, 2016).

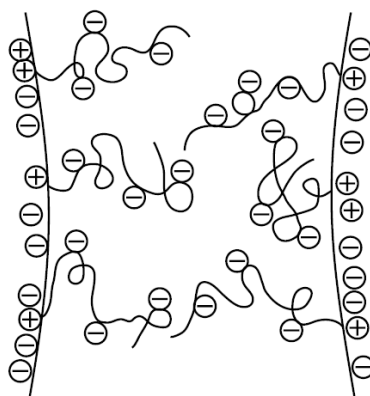
Por otro lado McMahon y Oommen (2008) y Trejo et al. (2011), observaron mediante TEM y *cryo*-TEM respectivamente, estructuras que interpretaron como canales de agua de distribución irregular. Se ha sugerido que los canales de agua dentro de la micela pueden estabilizarse mediante la interacción de moléculas de  $\beta$ -caseína con las porciones hidrófobas de los nanogrupos (*nanocluster* de fosfato de calcio coloidal) (Dalgleish, 2011). Se sabe que la micela es, en cierta medida, porosa dado que la  $\beta$ -caseína puede salir de la micela y volver a entrar durante el enfriamiento y el recalentamiento respectivamente. Así mismo, grandes moléculas pueden penetrar en la micela (Le Feunteun y Mariette, 2007). La **Figura 3** muestra una reconstrucción tomográfica de fotografías por *cryo*-TEM de una micela de caseína, en donde se pueden observar poros y canales internos (Trejo et al., 2011).



**Figura 3.** Representación del tomograma de la micela nativa de caseína, mostrada en 5 ángulos. La superficie azul muestra nanoagregados de proteína, mientras que la superficie rosa los nanogrupos de fosfato de calcio coloidal. Reproducido de Trejo et al. (2011).

Una interpretación más reciente del perfil SAXS (dispersión de rayos X de ángulo pequeño) ha sido propuesta por Bouchoux et al. (2010), a partir de estudios sobre la dispersión de micelas que se concentran y deshidratan progresivamente por estrés osmótico, donde se afirma que la micela contiene regiones duras de fosfato de proteína/calcio dentro de una estructura de tipo esponja altamente hidratada.

Las micelas en la leche se mantienen separadas una de otras debido a que las partes de la molécula de  $\kappa$ -caseína que sobresalen de la micela están cargadas negativamente, ejerciendo un efecto de repulsión entre ellas (Huppertz, 2013). La **Figura 4** esquematiza el efecto de repulsión entre dos micelas de caseína.

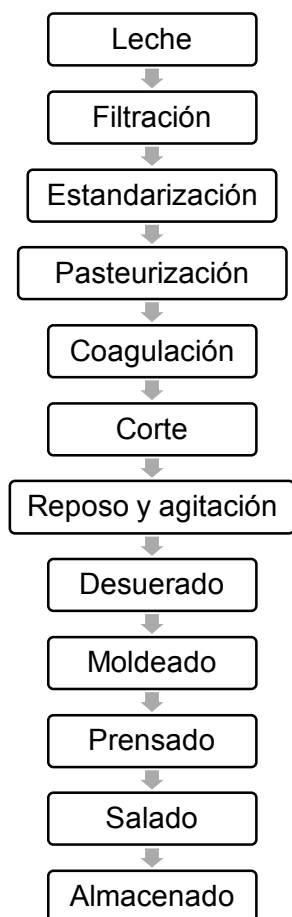


**Figura 4.** Imagen hipotética de las interacciones entre dos micelas de caseína. (A) Capas pilosas superpuestas y cargas electrostáticas. Reproducido de Walstra et al. (2006).

## 2.2 Etapas de elaboración de queso

Para la elaboración de queso se aplican diversas operaciones que varían ampliamente en todo el mundo e incluso dentro de cada país y entre las plantas queseras; esta variación también se da en función del tipo de queso a producir, por lo cual describiremos brevemente las operaciones que comúnmente se utilizan en las instalaciones de elaboración de quesos (**Figura 5**), centrándonos especialmente en las operaciones de coagulación y corte de cuajada (secciones 2.3 a 2.5).





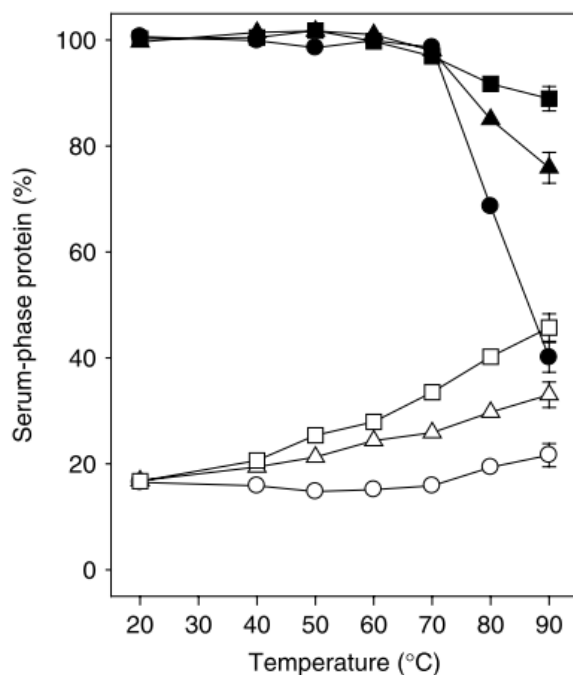
**Figura 5.** Diagrama de flujo de la elaboración de queso.

Entre los tratamientos anteriores a la coagulación tenemos el filtrado que se realiza utilizando filtros de malla inoxidable, que tiene por finalidad quitar partículas extrañas incorporadas durante el ordeño (Johnson, 2011). Otra operación que comúnmente se realiza es la estandarización del contenido de grasa y proteína de la leche; este procedimiento permite una normalización de la producción y mejora aún más la calidad bacteriana al someter a la crema a pasteurización (Walstra et al., 2006).

Otra operación importante es la pasteurización de la leche para queso la cual emplea una combinación mínima de tiempo y temperatura necesaria para matar a *Mycobacterium tuberculosis* (Fox et al., 2017). Inicialmente se utilizó la pasteurización discontinua (tiempo de baja temperatura a largo plazo, LTLT; 63-65 °C por 30 min), pero se reemplazó por pasteurización continua de tiempo corto (HTST) (72 °C por 15 s) cuando los intercambiadores de calor de placas se introdujeron en los años treinta (Westhoff, 1978). Pearce et al. (2012) demostraron que la mayor parte de las bacterias encontradas en la leche cruda

son lábiles al calor y mueren por pasteurización a 72 °C durante 15 s. A la mayoría de la leche para la elaboración de queso se le da este tratamiento térmico; sin embargo, algunas empresas pueden adoptar temperaturas más altas, p. ej. 73–78 °C por 20–30 s, como una medida de seguridad para reducir cualquier riesgo adicional de supervivencia de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Egger et al., 2016).

Los tratamientos térmicos tienen efectos adversos sobre el tiempo de gelificación y un efecto positivo en el rendimiento quesero debido a un mayor contenido de humedad y la recuperación más eficaz de proteínas de suero (Wang et al., 2012). Las proteínas del suero se desnaturalizan con la pasteurización, a temperaturas > 65 °C. Su sensibilidad al calor sigue el siguiente orden:  $\alpha$ -La <  $\beta$ -Lg < albúmina sérica bovina (BSA) < inmunoglobulinas (Igs) (Sakkas et al., 2014). Una vez desnaturalizadas, las proteínas del suero pueden reaccionar con la caseína de las micelas. La interacción implica reacciones de intercambio de enlaces tiol-disulfuro entre los tioles libres de las proteínas de suero desnaturalizadas (particularmente  $\beta$ -Lg) y los enlaces disulfuro de la  $\kappa$ -caseína. Como los enlaces disulfuro de la  $\kappa$ -caseína se encuentran en la región para- $\kappa$ -caseína, las proteínas de suero desnaturalizadas permanecerán con la para- $\kappa$ -caseína (micelas) después de la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína por quimosina. (Anema et al., 2007). Se ha estudiado el efecto del pH en la asociación de proteínas de suero desnaturalizadas a las micelas de caseína durante el tratamiento térmico a 90 °C de leche en polvo reconstituida (**Figura 6**) y se ha determinado que a pH natural de la leche (6,7) existe cerca de 35% de proteína sérica asociada mientras que a 6,5 existe alrededor de 71% asociada (Anema, 2008). Por lo tanto, el tratamiento térmico de la leche antes de la elaboración del queso es de interés considerable, ya que parece tener el potencial para aumentar sustancialmente el rendimiento mediante la incorporación de las proteínas de suero en la cuajada de queso (Taterka y Castillo, 2015, 2018). Sin embargo este tratamiento debe ser controlado porque puede llegar a inhibir considerablemente la gelificación de la leche a su pH natural, si esta se calienta a más de 90 °C durante un tiempo superior a 10 min (Sandra y Dalglish, 2007).



**Figura 6.** Porcentaje de proteína en suero: sérica (símbolos sólidos) y  $\kappa$ -caseína (símbolos vacíos), en muestras de leche calentadas durante 15 min a diferentes temperaturas. Las muestras de leche se ajustaron a pH 6,5 (●,○), pH 6,7 (▲,△) y pH 6,9 (■,□) antes de calentar. Las barras de error representan las desviaciones estándar de las mediciones triplicadas. Reproducido de Anema (2008).

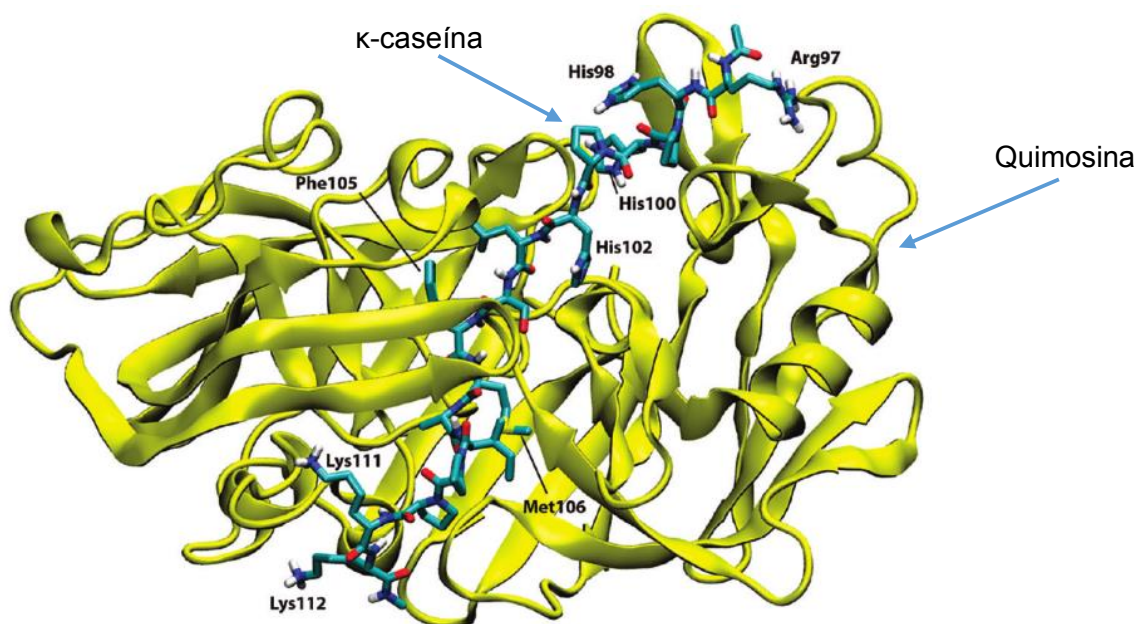
Otras operaciones poco frecuentes son la homogeneización y la concentración de proteína por ultrafiltración. La homogeneización es empleada por algunos fabricantes para la elaboración de quesos azules, feta y crema, ya que provoca un mayor grado de lipólisis, una mayor recuperación de grasa y un mayor contenido de humedad, lo que les confiere un color más blanco, un olor característico y una mayor cremosidad (Tunick, 2014). También ha sido utilizada por algunos fabricantes de variedades de queso de bajo contenido en grasa (Johnson, 2011). Por otro lado, se emplea la ultrafiltración (UF) para concentrar la leche desnatada antes de coagularla. Esta técnica permite la incorporación de una mayor cantidad de proteínas de suero nativas en la cuajada, debido al drenaje de suero de leche. Sin embargo, durante el proceso de concentración de la leche por UF, el tamaño de las micelas disminuye y, posiblemente, hay un reordenamiento mediante enlaces hidrófobos, hacia una estructura más compacta. Eso puede conducir a cambios físico-químicos durante la adición de cuajo, lo que resulta en un aumento en la firmeza de la cuajada (Catarino et al., 2013).

Se pueden hacer otros tratamientos a la leche como: bacto-fugado, adición de NaCl (en caso de algunos quesos frescos) y adición de  $\text{CaCl}_2$  para que exista suficiente  $\text{Ca}^{+2}$  disponible para la formación de la cuajada, adición de cultivos iniciadores y adición de  $\text{KNO}_3$  para controlar el crecimiento de bacterias butíricas y coliformes (Guamis y Trujillo, 2014; Verruck et al., 2015).

### 2.3 Coagulación enzimática

La coagulación de la leche puede realizarse por vía enzimática o ácida. La coagulación enzimática de la leche es el proceso en el que la leche líquida se transforma en un coágulo semisólido viscoelástico por la aplicación de enzimas específicas llamadas genéricamente quimosinas. Estas enzimas actúan sobre la  $\kappa$ -caseína de la leche, fragmentando parcialmente estas moléculas (Budelli et al., 2014). Tradicionalmente, la formación de la cuajada es causada por la adición de un extracto del abomaso de los terneros lactantes. Sin embargo, en la zona del Mediterráneo también se utiliza cuajo en pasta de pequeños rumiantes (corderos o cabritos) para producir quesos. En este caso, los quesos se caracterizan por un complejo perfil de flavor debido a una mayor presencia en los extractos de lipasas gástricas y pre-gástricas. Los extractos de cuajo animal se componen principalmente de tres enzimas, que pertenece a la familia de las aspártico proteasas: quimosina, la pepsina A, y gastricsina. Las dos primeras enzimas son mayoritarias frente a la gastricsina, cuya actividad hidrolítica sobre las caseínas no ha sido excesivamente estudiada. La proporción de estas enzimas depende del régimen de alimentación y, especialmente, de la edad del animal al sacrificio. En particular, la proporción de pepsina aumenta en el ganado adulto, mientras que la quimosina está reducida (Corredig y Salvatore, 2016).

La enzima más utilizada para la coagulación de la leche es la quimosina, pues a diferencia de la pepsina A y gastricsina, esta tiene acción específica escindiendo la  $\kappa$ -caseína en el enlace peptídico Phe105-Met106, produciendo para- $\kappa$ -caseína hidrófoba y un macropéptido de caseína hidrófilo (Jaros et al., 2008). La **Figura 7** representa la interacción de la quimosina con la  $\kappa$ -caseína. La quimosina es un polipéptido de cadena única que contiene aproximadamente 323 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 35.600 Da. La molécula dispone de dos dominios separados por la hendidura del sitio activo en la que están localizados los dos residuos de aspartilo catalíticamente activos (Ansari et al., 2016).



**Figura 7.** El complejo de quimosina-κ-caseína después de 17 ns de simulación de dinámica molecular. Reproducido de Palmer et al. (2010).

Existen otras fuentes de enzimas para la elaboración de queso como la encontrada en la planta de cardo (*Cynara cardunculus*), que se utilizan como un coagulante de la leche para la fabricación de determinadas variedades de quesos tradicionales. Estos extractos contienen aspártico proteasas que poseen especificidad similar a la quimosina (escindiendo κ-caseína en el enlace peptídico Phe105-Met106) y menos específica, similar a la pepsina que produce una extensa degradación de la red de caseína, haciendo que el queso resultante tenga una textura suave y cremosa (Chen et al., 2003). Shah y Mir (2014) realizaron una revisión de las enzimas de origen vegetal que se han estudiado para la coagulación de la leche.

Las enzimas producidas por hongos tienen la ventaja de que sus enzimas extracelulares se recuperan fácilmente en los procesos de fermentación. Enzimas de coagulación de leche de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus oryzae* y *Endothia parasítica* ya se utilizan comercialmente (Alecrim et al., 2015). Los avances en la tecnología de separación y purificación son responsables de una mejora significativa de estas enzimas. Estas enzimas, sin embargo, difieren en la estructura molecular y en la actividad proteolítica; y todavía hay informes de que el rendimiento y la calidad del queso se ven

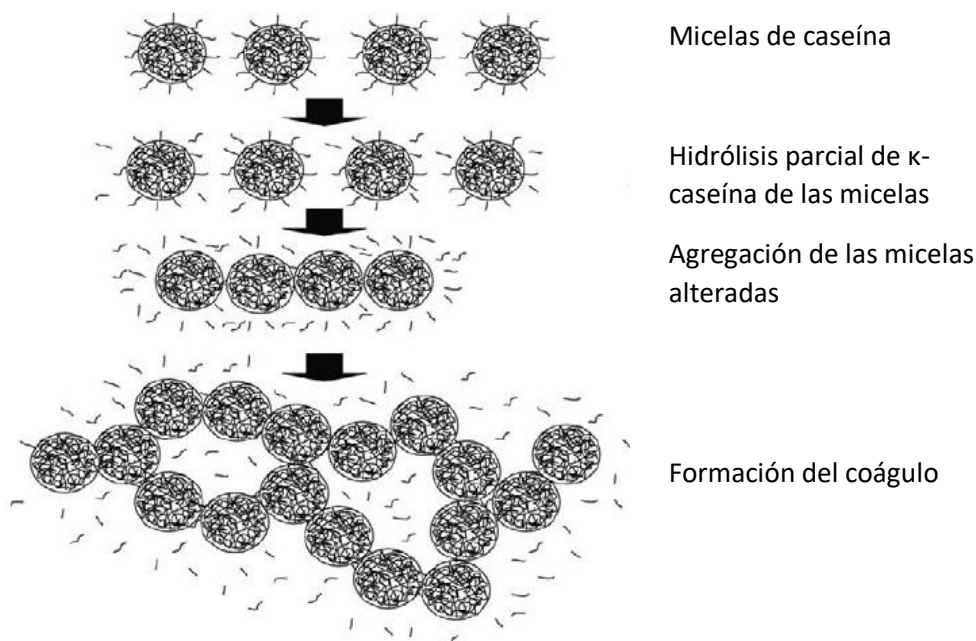
afectados negativamente debido a una mayor actividad proteolítica (Jaros et al., 2008; Jacob et al., 2011).

La quimosina recombinante a partir de diferentes fuentes tales como vaca, búfalo y, más recientemente, de cabra han sido explorados como alternativas adecuadas para el cuajo extraído del estómago de rumiantes. Entre ellas, la quimosina de cabra se ha defendido como un excelente sustituto de la quimosina bovina debido a sus mejores propiedades de eficiencia hidrolítica y a una mayor estabilidad térmica. Esto último tiene una ventaja añadida durante la producción de queso de alta temperatura, que utiliza bacterias termófilas tales como *Streptococcus thermophilus*. Esta enzima ha sido expresada en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris* (Tyagi et al., 2016).

La actividad coagulante de la quimosina se ha medido en varias unidades como las unidades Soxhelt (SU), las unidades de renina (RU) y las unidades internacionales de coagulación de la leche (IMCU), siendo esta última la más usada, para lo cual la leche debe estar a una temperatura de 32°C y a un pH de 6.5 (Tabayehnejad et al., 2012). La Norma IDF 157A: Norma de 1997 para la determinación de los coagulantes bovinos y la quimosina producida por fermentación y revisada posteriormente (IDF Standard 157: 2007 / ISO 11815) explica todos los por menores para realizar el ensayo (Fox et al., 2017).

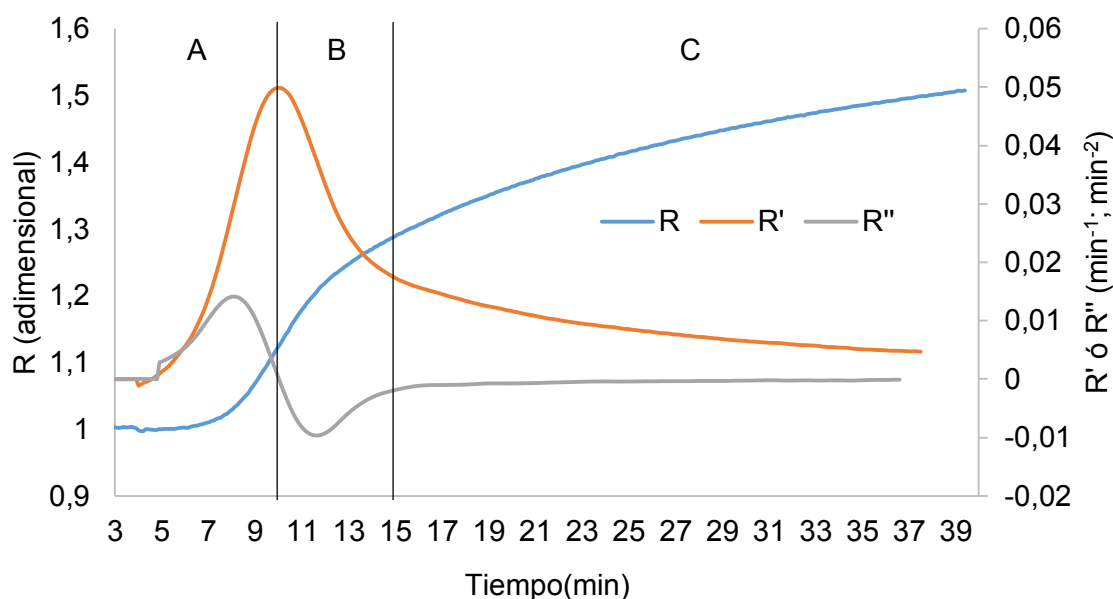
### **2.4 Fases de formación de la cuajada**

La transformación de la leche desde el estado líquido a gel tras la adición de la quimosina suele ser dividida en dos fases superpuestas: la fase enzimática y la fase de agregación (Gaygadzhiev et al., 2012). El endurecimiento se suele considerar como una continuación de la fase secundaria (agregación), pero requiere un enfoque e instrumentación diferentes para su estudio. Es el aspecto más complejo y, actualmente, menos conocido de la coagulación enzimática de la leche. Varios instrumentos están disponibles para estudiar las propiedades reológicas del gel y existe un interés particular en el desarrollo de métodos que pueden usarse para estudiar / cuantificar la gelificación en la cuba de queso (Fox et al., 2017). La **Figura 8** esquematiza el proceso de coagulación de la leche.



**Figura 8.** Proceso de coagulación de la leche. Reproducido de Lucey (2011).

Payne y Castillo (2007), que estudiaron la coagulación de leche de cabra utilizando un sensor de dispersión de luz NIR, describieron tres periodos que se solapan durante este proceso (**Figura 9**): A) el periodo correspondiente a la fase de hidrólisis enzimática que va desde la adición de la enzima hasta aproximadamente el punto de inflexión de la ratio de reflectancia ( $R$ ) o tiempo correspondiente al máximo de la primera derivada de  $R$  ( $t_{\max}$ ), B) el periodo sigmoideal correspondiente a la fase de agregación de las micelas que va desde  $t_{\max}$  hasta aproximadamente un valor de  $G' = 1$  Pa medido con un reómetro y C) el período asintótico correspondiente a la fase de endurecimiento que comienza desde que  $G' = 1$  Pa, hasta que se alcanza el punto óptimo de corte de la cuajada. Harboe et al. (2010) y Fox et al. (2017) también describen diferencias entre estas tres fases, pero desde el punto de vista de cambios de viscosidad y parámetros de reología. Según lo descrito anteriormente desarrollaremos las etapas de coagulación de la leche en base a este último enfoque ya que se adecua más a los propósitos de nuestro estudio.



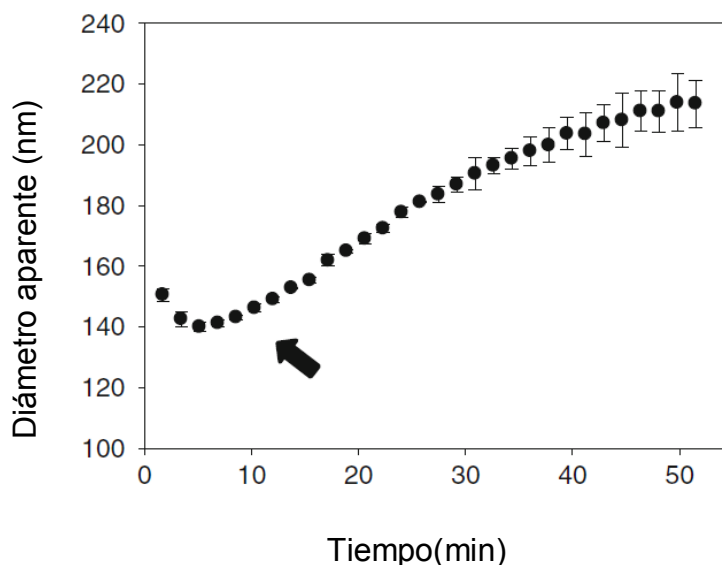
**Figura 9.** Curvas de coagulación de leche entera pasteurizada. R es la ratio de reflectancia, R' y R'' son la primera y segunda derivada de R respectivamente.

#### 2.4.1 Fase de hidrólisis enzimática

En esta primera fase de la coagulación predomina el proceso enzimático en el que la quimosina hidroliza la  $\kappa$ -caseína, formando dos péptidos como productos de reacción. Un péptido, el extremo  $\text{NH}_2$ -terminal o para- $\kappa$ -caseína, permanece asociado con la micela de caseína, mientras que el péptido  $\text{COOH}$ -terminal, el caseinmacropéptido (CMP), se libera en la fase de suero, ocasionando la desestabilización de las micelas de caseína (Anema et al., 2007).

Usando dispersión de luz dinámica sobre muestras de leche descremada diluida se ha determinado que durante la etapa de hidrólisis de la caseína se produce una reducción del diámetro de las micelas de caseína, como se muestra en la **Figura 10** debido a la liberación de CMP al suero. Esta reacción produce una disminución de la viscosidad de la leche. Sin embargo, esta disminución no es evidente cuando la adición de cuajo se produce a un pH más bajo que el pH natural de la leche, p. ej., a pH 6,2 (Gaygadzhiev et al., 2012; Corredig y Salvatore, 2016).





**Figura 10.** Cambio en el diámetro aparente de las micelas de caseína en función del tiempo, medida por dispersión de luz dinámica. La fase correspondiente a la eliminación de la capa pilosa de  $\kappa$ -caseína se indica con la flecha. Reproducido de Gaygadzhiev et al. (2012).

La reacción enzimática en la leche parece obedecer a una cinética de primer orden. La proteólisis de la  $\kappa$ -caseína se describe habitualmente por cinética estándar de Michaelis – Menten, cuya forma integrada está representada por la ecuación 1.

$$\left( \frac{[S_0] - [S]}{t} \right) = V_{\max} - K_M \frac{\left[ \ln \frac{S_0}{S} \right]}{t} \quad (1)$$

donde:

[S] : concentración de sustrato a tiempo t

[S<sub>0</sub>] : concentración inicial de sustrato

V<sub>max</sub> : velocidad máxima de proteólisis a una concentración de sustrato infinita

K<sub>M</sub> : constante de disociación del complejo enzima-sustrato, o constante de Michaelis – Menten.

Los valores más bajos de K<sub>M</sub> suelen estar asociados con sistemas enzimáticos más activos (Hyslop, 2003). Para la hidrólisis de  $\kappa$ -caseína bovina se han determinado valores de K<sub>M</sub> de 0,29 y 0,21 mM para la quimosina de camella y de vaca respectivamente (Møller et al., 2012). Se han obtenido diferentes resultados de K<sub>M</sub> con  $\kappa$ -caseína purificada, probablemente debido a una

accesibilidad más fácil de la enzima a un sustrato soluble de  $\kappa$ -caseína (Lucey, 2011).

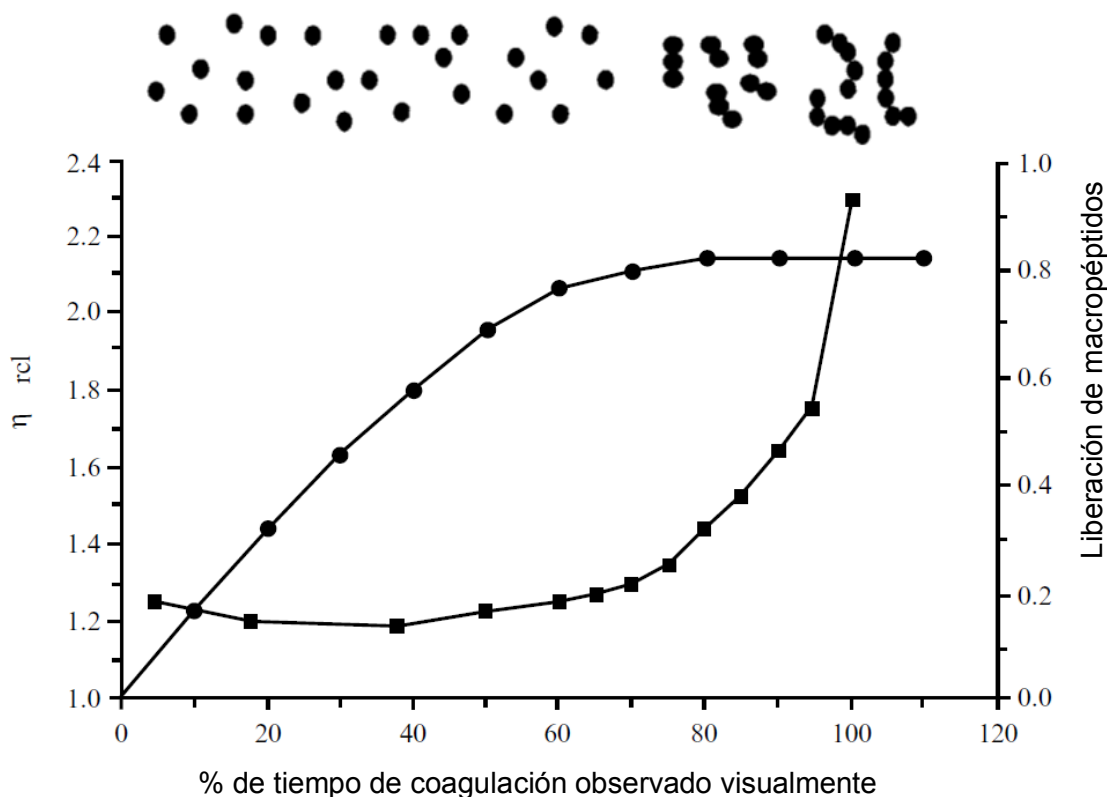
La fase de hidrólisis puede monitorizarse midiendo la formación de para- $\kappa$ -caseína o el CMP. La para- $\kappa$ -caseína puede medirse mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE), que es lenta y engorrosa, o por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de intercambio iónico (Fox et al., 2017).

El CMP es soluble en TCA (2-12% dependiendo de su contenido en carbohidratos) y puede ser cuantificada por el método de Kjeldahl o más específicamente determinando la concentración de ácido N-acetil neuramínico o por RP-HPLC. La actividad coagulante de los cuajos puede determinarse fácilmente usando sustratos de péptidos cromogénicos, algunos de los cuales están disponibles, p. ej., el hexapéptido Pro.Thr.Glu.Phe(NO<sub>2</sub>).Phe.Arg.Leu (Hurley et al., 1999).

#### **2.4.2 Fase de agregación**

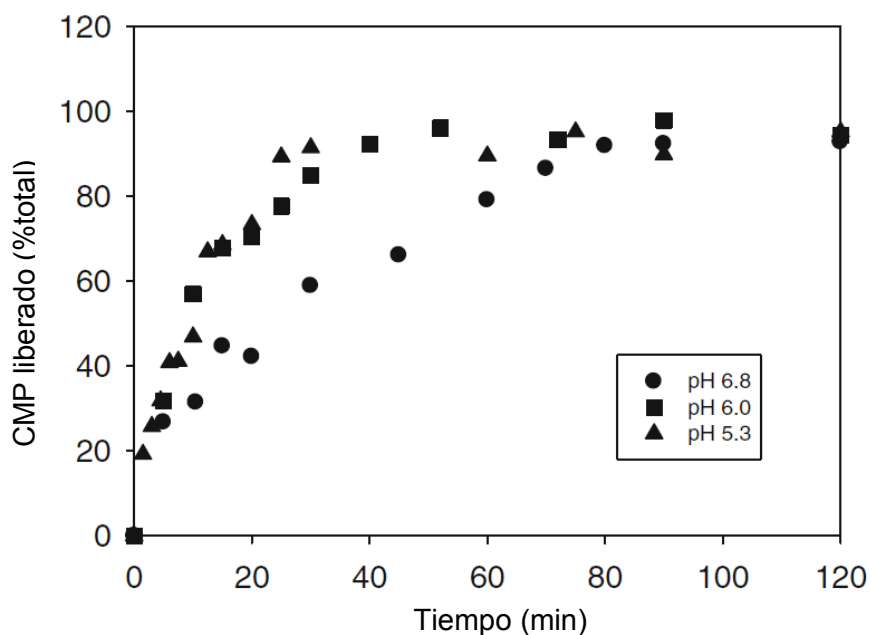
La segunda fase consiste en la agregación de micelas, que ocurre cuando existe suficiente  $\kappa$ -caseína hidrolizada –65-90% según Sinaga et al. (2016)– y si la actividad de iones de calcio y temperatura son adecuadas (Koutina et al., 2015). Inicialmente se forman pequeños agregados en forma de cadenas (**Figura 11**), en lugar de grumos (Fox et al., 2017). Esto podría explicarse por el modelo geométrico descrito por Dalgleish y Holt (1988), quienes plantean que dos micelas de caseína hidrolizadas solo se agregarán si tiene huecos suficientemente amplios en su superficie formados por  $\kappa$ -caseína hidrolizada y si colisionan en la orientación apropiada. No se conocen los sitios implicados en el proceso de agregación. El enlace inter-partícula podría ser a través de puentes de calcio y/o interacciones hidrofóbicas (Fox et al., 2017). La modificación de los residuos de histidilo, lisilo y arginilo en la  $\kappa$ -caseína inhibe la fase secundaria de la coagulación, lo que sugiere que un grupo cargado positivamente sobre la para- $\kappa$ -caseína interactúa electrostáticamente con sitios negativos no identificados. En las micelas nativas, este sitio positivo puede estar enmascarado o cubierto por el segmento macropeptídico de la  $\kappa$ -caseína, pero se vuelve expuesto y reactivo cuando se libera este péptido (Hill, 1970). También se han demostrado cambios en la hidrofobicidad superficial de las micelas de caseína durante la formación

de la cuajada a través de cambios en la unión del marcador fluorescente 8-anilino naftaleno-1-sulfonato (Peri et al., 1990; Iametti et al., 1993).



**Figura 11.** Liberación de macropéptidos (●) y cambios en la viscosidad relativa (■) durante el curso de la coagulación del cuajo. Adaptado de Fox et al. (2017).

La agregación, se debe en parte a la atracción de van der Waals, pero esta atracción es en sí misma insuficiente. La actividad necesaria de  $\text{Ca}^{2+}$  ya apunta a esto. Presumiblemente, el efecto de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  es doble. Primero, disminuyen la repulsión electrostática neutralizando cargas negativas en las micelas. En el intervalo de pH en cuestión, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  actúan más eficazmente que los iones  $\text{H}^+$ . En segundo lugar, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  pueden hacer puentes (enlaces salinos) entre sitios negativos sobre las micelas de paracaseína. También puede observarse que la reducción del pH de la leche aumenta considerablemente la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  (Walstra et al., 2006). La **Figura 12** muestra el porcentaje de CMP liberado en función del tiempo a diferentes pHs. Aquí podemos observar que a medida que el pH disminuye se necesita menos tiempo para liberar la cantidad de CMP necesario para causar la agregación de las micelas (Corredig y Salvatore, 2016).



**Figura 12.** Liberación de caseinmacropeptídeo durante la coagulación de la leche a diferentes valores de pH. Reproducido de Corredig y Salvatore (2016).

El tiempo de coagulación de Berridge o tiempo de coagulación visual es el tiempo donde se visualizan los primeros flóculos de caseína hidrolizada en las paredes de un tubo de vidrio (Klandar et al., 2007). La reacción enzimática primaria se ha completado en ~85% a un tiempo equivalente al 60% del tiempo de coagulación visual. Entre el 60 y el 80% del tiempo de coagulación visual, las micelas alteradas por el cuajo comienzan a agregarse de manera constante (Fox et al., 2017). Castillo et al. (2000), coagulando leche de cabra, encontraron que el inicio de la fase de agregación se podría determinar objetivamente utilizando un sensor de dispersión de luz NIR, señalando como inicio de la agregación el punto de inflexión del ratio de reflectancia, R, (**Figura 9**), el cual correspondió a un 88% del tiempo de coagulación de Berridge. Tabayehnejad et al. (2012), trabajando con leche en polvo descremada *low heat* y con la misma metodología, encontraron que el inicio de la agregación ocurre a un 84% del tiempo de coagulación de Berridge, confirmando dos hechos ineludibles: que la detección de un punto de agregación está determinada por la sensibilidad de la técnica de medición a la presencia de los agregados y también que los dos procesos, proteólisis y posterior agregación, se superponen en el tiempo (Horne, 2004). Por lo tanto, se propuso el valor de  $t_{max}$  como un valor objetivo de tiempo de inicio de la agregación (Castillo et al., 2003a; Tabayehnejad et al., 2012).

Se han hecho muchos intentos para modelizar las reacciones de hidrólisis y agregación; uno de los primeros fue el de Holter (1932) quién considero la duración de la fase de hidrólisis ( $t_h$ ) y el tiempo de agregación ( $t_a$ ), definiendo el tiempo de coagulación como  $t_c = t_h + t_a$ . Posteriormente, Foltmann (1959) propuso la siguiente ecuación para  $t_c$ :

$$t_c = \frac{C}{[E_0]} + t_a \quad (2)$$

donde:

$t_c$  : tiempo de coagulación

$E_0$  : concentración de la enzima

$C$  : constante

Esta relación es puramente empírica, pero es una relación importante que debe ser satisfecha por cualquier modelo mecanicista más descriptivo, aunque sólo sea sobre un rango restringido de concentración de enzima y valores de  $t_c$ . Sin embargo, la ecuación supone que no hay superposición entre la proteólisis y la fase de agregación (Foltmann, 1971).

Payes (1976) y Payens et al. (1977) propusieron un modelo para la agregación sobre la base de la cinética de Michaelis – Menten para la hidrólisis y una cinética de agregación de Smoluchoski. Consideraron que las micelas se agregaban en proporción exacta a la cantidad de  $\kappa$ -caseína escindida. Así, en las primeras etapas de la reacción, la proteólisis sólo puede haber creado pequeñas concentraciones de micelas que pueden agregar. Por lo tanto, habrá un período de retraso durante el cual no se observará un gran efecto de la enzima sobre el tamaño medio de partícula. Este modelo describió bien la cinética de la coagulación de la  $\kappa$ -caseína aislada tratada con pepsina (Dalgleish, 1993). El problema principal con el modelo fue que, para describir la coagulación de la leche, la constante de velocidad para la floculación ( $k_s$ ) de las micelas hidrolizadas encontrada experimentalmente fue muy baja ( $5 \times 10^5 \text{ mL mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) comparada con la tasa controlada por difusión ( $6.6 \times 10^{12} \text{ mL mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Dalgleish et al., 1981; Dalgleish, 1983; Brinkhuis y Payens, 1984; Hyslop, 2003).

Dalgleish (1980) propuso el modelo de función escalonada, utilizando una distribución binomial. Este modelo se basa en la idea de que la enzima actuaría

sobre la superficie de la micela de forma aleatoria y que un nivel crítico de proteólisis se debe alcanzar antes de que la agregación sea posible; menciona que las fases de hidrólisis y agregación se puede modelar teniendo en cuenta que se necesita que alrededor del 97% de la  $\kappa$ -caseína en una micela sea hidrolizada para que pueda participar en la agregación.

El modelo de barrera de energía propuesto por Darling y Van Hooydonk (1981) se basa en la idea de que una barrera de energía se reduce gradualmente debido a la proteólisis, lo que conduce a una probabilidad creciente de colisión en la reacción de agregación. Este modelo de barrera de energía ha sido probado extensamente (Horne y Bank, 2004). En este modelo la constante de velocidad de agregación  $k_{ij}$  es dependiente del tiempo.

Hyslop (1993) y Hyslop y Qvist (1996) propusieron el modelo de funcionalidad, el cual se basa en que la eliminación continua de CMP conduciría a múltiples huecos sobre la superficie de la micela y que, por tanto, la constante de velocidad de agregación  $k_{ij}$  debería ser una función del número de sitios reactivos libres sobre las partículas de agregación, lo que llevó a tener las condiciones necesarias para un modelo polifuncional del tipo Flory-Stockmayer (Stockmayer, 1943):

$$k_{ij} = K[4 + 2(f - 2)(i + j) + (f - 2)^2ij] \quad (3)$$

donde:

K : factor de proporcionalidad

f : número de sitios funcionales (funcionalidad)

ij : número de partículas de tipo i,j

Si  $f = 1$ , sólo es posible la formación de dímeros, mientras que si  $f = 2$ , el modelo predice polímeros lineales y si  $f > 2$ , se produce la ramificación de la cadena y es posible la gelificación. Al principio, a tiempo  $t = 0$ ,  $f = 0$ , las micelas no tienen reactividad o inclinación para agregarse (Horne y Bank, 2004). Sin embargo, Fox et al. (2017) menciona que la velocidad de agregación no es consistente con un modelo de proceso de ramificación ya que la funcionalidad micelar es 1,8, mientras que se requiere una funcionalidad media mayor que 2 para la formación de la red.

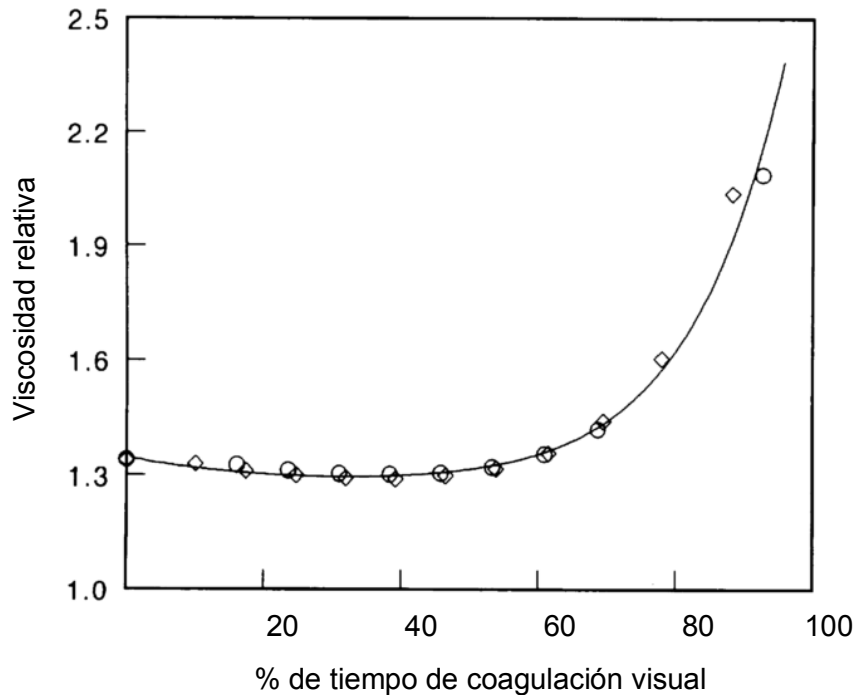
Las reacciones que conducen hasta la agregación de las micelas hidrolizadas también se han estudiado usando la teoría de esfera dura adhesiva (AHS), propuesta por De Kruif (1992, 1999). La teoría ha estimado con éxito los cambios de viscosidad hasta el punto donde ocurre la agregación (Lucey, 2011). En lugar de atribuir el aumento de viscosidad a la formación de agregados, De Kruif propuso un mecanismo diferente basado en el tratamiento de las micelas de caseína como esferas rígidas estéricamente estabilizadas que se vuelven pegajosas, o adhesivas, a medida que la  $\kappa$ -caseína está siendo proteolizada, y describe la viscosidad relativa de la leche descremada como:

$$n_r = 1 + 2.5\Phi + \left(5.9 + \frac{1.9}{\tau}\right)\Phi^2 \quad (4)$$

dónde  $\Phi$  es la fracción de volumen micelar y  $\tau$  un parámetro de pegajosidad relacionado con la profundidad ( $\epsilon$ ) de un potencial atractivo creado cuando las pilosidades de la  $\kappa$ -caseína se proteolizan.

Tras la adición de quimosina a la leche, hay una disminución inicial en la viscosidad que supera un mínimo antes de aumentar bruscamente a medida que progresa la coagulación (**Figura 13**). Por tanto los viscosímetros rotacionales proporcionan información limitada acerca de la coagulación, ya que la viscosidad de la leche cuajada tiende hacia el infinito al tiempo de coagulación visual (Castillo, 2006).

La disminución inicial en la viscosidad surge debido a la disminución en la fracción volumétrica hidrodinámica,  $\Phi$ , cuando la capa pilosa de  $\kappa$ -caseína se hidroliza. Esta disminución en el tamaño hidrodinámico se ha medido experimentalmente usando técnicas dinámicas de dispersión de luz en suspensiones micelares diluidas (Walstra et al., 1981) y concentradas (Horne y Davidson, 1993). Posteriormente, la viscosidad comienza a aumentar debido a la agregación y la formación de la red. Una desventaja importante del modelo de esfera adhesiva es que su dependencia del tiempo se relaciona mayormente con la reacción de proteólisis, lo que limita su uso a etapas preliminares de agregación y no puede aportar información sobre la cinética completa de agregación y formación de gel, eventos altamente significativos en la definición de las propiedades del gel (Horne y Bank, 2004).



**Figura 13.** Viscosidad relativa de leche descremada durante el proceso de coagulación. La línea dibujada representa el cálculo teórico en el que las micelas se consideran esferas duras adhesivas. Adaptado de De Kruif (1999).

Bremer et al. (1989) y Bremer et al. (1993) aplicaron la teoría de agregación de fractales a la floculación de partículas de caseína. Los agregados se pueden considerar como fractales si su estructura geométrica es similar cuando se ve sobre un rango razonablemente grande de escalas. Si la agregación se produce en las mismas condiciones, mientras que el número de partículas en un agregado se incrementa con el tiempo, se obtiene una relación entre el tamaño de un agregado y el número de partículas,  $N_p$ , que contiene:

$$N_p \propto \left(\frac{R}{a}\right)^D \quad (5)$$

donde:

- R : radio del flóculo
- a : radio de la partícula primaria
- D : dimensión fractal

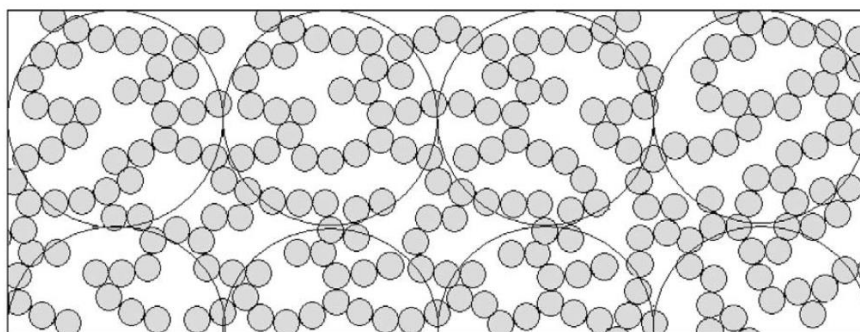
Suponiendo una esfera de radio R que contiene  $N_s$  partículas estrechamente empaquetadas, se obtiene la fracción volumétrica de las partículas en un agregado fractal,  $\phi_A$ , dada por:



$$\varphi_A = \frac{N_p}{N_s} \propto \left(\frac{R}{a}\right)^{D-3} \quad (6)$$

dado que invariablemente  $D < 3$  (en el espacio tridimensional), esto significa que la fracción de volumen de partículas  $\varphi_A$  disminuirá con valores crecientes de  $R$ ; es decir, a medida que crece el grupo (Walstra, 2003). A un cierto radio  $R_g$ ,  $\varphi_A$  será igual a la fracción volumétrica de partículas en el sistema  $\varphi$  y todos los agregados se tocarán, formando una red continua de gel (Lucey, 2011). Bremer et al. (1989) definen el punto de gel por este evento, lo que implica que todas las partículas presentes en el sistema se incorporan en los agregados. La verdadera cuestión es si esto se puede equiparar al punto de gel reológico reconocido experimentalmente, pero esta parece ser la suposición hecha (Horne y Bank, 2004).

La imagen de la red es entonces similar a la representada en la **Figura 14**, y en el punto de gel la fracción volumétrica obtenida es nuevamente la que había originalmente en la suspensión,  $\varphi$ .

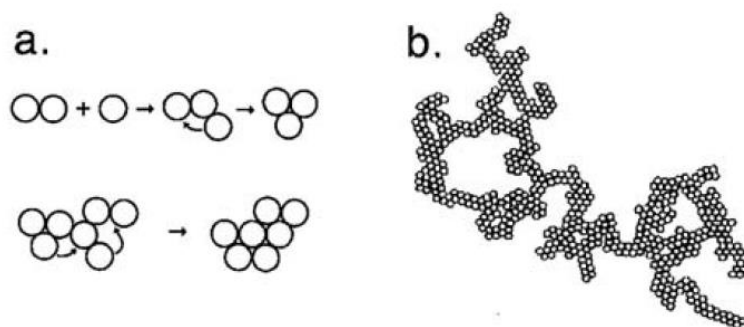


**Figura 14.** La formación de un gel débil en el que la mayoría de las partículas están ligadas débilmente a la red. Los círculos más grandes representan el concepto fractal 'blob'. Reproducido de Horne y Bank (2004).

Waltra (2003) menciona que también es posible un reordenamiento intermicelar a medida que los agregados se forman (reordenamiento a corto plazo); las partículas se enrollan unas sobre otras hasta que han obtenido un número de coordinación más alto, lo que implica una configuración más estable (**Figura 15**).

La dimensión fractal puede ser obtenida de la pendiente de la gráfica de  $\log B$  y  $\log \varphi$ , siendo  $B$  la permeabilidad del gel (Mellema et al., 2000). Se ha calculado valores de 2,2 a 2,25 para geles obtenidos por coagulación enzimática (Walstra,

2003). La dimensión fractal también puede ser calculada mediante microscopía laser de exploración confocal (Mellema et al., 2000).



**Figura 15.** Reordenamiento a corto plazo. (a) Reordenamiento de partículas. (b) Grupo fractal en dos dimensiones, donde se ha producido un reordenamiento a corto plazo. Reproducido de Waistra (2003).

Los diversos modelos mencionados anteriormente describen esencialmente el crecimiento en la masa molecular media del agregado micelar con el tiempo de reacción. La masa molecular media es fácilmente medible por técnicas estáticas de dispersión de luz (Horne y Bank, 2004). Sin embargo, debido a los problemas encontrados con la dispersión de luz múltiple, donde el fotón detectado ha encontrado más de un dispersor en su paso a través de la suspensión, estas técnicas son aplicables solamente en suspensiones altamente diluidas (Bauer et al., 1995) o en longitudes de trayecto muy cortas, como en las mediciones de turbidez de Lomholt et al. (1998). Una desventaja principal de estos modelos es que la mayoría describen la agregación únicamente hasta el tiempo de coagulación visual, en gran parte debido a limitaciones relacionadas con las técnicas experimentales.

Los posibles mecanismos de agregación implicados en los geles de caseína, se están estudiando ahora usando simulaciones computacionales de dinámica browniana. Con este tipo de enfoque, se puede estudiar el comportamiento de agregación de partículas que tienen diferentes tipos de enlaces y barreras repulsivas. Esta técnica es muy útil en nuestra comprensión de cómo las interacciones de las partículas influyen en las propiedades de gelificación (Lucey, 2011).

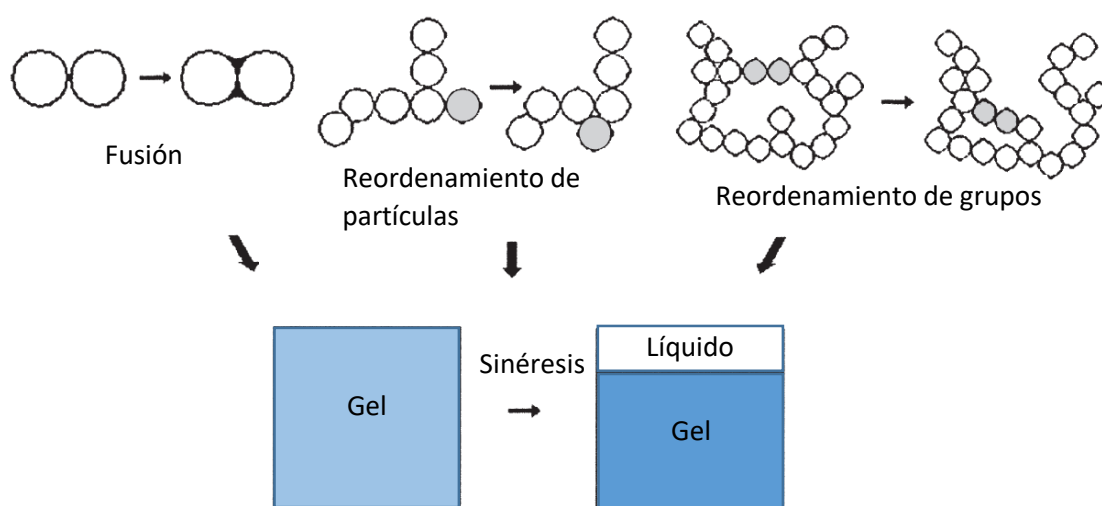
Para determinar el tiempo de coagulación de la leche, el método más empleado es el de Berridge. Se define como el tiempo de aparición visual de flóculos de

leche cuajada en la pared de un tubo de ensayo giratorio. El método del tiempo de coagulación de Berridge es algo subjetivo porque se basa en una identificación visual de la floculación, lo cual condiciona la precisión de esta observación (Tabayehnejad et al., 2012).

Para monitorizar la fase de agregación se han empleado diversos equipos que miden en la mayoría de los casos viscosidad, dispersión de luz y turbidez (Horne, 2004).

### 2.4.3 Fase de endurecimiento

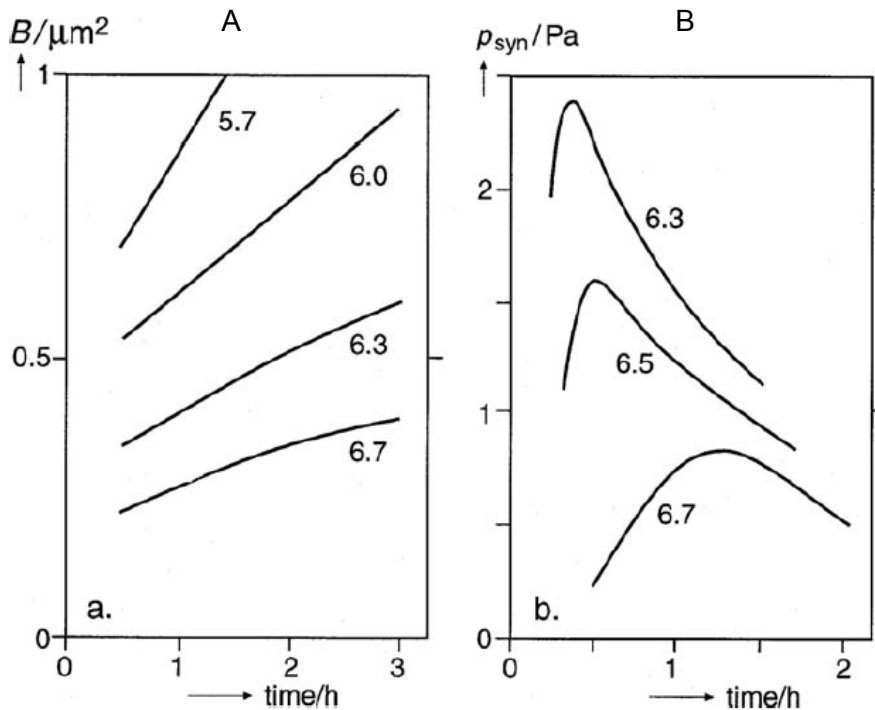
Con todas las partículas (micelas) ya unidas a la red en el punto de gelificación, la única manera en que la firmeza del gel puede crecer con el tiempo a partir de entonces es a través de fusiones y reordenamientos de las partículas y grupos, fenómeno conocido como “envejecimiento” (Mellema et al., 2002). Varios estudios experimentales han considerado específicamente el efecto de reordenamiento en el contexto de una descripción fractal de la estructura del agregado o del gel. Estos incluyen estudios microscópicos (Mellema et al., 2000) y reológicos (Bremer, 1992) sobre geles de caseína. En base a estos estudios, Mellema et al. (2002) consideró cuatro niveles de reordenamiento: fusión de partículas, reordenamiento de partículas, reordenamiento de grupos y sinéresis, siendo esta última consecuencia de las tres anteriores (**Figura 16**).



**Figura 16.** Niveles de reordenamiento durante las fases de agregación y endurecimiento. Adaptado de Horne y Bank (2004).

La fusión y el reordenamiento de partículas hacen que los agregados sean más densos, esto puede conducir a esfuerzos de tracción en los filamentos próximos

a los agregados y producir su ruptura y reordenamiento, dando lugar a un proceso de microsinéresis, expulsando el suero retenido a poros en crecimiento. La ruptura extensiva de los filamentos en el sistema terminará por inducir la sinéresis (Mellema et al., 2002). Se ha observado un crecimiento del valor de permeabilidad (B) y presión de sinéresis endógena ( $p_{syn}$ ) después de la formación de geles obtenidos por cuajo (**Figura 17**), lo que indica el crecimiento de poros en el interior del gel durante las primeras etapas de la gelificación. Una vez que el gel se ha formado completamente, el valor de la presión de sinéresis endógena ( $P_{syn}$ ) comienza a descender producto, ya, de la sinéresis (Walstra, 2003).



**Figura 17.** Cambios en los geles de cuajo a diversos valores de pH (indicados) en función del tiempo después de la adición del cuajo, a 30°C. (A) Permeabilidad B. (b) Presión de sinéresis endógena  $p_{syn}$ . Reproducido de Walstra (2003).

Se han elaborado varios modelos matemáticos para predecir el incremento de la firmeza del gel con el tiempo. Así, Scott Blair y Burnett (1958) propusieron un modelo empírico como sigue:

$$G(t) = G_{\infty} \exp\left(\frac{-\tau}{t - t_g}\right) \quad (7)$$

Este modelo describe el aumento del módulo de cizallamiento (G) con el tiempo más allá del punto de gel que se produce en  $t_g$ , siendo  $\tau$  una característica

constante de la muestra, determinada por ajuste y,  $G_{\infty}$  el valor del módulo de cizalla a  $t = \infty$ . Dejmek (1987) demostró que este modelo proporciona un buen ajuste a las curvas obtenidas experimentalmente, pero tiene residuos no aleatorios, lo que indica que la función puede no ser apropiada para su propósito.

Argumentando que la forma de la curva de crecimiento de  $G$  era similar a la de las reacciones autocatalíticas simples, Tuszynski (1971) propuso que la cinética de crecimiento sea ajustada por el modelo:

$$\frac{dG}{dt^*} = kG(G_{\infty} - G) \quad (8)$$

donde  $t^* = t - t_g$ ,  $G_{\infty}$  es el valor del módulo de cizalla a tiempo  $t = \infty$  y  $k$  es la constante de velocidad para el proceso, esencialmente un parámetro de ajuste. Sin embargo, el modelo no proporciona ninguna indicación de cómo los cambios en las variables de reacción influirán en el proceso de endurecimiento del gel al igual que el modelo de Scott Blair y Burnett. De hecho, ambos modelos presentan un comportamiento sigmoideal. El modelo de Tuszynski es una función simétrica, que predice que la inflexión se produce cuando  $G = 0.5G_{\infty}$ ; sin embargo, esto no se observa en la práctica.

Douillard (1973) propuso un modelo en el que la velocidad de cambio del módulo de cizallamiento con el tiempo seguía una cinética de primer orden:

$$\frac{dG}{dt^*} = k(G_{\infty} - G) \quad (9)$$

esta ecuación puede ser integrada para dar:

$$G = G_{\infty}[1 - \exp(-kt^*)] \quad (10)$$

Con la condición inicial de que  $G = 0$  en  $t = t_g$ .

Tokita et al. (1982) ajustaron sus curvas de cuajado a una ecuación de reacción de orden  $n$  y determinaron que la forma de primer orden, de la ecuación de Douillard, dio el mejor ajuste. Además, demostraron que el tiempo de gelificación,  $t_g$ , obtenido en estos estudios variaba inversamente con la concentración de enzima, y que el parámetro de velocidad,  $k$ , seguía una dependencia de la ley de potencia con la concentración de enzima con un exponente de 0,8:

$$k = C[E]^{0,8} \quad (11)$$

Aunque se aplica ampliamente, la ecuación de Douillard no reproduce la fase de aceleración inmediatamente después del punto de gel, una de las características más significativas observadas experimentalmente en las curvas de endurecimiento del gel obtenidas con reómetros modernos más sensibles. Por ello, Carlson et al. (1987a) propuso un modelo más complejo dado por:

$$G = G_{\infty} \left[ 1 - \left( \frac{k_1}{k_1 - k_f} \right) \exp(-k_f \cdot t^*) + \left( \frac{k_f}{k_1 - k_f} \right) \exp(-k_1 \cdot t^*) \right] \quad (12)$$

Donde  $t^* = t - t_g$ ,  $k_1$  es la constante de velocidad para la creación de sitios "activos" y  $k_f$  es la constante de velocidad para la destrucción de estos sitios, a medida que se incorporan a la red del gel. Esencialmente, el modelo prevé sitios 'activos' que se crean en micelas, que luego reaccionan entre sí para formar enlaces en la red de gel. Ambas reacciones, activación y destrucción, se consideran procesos de primer orden. La activación requiere la hidrólisis enzimática de la  $\kappa$ -caseína y, por lo tanto,  $k_1$  emerge como proporcional a la concentración de la enzima.

Otro enfoque es la descripción de la cinética del cambio de dispersión de luz durante la etapa de endurecimiento del gel propuesto por Castillo et al. (2003b). El modelo considera una reacción de primer orden para esta etapa:

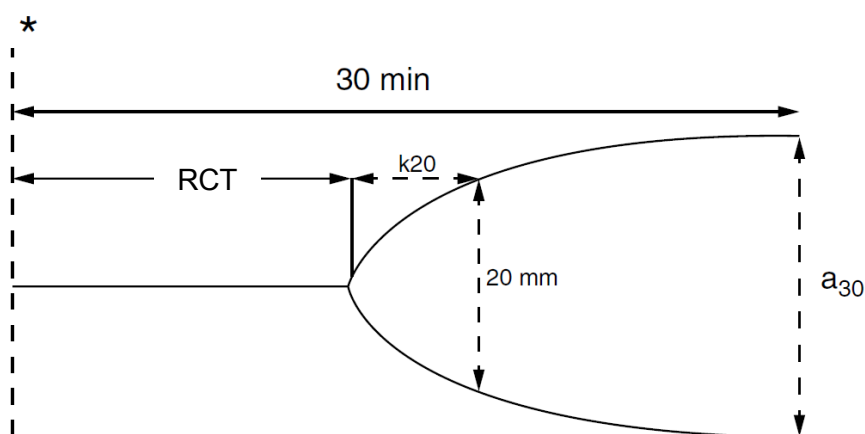
$$R_f = R_{\infty} - (R_{\infty} - R_0) e^{-k_1 \cdot (t - t_0)} \quad (13)$$

donde:

- $R_f$  : ratio de reflectancia a tiempo  $t - t_0$ ,
- $R_{\infty}$  : ratio de reflectancia a  $t = \infty$ ,
- $R_0$  : ratio de reflectancia a  $t_0$ ,
- $k_1$  : constante de velocidad de reacción de primer orden,
- $t$  : tiempo después de la adición de la enzima,
- $t_0$  : tiempo de inicio de la reacción de endurecimiento igual a  $t_{2min}$  de la segunda derivada de la ratio de reflectancia  $R$ .

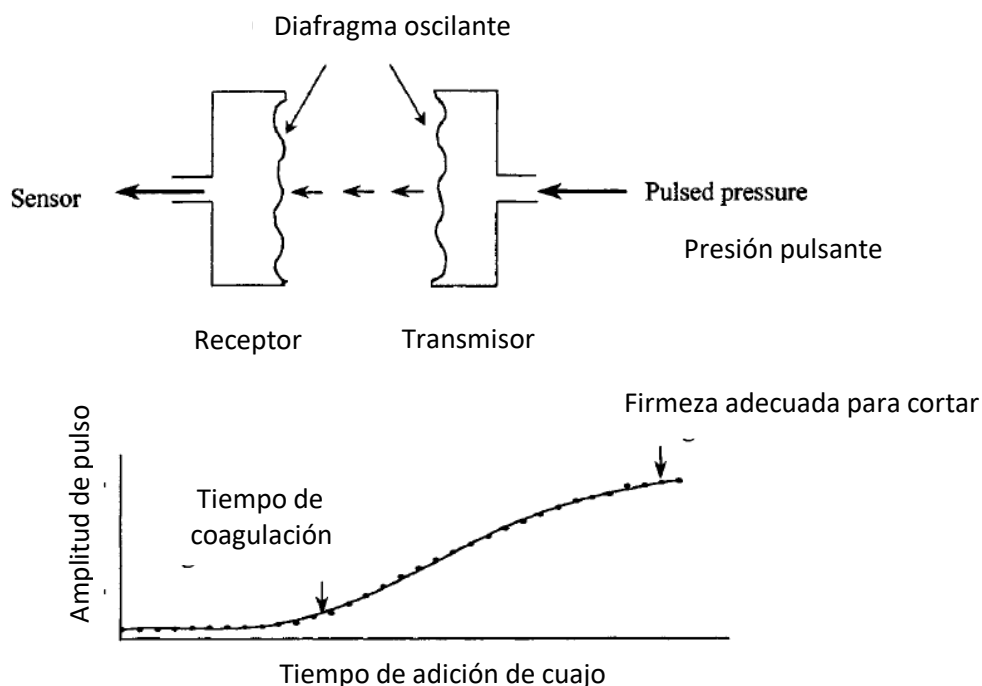
Se han utilizado diversos equipos para seguir el curso de la gelificación como, p. ej., el Lactodinamógrafo que consiste en un péndulo o un cilindro que se sumerge en la leche. El soporte de la muestra se hace oscilar o girar. Mientras la leche permanece líquida, los movimientos oscilatorios no transmiten fuerza suficiente, a través de la leche hasta el péndulo, como para producir movimiento del mismo.

Cuando tienen lugar la coagulación, el aumento de viscosidad crea un lastre para el péndulo en la leche, lo que causa un movimiento sincrónico del péndulo y el coagulo, que se registra de forma continua. El módulo de rigidez,  $G$ , se ha aproximado a partir de la señal de este tipo de dispositivo (Bittante, 2011). La **Figura 18** muestra el registro de la señal. El parámetro  $k_{20}$  es el tiempo requerido después de la coagulación para llegar una anchura de 20 mm de la señal bifurcada. La velocidad de endurecimiento de la cuajada puede ser calculada de  $1/k_{20}$ . El parámetro  $a_t$  es la firmeza de la cuajada en el momento,  $t$ , después de la adición de cuajo. Corresponde al ancho de traza al tiempo  $t$ . Los valores típicos para estos parámetros para una leche pasteurizada de mediados de la lactancia (3,3% proteína), cuajada en condiciones normales (dosificación de cuajo  $\sim 16$  RU / L; pH = 6,55, temperatura = 31 °C) son: RCT = 5,5 min;  $k_{20}$  = 11min y  $a_{30}$  = 48,5 mm (Fox et al., 2017).



**Figura 18.** Traza típica del Lactodinamógrafo. \*, punto de adición de cuajo, RCT, es el tiempo de coagulación y  $a_{30}$ , medida de bifurcación 30 min después de la adición de cuajo. Adaptado de Fox et al. (2017).

Un aparato de diafragma oscilante accionado hidráulicamente fue desarrollado por Vanderheiden (1976). En este aparato, una muestra de leche se coloca entre dos diafragmas (**Figura 19**) y se añade el cuajo. Un diafragma (el diafragma de transmisión) se hace vibrar mediante la aplicación cíclica de la presión hidráulica. Cuando la leche es líquida, el efecto de la vibración se disipa rápidamente y no afecta a la membrana receptora. Cuando se forma un gel, las vibraciones emitidas por el diafragma de transmisión alcanzan el diafragma de recepción, haciendo que vibre. Estas vibraciones se detectan y cuantifican (Fox et al., 2000).



**Figura 19.** Representación esquemática de un aparato de transmisión de presión para medir el tiempo de coagulación de la leche y la firmeza del gel resultante. Reproducido de Fox et al. (2000).

Posiblemente la forma más directa para medir la formación del gel es monitorizando la evolución de las propiedades reológicas (Horne y Bank, 2004). Para los geles de leche es recomendable utilizar reómetros rotacionales con sondas de tipo cilindros concéntricos ya que permiten medir propiedades reológicas de materiales viscoelásticos y tener una mejor termorregulación (Anandha, 2014). Para estudiar la coagulación de la leche se aplican las pruebas de reometría de pequeña amplitud oscilatoria (SAOR) debido a que aplican pequeñas deformaciones al gel, que permiten obtener información sobre la estructura de la red intacta (Tornberg, 2017).

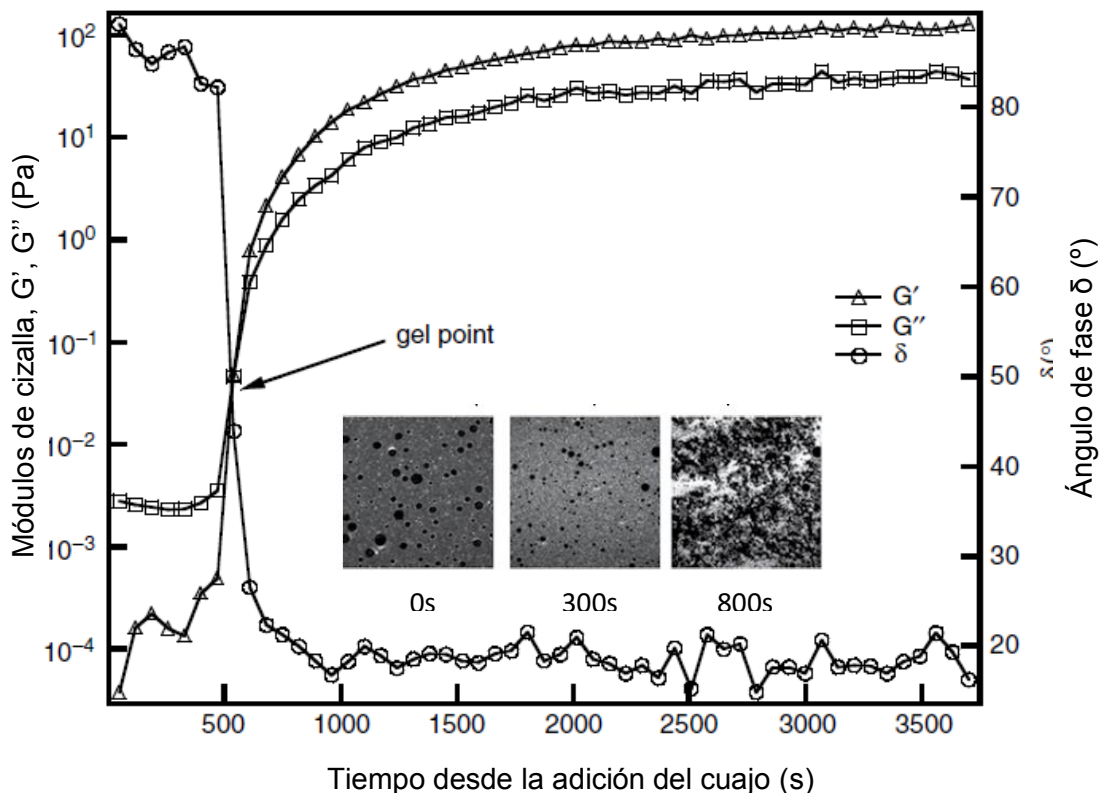
Las propiedades reológicas que permiten caracterizar al gel son el módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ) y la tangente de pérdida ( $\tan \delta$ ) (Sanz et al., 2017).  $G'$  expresa la magnitud de la energía almacenada en el material o que es recuperable por ciclo de deformación.  $G''$  es una medida de la energía que se pierde en forma de disipación viscosa por ciclo de deformación (Anandha, 2014). Por lo tanto, para un sólido perfectamente elástico, toda la energía se almacena, es decir,  $G''$  es cero. Por el contrario, para un líquido sin propiedades elásticas, toda la energía se disipa en forma de calor, es decir,  $G'$  es cero. Por otro lado, se tiene que:



$$\frac{G''}{G'} = \tan\delta. \quad (14)$$

Un mayor valor de  $\tan\delta$  significa que, durante la deformación del material, una parte relativamente grande de la energía suministrada se disipa en forma de calor y menos se almacena elásticamente, es decir el material se comporta de una manera más viscosa y menos elástica (Van Vliet, 2014). Además, la tangente de pérdida es un indicador de la estructura de la organización (interacción molecular). Un material altamente estructurado, generalmente presenta un bajo valor de  $\tan\delta$  (Létang et al., 1999).

El inicio de la gelificación se caracteriza por fuertes aumentos de  $G'$  y  $G''$  y una disminución de  $\delta$ , que disminuye abruptamente de  $\sim 80^\circ$  en la leche a  $\sim 10^\circ$  y marca la transición de un material mayormente viscoso, como la leche, a un gel que es en gran parte elástico (**Figura 20**) (Fox et al., 2017).



**Figura 20.** Cambios en la viscoelasticidad y microestructura durante la gelificación de la leche inducida por el cuajo. Agregación de micelas de caseína hidrolizada observada por microfotografía confocal de barrido láser. Adaptado de Fox y Guinee (2013) y de Gunasekaran y Mehmet (2003).

$G''$  y  $\delta$  son parámetros útiles para monitorizar los cambios viscoelásticos en el gel durante el endurecimiento, pero no están directamente relacionados con la fuerza del gel. Por el contrario,  $G'$ , es una medida directa de la firmeza de la cuajada y, por tanto, es importante en la fabricación de queso.

Varios parámetros objetivos de la coagulación, que son relevantes en la elaboración de quesos, pueden derivarse de la curva  $G'$  vs tiempo, en la modelización de la curva, como se describe a continuación (Guinee et al., 1996):

- Tiempo de gelificación ( $t_g$ ), definido como el tiempo al que  $G'$  alcanza un valor umbral, fijado arbitrariamente en 0,2 Pa. Sin embargo, autores como Arango et al. (2013), consideran el valor de 1 Pa, mientras que otros autores consideran que este tiempo coincide con el entrecruzamiento (*crossover*) de las curvas de  $G'$  y  $G''$  ( $\tan\delta = 1$ ) a una frecuencia que permita estar dentro del régimen viscoelástico lineal (Gunasekaran y Mehmet, 2003). Una preocupación es que en sistemas de gelificación de baja concentración, los módulos viscoelásticos pueden ser demasiado bajos para dar una señal medible mediante un reómetro convencional. Sin embargo, este no sería el caso de fluidos como la leche. Por tanto, es probable que el tiempo de cruce  $G'-G''$  sea cercano al tiempo de transición sol/gel en la leche (Anandha, 2014).

- La firmeza después de un tiempo de cuajado fijo, por ejemplo 30 ó 60 min,  $G'_{30}$  o  $G'_{60}$ .

- La velocidad máxima de endurecimiento de la cuajada, definida como la pendiente máxima,  $S_{max}$ , del gráfico  $G'$  vs  $t$ .

- Tiempo de corte reológico ( $t_G$ ), es decir, tiempo entre la adición de cuajo y el corte de gel con una firmeza adecuada, por ejemplo,  $t_{G'40}$  es el tiempo de corte a 40Pa.

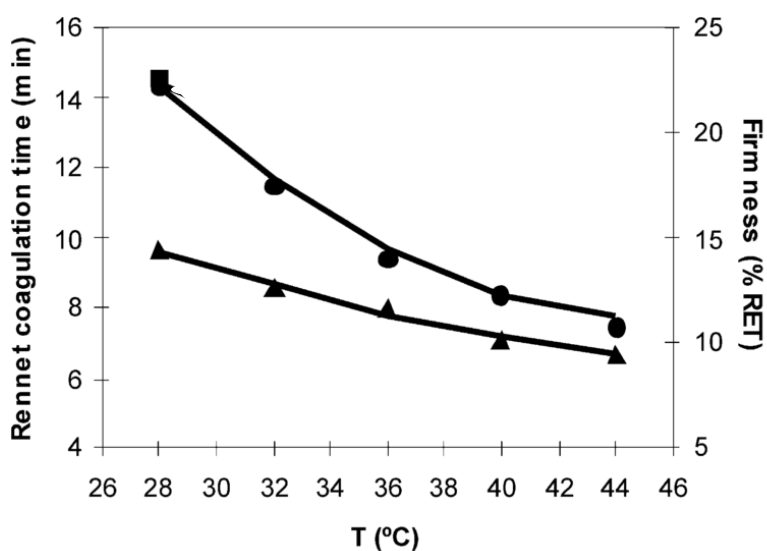
Otras técnicas como la microscopía óptica, combinada con el análisis de imágenes, se han utilizado para seguir la coagulación de la leche. Mediante el recuento de aglomerados proteicos y la medición de su tamaño medio, se observó floculación y coagulación. El valor principal de este método es que confirmó el mecanismo por el cual se forma un gel de leche (O'Callaghan, 2011).

#### 2.4.4 Factores que influyen en las diferentes fases de formación de la cuajada

Existen muchos factores que pueden influir en las tres fases de la coagulación. A continuación, pasamos a mencionar los más relevantes.

##### Temperatura de coagulación

El efecto principal de la temperatura tiene lugar en la fase secundaria, no enzimática, de la coagulación, que no ocurre a temperaturas  $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Eck, 1990). Por encima de esta temperatura, el tiempo de coagulación disminuye hasta un mínimo amplio a  $40\text{-}45\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego aumenta de nuevo a medida que la enzima se desnaturaliza (**Figura 21**). En la elaboración de quesos, la coagulación se produce normalmente a una temperatura muy por debajo de la temperatura óptima, por ejemplo,  $31\text{ }^{\circ}\text{C}$  para muchas variedades. La temperatura más baja es necesaria para optimizar el crecimiento de las bacterias iniciadoras mesofílicas, que tienen una temperatura óptima de crecimiento de  $\sim 27\text{-}28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Además, la estructura del coágulo mejora a la temperatura de coagulación de  $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ , incluso para los quesos hechos usando cultivos termófilos (Fox et al., 2017).



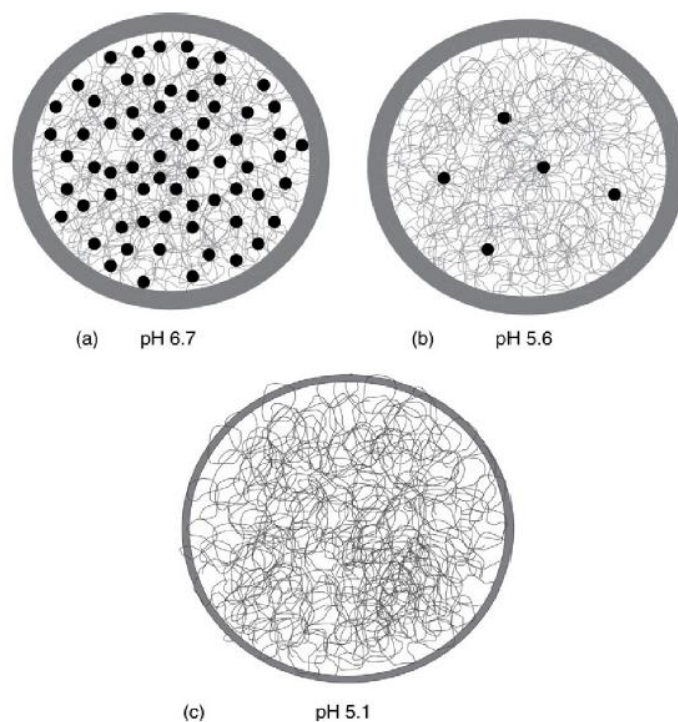
**Figura 21.** Cambios en el tiempo de coagulación (●), firmeza de la cuajada (▲) medida como porcentaje de luz transmitida relativa (RET), utilizando un gelógrafo. Las curvas se ajustaron a partir de ecuaciones de regresión simple. Reproducido de Nájera et al. (2003).

Como se demuestra por los cambios en la absorbancia a  $600\text{ nm}$ , la sedimentabilidad a  $5000 \times g$  durante  $1\text{ h}$ , la viscosidad o la dispersión de luz inelástica, las micelas se agregan en el cuajado a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aparentemente debido

a la hidrólisis de la  $\beta$ -caseína liberada de las micelas a bajas temperaturas (Bansal et al., 2007).

### Efecto del pH

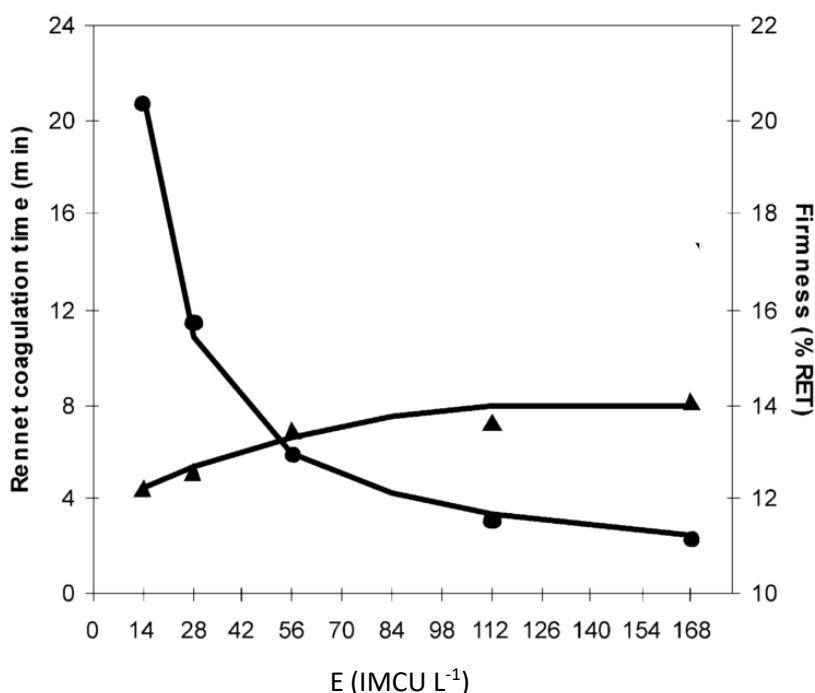
La reducción del pH de la leche favorece la coagulación enzimática, debido a tres efectos. El primero es que el pH óptimo para la acción del cuajo en la leche es  $\sim 6,0$  a 4 a la temperatura de 30 °C (Fox et al., 2017). El segundo es que reduce la carga negativa sobre las superficies de las micelas de caseína, disminuyendo la repulsión electrostática, combinada con o precedida por el colapso de la "capa pilosa" de  $\kappa$ -caseína que cubre la superficie de las micelas (Dalglish y Corredig, 2012). El tercero es que la acidificación solubiliza progresivamente el fosfato de calcio micelar, liberando calcio iónico, como se esquematiza en la **Figura 22**. Por tanto la disminución en el pH de la leche de 6.8 a 6 provoca una disminución en el tiempo de coagulación (Nájera et al., 2003).



**Figura 22.** Representaciones de estructuras de micelas de caseína a diversos valores de pH. Las cadenas indican moléculas de caseína. Los pequeños círculos negros son los nanogrupos de fosfato de calcio que se solubilizan cuando el pH se reduce. El círculo exterior es indicativo del intervalo de repulsión estérica generado entre las micelas. Reproducido de Horne (2014).

### Efecto de la concentración de enzima

El tiempo de coagulación disminuye cuando la concentración de la enzima aumenta debido a un mayor nivel de proteólisis de la  $\kappa$ -caseína. Sin embargo, cuando la concentración excede cierto límite existe una disminución de la firmeza de la cuajada porque la reacción de hidrólisis es tan rápida que no da tiempo a formar el número de enlaces suficientes durante la etapa de agregación (Nájera et al., 2003). La **Figura 23** muestra el efecto de la concentración de cuajo en la coagulación de leche.



**Figura 23.** Cambios en el tiempo de coagulación del cuajo (●) y firmeza de la cuajada (▲), medida como porcentaje transmisión relativa (RET), utilizando un gelógrafo. Reproducido de Nájera et al. (2003).

### Efecto de la fuerza iónica

Se afirma que el efecto del NaCl se presenta en la fase enzimática más que en las otras fases. La adición de NaCl hasta 3 mM reduce el RCT, probablemente debido a la disminución del pH de la leche. Sin embargo, concentraciones más altas tienen un efecto inhibitorio. Un mayor aumento de la fuerza iónica reduce la velocidad de la hidrólisis, presumiblemente inhibiendo las interacciones electrostáticas implicadas en la formación del complejo de quimosina- $\kappa$ -caseína en el sitio activo. Además, la adición de NaCl da como resultado cierta solubilización de CCP (probablemente debido a la sustitución/intercambio de Na<sup>+</sup>

por  $\text{Ca}^{2+}$ ) y aumenta la hidratación de la caseína. La adición de NaCl hasta 0,35 M aumenta la firmeza del gel, pero disminuye notablemente a concentraciones mayores, posiblemente por desplazamiento del Ca micelar por  $\text{Na}^+$  (Karlsson et al., 2005; Karlsson et al., 2007; Fox et al., 2017). El efecto de la concentración de algunas sales en el pH y fracción volumétrica de caseína ( $\Phi$ ) se puede observar en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Variación del pH y fracción volumétrica de caseína ( $\Phi$ ) a diferentes concentraciones de NaCl y KCl en leche UF.

| Sal         | (mol/kg) | pH   | ( $\Phi$ ) |
|-------------|----------|------|------------|
| -           | -        | 6,51 | 0,635      |
| <b>NaCl</b> | 0,33     | 6,40 | 0,684      |
| <b>NaCl</b> | 0,66     | 6,33 | 0,694      |
| <b>KCl</b>  | 0,33     | 6,46 | 0,683      |
| <b>KCl</b>  | 0,66     | 6,44 | 0,685      |

Reproducido de Karlsson et al., 2005.

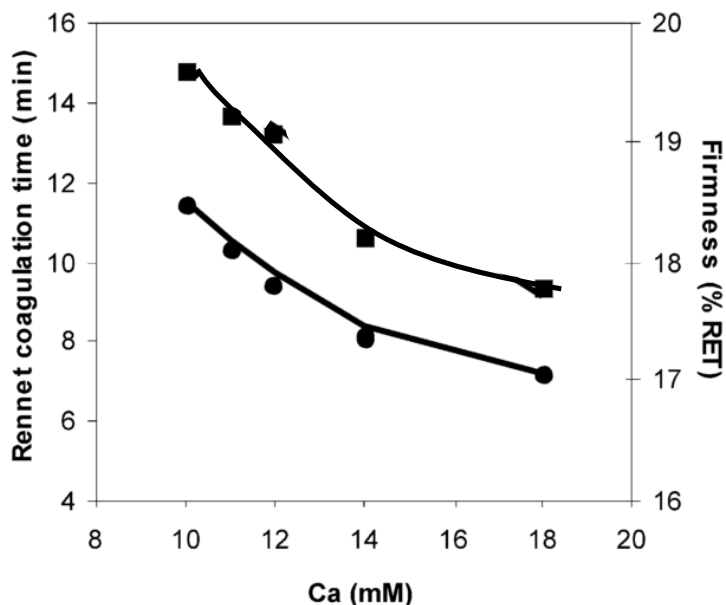
### Efecto de la adición de $\text{CaCl}_2$

La adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche, que es una práctica común, promueve la coagulación mediante tres cambios beneficiosos:

- Aumenta el calcio libre [ $\text{Ca}^{2+}$ ],
- Aumenta la concentración de fosfato de calcio coloidal, y
- Provoca una disminución del pH. La adición de  $\text{CaCl}_2$  a 0,02% - 0,2 g / L o 1,8 mM Ca - reduce el pH en ~0,05-0,1 unidades, dependiendo del nivel de proteína).

Por lo tanto, la adición de  $\text{CaCl}_2$  (a 0,2 g / L, es decir, ~1,8 mM de Ca) aumenta las propiedades de coagulación del cuajo, reduciendo el tiempo de coagulación e incrementando la velocidad de endurecimiento y firmeza de la cuajada (**Figura 24**). Sin embargo, a niveles  $\geq 1,0$  g / L (es decir,  $\geq 9$  mM Ca), la velocidad de endurecimiento de la cuajada y la meseta de firmeza de la cuajada disminuyen nuevamente. La disminución de la resistencia del gel a los niveles más altos de  $\text{CaCl}_2$  puede deberse a la interacción del exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  con los grupos carboxilo cargados negativamente en la para-caseína, lo que aumenta la carga positiva de la caseína, haciéndola menos propensa a la agregación. Como era

de esperar, la adición de quelantes de calcio (p. ej., EDTA y fosfatos de sodio) reduce la firmeza del gel (Fox et al., 2017).



**Figura 24.** Cambios en el tiempo de coagulación (●) y la firmeza del coágulo (■) con respecto a la concentración de  $\text{CaCl}_2$  (Ca), medidas como porcentaje de transmisión relativa (RET), utilizando un gelógrafo. Adaptado de Nájera et al. (2003).

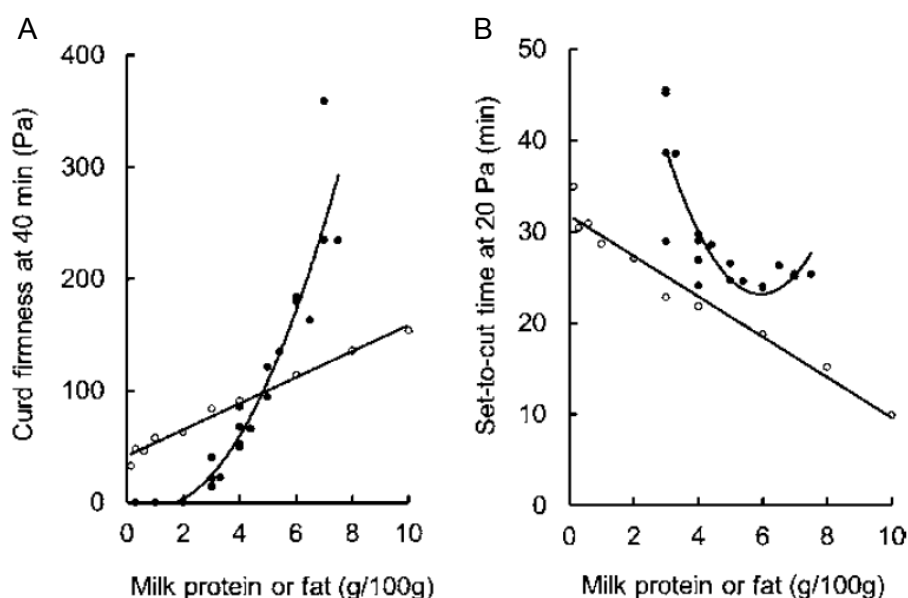
### Efecto de la concentración de proteína

El tiempo de coagulación de la leche disminuye notablemente con el contenido de proteína (y por tanto de caseína), en el intervalo de 2,0-3,0% (p/p). Aumentos adicionales en el nivel de proteína de la leche (es decir, > 3,0%, p/p) dan lugar a un ligero aumento en el tiempo de gelificación, un efecto atribuible a la disminución de la relación cuajo a caseína, lo que requiere un aumento del tiempo necesario para generar suficiente hidrólisis de  $\kappa$ -caseína para inducir la agregación de micelas de para-caseína (Fox et al., 2017).

Desde un punto de vista práctico, un nivel mínimo de proteína de 2,5-3,0% (p/p) es necesario para la formación de gel en la fabricación de queso, es decir, en un intervalo de 40-60 min. La firmeza del gel ( $G'$ ) aumenta más que proporcionalmente con el nivel de proteína (**Figura 25A**), dependiendo de la ley de potencia entre este último parámetro y la concentración de proteína, es decir  $G' \propto P^n$ , donde  $n > 1,0$ , típicamente  $\sim 2,0$  (Guinee et al., 1997).

### Efecto de la concentración de grasa de leche

Al aumentar el contenido de grasa en el intervalo de 0,1-10% (p/p) manteniendo constante el nivel de proteína, mejoran las propiedades de coagulación por cuajado, como se refleja en las disminuciones en el tiempo de coagulación y de corte así como en valores más altos de  $G'$  (**Figura 25a y b**). Sin embargo, los efectos positivos son mucho más pequeños que los obtenidos al aumentar el contenido de proteína en el mismo intervalo. De hecho, en una leche en la que el nivel de grasa más proteína se mantiene constante, el aumento del contenido de grasa resulta en disminuciones significativas de  $G'$ . Este último efecto se debe a la dilución de la proteína, que eventualmente compensa los beneficios del aumento del contenido de grasa (Fox et al., 2017).



**Figura 25.** Efecto del aumento del nivel de proteína (●) en la leche desnatada, o grasa (○) en las leches que contienen 3,3% de proteína, sobre las propiedades de coagulación del cuajo: A) Firmeza de la cuajada a 40 min de la adición de cuajo. B) Tiempo de corte con una firmeza de 20 Pa. Adaptado de Guinee et al. (1997).

### 2.5 Corte de la cuajada

El corte del gel es una parte central de la fabricación de queso, siendo el primer paso en el proceso de deshidratación mediante el cual los componentes coloidales, es decir, grasa, caseína y sales micelares, de la leche se concentran para formar cuajada de queso. Después del inicio de la gelificación, se observa un aumento progresivo de la firmeza de la cuajada, alcanzando finalmente una firmeza óptima de corte (p. ej., 30 o 40 Pa, después de 40-50 min) dependiendo



de la composición de la leche y las condiciones de formación de cuajo que, para un diseño de cuba dado, permite soportar la acción mecánica de las cuchillas sin fracturar los granos de cuajada, especialmente si el gel es demasiado blando o demasiado rígido al cortar (Fox et al., 2017). Si el coágulo se corta demasiado pronto, el gel es demasiado blando para soportar la acción de las cuchillas, fracturándose en partículas menores a 1 mm (finos de cuajada), exponiendo más área con lo cual una mayor proporción de grasa, proteína y partículas de cuajada se pierden en el suero provocando una disminución del rendimiento y de la calidad del queso (Scott et al., 1998; Castillo, 2006; Fox et al., 2017). Si se corta demasiado tarde, el gel alcanza una mayor firmeza, presentando una tendencia reducida a reorganizar (formación de nuevos sitios de unión) y, por tanto, para contraerse y exprimir el suero, dificultando la fase de sinéresis. Por ello, queda más agua atrapada en la matriz, resultando en queso de alta humedad, lo que podría interferir en la etapa de maduración del queso, comprometiendo la calidad del mismo. Además, la cuajada resultante es frágil (baja deformación por fractura) siendo susceptible de rotura por la deformación aplicada durante el corte y la agitación normal (Castillo et al., 2000; Castillo, 2006).

Los fabricantes de queso han estado esforzándose por muchos años para identificar el tiempo correcto para cortar la cuajada. Dado que la firmeza del coágulo continúa aumentando durante varias horas, es difícil determinar un tiempo óptimo para cortar la cuajada. Tradicionalmente, el fabricante de queso determinaba de manera subjetiva la firmeza por medio de diversos medios, p. ej., haciendo un corte pequeño con un cuchillo y observando la "limpieza" del corte y la claridad del suero exudado. Sin embargo, en grandes fábricas modernas, las condiciones no son propicias para probar la firmeza del gel en cubas de queso de diferentes silos de leche debido a la gran escala de operación ( $> 2-3 \times 10^6$  L / día) y al uso de cubas con acceso restringido (Janhøj y Qvist, 2010; O'Callaghan, 2011; Abdelgawad et al., 2014). Por lo tanto, en muchos casos las operaciones de fabricación de queso se realizan sobre la base de un horario preestablecido en lugar de basarse en criterios objetivos, tales como la firmeza del gel en el corte, el pH en el drenaje del suero, etc., (Fox et al., 2017). Sin embargo, en muchas instalaciones de producción de queso más pequeñas,

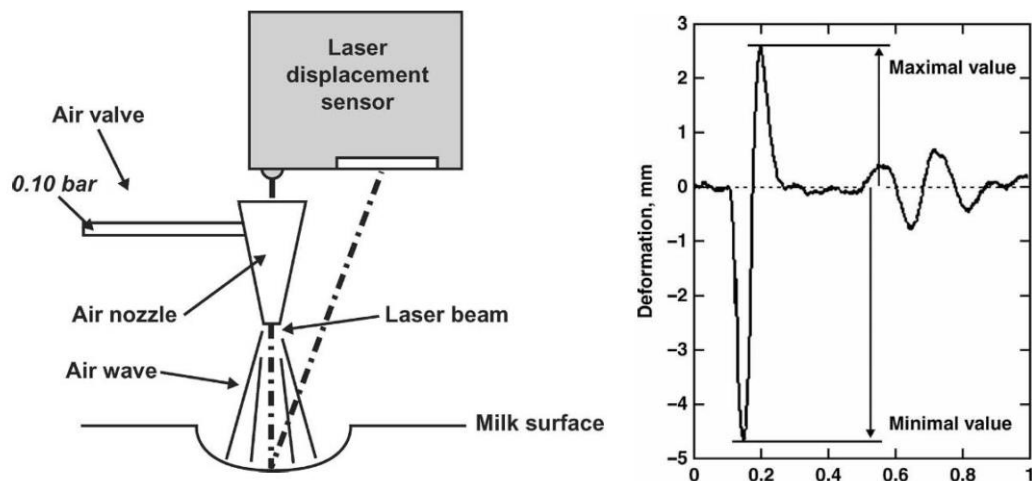
el tiempo de corte todavía es determinado por el juicio subjetivo del quesero (Gunasekaran y Mehmet, 2003).

Se han utilizado varios instrumentos para determinar el tiempo de corte de la cuajada como los descritos para seguir la fase de endurecimiento, sin embargo, estos instrumentos son de naturaleza invasiva y se utilizan más para estudiar la coagulación a nivel de laboratorio, siendo consideradas las pruebas SAOR como de referencia para seguir la fase de endurecimiento del gel (Klandar et al., 2007). Sin embargo, la industria está interesada en el uso de instrumentos menos invasivos y que cumplan con las normas de higiene exigidas, lo que está dando lugar al desarrollo de varias técnicas en línea para el control de la coagulación de la leche con estas características (Castillo et al., 2005; Payne y Castillo, 2007).

Algunos instrumentos de medida en línea están disponibles comercialmente, otros se encuentran en desarrollo. Sin embargo, todavía no existe un procedimiento universal para identificar el tiempo óptimo de corte de la cuajada. Castillo (2006) y O'Callaghan (2011) hacen una revisión de los principales métodos en línea de determinación del tiempo de corte, los cuales pasamos a describir brevemente.

### **Técnica del soplo de aire**

Mide la deformación de la superficie de la leche durante la coagulación después de aplicar un soplo de aire creado por una boquilla de aire (0.10 bar durante 50 ms), y dirigido sobre esta superficie (**Figura 26**). La deformación superficial se midió usando un sensor de desplazamiento láser. El dispositivo se montó 4 cm por encima de la superficie de la leche. Los resultados se correlacionaron con mediciones de referencia ( $G'$  y  $G''$ ) (Bamelis y De Baerdemaeker, 2006). Los principales desafíos en la adaptación comercial de esta técnica son garantizar el funcionamiento higiénico y encontrar una manera de hacer que el dispositivo siga la superficie de la leche cuando se llena una cuba a diferentes niveles.

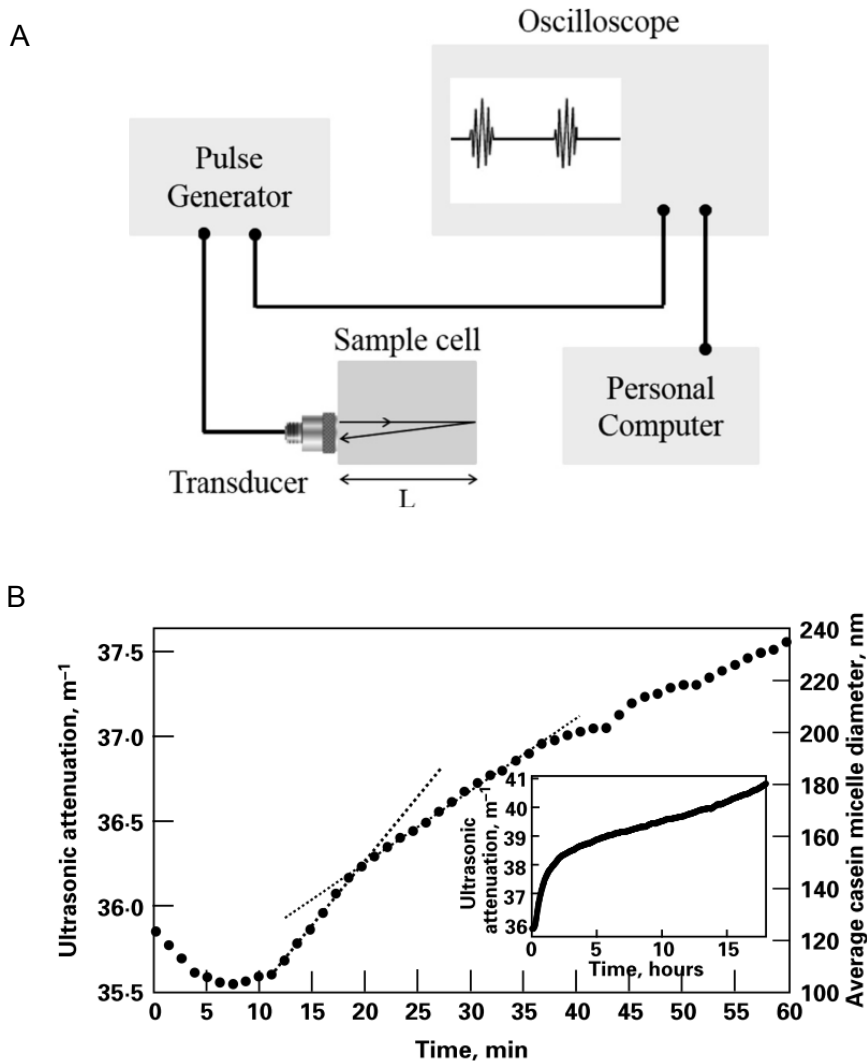


**Figura 26.** Cabeza de medición del dispositivo de soplo de aire. La distancia entre la boquilla de aire y la superficie de la leche y la presión de aire se mantienen constantes. Reproducido de Bamelis y De Baerdemaeker (2006).

### Sistemas de ultrasonidos

Debido a que las ondas ultrasónicas tienen longitudes de onda del orden de magnitud de micelas de caseína, son absorbidas por micelas aglomerantes y, en teoría, pueden utilizarse para monitorizar la coagulación de la leche (O'Callaghan et al., 2002). Se han estudiado técnicas de ultrasonidos (continuas y pulsadas) para monitorizar la coagulación de la leche, utilizando transductores piezoeléctricos a frecuencias entre 1-400 MHz (**Figura 27**). Se encontró que la gelificación podría ser detectada ya sea por una medición de atenuación o por una medición de velocidad (Corredig et al., 2004).

Aunque se demostró el potencial del ultrasonido para monitorizar la coagulación de la leche, se encontró que las burbujas de aire en la leche, y posiblemente los glóbulos de grasa, confundían algunas de las mediciones. Se llegó a la conclusión de que se requeriría una cantidad significativa de trabajo de desarrollo para llevar la tecnología a una etapa en la que pudiera utilizarse en línea en una situación comercial de fabricación de quesos (Castillo, 2006).



**Figura 27.** A) Diagrama esquemático de la técnica de eco de pulso para medir la velocidad o atenuación ultrasónica. B) Atenuación ultrasónica medida a 14,5 MHz en la leche durante el proceso de coagulación a 30°C. Reproducido de Mohammadi et al. (2014) y Dwyer et al., (2005).

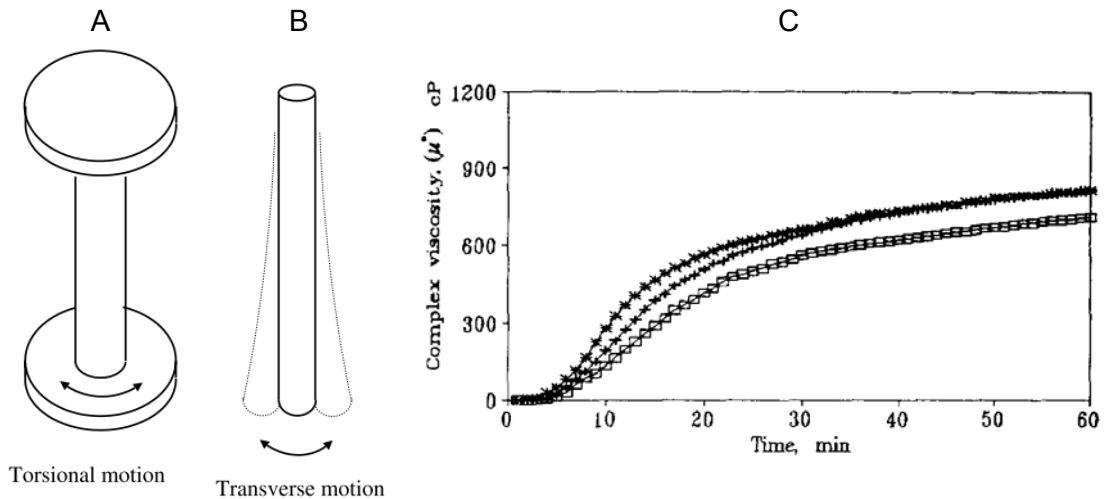
### Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica disminuye durante la coagulación un ~0,5-1,0% dependiendo del nivel de proteína y, por lo tanto, teóricamente se puede usar para monitorizar la coagulación. Se compararon los cambios en la conductividad eléctrica durante la coagulación con las mediciones de viscosidad y medición del módulo elástico (mediante reometría oscilatoria). Se encontró que, debido al gran coeficiente de conductividad de temperatura, era necesario minimizar los gradientes de temperatura en los ensayos. La variación de los electrolitos debido a la sal también confunde los cambios de conductividad como una medida de la

coagulación. Por lo tanto, esta técnica parece ser de uso limitado a menos que se combine con otras técnicas (Castillo, 2006; O' Callaghan, 2011).

### **Sistemas vibracionales**

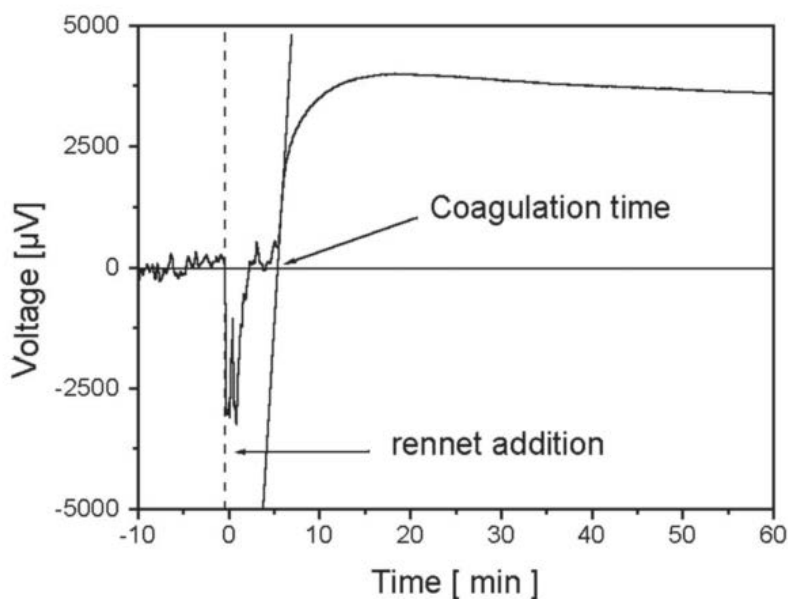
Las sondas de vibración son mucho menos intrusivas que los sistemas de movimiento mecánico y podrían adaptarse a cubas comerciales de queso. Tales sistemas pueden vibrar en un modo de diapasón (que a veces se conocen como sondas acústicas) o en modo torsional (**Figura 28**). En cualquier modo, la viscosidad del fluido se puede medir mediante amortiguación y efectos de desplazamiento de fase, que ocurren cuando una sonda vibratoria se sumerge en un fluido tal como leche. Cuando dicha sonda se sumerge en una cuba de queso, la coagulación de la leche puede seguirse directamente midiendo la viscosidad creciente antes de la gelificación y el incremento de elasticidad de la cuajada después del inicio de la gelificación. Puesto que las vibraciones pueden ser generadas y medidas en tales sondas utilizando el principio piezoeléctrico, ofrecen la ventaja de no tener partes mecánicamente móviles (O'Callaghan et al., 2002). Senge et al. (1997) y Schulz et al. (1997) mostraron que una sonda de vibración en modo torsional (Paar Physica Rheoswing; actualmente no se comercializa) a una frecuencia de alrededor de 8500 Hz puede seguir la coagulación de la leche. O'Callaghan et al. (2000), mostraron que los modos de vibración transversales o torsionales se pueden usar para monitorizar la coagulación. Sin embargo, en ese experimento ambos tipos de sonda sometieron la cuajada a un riesgo de microsinéresis debido a la amplitud del movimiento y esto limitó el grado de coagulación que podía medirse. Por esta razón, una sonda de vibración para uso en la elaboración de quesos debe diseñarse con una amplitud de vibración muy baja (O'Callaghan, 2011). Sharma et al. (1989) utilizaron una sonda de viscosidad de vibración torsional de Nametre (frecuencia de vibración de alrededor de 660 Hz) en leche desnatada reconstituida y encontraron que el instrumento detecta una fase temprana de coagulación antes de que se formen coágulos visibles. La vibración de torsión detecta el producto de la viscosidad por la densidad, que disminuye a un mínimo durante 10-20 min después de la adición del cuajo y luego aumenta progresivamente.



**Figura 28.** Concepto de sonda vibratoria: A) en modo torsional y B) en modo acústico. C) Viscosidad compleja ( $\mu^*$ ) en función del tiempo. Reproducido de O’Callaghan et al. (2002) y Sharma y Hill (1993).

### Sonda de alambre caliente

El uso de un alambre caliente para controlar la coagulación en la fabricación de queso se debe al principio de que la viscosidad del fluido gobierna la transferencia de calor por convección desde una sonda caliente y sumergida en un fluido. El cambio de la viscosidad del coágulo en el curso de la formación de gel se puede observar así midiendo la velocidad de transferencia de calor, en la práctica, la diferencia de temperatura entre una sonda caliente y la leche (O’Callaghan et al., 2002). Hori (1985) observó los cambios de viscosidad durante la coagulación enzimática, y demostró que el aumento de viscosidad de un fluido es proporcional a la elevación de la temperatura del alambre. Sbodio et al. (2002) utilizaron la misma metodología y pudieron determinar condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de quimosina para establecer el tiempo de corte. Sbodio y Revelli (2012) desarrollaron un dispositivo para la monitorización online de la coagulación de la leche, utilizando leche descremada reconstituida (~10%). Las respuestas obtenidas de voltaje en función del tiempo, se ilustran en la **Figura 29**. El dispositivo permitió determinar el tiempo de coagulación ( $t_c$ ), el tiempo en el que se produce el cambio de signo de la derivada ( $t_{max}$ ), la velocidad de crecimiento del voltaje ( $dV/dt$ ) (“firmeza”) y el voltaje máximo ( $V_{max}$ ) (“firmeza máxima”).



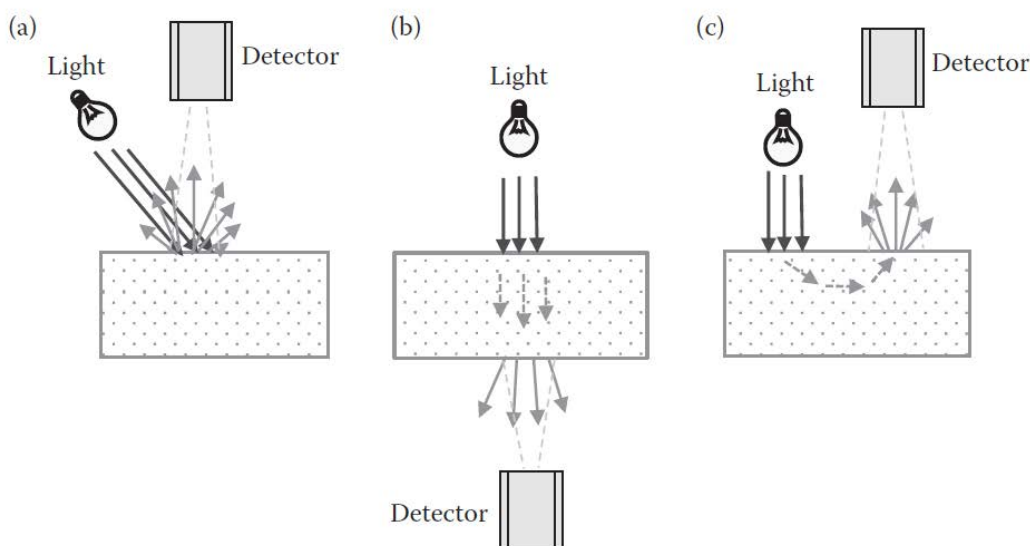
**Figura 29.** Relación ilustrativa entre el  $\mu\text{V}$  del alambre caliente y el tiempo durante el tratamiento del cuajo de la leche. Reproducido de Sbodio et al. (2002).

Mientras que un sensor de alambre caliente mide un punto de gelificación con bastante precisión, no sigue la fase de endurecimiento. Sin embargo, cuando la velocidad de coagulación varía por la concentración de cuajo -a composición de la leche y temperatura de coagulación constantes-, el punto de inflexión del alambre caliente podría usarse para predecir el punto de corte del coágulo (O'Callaghan, 2011).

## 2.6 Métodos ópticos de predicción del tiempo de corte

Se ha sabido durante muchas décadas que la coagulación de la leche se acompaña de cambios en las propiedades ópticas (incluyendo el color, la absorbancia y la reflectancia) y esto llevó al uso de sistemas de medición ópticos para el control de la coagulación de la leche. Los desarrollos en fibra óptica permitieron que tales técnicas fueran adaptadas para el uso en línea (O'Callaghan et al., 2002). En la espectroscopía convencional visible y de infrarrojo cercano, las mediciones espectrales se llevan a cabo principalmente en cuatro modos de detección (reflexión, transmisión, refracción y dispersión), como se muestra esquemáticamente en la **Figura 30**. El modo refractométrico se obtiene variando el ángulo de incidencia de la luz en (b). Cada modo de detección requiere una configuración de instrumentación diferente y puede tener diferentes implicaciones en la medición de alimentos y productos agrícolas (Lu, 2016).

A continuación, se describirán algunas técnicas ópticas de medición de la coagulación de la leche. Cipolat-Gotet et al. (2012), realizó una comparación de algunas características de la coagulación de la leche como el tiempo de coagulación (RCT) y la firmeza de la cuajada, utilizando un método mecánico como el Formagraph y un método óptico como el Optigraph, concluyendo que las lecturas de los métodos ópticos eran más independientes de las características del sensor y que podrían dar más información acerca de la coagulación de la leche, especialmente durante la fase de hidrolisis.



**Figura 30.** Tres modos de detección comúnmente utilizados en la medición espectroscópica del visible y del infrarrojo cercano: (a) reflexión, (b) transmisión, y (c) dispersión. Reproducido de Lu (2016).

Hardy y Fanni (1981) aplicaron la fotometría de reflexión a la medición fuera de línea de la coagulación de la leche, usando un colorímetro Hunterlab. Se observó una desviación en la luminosidad (valor L) antes de la coagulación visible. Esto se explicó en términos de agregación. Dybowska y Fujio (1996) utilizaron un colorímetro para monitorizar la gelificación ácida de la leche desnatada reconstituida utilizando glucono- $\delta$ -lactona (GDL) como coagulante. Mostraron que la agregación puede ser monitorizada en términos de los parámetros de luminosidad,  $L^*$  y azul-amarillo,  $b^*$ , sobre un rango de temperatura y concentración de coagulante. Las coordenadas  $L^*$  y  $b^*$  aumentan durante la coagulación, lo que se atribuye al aumento de la dimensión media de las



partículas de caseína durante su agregación (Castillo, 2006). La colorimetría fue diseñada originalmente para simular la percepción del ojo humano. Para el control en línea de la formación de gel, se ha sustituido por otras técnicas ópticas.

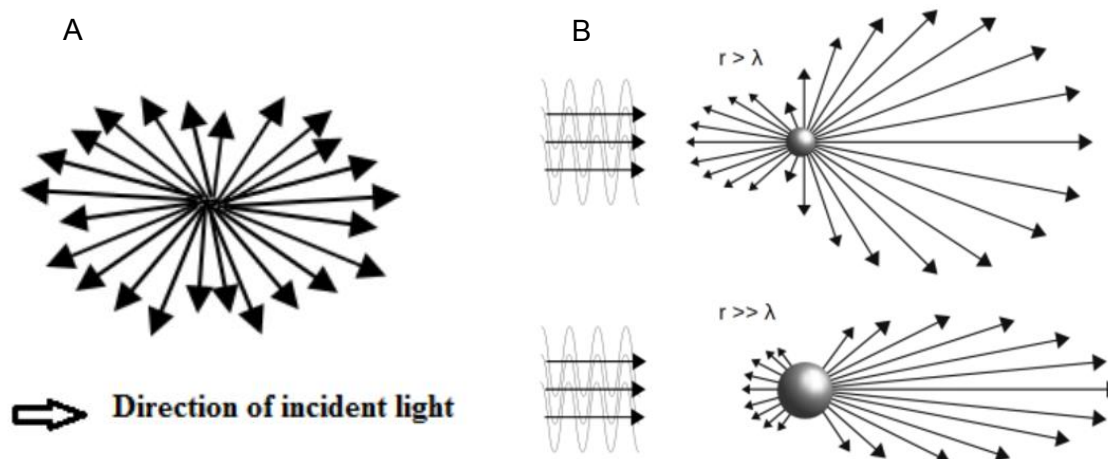
Se han aplicado varias técnicas de absorción de luz a la monitorización de sistemas de coagulación de leche. McMahon et al. (1984a, b) demostraron que la absorbancia de la luz a 600 nm podía responder a la coagulación de la leche y discriminar entre un rango de niveles de enzimas. Korolczuk (1988) ajustó el perfil refractométrico obtenido durante la coagulación a varias ecuaciones teóricas que describían el aumento del módulo de rigidez durante el endurecimiento del gel. De Kruif (1993) midió la turbidez de la leche descremada, que es una función de la transmisión de luz, utilizando un espectrofotómetro en una gama de longitudes de onda visibles e infrarrojas (de 650 a 1200 nm). Fue capaz de interpretar la gran caída observada en la transmisión (~100 veces) durante la coagulación en términos de tamaño de partícula debido a la floculación. Uno de los equipos que funciona bajo el fundamento de la transmisión es el Optigraph el cual mide la disminución de la intensidad de luz infrarroja cercana transmitida a través de la leche en coagulación. El Optigraph calcula los parámetros de coagulación (tiempo de coagulación, firmeza de la cuajada, velocidad de agregación) mediante puntos de características particulares extraídos de la información óptica adquirida en tiempo real (Kübarsepp et al., 2005; Pretto et al., 2011).

La dispersión de la luz es el cambio de la dirección de su propagación en un medio, debido a la presencia de partículas discretas y/o al cambio del índice de refracción en dicho medio. La dispersión se ve afectada por la densidad y el tamaño de las partículas, las estructuras celulares en el material, etc. (Yguerabide y Yguerabide, 1998). Por lo tanto, la dispersión es útil para detectar las características estructurales y la composición de los alimentos y los materiales biológicos.

Existen dos tipos de dispersión de luz en alimentos y materiales biológicos: elástica e inelástica. En la dispersión elástica, el material no cambia su estado después de la interacción con los fotones y todos los fotones dispersados de las partículas mantienen la misma longitud de onda. Las dispersiones Rayleigh y Mie son elásticas. La dispersión de Raman, por otra parte, es inelástica, porque

los fotones dispersados por las moléculas o las partículas no tienen las mismas longitudes de onda que los originales (Lu, 2016).

De los tres tipos de dispersiones antes mencionados, la dispersión Mie es la que se utiliza para medir la coagulación de la leche. Esta dispersión se aplica a las partículas de forma esférica cuyo tamaño es comparable a la longitud de onda de la luz (Jacques, 2013). Como muestra la **Figura 31**, en una dispersión Rayleigh los lóbulos de dispersión hacia atrás y hacia adelante tienden a ser simétricos mientras que en una dispersión Mie la dispersión hacia adelante tiende a ser más grande a medida que el tamaño de la partícula sea más próximo a la longitud de onda de la luz incidente (Abdulsalam y Khaleel, 2014). La mayoría de las estructuras celulares en materiales biológicos están en el rango entre unos pocos nanómetros y algunos micrómetros. Por lo tanto, la dispersión de luz en materiales biológicos y alimentarios puede ser adecuadamente descrita por la teoría de dispersión de Mie (Lu, 2016).

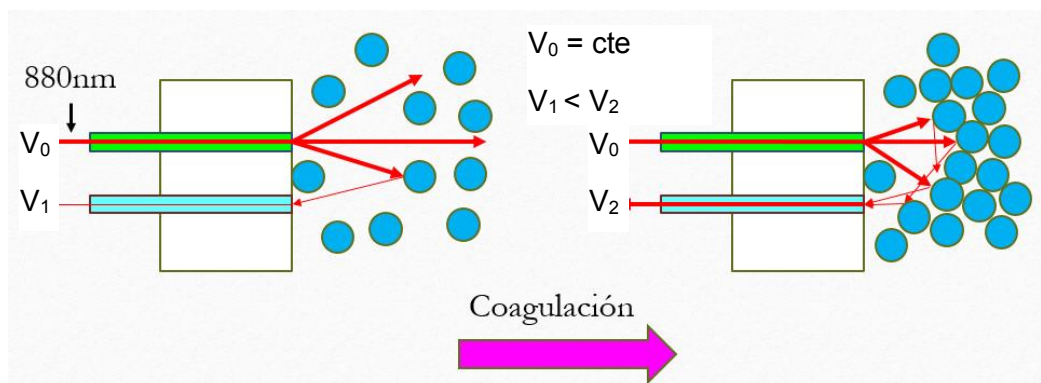


**Figura 31.** A) Dispersión Rayleigh. B) Dispersión Mie. Reproducido de Abdulsalam y Khaleel (2014).

Una aplicación importante de la tecnología de dispersión de luz es el uso de sensores ópticos para monitorizar y controlar las operaciones de elaboración de queso durante la coagulación de la leche (Payne y Castillo, 2007).

Cuando la luz se dirige a la leche, la mayoría de la luz se dispersa o se transmite hacia adelante, mientras que muy poca luz se dispersa hacia atrás (hacia el foco de luz). A medida que las caseínas de la leche se entrecruzan, la leche se transforma en un gel y, la cantidad de luz dispersada hacia atrás aumenta. El sensor dirige la luz hacia la muestra de leche a través de una fibra óptica y la luz

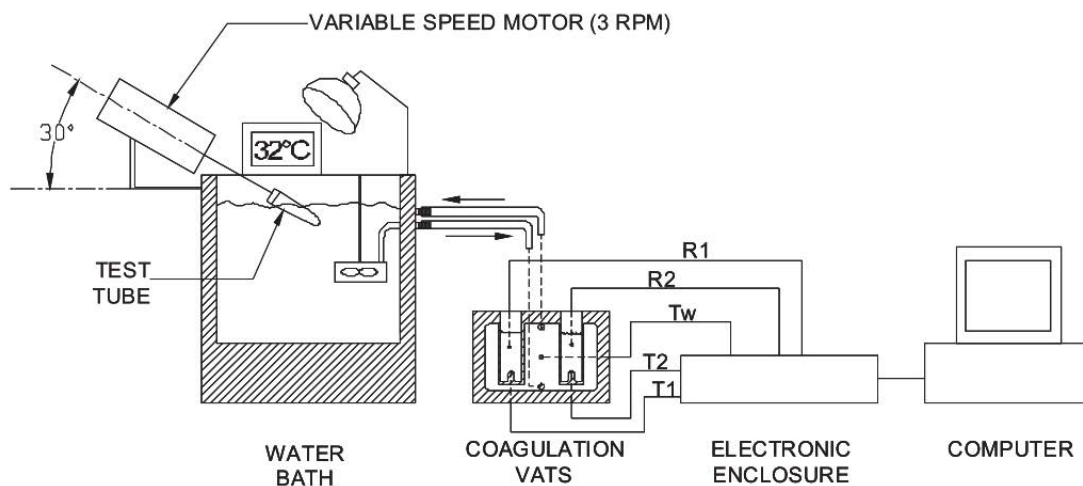
dispersada hacia atrás es recibida por una segunda fibra, como se muestra en la **Figura 32**. Al medir el aumento de la dispersión luminosa, se puede monitorizar el grado de agregación y formación del gel.



**Figura 32.** Funcionamiento de un sensor de dispersión, que muestra la cantidad relativa de luz transmitida y dispersada en leche antes de la coagulación y en gel de leche después de la coagulación.

Se han desarrollado sensores de fibra óptica para monitorizar los cambios en la dispersión de luz durante la coagulación enzimática de la leche (Castillo et al., 2003). El sensor de dispersión de luz de fibra óptica, CoAguLite™, que detecta la dispersión a 880 nm, es una tecnología óptica para uso en línea, desarrollada para monitorizar la coagulación de la leche y predecir tanto los tiempos de coagulación como de corte (Castillo et al., 2000). Se demostró que el sensor podía ser utilizado como un método alternativo para detectar el tiempo de coagulación de Berridge, establecido por la IDF como método de referencia para la determinación de la actividad coagulante de los cuajos (Tabayehnejad et al., 2012). La **Figura 33** esquematiza un sistema para la adquisición de datos con este tipo de sensor.

Estos sensores funcionan bien para aplicaciones en las que un cambio en la reflectancia proporciona la información necesaria. Sin embargo, una limitación de los sensores de reflectancia citados anteriormente es que su salida no es una propiedad física sino una medida relativa de energía luminosa en voltios que depende del tamaño de la fibra, la ganancia del amplificador, etc. En algunos casos, estos sensores de reflectancia pueden calibrarse a una propiedad física (por ejemplo, contenido de proteína) (Payne y Castillo, 2007).



**Figura 33.** Un esquema del sistema de medición utilizado para determinar el tiempo de coagulación de Berridge y los parámetros de tiempo ópticos. R1 = sensor de dispersión de luz para la cuba 1; R2 = sensor de dispersión de luz para la cuba 2; T1 = termistor para la cuba 1; T2 = termistor para la cuba 2; Tw = termistor para circulación de agua dentro de la cuba de la coagulación. Reproducido de Tabayehnejad et al. (2012)

La tecnología de dispersión de luz NIR se utilizó para monitorizar la coagulación de: leche de vaca (Payne et al., 1993), leche de cabra (Castillo et al., 2000), leche de oveja (Nicolau et al., 2015), leche con inulina (Arango et al., 2013).

Castillo (2002) obtuvo los valores de las constantes de velocidad de las reacciones de agregación micelar,  $k_2$ , y de endurecimiento del gel,  $k_1$ , a partir del perfil de dispersión, a tres niveles de proteína y cinco niveles de temperatura. Dichas estimaciones se obtuvieron mediante un modelo que describe el incremento de dispersión de luz tras el punto de inflexión de la curva, mediante la combinación de una expresión de segundo orden para la agregación y otra de primer orden para el endurecimiento. Estos resultados indicaron que la coagulación de la leche podría separarse en tres etapas: proteólisis de  $k$ -caseína, agregación de micelas y endurecimiento de la red de caseínas.

Para predecir el tiempo de corte en mezclas de leche (vaca, oveja y cabra) se utilizó un sensor de dispersión de luz de fibra óptica NIR y reometría oscilatoria de pequeña amplitud (SAOR). Se desarrolló con éxito un modelo de predicción sobre el tiempo de corte (Abdelgawad et al., 2014). Se ha investigado el efecto de la mamitis subclínica en las propiedades de coagulación de la leche de oveja utilizando un sensor de fibra óptica de dispersión de luz. Se obtuvieron con éxito modelos de predicción utilizando parámetros de dispersión de luz solos o en

combinación con la concentración de proteína/sólidos para tiempo de corte y de coagulación determinados visualmente, así como tiempos de gelificación y de corte derivados reológicamente. Los resultados sugieren que la detección precoz de la mamitis subclínica y la monitorización de la coagulación de la leche utilizando dispersión de luz pueden disminuir el impacto negativo de mezclar la leche de animales infectados cuando se usa leche para la fabricación de queso (Abdelgawad et al., 2016).

Se utilizaron datos espectrales NIR (2000-2500 nm) para desarrollar un algoritmo que permitió determinar un tiempo de corte en tiempo real. Los datos de todo el proceso de coagulación se analizaron por análisis de componentes principales en función del tiempo. Se crearon dos modelos en tiempo real, uno para todo el proceso de coagulación y otro para el modelo compuesto de tres etapas: hidrólisis, agregación y endurecimiento. Estos fueron comparados con los datos NIR experimentales y ambos modelos encajaron muy bien ( $R^2 > 0,99$ ) a los datos experimentales y sirvió como un primer paso para un modelo de simulación (Lyndgaard et al., 2012).

Otra técnica óptica que se ha descrito como susceptible de ser utilizada como un método no destructivo en línea para monitorizar la coagulación de la leche, es la espectroscopía de fluorescencia, donde se emite luz a la leche, generalmente a través de una fibra óptica. Los fluoróforos endógenos de la muestra irradian luz casi instantáneamente al ser excitados por la luz incidente y la luz de fluorescencia emitida se recibe en un detector, generalmente a través de otra fibra óptica, y se analiza en función del tiempo para evaluar la coagulación de la leche. El perfil de fluorescencia de algunos de los fluoróforos endógenos (específicamente triptófano y riboflavina) también aumenta sigmoidalmente durante la coagulación. Adicionalmente, este método, además proporciona información sobre el proceso de sinéresis de la cuajada (Fagan et al., 2011).

La espectroscopía de onda de densidad de fotones (PDW) se utilizó para estudiar la coagulación de leche fresca homogeneizada a diferentes concentraciones de grasa (Hass et al., 2015). La espectroscopía PDW es una técnica analítica óptica en línea que se basa en la teoría del transporte de radiación. Se genera una PDW insertando una luz intensamente modulada (es decir, diodos láser) en un material turbio pero de baja absorción. La amplitud y

la fase de la onda se caracterizan por las propiedades de absorción y dispersión del material. PDW se cuantifica por los coeficientes de absorción ( $\mu_a$ ) y reducción de la dispersión ( $\mu_s$ ) que representan la composición química y las propiedades físicas del material, respectivamente. Como se demostró en el trabajo de Hass et al. (2015), los coeficientes de dispersión detectan los diferentes contenidos de grasa en la leche, así como los cambios en las micelas de caseína, observando una cinética en la coagulación similar a otras técnicas de monitorización.



### **Capítulo III. Objetivos y plan de trabajo**

Para desarrollar el presente trabajo de investigación se trazó un objetivo general y cuatro objetivos específicos, que fueron los siguientes:

#### **3.1 Objetivo General**

Calibrar y validar a nivel industrial un modelo de predicción del tiempo de corte de la cuajada, utilizando un sensor de fibra óptica, en base al módulo elástico del gel.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

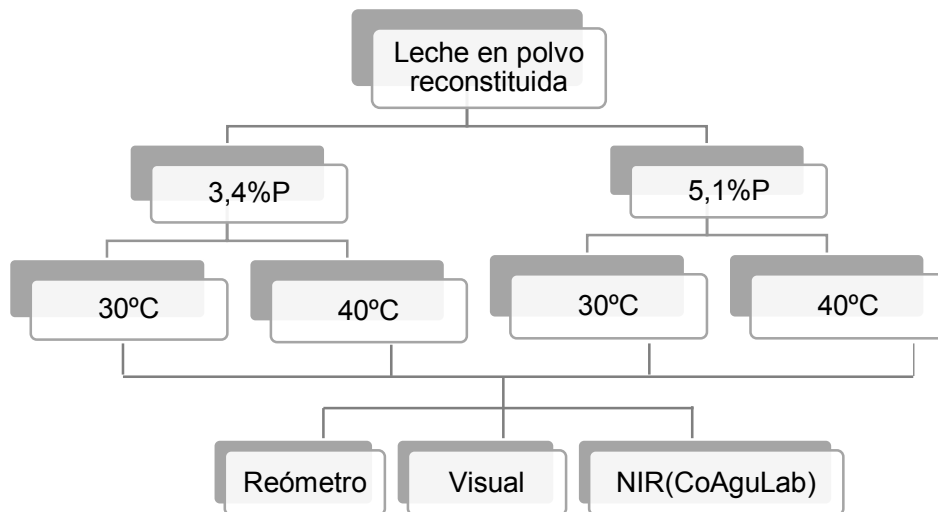
- A. Desarrollar un modelo matemático para la monitorización del módulo elástico,  $G'$ , del gel a temperatura y porcentaje de proteína variables.
- B. Calibrar y validar a nivel de laboratorio el modelo de predicción de la dureza de la cuajada, utilizando leche de vaca.
- C. Desarrollar e implementar un sistema de monitorización y adquisición de datos (hardware y software) que permita la adquisición de datos, a tiempo real, tanto a nivel de planta piloto como industrial.
- D. Validar a nivel de planta piloto el modelo de predicción de la dureza de corte de la cuajada previamente calibrado a nivel de laboratorio.
- E. Validar en la industria la ecuación de predicción de la dureza de corte de la cuajada previamente validado a escala de planta piloto.

Seguidamente, se procede a explicar brevemente el desarrollo de cada objetivo.



### 3.3 Plan de trabajo

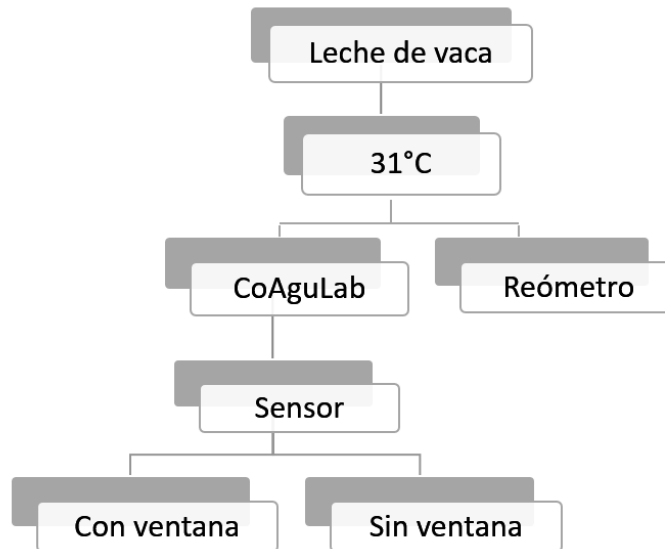
Para desarrollar el objetivo específico A, se utilizó un diseño factorial completamente al azar con dos factores y dos niveles por factor: temperatura (30 y 40 °C) y concentración de proteína (3,4 y 5,1%), para estudiar el efecto de la concentración de proteína y la temperatura en el tiempo de coagulación visual, de gelificación y de corte, y para desarrollar el modelo de monitorización del módulo elástico del gel ( $G'$ ) incorporando el porcentaje de proteína y temperatura como variables predictoras, para lo cual se utilizó el diseño experimental de la **Figura 34**.



**Figura 34.** Diseño experimental para la determinación de la ecuación de monitorización del módulo elástico ( $G'$ ) de la cuajada.

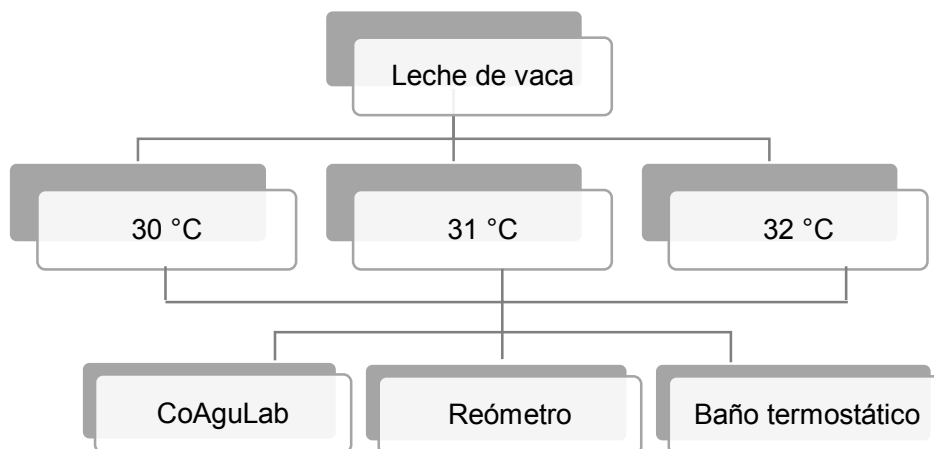
## Objetivos y plan de trabajo

Para desarrollar el objetivo específico B, en primer lugar, se probó un sensor con ventana de zafiro para comprobar si este producía una mejor señal que el sensor sin ventana que se estaba utilizando hasta ese momento, para lo cual se coagularon 3 lotes de leche de vaca a la temperatura de 31 °C y se realizó una comparación de señales aplicando el diseño experimental de la **Figura 35**.



**Figura 35.** Diseño experimental para la comparación de sensores.

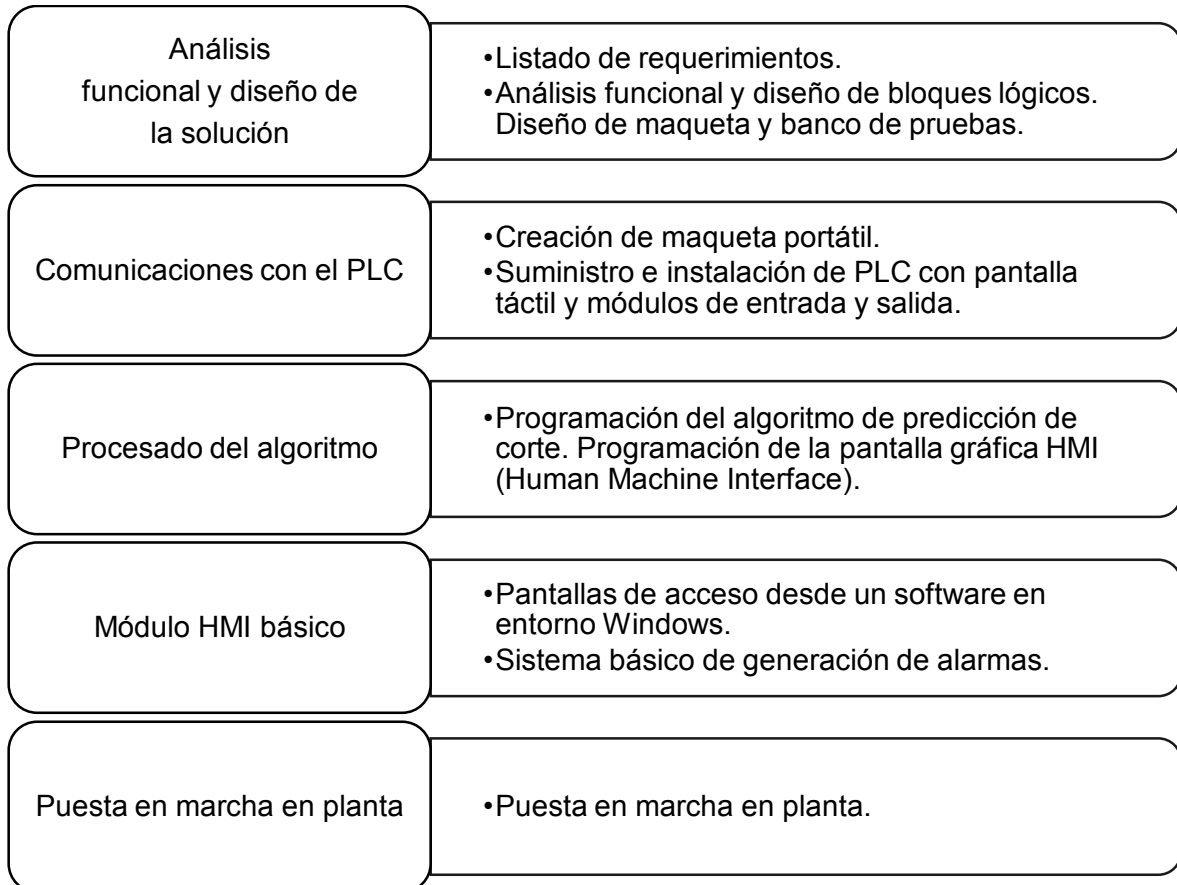
En segundo lugar, se utilizó un diseño en bloques completos al azar, donde los bloques fueron los lotes de leche. Se coagularon cuatro lotes de leche, a tres temperaturas: 30, 31 y 32 °C, con tres replicas, utilizando el diseño experimental de la **Figura 36**, con la finalidad de calibrar y validar la ecuación de monitorización.



**Figura 36.** Diseño experimental para la calibración y validación a nivel de laboratorio, de la ecuación de predicción de  $G'$  de la cuajada.

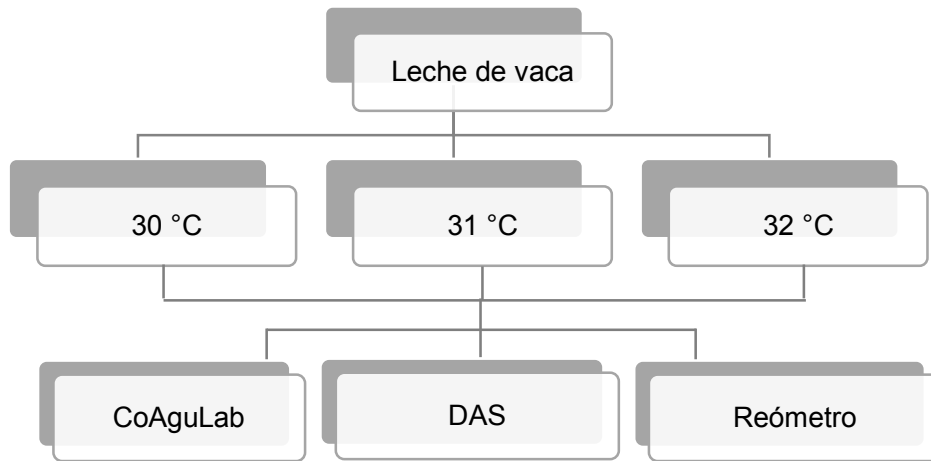
## Objetivos y plan de trabajo

Para desarrollar el objetivo específico C, se aplicó el flujograma de trabajo de la **Figura 37**, conjuntamente con una empresa tecnológica integradora, para el desarrollo e implementación de hardware y software del sistema de adquisición de datos (DAS) que se utilizaría en las etapas posteriores del estudio,



**Figura 37.** Flujograma para la implementación del sistema de adquisición de datos (DAS).

Luego se realizó un ajuste previo para equiparar la señal del sistema de adquisición de datos (DAS) y el sistema CoAguLab, y posteriormente una validación del DAS para verificar que no existían diferencias significativas con las señales del sistema CoAguLab, realizando coagulaciones paralelas en ambos sistemas y en un reómetro, a tres temperaturas y utilizando el diseño experimental de la **Figura 38**.



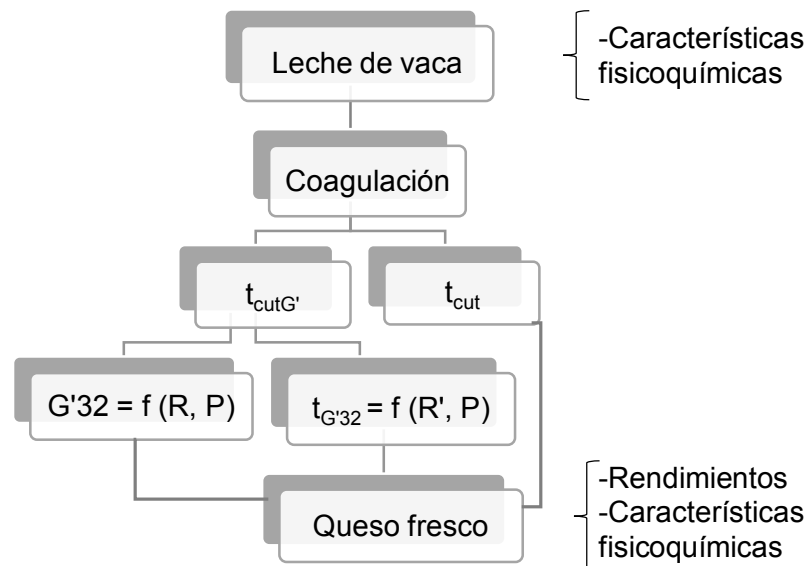
**Figura 38.** Diseño experimental para la validación del DAS.

## Objetivos y plan de trabajo

Para desarrollar el objetivo específico D, se aplicó un diseño factorial, coagulando 12 lotes de leche de vaca, aplicando tres métodos de corte por lote, en una cuba quesera de 10 L de capacidad, a la temperatura de 32 °C, determinándose el tiempo de corte según los métodos de corte (MC):

1. El tiempo dado por el modelo de predicción del módulo elástico de la cuajada,  $G'_{32} = f(R, P)$ , estableciéndose el momento de corte cuando la cuajada alcanza una dureza de 32 Pa. Este nivel de dureza se eligió en base a experimentos previos en la cuba quesera.
2. El tiempo dado por el modelo de predicción  $t_{G'_{32}} = f(R', P)$  necesario para que la cuajada alcance un valor de módulo elástico de 32 Pa.
3. El tiempo de corte visual dado por el maestro quesero.

Utilizando el diseño experimental de la **Figura 39**, se compararon los rendimientos y características fisicoquímicas de los quesos elaborados de cada método de determinación de tiempo de corte, con la finalidad de comprobar si existían diferencias significativas entre métodos de corte.

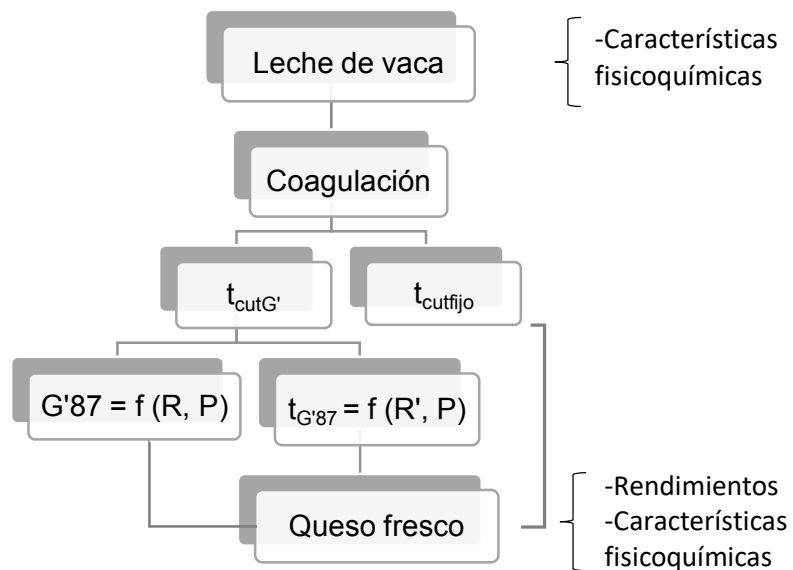


**Figura 39.** Diseño experimental para la validación del modelo de monitorización de la dureza de la cuajada a nivel de planta piloto.  $t_{cutG'}$ , tiempo de corte en base a un valor predeterminado del módulo elástico de la cuajada.  $t_{cut}$ , tiempo de corte visual.

Para desarrollar el objetivo específico E, se coagularon 36 lotes de leche de vaca, en una cuba quesera de 3500 L de capacidad, a la temperatura de 38,5 °C, según los métodos de corte (MC) siguientes:

1. El tiempo dado por modelo de predicción del módulo elástico de la cuajada,  $G'_{87} = f(R, P)$ . En este caso, el momento del corte se selecciona una vez el gel haya alcanzado una dureza de 87 Pa.
2. El tiempo dado por el modelo de predicción de la dureza de corte  $t_{G'_{87}} = f(R', P)$  a 87 Pa.
3. Corte a un tiempo fijo de ~31 min tras la adición de la enzima a la cuba.

Se utilizaron 12 lotes de leche por cada MC, seleccionados aleatoriamente, y se compararon los rendimientos y características fisicoquímicas de los quesos elaborados con cada MC, mediante el diseño experimental de la **Figura 40**.



**Figura 40.** Diseño experimental para la validación de la ecuación de predicción de la dureza de la cuajada a nivel industrial.  $t_{cutG'}$ , tiempo de corte en base a un valor predeterminado del módulo elástico de la cuajada.  $t_{cutfijo}$ , tiempo de corte fijo.



## **Capítulo IV. Desarrollo de un modelo matemático para la predicción del módulo elástico, $G'$ , de la cuajada a temperatura y porcentaje de proteína variables**

### **4.1 Introducción**

La monitorización de la evolución de la firmeza de un gel a partir de mediciones ópticas en línea es una meta deseada desde hace mucho tiempo. El gel de leche es uno de los geles más interesantes, ya que el seguimiento y control de la evolución de su dureza, como p. ej. en el queso, puede traer beneficios tanto desde el punto de vista económico como de calidad (Castillo et al., 2000; Lyndgaard et al., 2012).

La selección del tiempo de corte ( $t_{cut}$ ) depende de las propiedades reológicas y microestructurales de los geles, tales como la firmeza del coágulo y la capacidad de reordenación que, a su vez, dependen de factores de coagulación, composición y pretratamiento de la leche. Por esta razón, la selección de  $t_{cut}$  afecta en gran medida a la humedad, calidad y el rendimiento de queso (Castillo, 2006).

Dada la importancia de la etapa de coagulación de la leche en la calidad final del queso, se han desarrollado y comparado numerosos dispositivos para monitorizar el proceso de la coagulación de la leche inducida por el cuajo a escala de planta y/o laboratorio (Klandar et al., 2007; O'Callaghan, 2011). A nivel de planta, un sistema de monitorización ideal debe evaluar la firmeza de la cuajada, operar en línea en la cuba de proceso, no ser intrusiva y ser compatible con los requisitos de higiene (Sbodio y Revelli, 2012). Los dispositivos reológicos, como el reómetro oscilatorio dinámico de baja amplitud, proporcionan información muy útil sobre el proceso de formación de gel (Lucey, 2002). Este método “*off line*”, considerado como de referencia, se usó a menudo para monitorizar la coagulación inducida por el cuajo (Zhong y Daubert, 2004; Hemar et al., 2004), pero no resulta práctico para aplicación en línea.

Los cambios de las propiedades ópticas de la leche durante la coagulación han permitido el desarrollo de varios dispositivos ópticos, debido a que el uso de la fibra óptica se generalizó. Las técnicas ópticas tales como la absorbancia de luz, la transmisión y la reflectancia, sobre longitudes de onda del visible e infrarrojo

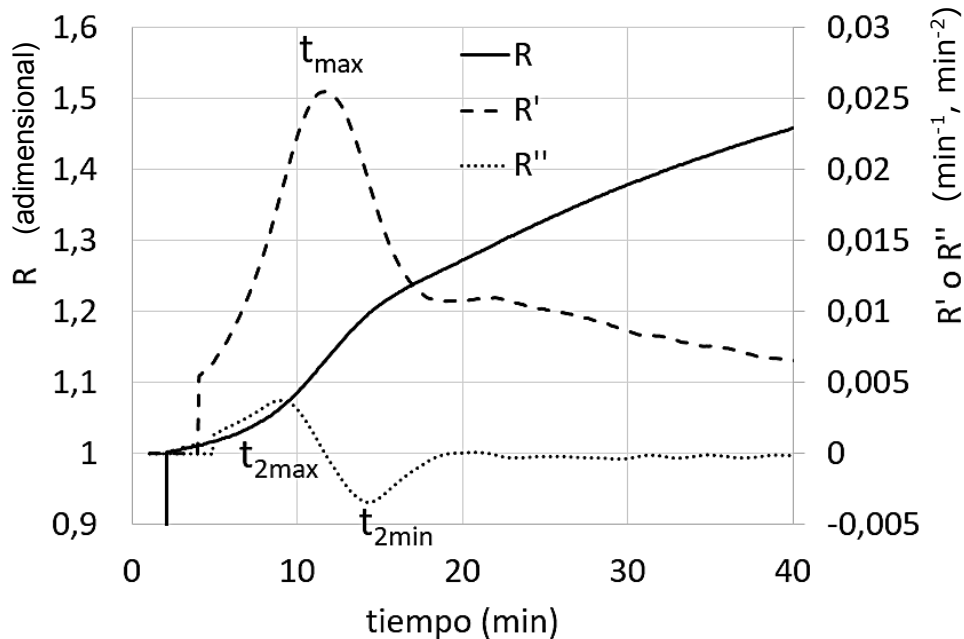


cercano (NIR), fueron empleadas para evaluar la coagulación de la leche (Nájera et al., 2003; Renfu, 2016). Un método microscópico óptico fue propuesto por Lagaude et al. (2004) para la estimación de la floculación visual del cuajo y tiempos de gel reométricos; y para observar simultáneamente cambios estructurales que ocurren durante la formación del gel. El estudio de la formación de la red también se ha realizado a menudo utilizando la dispersión de la luz. En la leche y, especialmente, en los rangos visible e infrarrojo cercano, la dispersión de la luz predomina sobre la absorción. El uso de fibras ópticas permite aplicar diferentes configuraciones ópticas para el desarrollo de sensores (Payne y Castillo, 2007).

Las mediciones de dispersión de luz directa, tales como las realizadas a 880 nm por el sensor en línea CoAguLite desarrollado por Payne et al. (1990) tienen la ventaja de que las mediciones no dependen de una determinada longitud de trayectoria en comparación con las mediciones indirectas de dispersión de luz basadas en la transmisión relativa (Optigraph). La tecnología de sensores de fibra óptica CoAguLite ha demostrado ser uno de los métodos para aplicación en línea, no destructivos más prometedores para la monitorización de la coagulación de la leche. Esta técnica es comercial y está disponible para la monitorización en línea de la producción de queso (Arango et al., 2013).

El uso de dos fibras ópticas separadas 1,2 mm entre sí para transportar la luz es una configuración óptica única que produce una señal potente proporcional a los cambios que se producen en la estructura de la proteína durante la coagulación. La luz procedente de un diodo emisor de luz (LED) se transfiere a la leche a través de una fibra, y la luz dispersada a 180° (LB) de la leche se transmite a través de una fibra adyacente a un detector óptico. La señal de luz LB contiene información sobre la agregación de micelas de caseína y la formación del gel durante la coagulación de la leche. El perfil de LB se incrementa sigmoidalmente a medida que la coagulación de la leche avanza, tanto si esta es inducida por cuajo, ácido o por ambos, en la leche de vaca, cabra y oveja (cruda y descremada) (Nicolau et al., 2010). El perfil LB tiene un período latente (**Figura 9 y 41**) durante el cual predominan las reacciones enzimáticas sin cambio detectable en la intensidad de dispersión (Payne y Castillo, 2007). La ratio LB aumenta a medida que el tamaño de partícula asciende durante la formación de

la red debido a la agregación de las micelas de caseína. Como resultado, se puede distinguir un período sigmoidal durante el cual predominan las reacciones de agregación, así como un período asintótico durante el cual la agregación continúa a una velocidad decreciente mientras que el endurecimiento de la cuajada se desarrolla.



**Figura 41.** Perfil de luz dispersa o ratio de reflectancia ( $R$ ) versus tiempo.  $R'$ , primera derivada de  $R$ .  $R''$ , segunda derivada de  $R$ . Los significados de los parámetros ópticos están explicados en el texto y en la sección 4.2.3.

Como consecuencia de la forma sigmoidal del perfil de la ratio LB, se obtiene un parámetro que indica el tiempo desde la adición enzimática hasta el punto de inflexión del perfil LB,  $t_{max}$  (**Figura 41**). Un importante descubrimiento fue la fuerte correlación entre  $t_{max}$  y la velocidad de reacción enzimática,  $k$  (Saputra et al., 1992). Por tanto, la medida de LB mide indirectamente la velocidad de reacción enzimática cuando mide  $t_{max}$ . Otro descubrimiento importante fue que el inicio de la agregación se localiza alrededor de  $t_{max}$ , estando la hidrólisis a  $t_{max}$  casi terminada (Castillo et al., 2003a). Por lo tanto, no es de extrañar que, cuando la temperatura, el pH, el calcio añadido o la concentración enzimática cambien,  $t_{max}$  también cambie.

El parámetro de dispersión,  $t_{max}$ , está altamente correlacionado con el tiempo de corte, como se determinó objetivamente usando el parámetro  $k_{20}$  de Formagraph. La siguiente ecuación de predicción fue desarrollada por Payne et

al. (1993) para predecir el tiempo de corte,  $t_{cut}$ , siendo  $t_{cut} = \beta t_{max}$ . El coeficiente  $\beta$  se selecciona en la planta para replicar el juicio del fabricante de queso sobre el tiempo de corte. El valor de  $\beta$  calibra el sistema y es la única variable que el fabricante de queso tiene que determinar. La ecuación para  $t_{max}$  es exacta sólo si la proteína es constante. Castillo (2001) demostró que  $\beta$  disminuye significativamente cuando aumenta la proteína. Esto permitió el desarrollo de un algoritmo de predicción para corregir la predicción del tiempo de corte para los cambios en el contenido de proteína de la leche como sigue:  $t_{cut} = \beta t_{max}(1 + \gamma P)$ , donde la constante  $\gamma$  corrige la predicción del tiempo de corte para el efecto de la concentración de proteína ( $P$ ).

Los geles producidos por cuajado son viscoelásticos y sus propiedades reológicas pueden caracterizarse mediante reología oscilatoria dinámica de baja amplitud (Lucey, 2002). Los parámetros que se pueden determinar incluyen el módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ), que es una medida de la energía almacenada por ciclo de oscilación, el módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ), que es una medida de la energía disipada como calor y la tangente de pérdida ( $\tan \delta$ ), que es la relación de las propiedades viscosas a las elásticas ( $G''/G'$ ) (Van Vliet, 2014).

En la Patente de Estados Unidos N° 6.831.741 B1 (14 de diciembre de 2004) se describe una disposición y un método para determinar los valores de firmeza del gel a partir de mediciones ópticas en línea, consistentes en aplicar dispersión dinámica de luz para seguir la formación de cuajada y obtener la resistencia de gel ( $G'$ ). Sin embargo, el método utiliza dispersión dinámica de luz, que es un sistema complejo y costoso. Por otra parte, el método para el cálculo de la resistencia al gel en el documento se basa en la teoría fractal, por lo que requiere el conocimiento de una serie de parámetros teóricos que deben medirse o conocerse previamente.

Aparte de este, ningún otro método es conocido para determinar los valores de firmeza del gel a partir de mediciones ópticas en línea, ni de mediciones de dispersión de luz, ni de mediciones de luz de fluorescencia ni de cualquier otro tipo de mediciones ópticas.

La UAB ha patentado un método para determinar la firmeza de la cuaja a partir de la señal óptica dada por el sensor CoAguLite, obtenida combinando la ecuación 15 adapta del modelo de Douillard (1973) para la velocidad de cambio del módulo de almacenamiento con el tiempo como sigue:

$$G' = G'_{\infty} + (G'_0 - G'_{\infty})e^{-k_{G'}t} \quad (15)$$

dónde:

$G'$  : módulo de almacenamiento al tiempo  $t$ ,  $t \geq t_g$

$G'_{\infty}$  : valor del módulo de almacenamiento a  $t = \infty$

$k_{G'}$  : constante de velocidad de reacción para el proceso,

con la ecuación 16 que describe la reacción de endurecimiento de la cuajada en términos de la señal del sensor de dispersión CoAguLite (Castillo et al., 2003a) dada por:

$$R = R_{\infty} + (R_0 - R_{\infty})e^{-k_R t} \quad (16)$$

dónde:

$R$  : ratio de dispersión a tiempo  $t$ ,  $t \geq t_g$

$R_{\infty}$  : ratio de dispersión a  $t = \infty$

$k_R$  : constante de velocidad de reacción para el proceso,

dando la expresión (17):

$$G' = G'_{\infty} + (G'_0 - G'_{\infty}) \left( \frac{R - R_{\infty}}{R_0 - R_{\infty}} \right)^{k_{GR}} \quad (17)$$

Donde  $k_{GR} = k_{G'}/k_R$  es una constante que representa la relación entre las tasas de aumento de los valores  $G'$  y  $R$  como resultado del endurecimiento del gel.

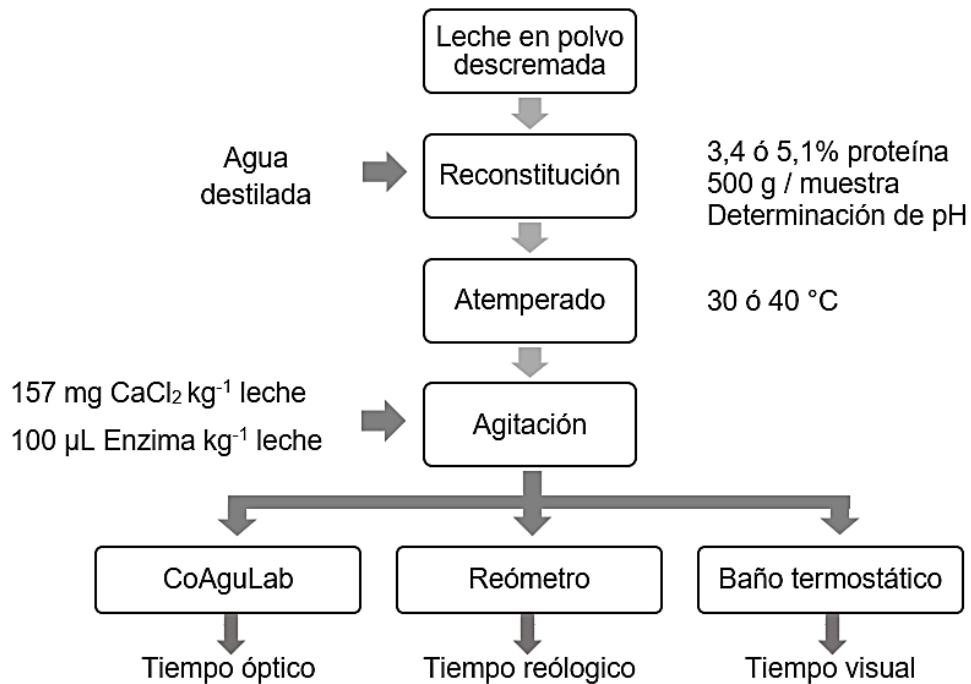
La principal razón para modelizar el proceso de coagulación es tener una manera objetiva de caracterizar el proceso de gelificación y el efecto de los tratamientos, como el tipo de coagulante y la composición de la leche, entre muchos otros, en los diversos parámetros del modelo. Otro objetivo es tratar de estandarizar la firmeza del gel en el corte, ya que es importante para controlar el rendimiento y el contenido de humedad del queso. En este sentido se desarrolló un modelo para la monitorización de la dureza de la cuajada, partiendo de la ecuación 17 y modificándola para diferentes niveles de proteína y temperatura.

## 4.2 Materiales y métodos

Para desarrollar el modelo de predicción, se aplicó el diseño experimental de la sección 3.3 correspondiente al objetivo específico A.

### 4.2.1 Procedimiento experimental

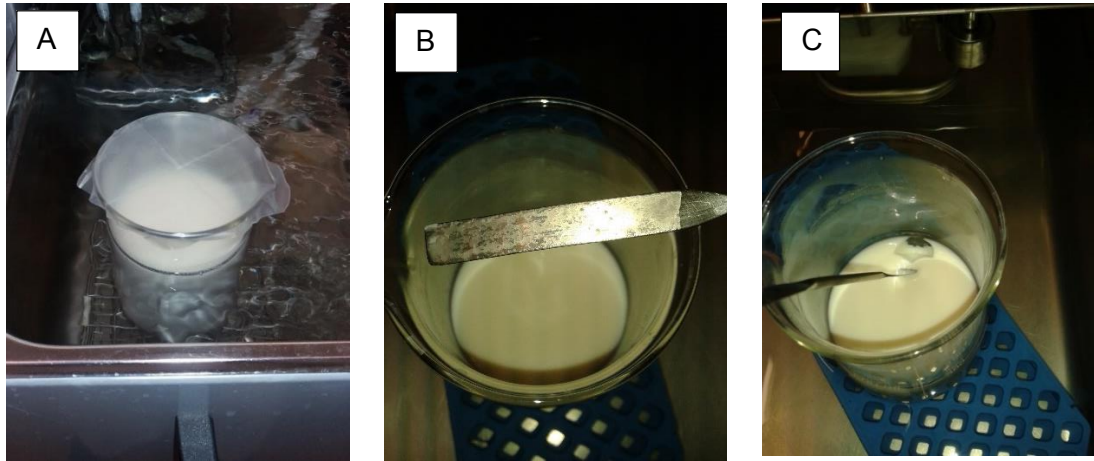
A cada unidad experimental se le aplicó el diagrama de flujo de la **Figura 42**.



**Figura 42.** Diagrama de flujo para la coagulación de las muestras de leche en polvo reconstituida.

Se utilizó leche desnatada en polvo *low heat* suministrada por Chr. Hansen Inc. (Chr. Hansen Barcelona, España) con un contenido de proteína ~34%, la cual es sometida a un suave tratamiento de deshidratación por atomización que preserva su aptitud para la coagulación. Este tipo de leche fue seleccionado para el estudio porque tiene una composición constante, lo que permitió minimizar las fuentes experimentales de variación de los resultados. La leche desnatada en polvo se reconstituyó con agua destilada hasta obtener los valores de proteína antes mencionados. Para esto, se pesó la leche en polvo y después se diluyó con agua destilada hasta obtener 500 g. Esta mezcla se colocó en una placa de agitación a temperatura ambiente durante 30 min para la reconstitución completa de la leche en polvo. Después de agitar la leche, se colocó durante 30 min en un lugar oscuro para una rehidratación completa de las micelas de caseína.

Después de estos 30 min de reposo, la leche estaba lista para la coagulación. Se determinó el pH de la leche reconstituida, utilizando un pHmetro Crison pH Basic 20 y después se puso la leche en un baño termostático hasta alcanzar la temperatura de coagulación (**Figura 43A**).



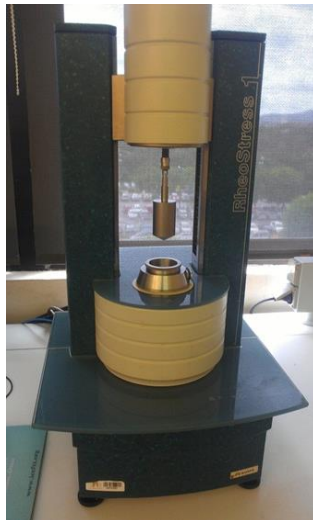
**Figura 43.** A) Aterperado de leche reconstituida. B) determinación visual del tiempo de coagulación. C) Determinación visual del tiempo de corte.

Una vez que la leche alcanzó la temperatura deseada, para mejorar la capacidad de coagulación de la leche, se adicionaron 0,157 g de cloruro de calcio por kg de leche, a partir de una solución de 525 g de cloruro de calcio anhidro por kg de solución, que fue preparada empleando  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Panreac Química S.A., Montcada i Reixac, Barcelona, España). Tras agitar la mezcla, se añadió quimosina recombinante 100% (CHY-MAX extra; EC 3.4.23.4, 600 IMCU  $\text{mL}^{-1}$ ) suministrada por Chr. Hansen Inc. (Chr. Hansen Barcelona, España) almacenada en refrigeración a 4° C hasta su empleo, que fue utilizada para inducir la coagulación de la leche en una proporción de 100  $\mu\text{L}$  por kg de leche. Luego, la enzima fue mezclada bien con una espátula durante 30 s. Inmediatamente, dos alícuotas de 80 mL se colocaron en los vasos del sensor óptico y otra alícuota de 40 mL se colocó dentro del vaso del reómetro y se pusieron en marcha ambos equipos a la vez. También una muestra de 300 mL se puso en el baño termostático a la misma temperatura de coagulación que las otras muestras, a fin de determinar el tiempo de coagulación visual ( $t_{\text{clot}}$ ), siguiendo la metodología de Abdelgawad et al. (2016), introduciendo una espátula en el interior de la leche y observando el tiempo en el cual aparecieron flóculos pequeños (**Figura 43B**). El tiempo de corte se determinó también visualmente ( $t_{\text{cut}}$ ) siguiendo la metodología utilizada por Arango et al. (2013),

utilizando una espátula para separar el gel de las paredes del vaso de precipitados hasta que la separación estaba completamente limpia y el gel ofrecía resistencia elástica sin rotura cuando se forzaba hacia el centro del vaso de precipitados con la espátula (**Figura 43C**).

#### 4.2.2 Determinación del módulo elástico

El proceso de coagulación de la leche fue monitorizado a través de una prueba de cizallamiento de pequeña amplitud oscilatoria (SAOR) utilizando un reómetro ThermoHaake RS1 (thermo-Haake GmbH, Karlsruhe, Alemania) equipado con un sensor de cilindros concéntricos (Z34) (**Figura 44**). Las pruebas se realizaron mediante la aplicación de una deformación del 3%, que está dentro de la región de viscoelasticidad lineal para geles de leche (Zoon *et al.*, 1988) y una frecuencia de 1 Hz. El parámetro identificado fue el módulo elástico o módulo de almacenamiento ( $G'$ ). El tiempo de gelificación ( $t_{gel}$ ) se definió como el tiempo cuando los geles tuvieron un  $G' = 1$  Pa. Cuando  $G'$  del gel alcanzó 30 Pa se obtuvo el tiempo de corte reológico,  $t_{G'30}$ .

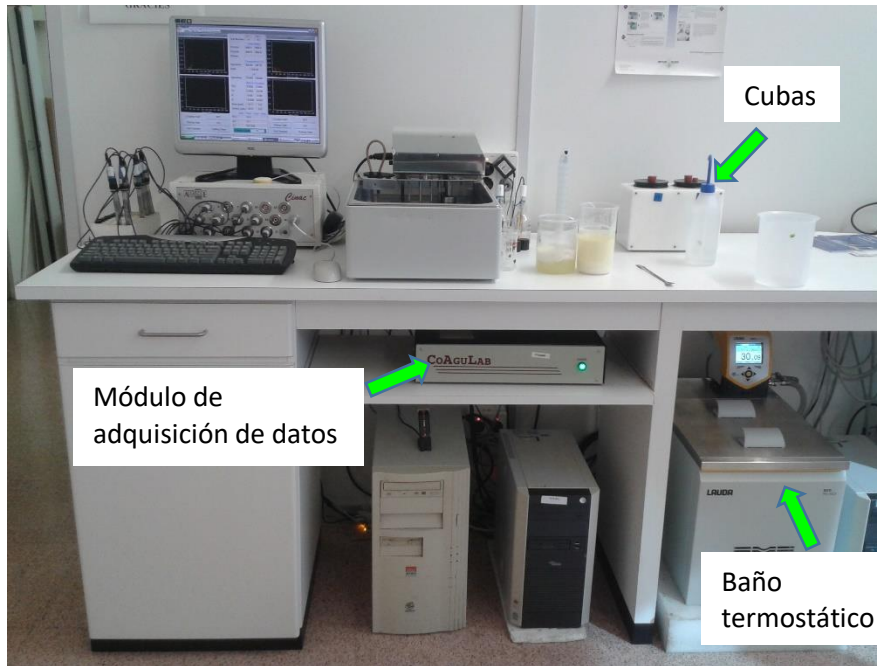


**Figura 44.** Reómetro con sensor de cilindros concéntricos utilizado en los experimentos.

#### 4.2.3 Monitorización de la coagulación mediante dispersión de luz NIR

Se utilizó un equipo CoAguLab diseñado en la Universidad de Kentucky, para determinar el perfil de dispersión de luz durante la coagulación de la leche (**Figura 45**). Una descripción detallada de este equipo se presentó en el trabajo de Tabayehnejad *et al.* (2012). El dispositivo tiene dos cubas de 98 mL, para monitorizar la coagulación en dos muestras simultáneamente. Los sensores

ópticos se localizan atravesando cada cuba hasta la pared interior; además cuenta con un baño termostático que recircula agua entre el baño y el interior de la camisa de las cubas para regular la temperatura de las muestras de leche. Un módulo de adquisición de datos, conectado a un ordenador, transforma la señal luminosa en voltaje, además de regular la intensidad de luz emitida.



**Figura 45.** Equipo de monitorización de la coagulación CoAguLab. Prototipo instalado en el laboratorio de análisis instrumental de la Facultad de Veterinaria de la UAB.

Cada sensor transmite luz infrarroja a 880 nm a través de una fibra de 600  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que otra fibra, separada de la primera 1,2 mm, recibe la radiación dispersada por la leche. Esta señal luego es transmitida a un fotodetector de silicio. Para la calibración, el sensor óptico fue puesto a cero excluyendo la luz y ajustando la tensión de salida a 0 V. La respuesta inicial de voltaje ( $V_0$ ) se calculó promediando los primeros diez datos. Los datos ópticos generados en las cubas se recolectaron a intervalos de 6 s. El ratio de dispersión de luz ( $R$ ) se calculó tras la adición de enzima, dividiendo la tensión de salida del detector entre  $V_0$ , según el procedimiento descrito por Tabayehnejad et al. (2012). Se calcularon la primera y segunda derivadas del perfil de dispersión de luz. Algunos parámetros de tiempo ópticos fueron definidos por los máximos y mínimos de las derivadas como se muestra en la **Figura 41**. Los tiempos hasta el primer máximo de la primera y segunda derivadas se definieron como  $t_{\text{max}}$  y



$t_{2max}$ , respectivamente, mientras que el tiempo hasta el primer mínimo de la segunda derivada se definió como  $t_{2min}$ .

#### 4.2.4 Análisis estadístico

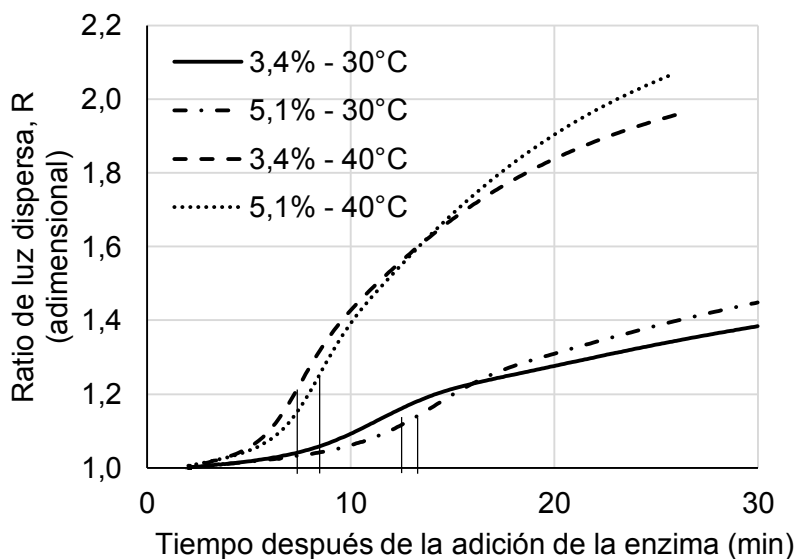
En este estudio, los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SAS (SAS ® 9.4, 2012). El análisis de covarianza (ANCOVA) se realizó mediante el procedimiento del modelo lineal general (GLM) de SAS. La media de mínimos cuadrados (LSMEANS) y la significación de cada tratamiento se computaron mediante suma de cuadrados de tipo IV. El método de la media de mínimos cuadrados predice diferencias entre todos los tratamientos. En este experimento las medias fueron consideradas significativamente diferentes a  $p < 0.05$ . Se utilizó el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar de calibración (SEC) para evaluar la calidad de la calibración de los modelos. Para la validación de los mismos se empleó una validación cruzada, determinando el error estándar de predicción (SEP).

### 4.3 Resultados y discusión

#### 4.3.1 Perfil de dsipersión

Como se muestra en la **Figura 46**, la ratio de dispersión de luz ( $R$ ) incrementa su valor hasta el valor de máxima pendiente correspondiente a  $t_{max}$ . Castillo et al. (2003a) consideran que alrededor de este punto cerca del 78% de las micelas de caseína se han hidrolizado, iniciándose la reacción de agregación. Seguidamente comienza una etapa a velocidad decreciente correspondiendo a las etapas de agregación y, principalmente al endurecimiento (Payne y Castillo, 2007). Este comportamiento es más notable para el tratamiento a temperatura más alta, probablemente debido a una aceleración de los fenómenos de agregación, produciendo partículas de mayores tamaños y, por lo tanto, un voltaje más alto es detectado por la fibra receptora (Castillo, 2001). A temperaturas más altas se observa una disminución en el tiempo requerido para alcanzar el punto de inflexión de la curva,  $t_{max}$  y por consiguiente se produce una disminución en el tiempo de corte,  $t_{cut}$ , que podría deberse a que el aumento de la temperatura beneficia tanto a la fase de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína como a la agregación de micelas de caseína hidrolizadas (Walstra et al., 2006). Sin embargo, un aumento en la concentración de proteína produjo un pequeño

cambio en la ratio de dispersión de luz a una determinada temperatura, observándose al inicio de la etapa de agregación un ligero aumento en  $t_{max}$  cuando aumenta el porcentaje de proteína. Puede ser que la adición de una mayor cantidad de proteína, produzca una disminución de la relación enzima/sustrato necesitándose más tiempo para alcanzar el nivel de hidrólisis necesario para el inicio de la agregación (Fox et al., 2017; Saputra, 1992), tomando más tiempo para llegar a  $t_{max}$ . Además, se observa que, a un tiempo superior a 14 - 16 min, los tratamientos que tienen una mayor concentración de proteína presentan una mayor reflectancia en comparación con las muestras de menor concentración de proteína, indicando que el tratamiento con mayor contenido de proteína alcanzará antes el tiempo de corte deseado. Este comportamiento fue observado por Castillo et al. (2003b) al comparar mesetas de curvas de  $R$  ( $R_{\infty}$ ) durante la coagulación de leche de cabra a diferentes concentraciones de proteína.



**Figura 46.** Perfil de la ratio de dispersión de luz a diferentes niveles de temperatura y proteína, durante la coagulación de leche en polvo reconstituida. Las líneas negras verticales indican el valor de  $t_{max}$  para cada curva. Medias de tres replicas por tratamiento.

#### 4.3.2 Análisis de covarianza de los parámetros de tiempos ópticos y de corte

A partir de la figura anterior, podemos deducir que el efecto de la temperatura sobre los valores de las variables dependientes en el proceso de coagulación de la leche fue mayor que el efecto ejercido por la concentración de sólidos. Para

comprobar esta hipótesis los parámetros de tiempo obtenidos de los tratamientos fueron sometidos a análisis de covarianza (ANCOVA) (**Tabla 4**).

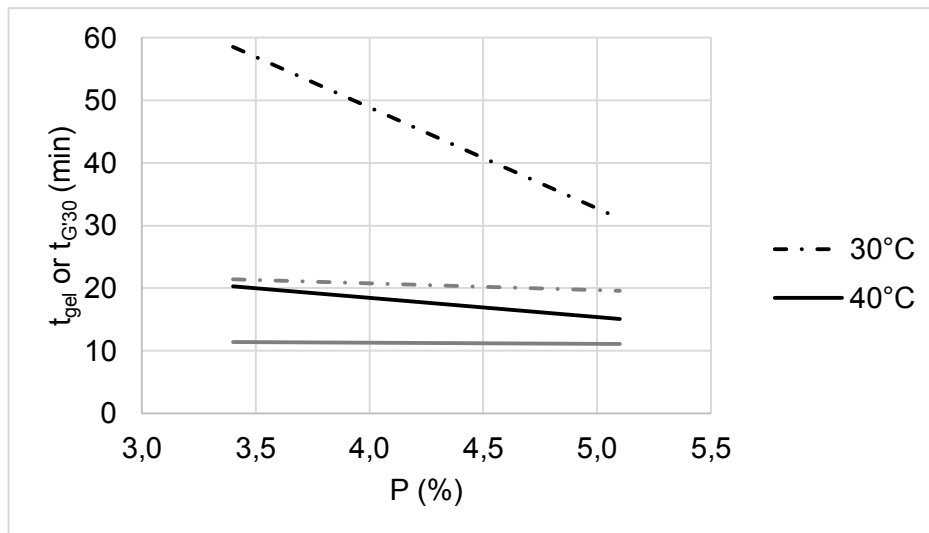
**Tabla 4.** Análisis de covarianza de los parámetros de tiempos ópticos y de corte, obtenido de la coagulación de leche en polvo reconstituida.

| Parámetros        | Modelo         |           | Factores principales |                  | Interacción        | Covariable         |
|-------------------|----------------|-----------|----------------------|------------------|--------------------|--------------------|
|                   | R <sup>2</sup> | F         | P (%)<br>(DF=1)      | T (°C)<br>(DF=1) | %PxT<br>(DF=1)     | pH<br>(DF=1)       |
|                   |                | F         | F                    | F                | F                  | F                  |
| t <sub>max</sub>  | 0,963          | 45,77***  | 9,50*                | 145,07***        | 4,03 <sup>ns</sup> | 2,36 <sup>ns</sup> |
| t <sub>2max</sub> | 0,951          | 33,99***  | 11,60*               | 97,20***         | 3,40 <sup>ns</sup> | 2,88 <sup>ns</sup> |
| t <sub>2min</sub> | 0,966          | 49,86***  | 6,84*                | 169,89***        | 2,25 <sup>ns</sup> | 1,93 <sup>ns</sup> |
| t <sub>gel</sub>  | 0,973          | 62,90***  | 0,12 <sup>ns</sup>   | 228,20***        | 2,60 <sup>ns</sup> | 1,06 <sup>ns</sup> |
| t <sub>G'30</sub> | 0,992          | 207,78*** | 12,92**              | 500,22***        | 87,83***           | 1,26 <sup>ns</sup> |
| t <sub>clot</sub> | 0,979          | 82,29***  | 8,25*                | 313,00***        | 0,30 <sup>ns</sup> | 6,05*              |
| t <sub>cut</sub>  | 0,980          | 85,29***  | 0,13 <sup>ns</sup>   | 272,74***        | 31,78***           | 5,44 <sup>ns</sup> |

Número de observaciones N = 12; T, temperatura; P, porcentaje de proteína; PxT, interacción proteína x temperatura; R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; F, ANCOVA F-estadística; DF, grado de libertad; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001; <sup>ns</sup>no significativo.

Se observaron efectos de temperatura muy significativos (p < 0,001) para casi todas las variables dependientes evaluadas. Esto está de acuerdo a lo reportado por Arango et al. (2013) que evaluó el efecto de la temperatura en tiempos de coagulación y corte de leches con inulina. Como ya se mencionó, esto se debería a que la temperatura acelera tanto los procesos de hidrólisis como de agregación de las micelas de caseína (Castillo et al., 2003b), mientras que el efecto de la concentración de proteína resultó ser significativo para todas las variables excepto para t<sub>gel</sub> y para t<sub>cut</sub>. En cuanto a t<sub>gel</sub>, este comportamiento podría ser debido a que, si bien es cierto que a medida que se incrementa la concentración de proteína, el principio de la agregación (t<sub>max</sub>) se prolonga, una vez que se ha alcanzado t<sub>max</sub> existe un incremento de la velocidad de agregación al haber más micelas disponibles en el medio. Por otro lado no se observaron efectos significativos del pH excepto para t<sub>clot</sub>, lo que podría deberse a que t<sub>clot</sub> está muy cercano a t<sub>max</sub> y como hemos mencionado t<sub>max</sub> está relacionado con el inicio de la etapa de agregación he influenciado por el pH, ya que el pH influye significativamente en el periodo de hidrólisis enzimática reduciendo la carga de la capa de κ-caseína de las micelas, acortando t<sub>clot</sub> (Vasbinder et al., 2001). Waungana et al. (1998) también observaron una disminución de t<sub>clot</sub> al disminuir el pH de la leche a 6,5. El efecto de la interacción PxT fue significativo en las variables t<sub>cut</sub> y t<sub>G'30</sub>, debido probablemente a que a la temperatura de 30 °C

permite una reorganización mejor de la estructura de las micelas permitiendo un mayor número de enlaces durante la fase de endurecimiento, efecto que se ve reforzado por la presencia de un mayor contenido de proteína, lo cual hace que el tiempo de corte descienda más que a la temperatura más alta. Este efecto se puede observar en la **Figura 47**.



**Figura 47.** Efecto de interacción entre la temperatura y el contenido de proteína (P) sobre  $t_{gel}$  (líneas grises) y  $t_{G'30}$  (líneas negras).

#### 4.3.3 Comparación de medias de mínimos cuadrados de los parámetros de tiempos ópticos y de corte

La comparación de las medias de mínimos cuadrados se muestra en la **Tabla 5**. El aumento de la temperatura produjo una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en todos los parámetros de dispersión óptica, visuales y reológicos. El aumento de la temperatura de 30 a 40 °C produjo una disminución del parámetro  $t_{max}$  en un 37%. Asimismo, el tiempo de gelificación ( $t_{gel}$ ) y el tiempo de corte reológico a 30 Pa ( $t_{G'30}$ ) se redujeron en 46 y 61%, respectivamente. Esto se debe a que la temperatura acelera tanto la hidrólisis enzimática como las reacciones de agregación y endurecimiento en la coagulación de la leche (Fox et al., 2015). Sin embargo, el efecto de la temperatura en la agregación y endurecimiento de micelas de caseína es mucho más pronunciado en comparación con la hidrólisis (Fox et al., 2017). De hecho, el coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ) para la hidrólisis de  $\kappa$ -caseína reportada por varios autores varía entre 1,3 y 2, mientras que en la agregación,  $Q_{10}$  oscila entre 11 y 30 (Abdelgawad et al., 2014). Una temperatura más alta aumenta los movimientos brownianos produciendo un aumento en la

probabilidad de colisión entre las micelas hidrolizadas (Jiménez y Macarulla, 1984). Además, las conexiones que se establecen entre las micelas de para- $\kappa$ -caseína y que conducen a la gelificación de la leche son esencialmente hidrófobas, pero también son importantes los puentes de hidrógeno y los enlaces de la naturaleza iónica (Castillo, 2001). Los enlaces hidrófobos aparecen más rápidos y son más fuertes cuando aumenta la temperatura, dando lugar a la rápida formación de cadenas y grupos de micelas y una fusión más rápida de ellos (Lagoueyte et al., 1994). Castillo et al., (2000) obtuvo un comportamiento similar de los parámetros de tiempo al evaluar los efectos de la temperatura en estos parámetros, coagulando leche de cabra de 28 a 36°C. También podemos observar que los valores de  $t_{G'30}$  y  $t_{cut}$  tienden a aproximarse a una temperatura cercana a 30 °C, haciendo suponer que el tiempo de corte medido a 30 Pa es un tiempo adecuado para realizar el corte.

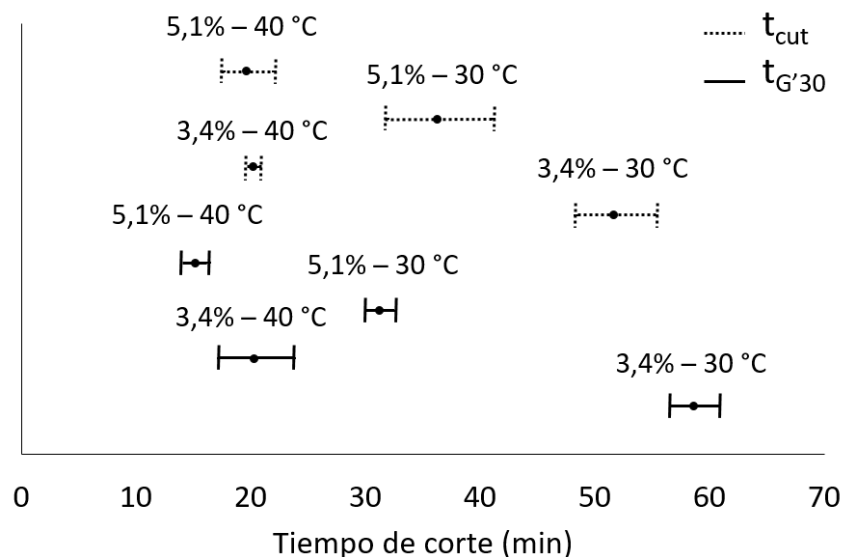
**Tabla 5.** Medias de mínimos cuadrados de parámetros ópticos y de corte en función del porcentaje de proteína y temperatura, obtenido de la coagulación de leche en polvo reconstituida.

| Parámetros       | P(%)               |                    | T(°C)              |                    |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                  | 3,4                | 5,1                | 30                 | 40                 |
| $t_{max}$ , min  | 8,80 <sup>a</sup>  | 12,29 <sup>b</sup> | 12,96 <sup>a</sup> | 8,14 <sup>b</sup>  |
| $t_{clot}$ , min | 12,31 <sup>a</sup> | 16,04 <sup>b</sup> | 18,24 <sup>a</sup> | 10,12 <sup>b</sup> |
| $t_{gel}$ , min  | 15,59 <sup>a</sup> | 16,20 <sup>a</sup> | 20,60 <sup>a</sup> | 11,18 <sup>b</sup> |
| $t_{cut}$ , min  | 31,16 <sup>a</sup> | 32,70 <sup>a</sup> | 44,54 <sup>a</sup> | 19,31 <sup>b</sup> |
| $t_{G'30}$ , min | 37,58 <sup>a</sup> | 25,00 <sup>b</sup> | 45,12 <sup>a</sup> | 17,46 <sup>b</sup> |

Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ); Número de réplicas = 3; Número de observaciones, N = 12. Parámetros de tiempo explicados en el texto.

Los parámetros ópticos aumentaron significativamente con el aumento de la concentración de proteína. Esto se debería a que, a concentración constante de enzima, la saturación de la enzima por el sustrato induce un aumento significativo de los parámetros ópticos de tiempo ( $t_{max}$ ,  $t_{2max}$ ,  $t_{2min}$ ). Esto también fue observado por Castillo et al. (2003b) al coagular leche de cabra a diferentes concentraciones de proteína. Aunque no se observaron diferencias significativas para  $t_{gel}$  y  $t_{cut}$ , se observó una disminución significativa en los tiempos de corte reológico a 30 Pa ( $t_{G'30}$ ) en 33%, con el aumento de la concentración de proteína. En este sentido, también se observa un acortamiento de la separación de tiempo entre  $t_{max}$  y  $t_{cut}$  al aumentar el porcentaje de proteína. Castillo et al. (2003b) también observaron este comportamiento en la determinación de la distancia

entre  $t_{max}$  y  $t_{cut}$ , en el proceso de coagulación de la leche de cabra. Esto probablemente se debió al aumento de la velocidad de agregación por el incremento del número de colisiones entre las micelas de caseína. Varios autores han encontrado que la velocidad de endurecimiento de la cuajada aumentó al incrementarse la concentración de proteína (Van Hooydonk y van den Berg, 1988; Guinee et al., 1997) y el efecto es mayor comparado con la etapa de hidrólisis (Fox et al., 2017). La **Tabla 5** muestra un incremento significativo en  $t_{clot}$  a medida que se incrementa la concentración de proteína acortándose la distancia en tiempo con  $t_{gel}$ . Esto sugiere que, a una mayor concentración de proteína,  $t_{gel}$  tiende a ser similar a  $t_{clot}$ . Como ya se mencionó esto se debería a un retardo en el tiempo de coagulación por saturación de la enzima. También podemos observar que los valores de  $t_{G'30}$  tienden a disminuir al aumentar el contenido de proteína, mientras que  $t_{cut}$  tienden a mantenerse constante, lo que sugiere que el tiempo de corte medido a 30 Pa es más sensible al cambio de contenido de proteína. En adición a esto las precisiones de las determinaciones reológicas del tiempo de corte son mejores en comparación con las de las determinaciones visuales tal como lo muestra la **Figura 48**.

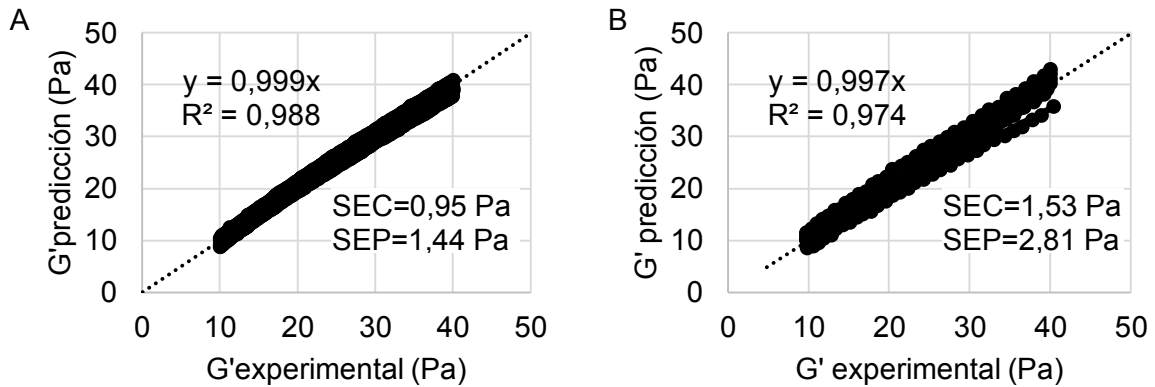


**Figura 48.** Variabilidad de datos experimentales de  $t_{G'30}$  y  $t_{cut}$ . Se muestra el promedio con rangos de variación de desviación estándar (DS).

#### 4.3.4 Ecuaciones para la monitorización de la dureza de la cuajada

Según los estudios previos, la dureza de la cuajada para el corte podría ser determinada objetivamente utilizando medidas reológicas mediante el sensor de dispersión de luz NIR. Por lo tanto, se determinó una ecuación para la

monitorización de la dureza de la cuajada en términos del módulo elástico ( $G'$ ) basada en la ecuación 17, que incluyó el porcentaje de proteína (P) y la ratio de dispersión (R) como variables independientes, a la que denominamos  $G' = f(R, P)$ , y que fue ajustada a los datos correspondientes a las temperaturas de 30 y 40 °C, obteniéndose las calibraciones presentadas en la **Figura 49**.

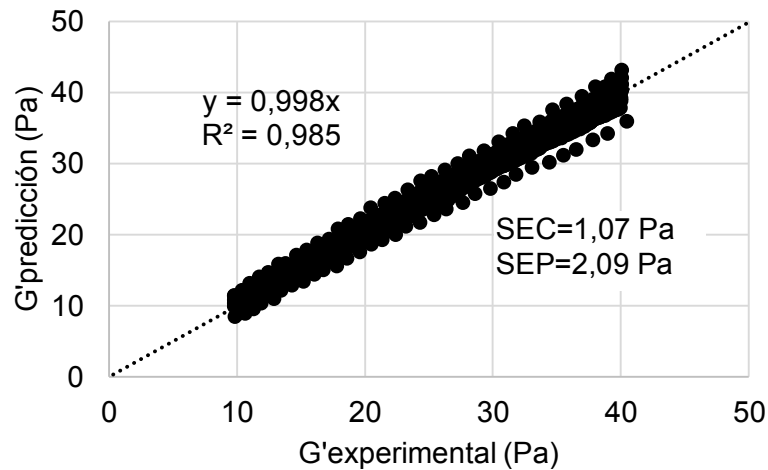


**Figura 49.** Calibración del modelo de monitorización de la dureza de la cuajada,  $G' = f(R, P)$ . A) 30 °C y B) 40 °C. A dos niveles de proteínas (3,4 y 5,1%). Los términos de la ecuación están explicados en el texto.

Como podemos observar, esta ecuación presenta un rango de validez de 10 a 40 Pa, cubriendo un amplio rango de niveles de dureza de la cuajada. Al observar los valores de la pendiente de la recta de calibración, así como de  $R^2$  y SEC, vemos que la ecuación se ajusta bien a los datos experimentales. También podemos observar que la calibración a 40 °C presenta una menor calidad predictiva que la ecuación ajustada a 30 °C. Esto podría deberse al efecto que ocasiona la elevada temperatura sobre la actividad de la enzima la cual está cerca de su temperatura de desnaturalización (Troch et al., 2017). También podría atribuirse a que a esta alta temperatura las reacciones de agregación son muy rápidas impidiendo que los grupos de paracaseína se reestructuren y formen suficientes enlaces intermoleculares para tener una estructura más estable frente a los procesos de sinéresis (Walstra, 2003; Mellema et al., 2002).

Por otro lado, se realizó una validación cruzada de esta ecuación, según lo descrito por Mark y Workman (2003) y Schönbach et al. (2007), obteniendo errores estándar de predicción (SEP) de 1,44 y 2,81 Pa para las temperaturas de 30 y 40 °C respectivamente. Por tanto, la ecuación reproduce mejor los datos experimentales a 30 °C.

Por otro lado, se decidió probar una ecuación de ajuste para todos los niveles de proteína y temperatura,  $G' = f(R, P, T)$ , obteniendo el ajuste mostrado en la **Figura 50**.



**Figura 50.** Ajuste de la ecuación de monitorización  $G' = f(R, P, T)$  a dos niveles de temperatura (30 y 40 °C) y de proteína (3,4 y 5,1%).

Como podemos observar la ecuación tiene un buen ajuste a los datos; sin embargo, cuando se realizó la validación cruzada el error estándar de predicción fue ligeramente superior a dos, probablemente debido a las condiciones amplias de temperatura y porcentaje de proteína empleadas en el ajuste. Por lo tanto, se debería emplear la ecuación de estimación de la dureza fijando la temperatura de coagulación, proporcionando robustez al modelo al tener menos variables de ajuste. Nótese que en la industria las variaciones de temperatura no son tan amplias; según algunos reportes pueden variar en  $\pm 0,7 \text{ °C}$  (Castillo et al., 2005).

#### 4.4 Conclusiones

La temperatura tuvo un efecto significativo en todos los parámetros de tiempo ( $p < 0,001$ ), que tienden a disminuir con el aumento de la misma. Hay dos fenómenos que explican esto. En primer lugar, la temperatura acelera la hidrólisis enzimática en la etapa primaria de la coagulación de la leche. Segundo, la temperatura acelera la agregación de las micelas de caseína durante las fases no enzimáticas de la coagulación de la leche.



Por otro lado, si la velocidad de hidrólisis es independiente de la concentración de la enzima, la enzima por saturación del sustrato tiende a inducir un aumento significativo de los parámetros ópticos ( $t_{2max}$ ,  $t_{max}$  y  $t_{2min}$ ) cuando la concentración de proteína aumenta, mientras que las velocidades de las reacciones de agregación y endurecimiento aumentan cuando las micelas de para-k-caseína están más juntas, a altas concentraciones de proteína, lo que resulta en una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) de  $t_{G'30}$  con una concentración creciente de proteína.

Por otra parte, los tiempos de corte reológicos fueron más reproducibles que las predicciones visuales, mostrando mayores desviaciones estándar que las reológicas, demostrando que el uso de un sensor óptico calibrado en base a determinaciones reológicas, podría mejorar la selección del tiempo de corte.

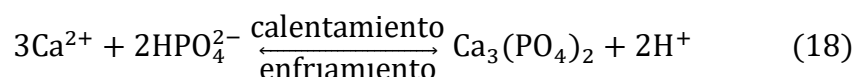
Finalmente, las ecuaciones de monitorización de la dureza de la cuajada  $G' = f(R, P)$  y  $G' = f(R, P, T)$ , presentan una buena calidad predictiva, si bien se recomienda la aplicación de la primera, ya que las variaciones de temperatura de coagulación usadas en la industria no son tan amplias.

## Capítulo V. Calibración y validación a nivel de laboratorio de un modelo de predicción del módulo elástico, $G'$ , de la cuajada, utilizando leche de vaca

### 5.1 Introducción

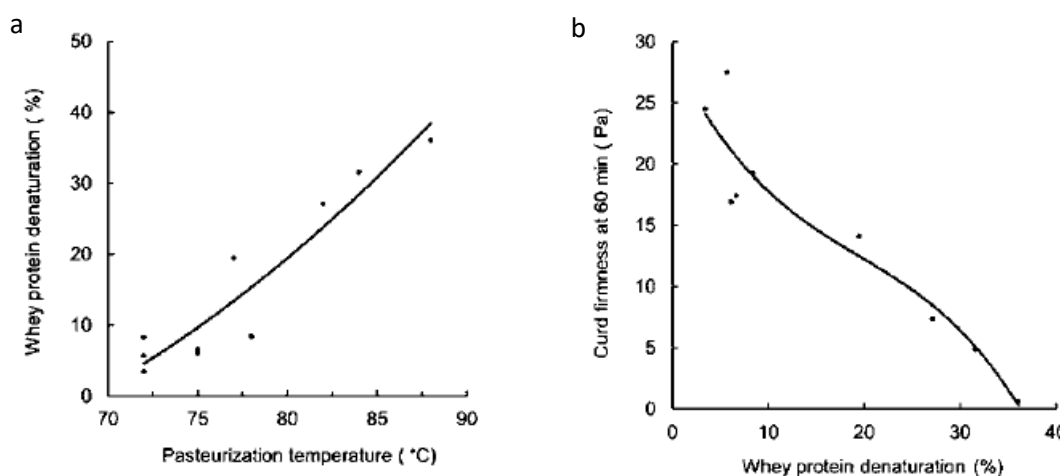
Se ha estudiado el efecto de varios factores (proteína, concentración de calcio y enzima, pH, temperatura y tipo de enzima) sobre la predicción del tiempo de coagulación enzimática y el tiempo de corte de cuajada para la leche de vaca (Castillo, et al., 2006). Sin embargo, el factor que tiene una gran influencia en todas las fases de la coagulación enzimática de la leche es, sin duda, la temperatura. A nivel industrial la leche pasa por un tratamiento térmico de pasteurización para eliminar microorganismos patógenos (Walstra et al., 2006).

El tratamiento térmico debe permitir la eliminación de los microorganismos patógenos, reducir aquellos que pueden causar defectos en los quesos y conservar su aptitud para la coagulación (Kousta et al., 2010). La pasteurización de la leche a 65 °C tiene un cierto efecto beneficioso sobre la coagulación por cuajo, debido a que produce un incremento de fosfato de calcio coloidal o CCP (Anema, 2008) y en consecuencia una disminución del pH (On-Nom et al., 2010), siendo estos cambios reversibles cuando la leche se pasteuriza a bajas temperaturas tal como se describe en la ecuación siguiente:



Sin embargo, a más altas temperaturas y tiempos largos estos cambios se vuelven parcialmente irreversibles (Fox et al., 2015). Esto puede provocar, por un lado, la desnaturalización de la proteína de suero ya que a temperatura >65 °C comienza el desplegamiento de la  $\beta$ -lactoglobulina (Claeys et al., 2001), que posteriormente puede enlazarse con la  $\kappa$ -caseína micelar y, por otro lado, se produce la deposición de fosfato de calcio insoluble inducido por calor y la reducción de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , que es importante para la interacción de las micelas de para-caseína y, por tanto, la agregación, durante la formación del gel. En cualquier caso, el  $\text{Ca}^{2+}$  perdido por calentamiento de la leche podría ser reemplazado fácilmente por la adición de  $\text{CaCl}_2$  o por medios más indirectos tales como la acidificación (Kethireddipalli y Hill, 2015).

La complejación de la proteína de suero desnaturalizada con la  $\kappa$ -caseína afecta negativamente a la fase no enzimática de la coagulación por cuajo, presumiblemente debido al bloqueo de las zonas de agregación intermicelar (Fox et al., 2015). Sin embargo, varias investigaciones mencionan que el efecto en la fase de hidrolisis es pequeño o no tiene efecto significativo (Vasbinder et al., 2003; Anema et al., 2007; Sandra y Dalgleish, 2007). El aumento del grado de desnaturalización de la proteína de suero (en % del total) a un nivel  $> 15\%$  por un tratamiento térmico elevado de la leche, p. ej.,  $> 80\text{ }^{\circ}\text{C} \times 15\text{ s}$ , afecta las características de la coagulación del cuajo a tal punto que la leche es inadecuada para la elaboración del queso (**Figura 51**).



**Figura 51.** Efecto de la temperatura de pasteurización, durante 15 s. (a) Nivel de desnaturalización de la proteína de suero. (b) Firmeza de la cuajada 60 min después de la adición del cuajo en función de la concentración de la proteína del suero desnaturalizada. Adaptado de Fox et al. (2017).

El almacenamiento en frío de la leche promueve una pequeña disolución de CCP y  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CN), lo que afecta la coagulación de la leche por el cuajo, al aumentar el tiempo de coagulación enzimática (RCT) y reducir la firmeza de la cuajada, disminuyendo así el rendimiento del queso. Sin embargo, se sabe que la pasteurización de la leche almacenada en frío recupera, en cierta medida, sus propiedades de coagulación, invirtiendo los cambios mencionados en la estructura de la micela de caseína (Maciel et al., 2015). En la práctica, la leche debe ser pasteurizada inmediatamente antes de la elaboración de quesos y no debe almacenarse en frío antes de usarla (Fox et al., 2017).

Como ya hemos visto, la temperatura a la que es sometida la leche afecta al proceso de coagulación y este efecto puede notarse también cuando se

establece una determinada temperatura de coagulación en una cuba quesera. Este efecto se debe principalmente a la disminución del pH debido a la precipitación de CCP (**Tabla 6**) y a una mayor formación de enlaces hidrofóbicos durante las fases de agregación y endurecimiento, a medida que se incrementa la temperatura de coagulación (Mellema et al., 2002; Bansal et al., 2008). La leche segregada por la vaca contiene aproximadamente 200 mg de CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Debido a su baja concentración en el aire, el CO<sub>2</sub> es rápidamente y, de hecho, irreversiblemente perdido de la leche después del ordeño; su pérdida se acelera por calentamiento, agitación y tratamiento al vacío. Esta pérdida de CO<sub>2</sub> provoca un aumento del pH de aproximadamente 0,1 unidad y una disminución de la acidez titulable de casi 0,02%, expresada como ácido láctico (Fox y McSweeney, 1998). Bajo condiciones de calentamiento relativamente moderadas, este cambio en el pH es más o menos compensado por la liberación de H<sup>+</sup> (ecuación 18) en la precipitación de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Fox et al., 2015)

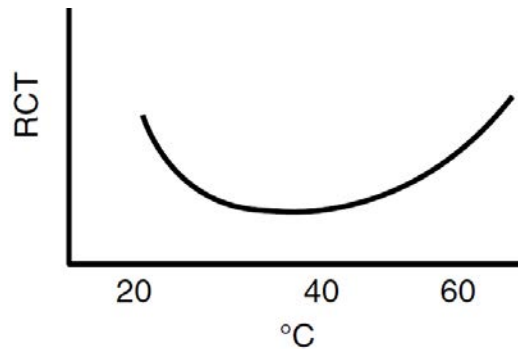
**Tabla 6.** El pH de leche a varias temperaturas.

| Temperatura(°C) | pH de la leche |
|-----------------|----------------|
| 20              | 6,64           |
| 30              | 6,55           |
| 40              | 6,45           |
| 50              | 6,34           |
| 60              | 6,23           |

Reproducido de Fox et al. (2015).

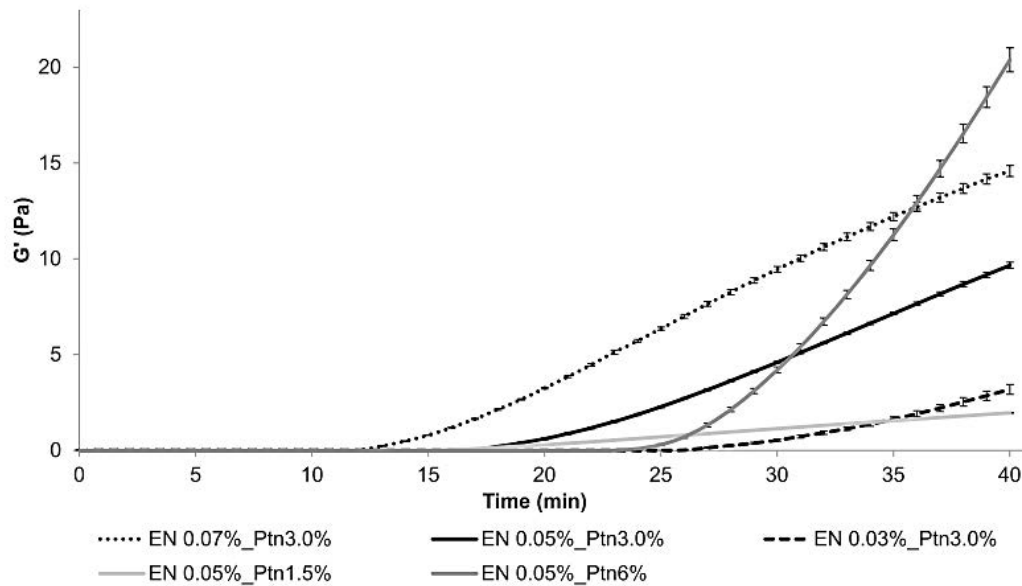
El efecto principal de la temperatura establecido sobre la coagulación de la leche se produce en la fase secundaria, no enzimática, que no ocurre a < 10 °C, debido a que esta fase tiene un mayor valor de Q<sub>10</sub> (11-30) en comparación con el valor de Q<sub>10</sub> (1,3-2) de la fase de hidrólisis (Abdelgawad et al., 2014). Esto es debido, principalmente, a una menor formación de enlaces hidrofóbicos entre micelas de para-κ-caseína (Dauphas et al., 2005; Fox et al., 2015). Por encima de esta temperatura, el tiempo de coagulación disminuye hasta un mínimo amplio a 40-45 °C y luego aumenta de nuevo a medida que la enzima se desnaturaliza (**Figura 52**). En la elaboración de quesos, la coagulación del cuajo se produce normalmente a una temperatura muy por debajo de la temperatura óptima, p.ej., 31 °C para muchas variedades. La temperatura más baja es necesaria para optimizar el crecimiento de las bacterias iniciadoras mesofílicas, que tienen una

temperatura óptima de crecimiento de ~ 27-28 °C y no crecerán, y tal vez ni siquiera sobrevivirán, a temperaturas mayores a 40 °C. Además, la estructura del coágulo se mejora a temperatura más baja, que se utiliza por lo tanto incluso para los quesos hechos usando cultivos termófilos (Fox et al., 2017).



**Figura 52.** Efecto de la temperatura de cuajado en el tiempo de coagulación por cuajo (RCT). Reproducido de Fox et al. (2015).

Los ensayos reológicos, realizados mediante la medición del módulo elástico ( $G'$ ), se consideran la forma más fácil y directa de caracterizar la formación de gel en el proceso de coagulación de la leche, ya que un aumento en el módulo de almacenamiento sobre el tiempo de coagulación implica la formación de redes (Leite et al., 2015). Se ha evaluado el efecto de la concentración de proteína en la cinética de endurecimiento de geles de leche por cuajado, a partir de leche en polvo desnatada low heat, aplicando pruebas de cizallamiento de pequeña amplitud oscilatoria. La **Figura 53** muestra el perfil reológico de los geles lácteos formados usando diferentes concentraciones de enzima y de proteína. El tiempo en que los agregados son lo suficientemente grandes para ser identificados a simple vista se llama tiempo de floculación o tiempo de coagulación del cuajo (RCT) (Janhøj y Qvist, 2010). Posteriormente, los agregados se unen en una red continua que, al ser medida con un reómetro, se tiene que  $\text{tg}\delta = 1$  o  $G' = G''$ , lo que indica el tiempo requerido para iniciar la fase de endurecimiento de la coagulación de la leche o tiempo de gelificación (Sandra y Corredig, 2013).



**Figura 53.** Evaluación reológica del proceso enzimático de coagulación de la leche con diferentes concentraciones de enzimas y proteínas. Los valores son medias de las repeticiones (N = 6). EN: Enzima; Ptn: Proteína. Reproducido de Leite et al. (2017).

También se ha evaluado el efecto de la temperatura en el perfil reológico de la coagulación de leche, coagulando mezclas de leche de oveja, cabra y vaca a 27, 32 y 37 °C, encontrándose que al incrementar la temperatura de coagulación los parámetros reológicos  $t_{gel}$ ,  $t_{cut30}$  y  $t_{cut60}$  decrecían (Abdelgawad et al., 2014).

Por otro lado, se ha evaluado el efecto de la temperatura (Abdelgawad et al., 2014) y concentración de proteína (Castillo et al., 2003b) en la predicción del tiempo de corte para diferentes tipos de leche (cabra, vaca y oveja), utilizando dispersión NIR. Sin embargo, ninguno de los estudios previos evalúa la determinación de la dureza de la cuajada de leche de vaca en tiempo real.

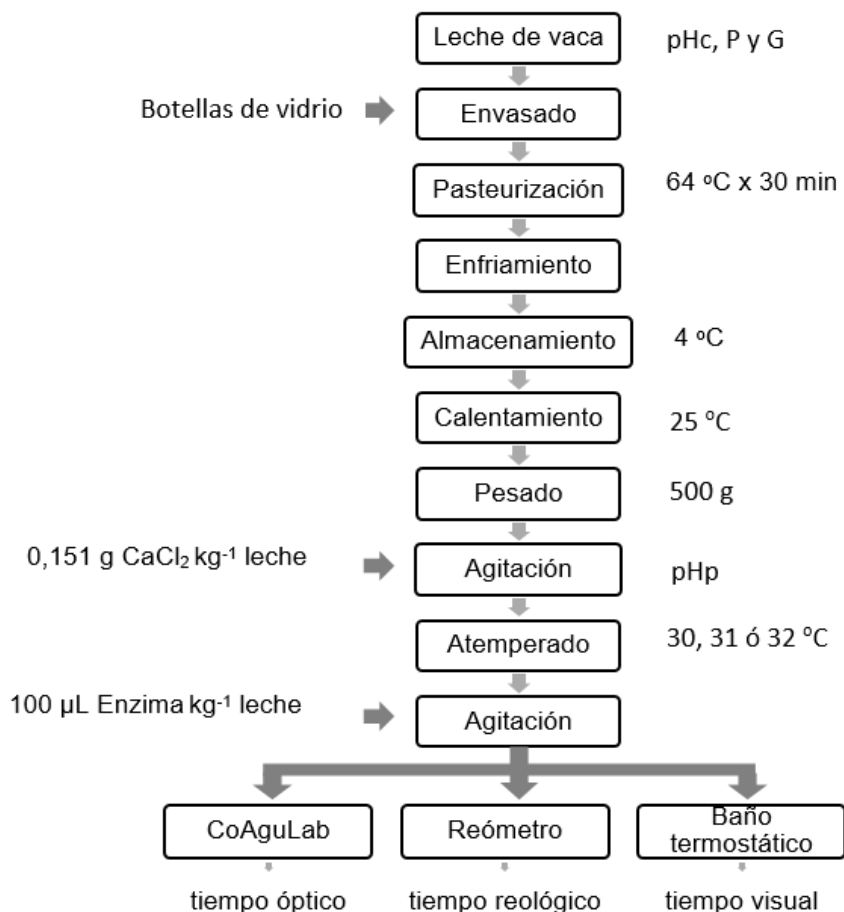
Como hemos visto, la temperatura tiene una influencia muy relevante en la coagulación de la leche. Se sabe que en las plantas de elaboración de queso existen factores que podrían hacer variar dicha temperatura como por ejemplo la temperatura del medio de calefacción y la del medio ambiente. En tal sentido se decidió investigar el comportamiento de la ecuación  $G' = f(R, P)$  a tres temperaturas de coagulación (30, 31 y 32°C) para evaluar la robustez del modelo frente a los posibles cambios de temperatura del sistema.

## 5.2 Materiales y métodos

Para realizar la calibración y validación del modelo de predicción a nivel de laboratorio se aplicó el diseño experimental de la sección 3.3 correspondiente al objetivo específico B.

### 5.2.1 Procedimiento experimental

A cada unidad experimental se le aplicó el diagrama de flujo de la **Figura 54**.



**Figura 54.** Diagrama de flujo para la coagulación enzimática de leche de vaca. Parámetros descritos en el texto.

Se utilizó leche entera de vaca que fue suministrada por la granja Mogent, ubicada en la provincia de Barcelona. A la leche cruda se le midió el pH (pHc), utilizando el pHmetro descrito en 4.2.1, el porcentaje de proteína (P) y el de grasa (G), utilizando un equipo NIRSystem 5000 con monocromador (Foss, Hillerød, Dinamarca), que fue calibrado con 20 muestras patrón de leche de vaca estandarizada. Luego, la leche cruda fue repartida en botellas de vidrio de 500 mL de capacidad para ser sometidas a pasteurización a 64 °C por 30 min. A continuación, fueron enfriadas y almacenadas a 4 °C para realizar

posteriormente las coagulaciones. Cada botella fue calentada a 25 °C para homogeneizar el contenido de grasa, para luego pesar 500 g de muestra en un vaso de precipitados de 500 mL. Entonces se adicionaron 0,151 g de cloruro de calcio por kilogramo de leche, utilizando la solución descrita en la sección 4.2.1, se agitó por espacio de 30 s, y se midió el pH de la leche preparada (pHp). Luego se introdujo la leche en el baño termostático hasta que alcanzó la temperatura de coagulación. Una vez alcanzado el equilibrio térmico, se adicionó la enzima descrita en la sección 4.2.1, en una relación de 100  $\mu\text{L}$  enzima  $\text{kg}^{-1}$  leche, que fue mezclada bien con una espátula durante 30 s. Inmediatamente, dos alícuotas de 80 mL se colocaron en los vasos del sistema óptico descrito en 4.2.1 y otra alícuota de 40 mL se colocó dentro del vaso del reómetro descrito también en 4.2.1 y se pusieron en marcha ambos equipos a la vez. También una muestra de 300 mL fue puesta en el baño termostático a la misma temperatura de coagulación que las otras muestras. El tiempo de corte se determinó visualmente ( $t_{\text{cut}}$ ) siguiendo la metodología utilizada por Arango et al. (2013), utilizando una espátula para separar el gel de las paredes del vaso de precipitados hasta que la separación era completamente limpia y el gel ofrecía resistencia elástica sin rotura cuando se forzaba hacia el centro del vaso de precipitados con la espátula. Se monitorizó la dureza de la cuajada ( $G'$ ) de leche de vaca y el tiempo de corte reológico a 30 Pa ( $t_{G'30}$ ).

Antes de realizar los experimentos se evaluó un sensor con ventana de zafiro para comprobar si éste producía una mejor señal que el sensor sin ventana que se estaba utilizando hasta ese momento, para lo cual se coagularon tres lotes de leche de vaca de distinta composición a la temperatura de 31 °C y se realizó una comparación aplicando para cada muestra el diagrama de flujo de la **Figura 54** y utilizando el primer diseño experimental de la sección 3.3 correspondiente al objetivo específico B.

### 5.2.2 Análisis estadístico

En este estudio, los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SAS (SAS ® 9.4, 2012). El análisis de varianza (ANOVA) se realizó mediante el procedimiento del modelo lineal general (GLM) de SAS, teniendo como variables independientes el lote y la temperatura y como variables dependientes  $R_{\text{max}}$ ,  $t_{\text{max}}$ ,  $t_{\text{gel}}$ ,  $t_{\text{cut}}$  y  $t_{G'30}$ , mientras que los coeficientes de

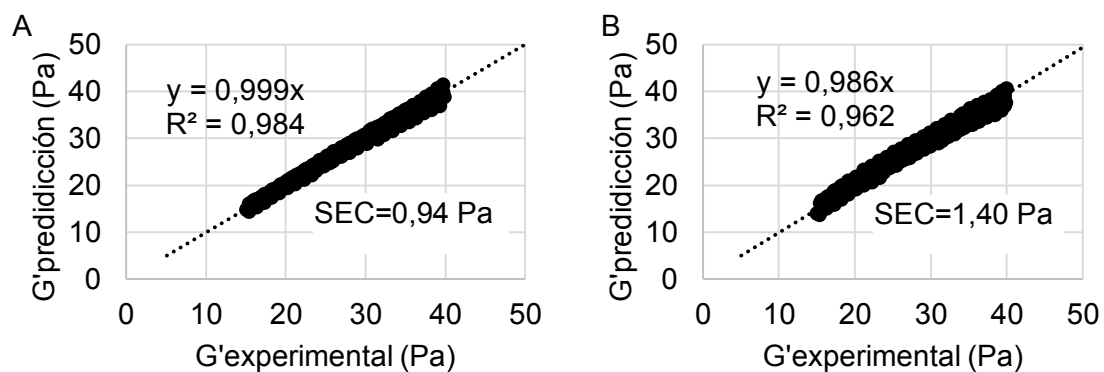


correlación de Pearson,  $r$ , fueron obtenidos por el procedimiento de correlación (CORR). La media de mínimos cuadrados (LSMEANS) y la significación de cada tratamiento se computaron mediante suma de cuadrados de tipo IV. En este experimento las medias fueron consideradas significativamente diferentes a  $p < 0.05$ . Se utilizó una regresión no lineal para la calibración del modelo  $G' = f(R, P)$ . Se utilizó el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar de calibración (SEC) para determinar la calidad de la calibración de los modelos. Para la validación de los modelos se empleó una validación cruzada, determinando el error estándar de predicción (SEP).

### 5.3 Resultados y discusión

#### 5.3.1 Comparación de sensores

Se obtuvo la calibración de la ecuación de predicción a la temperatura de 31 °C para los sensores con y sin ventana de zafiro, obteniendo su  $R^2$  y SEC como muestra la **Figura 55**. Como se observa, la calibración de la ecuación de predicción utilizando el sensor sin ventana resultó ser mejor que con ventana, debido a que la intensidad de luz captada por la fibra receptora es menor, probablemente como consecuencia de interferencias por reflexión especular. Por ello se optó por utilizar el sensor sin ventana de zafiro para los siguientes experimentos.



**Figura 55.** Comparación de calibraciones de las ecuaciones de monitorización, coagulando leche de vaca a 31 °C. A) sensor sin ventana de zafiro, B) sensor con ventana de zafiro. N = 12.

#### 5.3.2 Análisis de varianza de los parámetros ópticos y de corte

Una vez elegido el sensor sin ventana de zafiro, se realizaron las coagulaciones de los cuatro lotes de leche a las tres temperaturas de coagulación. Luego se

realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar las principales fuentes de variación en las variables dependientes ( $R'_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{\text{gel}}$ ,  $t_{\text{cut}}$  y  $t_{G'30}$ ), reportándose los valores de  $R^2$  y F para cada variable dependiente. En un principio se consideraron como principales fuentes de variación la temperatura (T), el lote (L) y la réplica; y como covariables el pH de la leche cruda (pHc) y el pH de la leche preparada para la coagulación (pHp). Sin embargo, al realizar el ANCOVA preliminar, la réplica, y los pHs resultaron no tener un efecto significativo sobre las variables dependientes, por lo cual se eliminaron del análisis final mostrado en la **Tabla 7**. Un efecto no significativo de la réplica sobre parámetros ópticos y tiempos de corte también fue encontrado por Castillo et al. (2006) al evaluar el efecto de la temperatura y la concentración de inóculo en las propiedades reológicas y de dispersión de luz durante la coagulación de leche en polvo reconstituida. El ANOVA mostró que el modelo determinado fue altamente significativo ( $p < 0,001$ ) para todas las variables dependientes. Por otro lado, a pesar de la cercanía entre temperaturas, se encontró un efecto altamente significativo de la temperatura en todas las variables dependientes, de acuerdo con lo reportado por Abdelgawad et al. (2014) quienes evaluaron el efecto de la temperatura en parámetros ópticos y tiempos de corte en la coagulación de mezclas de leche de oveja, cabra y vaca. El efecto de la temperatura sobre  $R_{\max}$  fue analizado por Castillo et al. (2003b), al coagular leche de cabra a cinco niveles de temperatura (20, 25, 30, 35 y 40°C), encontrando que la temperatura tiene un efecto altamente significativo sobre  $R_{\max}$ , como en nuestro caso. Como se ha mencionado anteriormente,  $R_{\max}$  representa la cantidad de luz dispersa hacia la fibra receptora en el inicio de la agregación de las micelas hidrolizadas. Esta luz dispersa estaría afectada por los cambios de temperatura ya que dichos cambios afectarían al equilibrio de minerales y nivel de hidratación de las micelas de caseína (Orlien et al., 2010) y, por otro lado, al aumento de velocidad de desplazamiento de las micelas hidrolizadas que se encuentran dentro de la leche (Wastra, 2003). Como ya se mencionó, la temperatura afecta tanto a la fase enzimática como a la no enzimática (Walstra, 2006), siendo  $t_{\max}$  influido mayoritariamente por la fase enzimática y  $t_{\text{cut}}$  y  $t_{G'30}$  por las fases enzimática y no enzimática, siendo mayor el efecto de la temperatura en la fase no enzimática (Fox et al., 2015). Por lo tanto, el efecto en estos dos últimos parámetros es mayor. El efecto del lote fue significativo para todas las variables dependientes

excepto para el valor de  $t_{\max}$  ( $p=0,055$ ), el cual tiende a ser significativo. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por Castillo et al. (2000), quienes evaluaron el efecto del lote en  $R'_{\max}$ ,  $t_{\max}$  y  $t_{\text{cut}}$ , durante la coagulación de leche de cabra, encontrando un efecto significativo para  $t_{\max}$  ( $p < 0,05$ ) y para  $t_{\text{cut}}$  ( $p < 0,01$ ). La diferencia en los resultados para  $t_{\max}$  se debería a que en este caso se coagularon ocho lotes de leche mientras que en nuestro caso fueron cuatro, ya que como se sabe aumentando el número de lotes, la probabilidad de encontrar un valor atípico que afecte a  $p$  disminuye.

**Tabla 7.** Análisis de varianza de parámetros de tiempos ópticos y de corte, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de laboratorio.

| Parámetros       | R <sup>2</sup> | Model<br>F            | Factores principales  |                       | Interacción        |
|------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
|                  |                |                       | T                     | L                     | LxT                |
|                  |                |                       | (DF=2)<br>F           | (DF=3)<br>F           | (DF=6)<br>F        |
| $R_{\max}$       | 0,811          | 7,82 <sup>***</sup>   | 36,00 <sup>***</sup>  | 6,85 <sup>**</sup>    | 0,82 <sup>ns</sup> |
| $t_{\max}$       | 0,955          | 38,51 <sup>***</sup>  | 164,84 <sup>***</sup> | 2,99 <sup>ns</sup>    | 0,74 <sup>ns</sup> |
| $t_{\text{gel}}$ | 0,961          | 45,17 <sup>***</sup>  | 174,97 <sup>***</sup> | 35,21 <sup>***</sup>  | 0,11 <sup>ns</sup> |
| $t_{\text{cut}}$ | 0,989          | 160,62 <sup>***</sup> | 592,33 <sup>***</sup> | 159,08 <sup>***</sup> | 5,81 <sup>**</sup> |
| $T_{G'30}$       | 0,986          | 127,97 <sup>***</sup> | 480,39 <sup>***</sup> | 130,69 <sup>***</sup> | 3,13 <sup>*</sup>  |

Número de observaciones  $N = 36$ ; T, temperatura; L, lote; LxT, interacción lote x temperatura; R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; F, ANOVA F-estadístico; DF, grado de libertad; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; ns, no significativo.

Podemos observar en la Tabla 8 que existe una correlación altamente significativa y directa de T con  $R_{\max}$ , mientras que con las demás variables dependientes las correlaciones son inversas, de acuerdo con lo reportado por Castillo et al. (2005) quienes evaluaron la correlación entre las variables mencionadas en la coagulación de leche de cabra a una temperatura de  $33 \pm 0,7$  oC.

**Tabla 8.** Análisis de correlación entre valores de las variables independientes y dependientes, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de laboratorio.

|                  | T                     | P                    | G                    | pHc                  | pHp                   |
|------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| $R_{\max}$       | 0,747 <sup>***</sup>  | 0,058 <sup>ns</sup>  | -0,107 <sup>ns</sup> | -0,323 <sup>ns</sup> | -0,602 <sup>***</sup> |
| $t_{\max}$       | -0,949 <sup>***</sup> | -0,156 <sup>ns</sup> | -0,313 <sup>ns</sup> | 0,183 <sup>ns</sup>  | 0,508 <sup>**</sup>   |
| $t_{\text{gel}}$ | -0,824 <sup>***</sup> | -0,196 <sup>ns</sup> | -0,047 <sup>ns</sup> | 0,374 <sup>*</sup>   | 0,620 <sup>***</sup>  |
| $t_{\text{cut}}$ | -0,818 <sup>***</sup> | -0,336 <sup>ns</sup> | -0,210 <sup>ns</sup> | 0,394 <sup>*</sup>   | 0,668 <sup>***</sup>  |
| $T_{G'30}$       | -0,820 <sup>***</sup> | -0,321 <sup>ns</sup> | -0,173 <sup>ns</sup> | 0,417 <sup>*</sup>   | 0,677 <sup>***</sup>  |

\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; ns, no significativo. El significado de los parámetros y contantes están explicados en el texto.

No se observan relaciones significativas de los porcentajes de proteína (P) y grasa (G) con  $R_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{\text{gel}}$ ,  $t_{\text{cut}}$  y  $T_{G'30}$ , coincidiendo con lo observado por Castillo et al. (2005), que reportaron las mismas relaciones para las variables

mencionadas excepto para  $t_{cut}$  que fue significativa. Esto, como ya se mencionó, se debería a que en este último caso se emplearon 20 lotes de leche, incrementando la probabilidad de encontrar un rango más amplio de P y G que puedan afectar a  $t_{cut}$ . También se observa una relación altamente significativa e inversa entre pH<sub>p</sub> y  $R_{max}$ , mientras que para el resto de variables dependientes se observa una relación altamente significativa directa. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Esteves et al. (2003) que evaluaron el efecto del pH en  $t_{gel}$  durante la coagulación de leche en polvo desnatada reconstituída *low heat* y por Castillo et al. (2000) que evaluaron el efecto en  $t_{max}$ , y  $t_{cut}$  durante la coagulación de leche de cabra. En nuestro caso las relaciones no son tan claras entre los tiempos de corte y el pH pues existe un efecto significativo del lote que está asociado a sus valores de pH, provocando probablemente, una mayor dispersión de tiempos de corte en función del pH. Como se ha mencionado, el descenso de los tiempos de corte a medida que disminuye el pH de la leche se debería a la disminución de carga negativa en la superficie de la micela y a la liberación de calcio del interior de la misma (Horne, 2014), lo que contribuiría a alcanzar la dureza de corte en un tiempo menor.

### **5.3.3 Comparación de medias de mínimos cuadrados de los parámetros de tiempos ópticos y de corte**

La **Tabla 9** muestra la comparación de medias de mínimos cuadrados para las variables dependientes. Como se puede observar, existe una disminución significativa en todas las variables dependientes a medida que se incrementa la temperatura, excepto para  $R'_{max}$  la cual incrementa su valor a medida que aumenta la temperatura, los valores y las tendencias de estos parámetros están de acuerdo con los resultados reportados por Arango et al. (2013), que determinaron la comparación de medias de mínimos cuadrados de las variables dependientes a tres temperaturas (27, 32 y 37 °C), coagulando leche en polvo reconstituida *low heat* con inulina y utilizando el mismo tipo de enzima y dosis similares de  $CaCl_2$  y enzima. Estas tendencias también se encuentran en otros trabajos como en el reportado por Abdelgawad et al. (2014) que coagularon mezclas de leche de vaca, oveja y cabra a las mismas temperaturas que Arango et al. (2013). Sin embargo, los valores de las medias de los parámetros difieren, principalmente debido a que, en este caso, se utilizaron dosis diferentes de

enzima y  $\text{CaCl}_2$ . Como se puede observar, existe una mayor reducción de  $t_{\text{cut}}$  y  $t_{G'30}$  en comparación con  $t_{\text{max}}$  y  $t_{\text{gel}}$  evidenciando un mayor efecto de la temperatura en la fase no enzimática. Esto, como ya se ha venido discutiendo, sería debido a la creación de un mayor número de enlaces hidrófobos entre micelas de para- $\kappa$ -caseína a medida que se incrementa la temperatura (Castillo, 2001), así como a la reducción de las repulsiones electrostáticas entre micelas debido a una pequeña reducción del pH del medio (Lucey, 2002).

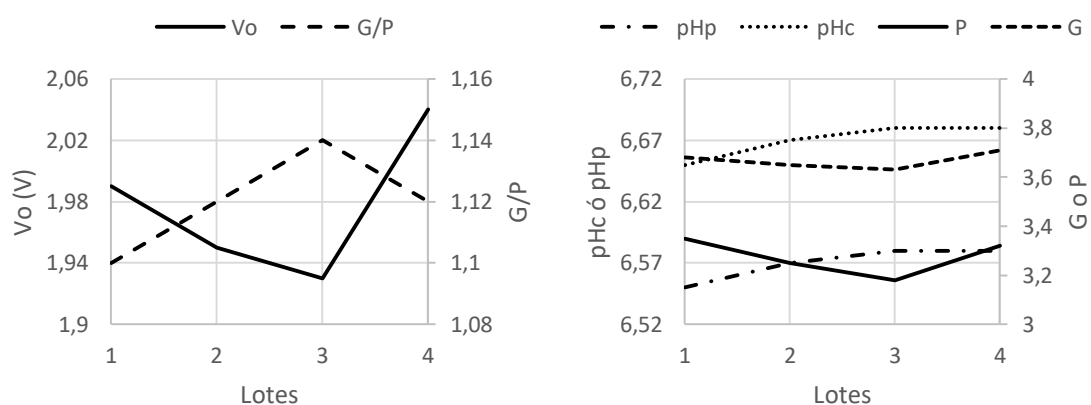
**Tabla 9.** Medias de mínimos cuadrados de parámetros ópticos, visuales y reológicos en función de la temperatura y el lote, obtenidas de la coagulación de leche de vaca a nivel de laboratorio.

|                                 | T (°C)             |                    |                    | Lote               |                    |                    |                    |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                                 | 30                 | 31                 | 32                 | 1                  | 2                  | 3                  | 4                  |
| $R_{\text{max}}$ , adimensional | 1,115 <sup>a</sup> | 1,119 <sup>a</sup> | 1,128 <sup>b</sup> | 1,124 <sup>a</sup> | 1,123 <sup>a</sup> | 1,12 <sup>ab</sup> | 1,116 <sup>b</sup> |
| $t_{\text{max}}$ , min          | 11,4 <sup>a</sup>  | 10,49 <sup>b</sup> | 9,9 <sup>c</sup>   | 10,62 <sup>a</sup> | 10,53 <sup>a</sup> | 10,77 <sup>a</sup> | 10,47 <sup>a</sup> |
| $t_{\text{gel}}$ , min          | 16,62 <sup>a</sup> | 15,93 <sup>b</sup> | 14,52 <sup>c</sup> | 15,07 <sup>a</sup> | 15,32 <sup>a</sup> | 16,12 <sup>b</sup> | 16,25 <sup>b</sup> |
| $t_{\text{cut}}$ , min          | 39,58 <sup>a</sup> | 34,58 <sup>b</sup> | 30,42 <sup>c</sup> | 31,67 <sup>a</sup> | 33,33 <sup>b</sup> | 37,28 <sup>c</sup> | 37,17 <sup>c</sup> |
| $t_{G'30}$ , min                | 38,53 <sup>a</sup> | 34,36 <sup>b</sup> | 29,91 <sup>c</sup> | 31,2 <sup>a</sup>  | 32,86 <sup>b</sup> | 36,48 <sup>c</sup> | 36,54 <sup>c</sup> |

Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ); Número de réplicas = 3; Número de observaciones, N = 36. Variables dependientes explicadas en el texto.

Por otro lado, podemos observar que no existen diferencias significativas en  $R_{\text{max}}$  entre lotes, excepto con respecto al cuarto lote. Además, no existen diferencias significativas entre lotes con respecto a  $t_{\text{max}}$ . Esto indicaría que el grado de unión de las micelas de caseína y los tiempos correspondientes al inicio de la etapa de agregación son similares. Esto tiene sentido, pues como se observa en la **Figura 56**, si bien es cierto que existe una pequeña reducción de proteína en la leche entre los lotes 1 y 3, esta reducción es mínima. En este caso, se esperaría que la pequeña disminución del contenido de proteína hubiese disminuido el valor de  $t_{\text{max}}$  como en el caso de Castillo et al. (2003b) que determinaron una disminución significativa del valor de  $t_{\text{max}}$  al pasar de un concentración de proteína del 5 al 3%, pero al parecer el estrecho rango de variabilidad de proteína que se tiene en nuestro caso ( $3,28 \pm 0,08\%$ ) provoca que este efecto no sea significativo. Además, según Fox et al. (2017), la variación de contenido de proteína en la leche tiene un reducido efecto en la etapa enzimática de la coagulación de la leche. Los valores de  $t_{\text{max}}$  están de acuerdo con el valor promedio de ~10 min reportados por Castillo et al. (2005) al coagular 20 lotes de leche de cabra a 33

°C. En cuanto a la comparación de  $t_{gel}$  en función del lote podemos observar que existe un ligero incremento significativo de este tiempo de  $\sim 1$  min, en los lotes tres y cuatro con respecto a los lotes uno y dos. Esto puede deberse a que la pequeña disminución del porcentaje de proteína tiene una mayor influencia en el tiempo de gelificación que en el tiempo de inicio del periodo de agregación ( $t_{max}$ ) (Fox et al., 2015). Esto se vería también influido por el pH más alto que presentan los lotes tres y cuatro. Como se sabe, a medida que se incrementa el pH, existe menos calcio soluble, el cual es necesario para que se desarrollen la etapas de agregación y endurecimiento del gel (Choi et al., 2007). Una tendencia similar sobre  $t_{gel}$  es reportada por Esteves et al. (2003) al coagular leche en polvo reconstituida a tres niveles de pH (6,0, 6,3 y 6,7). En cuanto a  $t_{cut}$  y  $t_{G'30}$ , en función del lote podemos observar que existe un incremento significativo de estos tiempos en los lotes dos y tres con respecto al lote uno, siendo no significativo este incremento entre el tres y el cuatro. Este hecho se debería otra vez a la disminución del porcentaje de proteína y al incremento de pHp. Castillo et al. (2000) también reportaron una tendencia similar sobre  $t_{cut}$  al coagular leche de cabra a tres niveles de pH (5,5, 6,0 y 6,5). Se esperaba que con el incremento del porcentaje de proteína en el lote cuatro estos tiempos disminuirían, pero no fue el caso, lo que podría deberse a algún tipo de anomalía en la leche (p.ej. alteraciones en la micela de caseína o bajo nivel de CCP) ya que el valor de  $V_0$  (voltaje al inicio de la coagulación) para el cuarto lote fue elevado (**Figura 56**).



**Figura 56.** Medias de  $V_0$ , pHp, pHc, P, G y G/P en función del lote. El significado de los parámetros está explicado en el texto.

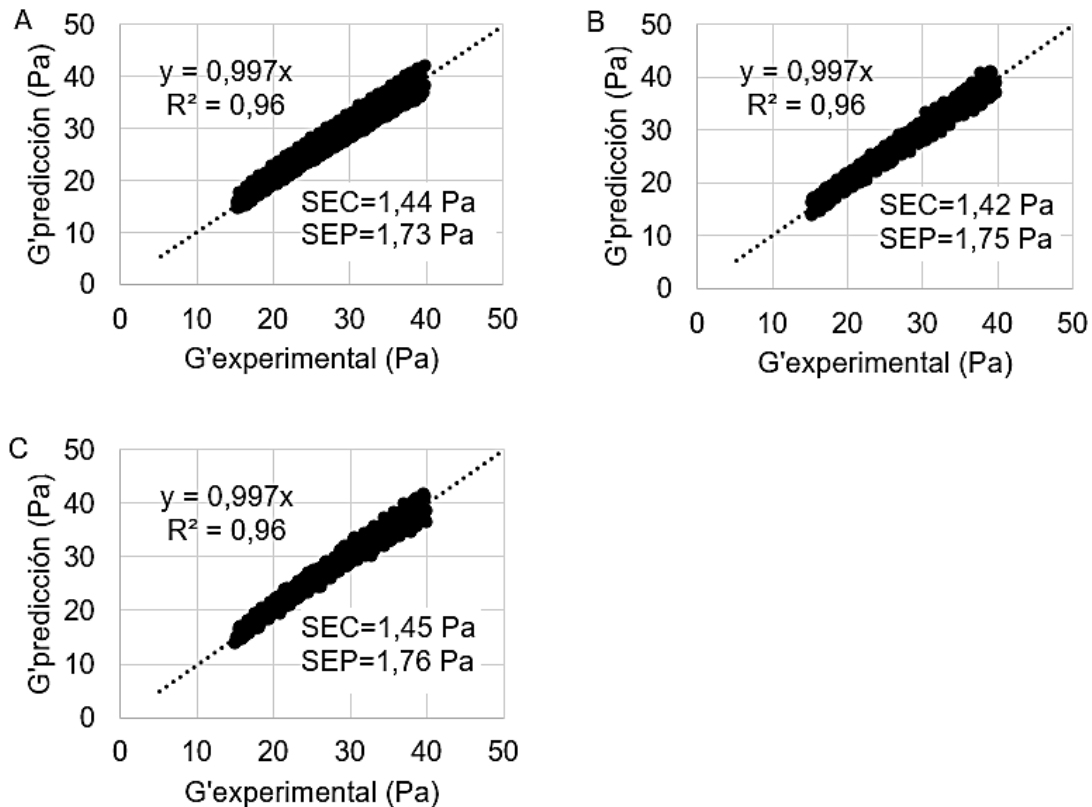
Por otro lado, la ratio grasa/proteína (G/P) se mantuvo en  $1,12 \pm 0,02$ . Esta ratio puede variar dependiendo de varios factores como raza, alimentación, clima,

años y fases de lactación, pero en general se tienen reportes de variabilidad de 1,1 a 1,3 para raza Holstein que es la que comúnmente se utiliza para la producción de leche (Paura et al., 2012; Jamrozik y Schaeffer, 2012; Nishiura et al., 2015).

#### **5.3.4 Calibración y validación a nivel de laboratorio del modelo de predicción a tres temperaturas de coagulación**

La **Figura 57** muestra las calibraciones y validaciones de la ecuación de predicción de coagulación de leche a 30, 31 y 32 °C sobre un rango de dureza de 15 a 40 Pa, observándose que la ecuación tuvo una buena calidad predictiva al arrojar valores de  $R^2$  de 0,96 y SEC de ~1,4 Pa. Según Ward et al. (2011) las calibraciones con un  $R^2$  superior a 0.95 son excelentes. En cuanto a los valores de SEP, fueron de 1,73, 1,75 y 1,76 Pa para 30, 31 y 32 °C respectivamente. Por otro lado, se calcularon para cada temperatura los promedios del incremento de  $G'$  en función del tiempo de la ecuación de predicción, obteniendo:  $1,53 \pm 0,17$ ,  $1,88 \pm 0,30$  y  $2,20 \pm 0,31$  Pa x  $\text{min}^{-1}$  para 30, 31 y 32 °C respectivamente, lo cual se traduce en un error estándar de predicción de  $1,14 \pm 0,14$ ,  $0,95 \pm 0,15$  y  $0,81 \pm 0,11$  min para 30, 31 y 32°C respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Abdelgawad et al. (2016), quien obtiene un SEP de 1,12 min para predecir  $t_{G'30}$  al coagular a 35°C leche de oveja con infección intramamaria subclínica, utilizando como predictores  $t_{2\text{max}}$  y el porcentaje de proteína. Además O'Callaghan et al. (1999) compararon la exactitud de los tiempos de corte de varios instrumentos (Gelografo, CoAgulite, Alambre caliente y Vibracional) con respecto al método reométrico, coagulando leche de vaca a 32 °C, encontrando para todos los métodos evaluados valores de SEP para el tiempo de corte de ~2 min.

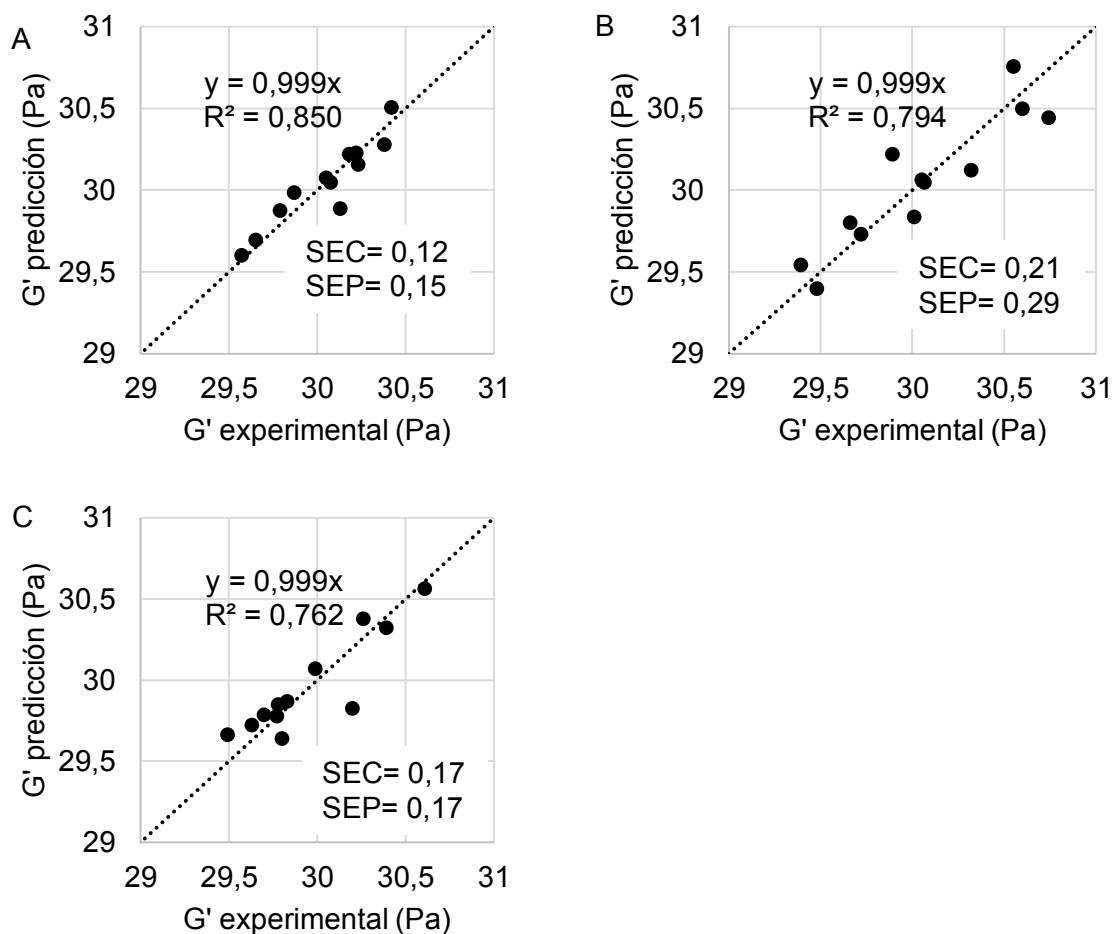
Como se observa en la **Figura 57** existe una pequeña dispersión para los valores de  $G'$  más altos, por lo cual se decidió realizar una calibración y validación de la ecuación a valores de  $G'$  alrededor de 30 Pa, que sería el valor de  $G'$  seleccionado para realizar el corte de la cuajada, obteniendo los datos de la **Figura 58** en donde se observa que los valores de  $R^2$  son un poco menores a los que teníamos al calibrar la ecuación en un intervalo de valores de  $G'$  más amplios.



**Figura 57.** Calibración y validación de la ecuación de predicción de la coagulación de leche de vaca a A) 30 °C, B) 31 °C y C) 32 °C. N = 36.

Esto se debería a que en esta estrecha región de  $G'$ , la proporción de la variación explicada a la no explicada por el modelo es menor. Según Ward et al. (2011), el  $R^2$  correspondiente a 30 °C sería una calibración moderadamente buena (0,8-0,9) y las de 31 y 32 °C serían moderadamente útiles (0,7-0,8). Sin embargo, los valores de SEC y SEP se redujeron considerablemente para todas las temperaturas. Los SEP expresados en tiempo serían de  $\sim 0,1$  min para las tres temperaturas evaluadas, debido probablemente a que con el nuevo ajuste realizado para esta estrecha región de  $G'$  los puntos están más colineales con la recta de calibración ( $\sim y=x$ ).

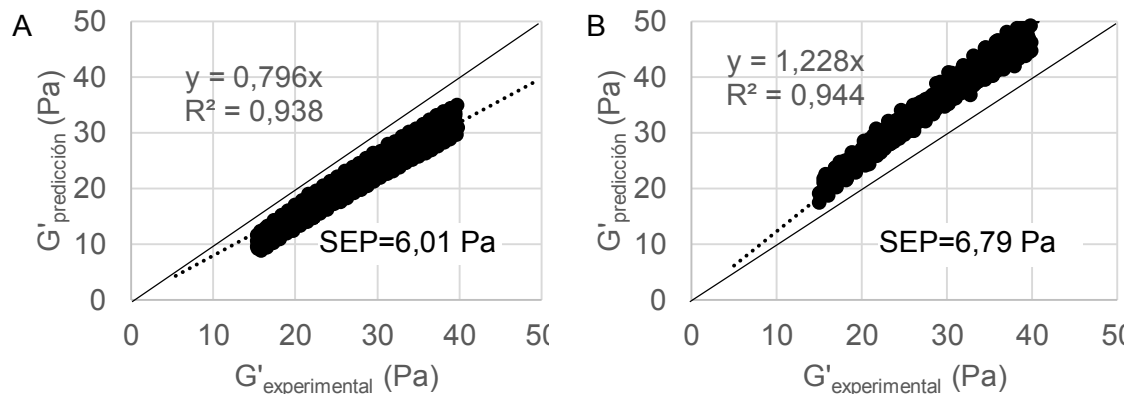




**Figura 58.** Calibración y validación de la ecuación de monitorización de la coagulación de leche de vaca a valores próximos a  $t_{G'30}$  a A) 30 °C, B) 31 °C y C) 32 °C.

Finalmente, se probó el efecto de la temperatura en la exactitud de la ecuación de predicción de la dureza de la cuajada ajustada a 31 °C y evaluada a 30 y 32 °C, como se puede observar en la **Figura 59**, existe un cierto desvío de la recta de calibración al aumentar o disminuir la temperatura de coagulación; sin embargo, según los valores de R<sup>2</sup> corresponden a una calibración buena en ambos casos (0,9-0,95) (Ward et al., 2011). Por otro lado, los valores de SEP son 6,01 y 6,79 Pa para 30 y 32°C respectivamente, que convertidos a valores de tiempo son 3,93 y 3,09 min para dichas temperaturas. Tomando como punto de partida el estudio de O'Callaghan et al. (1999) en el cual se menciona que se obtuvo un valor de SEP de 2 min para el tiempo de corte evaluado con varios instrumentos a una temperatura de 32 °C, y adoptando este valor para la temperatura de 31 °C, podemos calcular la máxima variabilidad de temperatura que debemos tener en cuba, teniendo en cuenta que el valor de SEP promedio en tiempo de nuestra ecuación evaluada a 31 °C fue de 0,95 min. De este cálculo

se obtiene que la variabilidad de temperatura de la leche en la cuba quesera no debe superar los 0,39 °C cuando se opera la cuba a 31 °C.



**Figura 59.** Efecto de la temperatura en la predicción a A) 30 °C y B) 32 °C, utilizando los valores de calibración a 31 °C.

#### 5.4 Conclusiones

A pesar de la cercanía de temperaturas se encontraron efectos significativos de la temperatura en  $R_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{\text{gel}}$ ,  $t_{\text{cut}}$  y  $t_{G'30}$  ( $p < 0,001$ ), generando una reducción de todos los parámetros a medida que se incrementa la temperatura, siendo mayor la disminución para los parámetros de tiempo de corte.

El efecto de lote fue significativo para  $t_{\text{gel}}$ ,  $t_{\text{cut}}$  y  $t_{G'30}$  ( $p < 0,001$ ), siendo también significativo para  $R_{\max}$  ( $p < 0,01$ ) y no significativo para  $t_{\max}$ , evidenciando que la composición y estado de la leche afectan más a la fase de agregación y endurecimiento de la misma que a la fase de hidrólisis.

La calidad de predicción de la ecuación de predicción fue muy buena para las temperaturas de 30, 31 y 32 °C, con SEP de ~1,75 Pa equivalente a ~ 1 min, en el rango de valores de  $G'$  de 15 a 40 Pa; sin embargo, la calibración alrededor de 30 Pa da una mejor exactitud, con SEPs de ~0,1 min.

La exactitud de la predicción de la ecuación ajustada a 31 °C fue de 3,93 min y 3,09 minutos cuando la temperatura sufrió una variación de -1 y +1 °C respectivamente, deduciéndose que la variabilidad de la temperatura de cuajado no debe ser mayor a 0,39 °C, para no superar el SEP de 2 min.



## **Capítulo VI. Desarrollo e implementación de un sistema de predicción y adquisición de datos (hardware y software) a tiempo real**

### **6.1 Introducción**

Actualmente existe un impulso hacia la monitorización y automatización continua en la industria de procesamiento de queso. El control de los procesos de fabricación a través del análisis en tiempo real de parámetros de procesado crítico puede mejorar la calidad y consistencia del producto. La automatización completa del proceso de fabricación del queso depende del desarrollo de tecnologías para monitorizar las etapas de transformación, que afectan a la calidad final del queso (Fagan et al., 2007). Se han estudiado una serie de técnicas en línea para la monitorización de la coagulación de la leche, desde técnicas mecánicas, eléctricas, vibratorias o de transmisión de calor hasta técnicas ópticas (O'Callaghan, 2011). Se han realizado comparaciones entre estas técnicas para establecer cuál de ellas es la mejor para monitorizar la coagulación de la leche, pero desafortunadamente, una comparación exhaustiva entre las técnicas citadas para determinar las ventajas y limitaciones de cada una es imposible, ya que cada estudio se realizó usando diferentes composiciones de leche, enzimas (tipo y concentración), cantidad de calcio y temperatura de coagulación. Sin embargo, recientemente Leite et al. (2017) realizaron una comparación de tres métodos para monitorizar la coagulación de la leche manteniendo constante los parámetros de coagulación, utilizando el método reológico, de dispersión de luz NIR y de microscopía confocal, concluyendo que la hidrólisis enzimática (primera fase de la coagulación) se puede explicar mediante los parámetros determinados en el perfil de dispersión de la luz NIR y, por otra parte, todas las metodologías fueron capaces de describir el proceso de agregación de las micelas de caseína hidrolizadas.

Las tecnologías de sensores ópticos, basadas en dispersión o transmisión, han demostrado ser una herramienta exitosa para monitorizar la coagulación de la leche. En particular, el sensor de dispersión de luz de fibra óptica, CoAguLite™ es una tecnología de sensores en línea bien documentada para monitorizar la

coagulación de la leche y predecir los tiempos de coagulación y corte (Fagan et al., 2007).

Si bien el mencionado sensor ha demostrado ser uno de los métodos en línea no destructivos más prometedores para controlar la coagulación de la leche (Payne y Castillo, 2007), las predicciones que realiza son en base a parámetros que se obtienen mucho antes del tiempo de corte, como p. ej., el parámetro de tiempo que representa el máximo de la primera derivada de la ratio de dispersión,  $t_{max}$ , y/o el máximo y mínimo de la segunda derivada de dicho ratio,  $t_{2max}$  y  $t_{2min}$ , respectivamente (Abdelgawad et al., 2016), no teniendo en cuenta, por tanto, los procesos posteriores al tiempo de gelificación.

Visto lo anterior, se formuló la hipótesis de que un sensor de dispersión de luz NIR podría ser utilizado para reproducir la señal de un reómetro y, de esta manera, determinar en tiempo real la dureza de la cuajada adecuada para el corte, lo que contribuiría a proporcionar a la industria una nueva herramienta no invasiva para lograr la automatización de esta parte del proceso que aún en las grandes fábricas queseras continúa siendo manual.

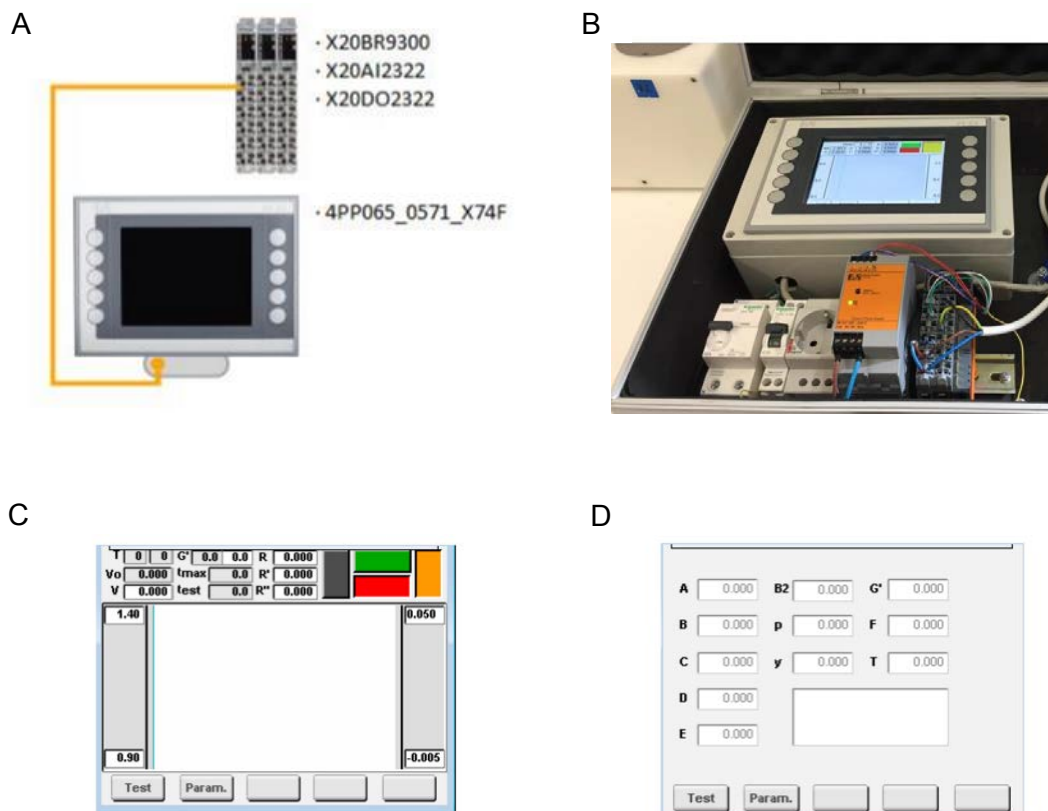
Por lo tanto, se desarrolló e implementó un sistema de adquisición de datos (DAS) consistente de un PLC y el sensor CoAguLite, que permite traducir las señales del sensor de dispersión NIR en señales reológicas. Luego se realizaron ajustes de las señales del nuevo DAS para equiparar las señales de los principales parámetros ópticos con los proporcionados con el sistema óptico de laboratorio CoAguLab y, finalmente, se realizó una validación del nuevo DAS mediante calibraciones a tres temperaturas y validaciones cruzadas.

## 6.2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Implementación del sistema de predicción

Se construyó el sistema de adquisición de datos (**Figura 60**) el cual consta de un PLC sobre el cual se encriptó la ecuación de Predicción  $G' = f(R, P)$  y una ecuación alternativa formulada por Castillo (2001) para la determinación de tiempos de corte visuales pero modificada para tiempos de corte reológicos a 30 Pa,  $t_{G'30} = f(R', P)$ , un módulo receptor de bus que conecta todo el sistema y que permite el intercambio ordenado de la información entre todos los componentes, un módulo de entrada analógica que transforma los voltajes provenientes del

sensor en señales digitales que son entregadas al PLC, un módulo de salidas digitales que permiten al PLC accionar algún dispositivo externo como una alarma una vez que se alcanza el nivel de dureza de 30 Pa, fuentes de alimentación de 24 Vdc para el PLC y el sensor. El PLC muestra dos pantallas: a) la pantalla de resultados dónde se visualizan a tiempo real los valores de  $G'$ , así como los parámetros ópticos  $V_0$ ,  $t_{max}$  y el tiempo estimado de corte por la ecuación de predicción  $t_{G'30} = f(R', P)$ ; y en la parte inferior muestra gráficamente la variación en función del tiempo del ratio de reflectancia (R), su primera (R') y segunda derivada (R'') y, b) la pantalla de parámetros donde se introducen las constantes de las ecuaciones utilizadas para realizar los cálculos del sistema. El PLC es autónomo, sin embargo, se puede acceder de forma remota por internet.



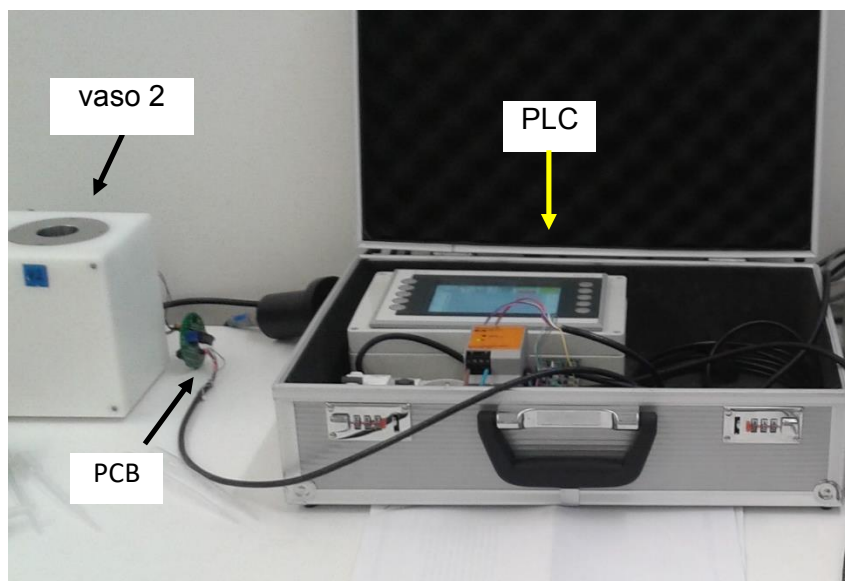
**Figura 60.** Sistema de adquisición de datos. A) Esquema del PLC y módulos de procesamiento de datos. B) Imagen del PLC y módulo de procesamiento de datos. C) Pantalla de resultados. D) Pantalla de parámetros.

### 6.2.2 Materia prima e insumos

Se utilizó leche de vaca descrita en la sección 5.2.1. Los demás materiales como enzima, cloruro de calcio, CoAguLab y Reómetro fueron descritos en 4.2.1.

### 6.2.3 Métodos

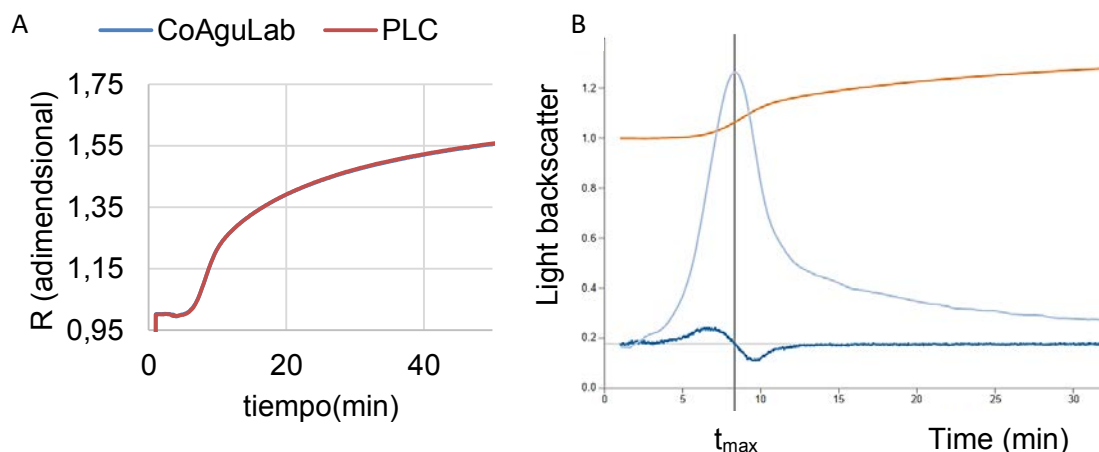
Tras la implementación del PLC, se procedió a conectar el sensor del vaso 1 del conjunto de cubas, al sistema CoAguLab y el sensor del vaso 2 al PLC mediante una placa de circuito impreso (PCB), la cual regula la intensidad de luz que emite el sensor (**Figura 61**).



**Figura 61.** Conexión del PLC con la cubeta 2 mediante el PCB.

Luego se realizaron una serie de coagulaciones a 31 °C, utilizando en paralelo el DAS y el sistema CoAguLab, y la metodología de la sección 5.2.1, con la finalidad de equiparar la señal del sistema implementado con la del sistema de laboratorio CoAguLab. Paralelamente se trabajó en la elaboración de una página web para el acceso a los datos almacenados en el PLC vía internet (**Figura 62**).

Posteriormente, se realizó una validación del DAS, realizando 36 coagulaciones en paralelo con el sistema CoAguLab y en reómetro a 30, 31 y 32 °C, siguiendo la metodología de la sección 5.2.1 y el diseño experimental de la **Figura 38**, evaluando el cambio de los parámetros más importantes del DAS como son:  $V_0$ ,  $t_{max}$  y  $R_{max}$ , con respecto a los mismos parámetros obtenidos con el sistema CoAguLab.



**Figura 62.** A) Comparación gráfica de las señales de los sistemas de adquisición de datos. B) Vista de la señal obtenida mediante PLC y visualización a través de página web.

Finalmente, con los datos obtenidos con el DAS, se realizó la calibración y validación de la ecuación de predicción  $G' = f(R, P)$ .

#### 6.2.4 Análisis estadístico

Se procedió como en 5.2.2, realizando un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen efectos significativos del sistema de medida (SM) en los parámetros ópticos ( $V_0$ ,  $t_{max}$  y  $R_{max}$ ). Para la calibración de la ecuación de predicción  $G' = f(R, P)$  se empleó el valor de  $R^2$  y SEC, y para la validación se empleó el SEP de validación cruzada.

### 6.3 Resultados y discusión

#### 6.3.1 Análisis de varianza de parámetros ópticos

Se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) previo considerando como variables independientes el porcentaje de proteína en leche (P), porcentaje de grasa en leche (G), el pH de la leche cruda (pHc), el pH de la leche preparada para la coagulación (pHp), el lote (L), la temperatura de coagulación (T) y el sistema de medida (SM) (DAS vs CoAguLab) y como variables dependientes  $V_0$ ,  $t_{max}$  y  $R_{max}$ . Este estudio preliminar dio como resultado que pHp, pHc, P y G no tuvieron efectos significativos en las variables dependientes por lo tanto se retiraron del modelo. La **Tabla 10** muestra el análisis de varianza para las variables dependientes evaluadas. Como se observa existe un efecto significativo ( $p < 0,001$ ) del SM sobre  $V_0$ . Este hecho se debería a que los ajustes



de  $V_0$  se realizaron de forma manual en ambos sistemas de medida. También se observa un efecto significativo de SM sobre  $R_{max}$  como consecuencia de que el valor de R está en función del valor de  $V_0$ . Sin embargo, cuando se evalúa el valor de  $t_{max}$ , no existen diferencias significativas entre los valores reportados por ambos sistemas de adquisición de datos. Por otro lado, se observan efectos significativos de la temperatura (T) y el lote (L) así como sus interacciones, teniendo la temperatura un mayor efecto sobre las variables dependientes excepto para  $V_0$ . Estos resultados están de acuerdo con Abdelgawad et al. (2014) quienes evaluaron el efecto de la temperatura en  $R_{max}$  y  $t_{max}$  en la coagulación de mezclas de leche de oveja, cabra y vaca, y también con Castillo et al. (2000) quienes evaluaron el efecto del lote sobre  $R_{max}$  y  $t_{max}$ , durante la coagulación de leche de cabra. Además, Castillo et al. (2003b) encontraron también un efecto significativo ( $p < 0,001$ ) de la temperatura sobre  $V_0$ . Las demás interacciones no se muestran porque fueron eliminadas del modelo a no ser significativas para ninguna de las variables dependientes.

**Tabla 10.** Análisis de varianza para los parámetros ópticos

| Parámetros | Model          |           | Main factors       |                  |                  | Interaction        |
|------------|----------------|-----------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|
|            | R <sup>2</sup> | F         | SM<br>(GL=1)<br>F  | T<br>(GL=2)<br>F | L<br>(GL=3)<br>F | LxT<br>(GL=6)<br>F |
| $V_0$      | 0,989          | 317,04*** | 31,97***           | 141,15***        | 910,98***        | 5,62***            |
| $R_{max}$  | 0,531          | 4,15***   | 8,82**             | 12,50***         | 3,81*            | 0,43 <sup>ns</sup> |
| $t_{max}$  | 0,942          | 60,02***  | 0,89 <sup>ns</sup> | 303,81***        | 3,63*            | 0,73 <sup>ns</sup> |

Número de observaciones N = 72; SM, sistema de medida; T, temperatura; L, lote; LxT, interacción lote x temperatura; R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; F, F-estadístico; GL, grado de libertad; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; <sup>ns</sup>, no significativo.

### 6.3.2 Comparación de medias de mínimos cuadrados de los parámetros ópticos

La **Tabla 11** muestra la comparación de medias de mínimos cuadrados de  $V_0$ ,  $t_{max}$  y  $R_{max}$  en función de SM, observándose que existe un incremento significativo de  $V_0$  del sistema nuevo con respecto al sistema CoAguLab. Como se ha mencionado esto se debería a que este voltaje inicial se estableció manualmente ocasionando una pequeña pero significativa diferencia en las milésimas de las lecturas de ambos instrumentos. En cuanto a  $R_{max}$ , podemos observar que existe también un incremento significativo de este valor en la tercera cifra decimal, al utilizar el sistema, debido a que como ya se mencionó,

este valor está en función del  $V_0$ . Los valores de  $t_{max}$  en función del sistema de medida no tuvieron diferencias significativas, validándose de esta manera el sistema de medida nuevo.

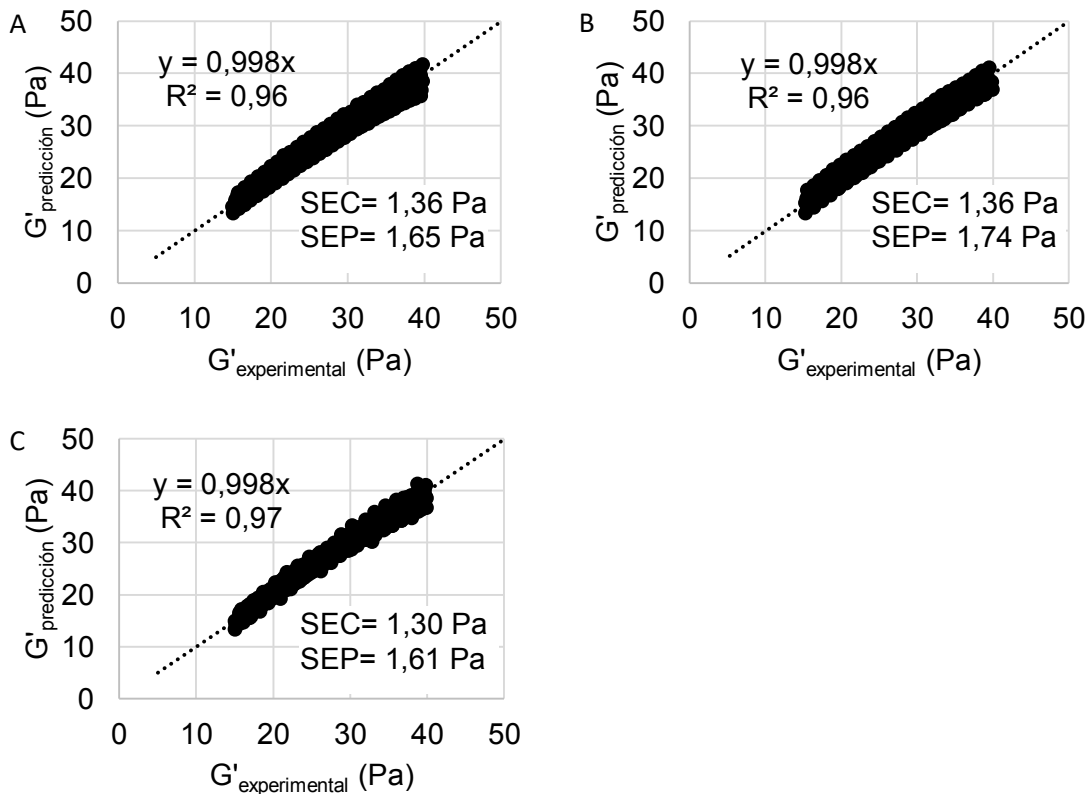
**Tabla 11.** Media de mínimos cuadrados de parámetros ópticos en función del sistema de adquisición de datos (DAS).

|                                | CoAguLab           | PLC                |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|
| $V_0, V$                       | 1,982 <sup>a</sup> | 1,989 <sup>b</sup> |
| $t_{max}, \text{min}$          | 10,62 <sup>a</sup> | 10,67 <sup>a</sup> |
| $R_{max}, \text{adimensional}$ | 1,121 <sup>a</sup> | 1,127 <sup>b</sup> |

Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ); Número de réplicas = 3; Número de observaciones,  $N = 72$ . Variables dependientes explicadas en el texto.

### 6.3.3 Calibración y validación del modelo de predicción a tres temperaturas de coagulación, utilizando datos del DAS

La **Figura 63** muestra la calibración y validación cruzada de la ecuación de predicción en un rango de dureza de 15 a 40 Pa, utilizando los datos del DAS y el reómetro.



**Figura 63.** Calibración y validación de la ecuación de monitorización de la coagulación de leche de vaca, utilizando el DAS a A) 30 °C, B) 31 °C y C) 32 °C.  $N = 36$ .

Como podemos observar los valores de la pendiente de la recta de calibración,  $R^2$ , SEC y SEP son similares a los obtenidos utilizando el sistema de medición CoAguLab (Capítulo V). En este caso los valores de SEP en términos de tiempo serían  $1,11 \pm 0,18$  min,  $0,94 \pm 0,13$  min y  $0,74 \pm 0,09$  min para 30, 31 y 32°C respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por O'Callaghan et al. (1999) quienes obtienen un error estándar de predicción de 2 min para el tiempo de corte reológico determinado durante la coagulación de leche de vaca a 32 °C, utilizando sondas de transmisión y reflectancia de luz, de transmisión de calor y vibratoriales.

### **6.4 Conclusiones**

Se logró desarrollar e implementar un sistema de adquisición de datos (DAS), constituido por el sensor CoAguLite y el PLC, el cual permite replicar la señal óptica dada por el sistema de medida CoAguLab y transformar dicha señal en valores de módulo elástico  $G'$ .

Coagulando leche de vaca a 30, 31 y 32 °C, se logró demostrar que el sistema de adquisición de datos (DAS), permite monitorizar eficientemente en línea (SEP  $\sim 1,67$  Pa equivalente a  $\sim 1$  min) el módulo elástico  $G'$  de la cuajada en un rango de valores de  $G'$  de 15 a 40 Pa.

## **Capítulo VII. Validación del modelo de predicción del módulo elástico, $G'$ , de la cuajada a nivel de planta piloto**

### **7.1 Introducción**

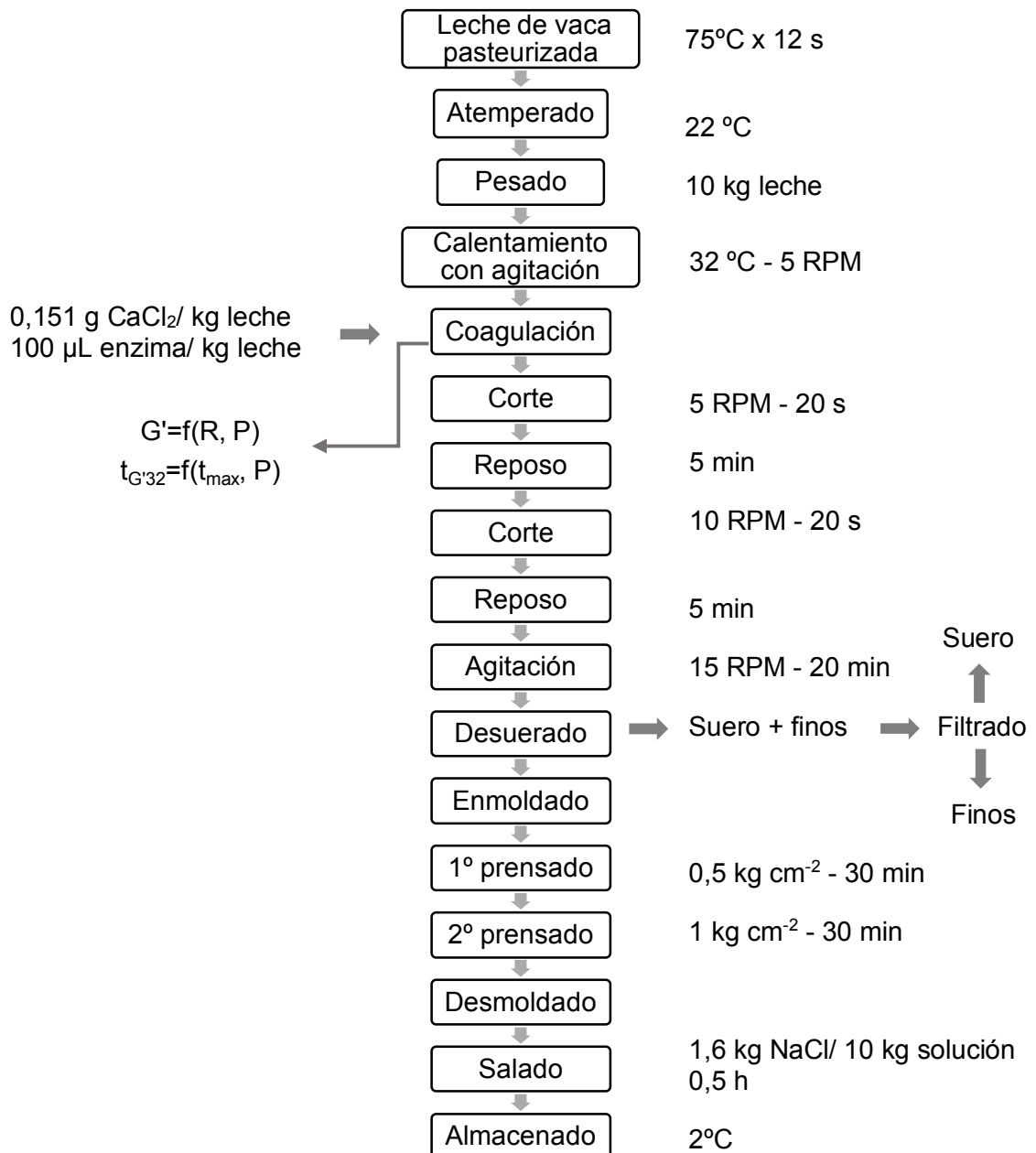
El desarrollo y la implementación de métodos en línea para monitorizar procesos industriales ha sido una tendencia general en las industrias de procesos en la última década, un área que a menudo se denomina tecnologías analíticas de procesos (PAT). El campo se ha desarrollado en paralelo a la evolución del análisis quimiométrico de datos, que ofrece las herramientas para predecir las propiedades del producto a partir de datos espectrales como, p. ej., espectros de infrarrojo cercano (Janhøj y Qvist, 2010). En el ámbito de producción de quesos también se han tratado de implementar estas técnicas de medida, específicamente para la determinación del tiempo óptimo de corte de la cuajada, a partir de cambios en las propiedades fisicoquímicas de la leche a medida que pasa del estado líquido a gel (propiedades luminosas, eléctricas, vibracionales, de transmisión de calor, etc.). Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado ninguna técnica universal que monitorice y detecte la dureza adecuada de la cuajada para realizar el corte (O'Callaghan, 2001; Ozbekova y Kulmyrzaev, 2017). No obstante, la técnica de dispersión de luz NIR ha probado dar buenos resultados para la predicción del tiempo de corte en base a parámetros de dureza a nivel de planta piloto (Abdelgawad et al., 2016). Sin embargo, una nueva tecnología, antes de aplicarse a nivel industrial, se debe estudiar a nivel de planta piloto utilizando en lo posible los mismos materiales y diseño que a escala industrial, a fin de aprender sobre esta nueva tecnología y anticipar las posibles ventajas y desventajas que pueda traer al implementarla a nivel industrial (Frishammar et al., 2015). En tal sentido, se decidió instalar el sistema de monitorización en una cuba quesera de 10 L de capacidad y realizar producciones de queso fresco a nivel de planta piloto con la finalidad de comparar el rendimiento y características fisicoquímicas de los lotes de queso, utilizando un corte visual y dos métodos de predicción de tiempo de corte reológico.

## 7.2 Materiales y métodos

Para realizar la validación del modelo de predicción a nivel de planta piloto se aplicó el diseño experimental de la sección 3.3 correspondiente al objetivo específico D.

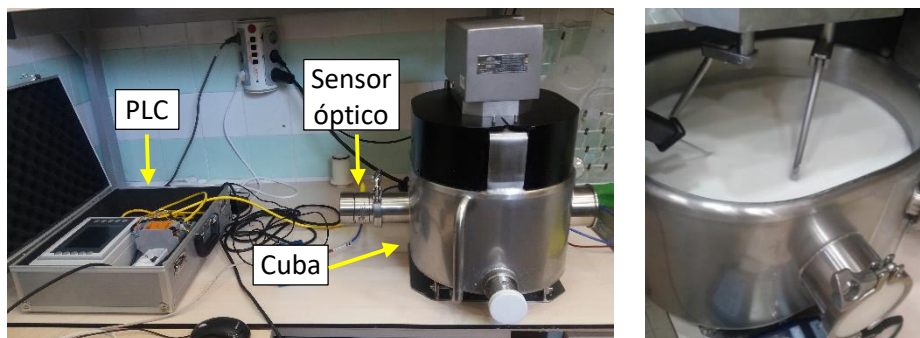
### 7.2.1 Procedimiento experimental

A cada unidad experimental se le aplicó el diagrama de flujo de la **Figura 64**.



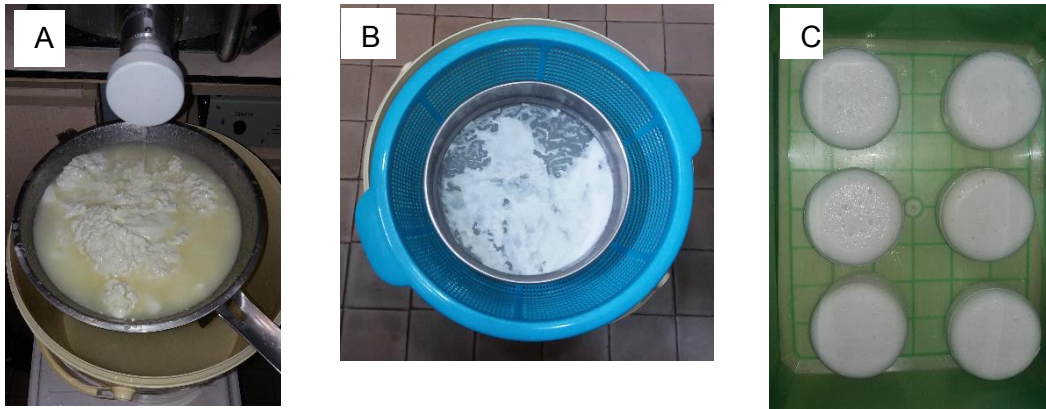
**Figura 64.** Diagrama de flujo de elaboración de queso fresco a nivel de planta piloto.

Se utilizó leche de vaca entera pasteurizada a 75 °C por 12 s, suministrada por la granja Mogent, ubicada en la provincia de Barcelona. Cada lote de leche se atemperó a 22 °C para homogeneizar el contenido de grasa. Luego se pesaron 10 kg de leche que fueron depositados dentro de una cuba de 10 L de capacidad (Pierre Guerin Technologies, Francia), conectada con el sistema óptico de medida del módulo elástico de la cuajada, tal como muestra la **Figura 65**. La leche se calentó, mediante un sistema de recirculación de agua suministrada por una bomba centrífuga (serie BD, Finish Thompson Inc., Germany) y un baño termostático (OvanTherm C-TC00E, España), hasta llegar a una temperatura de 32 °C, utilizando dos palas de agitación a velocidad constante de 5 rpm. La temperatura de la leche fue controlada utilizando un termómetro Omega Engineering 5831 A, USA. Luego se adicionaron 0,151 g  $\text{CaCl}_2 \text{ kg}^{-1}$  leche, y 100  $\mu\text{L}$  enzima  $\text{kg}^{-1}$  leche, utilizando las soluciones de cloruro cálcico y enzima descritos en 4.2.1, manteniendo el sistema en agitación durante 30 s, a la vez que se puso en marcha el sistema de medida óptico. Una vez transcurrido el tiempo de mezcla, se detuvo la agitación, se cambiaron las palas de agitación por dos de corte y se esperó hasta completar el tiempo de corte de la cuajada determinado en función del método de corte según el tratamiento correspondiente.



**Figura 65.** Sistema de medida de la dureza de la cuajada acoplado a la cuba de 10 L. Posteriormente, se procedió a realizar el corte a una velocidad de 5 rpm por un tiempo de 20 s, se mantuvo en reposo 5 min para provocar la salida de suero y la contracción de los granos formados. Seguidamente, se realizó un segundo corte con la finalidad de reducir aún más el tamaño de partícula a una velocidad de 10 rpm durante 20 s, dejándose reposar 5 min más. Pasado este tiempo, se

realizó una agitación a 15 rpm durante 20 min para facilitar la liberación del suero. La separación de suero se realizó utilizando un colador chino. El suero obtenido contenía también los finos, que fueron retirados utilizando un tamiz de 70  $\mu\text{m}$  de luz (**Figura 66**).



**Figura 66.** A) Desuerado de la cuajada. B) Obtención de finos. C) Queso fresco prensado.

Seguidamente, se realizó el enmoldado de la cuajada utilizando moldes de 300 g de capacidad. Los moldes con cuajada se sometieron a un primer prensado, utilizando una prensa neumática con pistones verticales (Talleres Garvía, Barcelona, España), a una presión constante de 0,5 kg  $\text{cm}^{-2}$  por un tiempo de 30 min. Tras dicho periodo, se invirtió el contenido y se realizó un segundo prensado a una presión constante de 1 kg  $\text{cm}^{-2}$  durante un tiempo de 30 minutos. Una vez transcurrido este periodo, se desmoldaron los quesos y se sometieron a salado por inmersión durante media hora, utilizando 10 kg de una salmuera de 16% (w/w) de NaCl a una temperatura de 4 °C, para finalmente ser embolsados y almacenados en cámara de refrigeración a 4 °C por un periodo de seis días para su posterior análisis fisicoquímico, que consistió en medir el pH, contenido de grasa mediante método Van Gulik (ISO 3433: 2008), proteína mediante método Dumas (ISO 14891:2002) y sólidos totales (FIL-IDF 4: 1958), así como las propiedades de textura y color en los quesos.

### 7.2.2 Análisis de textura

Se determinó el stress ( $\sigma_f$ ) y strain ( $\epsilon_f$ ) de fractura utilizando compresión uniaxial mediante un texturómetro TA-XT2 (Stable Micro Systems LTD, Surrey, UK). Las muestras de queso de 1,5 x 1,5 x 1,5 cm fueron comprimidas, con una sonda cilíndrica de 50 mm de diámetro, un 80% de su altura original ( $\epsilon = \Delta L/L_0 = 0.8$ ;  $\epsilon$

es deformación,  $L_0$  es longitud inicial y  $\Delta L$  es disminución de longitud) y a una velocidad y temperatura constantes de  $2 \text{ mm s}^{-1}$  y  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente. La tensión ( $\sigma_f$ ) y deformación ( $\varepsilon_f$ ) a la fractura fueron calculados según Ak y Gunasekaran (1992).

### 7.2.3 Análisis de color

Se determinaron los parámetros de color:  $L^*$  (luminosidad) = oscuro a luminoso (0 a 100);  $a^*$  = verde (-) a rojo (+);  $b^*$  = azul (-) a amarillo (+);  $C^*$  (saturación) =  $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  y  $h$  (tonalidad) =  $\arctan(b^*/a^*)$ , para lo cual se utilizó un colorímetro portátil Hunter Lab (MiniScan<sup>TM</sup> XETM, Hunter Associates Laboratory INC., Reston, Virginia, USA), bajo iluminación fluorescente blanca (D65), con un observador de 10 grados.

### 7.2.4 Cálculo de rendimientos

Los rendimientos y recuperaciones se calcularon utilizando las fórmulas de la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Variables dependientes de elaboración (VDE) de queso fresco<sup>1</sup>.

| VDE (%)                       | Símbolo | Cálculo                 |
|-------------------------------|---------|-------------------------|
| Rendimiento de cuajada        | Rc      | $(wc/wl) \cdot 100$     |
| Rendimiento de queso prensado | Rp      | $(wqp/wl) \cdot 100$    |
| Rendimiento de queso salado   | Rs      | $(wqs/wl) \cdot 100$    |
| Finos                         | Fi      | $wf/wl \cdot 100$       |
| Materia seca en queso         | MSq     | $(wmsq/wq) \cdot 100$   |
| Humedad en queso              | Hq      | $1 - MSq$               |
| Grasa en queso                | Gq      | $(wgq/wq) \cdot 100$    |
| Proteína en queso             | Pq      | $(wpq/wq) \cdot 100$    |
| Recuperación de materia seca  | RMS     | $(wmsq/wmsl) \cdot 100$ |
| Recuperación de grasa         | RG      | $(wgq/wgl) \cdot 100$   |
| Recuperación de proteína      | RP      | $(wpq/wpl) \cdot 100$   |
| Materia seca en suero         | MSs     | $(wmss/ws) \cdot 100$   |
| Grasa en suero                | Gs      | $(wgs/ws) \cdot 100$    |
| Proteína en suero             | Ps      | $(wps/ws) \cdot 100$    |

<sup>1</sup>wc, peso de cuajada; wl, peso de leche; wqp, peso de queso prensado; wqs, peso de queso salado; wf, peso de finos; wmsq, peso de materia seca en queso; wq, peso de queso; wmsl, peso de materia seca en leche; wgq, peso de grasa en queso; wgl, peso de grasa en leche; wpq, peso de proteína en queso; wpl, peso de proteína en leche; wmss, peso de materia seca en suero; ws, peso de suero; wgs, peso de grasa en suero; wps, peso de proteína en suero.

Antes de realizar los experimentos definitivos se hizo necesaria una calibración y validación previa del modelo de predicción de la dureza de la cuajada ya que



al realizar algunas pruebas preliminares para verificar que la calibración en laboratorio era la adecuada para los experimentos a nivel de planta piloto, resultó un cierto desvío de las predicciones atribuido al cambio de la intensidad de dispersión en la cuba quesera, para lo cual se coagularon trece lotes de leche de diferente composición, aplicando para cada lote de leche, el diagrama de flujo de la **Figura 64**, pero solo hasta la etapa de coagulación.

### **7.2.5 Análisis estadístico**

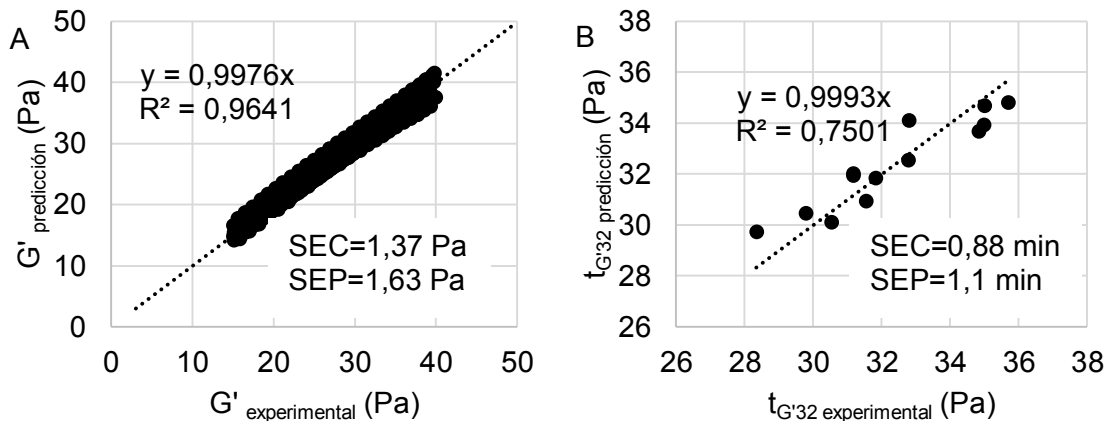
En este estudio, los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SAS (SAS ® 9.4, 2012). El análisis de covarianza (ANCOVA) se realizó mediante el procedimiento del modelo lineal general (GLM) de SAS, mientras que los coeficientes de correlación de Pearson,  $r$ , fueron obtenidos por el procedimiento de correlación (CORR). La media de mínimos cuadrados (LSMEANS) y el significado de cada tratamiento se computaron mediante suma de cuadrados de tipo IV. El método de la media de mínimos cuadrados predice diferencias entre todos los tratamientos. En este experimento las medias fueron consideradas significativamente diferentes a  $p < 0,05$ . Se utilizó el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar de calibración (SEC) para determinar la calidad de la calibración del modelo. Para la validación, se empleó el método de validación cruzada, determinando el error estándar de predicción (SEP).

## **7.3 Resultados y discusión**

### **7.3.1 Calibración y validación del modelo de predicción a nivel de planta piloto**

La **Figura 67** muestra los resultados de la calibración y validación previas a los experimentos de elaboración de queso. Como podemos observar, la calibración del modelo de predicción del módulo elástico de la cuajada,  $G'$ , arrojó un  $R^2$  de 0,96. Según Ward et al. (2011), este valor corresponde a una calibración excelente ( $>0,95$ ). Para este mismo modelo, se tiene un valor de SEP de validación cruzada de 1,63 Pa. Este valor puede ser transformado a unidades de tiempo dividiéndolo entre el cambio promedio de  $G'$  en función del tiempo el cual se calculó en 1,84 Pa/min, dando como resultado un SEP de 0,89 min. Por otro lado, la calibración para el modelo de predicción de la dureza de corte reológico,

$t_{G'32}$ , tuvo un  $R^2$  de 0,75 que según Ward et al. (2011), correspondería a una calibración moderadamente útil.



**Figura 67.** Calibración y validación de los dos modelos de predicción para realizar el corte a 32 Pa: A) modelo  $G'$ , B) modelo  $t_{G'32}$ .

Sin embargo, el valor del error estándar de validación cruzada fue de 1,1 min, lo que indica que la calibración sería adecuada para los fines establecidos. Como hemos visto, ambas ecuaciones dan SEPs menores a dos minutos que fue el tiempo promedio establecido por O'Callaghan et al. (1999) al comparar la exactitud de los tiempos de corte de varios instrumentos (Gelografo, CoAguLite, alambre caliente y sensor vibracional) con respecto al tiempo de corte obtenido por método reométrico, al coagular leche de vaca a 32 °C. Por otro lado Abdelgawad et al. (2016) también obtiene un SEP de 1,12 min al predecir  $t_{G'30}$  durante la coagulación de leche de oveja con infección intramamaria subclínica a 35 °C.

### 7.3.2 Análisis de covarianza de rendimientos, recuperaciones y pérdidas

Como se observa en la **Tabla 13**, el método de corte no tuvo efectos significativos sobre las variables dependientes, lo que indica que los dos modelos de predicción del módulo elástico de la cuajada a 32 Pa:  $G'_{32} = f(R, P)$  y  $t_{G'32} = f(R', P)$ , reproducirían bien el tiempo de corte establecido por el maestro quesero. Con respecto al tiempo de corte estimado por los diferentes métodos ( $t_{\text{cutE}}$ ), se observa que el modelo es significativo, si bien ninguno de los factores presentó un efecto significativo en esta variable. Sin embargo, al observar el análisis de correlaciones para esta variable, podemos ver que existe una correlación inversa significativa con el porcentaje de proteína (P). Esto es lógico pues al ser leches de una misma estación del año la composición varía poco; sin

embargo, se sabe que a medida que  $P$  se incrementa  $t_{cut}$  disminuye. Así lo afirmaron Payne y Castillo (2007) en leche de cabra y Guinee et al. (1994) al coagular leche de vaca. Sin embargo, estos autores utilizaron niveles de proteína con una clara diferenciación, que no es nuestro caso. Por otro lado, la ratio grasa proteína (G/P) tampoco presentó un efecto significativo en el tiempo de corte. Esto fue también comprobado por Arango et al. (2013), al coagular leche en polvo con inulina a dos porcentajes de grasa (0,2 y 1,5%) y por Abdelgawad et al. (2014) al coagular mezclas de leche de vaca, cabra y oveja. Sin embargo, el análisis de correlaciones (**Tabla 14**) reporta una relación directa significativa entre este parámetro y el tiempo de corte. Acerca de esta relación, Guinee et al. (1997) encontró que coagulando leche de vaca de 3,3% de proteína a diferentes concentraciones de grasa (0-10%), el tiempo de corte reológico medido a 20 Pa disminuye a medida que se incrementan los niveles de grasa. Por otra parte, Walstra y Jenness (1984) sugieren que la presencia de glóbulos de grasa puede debilitar la estructura de los geles de cuajo al interrumpir la matriz y crear "puntos blandos". En este mismo sentido, van Vliet (1988) afirma que cuando la membrana de los glóbulos grasos nativos de leche está intacta, estos no participan en la formación de la red de gel, ya que no interactúan con las partículas de caseína, por lo que, los glóbulos de grasa sólo toman parte como un relleno inerte, llenando los espacios vacíos dentro de la matriz de caseína. Pero al margen de las afirmaciones antes mencionadas, según muestra la **Tabla 14**, la relación entre el porcentaje de grasa (G) y el tiempo de corte no es significativa; por lo tanto, el aumento o disminución de G/P se debería más probablemente a la variación de la proteína. En cuanto a los rendimientos de cuajada, queso prensado y queso salado,  $R_c$ ,  $R_p$  y  $R_s$  respectivamente, se tiene que los modelos fueron significativos, evidenciando efectos significativos de  $P$ ,  $G$  y  $G/P$  sobre  $R_p$  y  $R_s$ , no siendo tan claros para  $R_c$ . Esto se debería a la variabilidad de humedad que presentaba  $R_c$  al momento del pesado, ya que la velocidad de sinéresis era todavía alta. Como se observa en la tabla de correlaciones,  $G/P$  muestra una relación directa y claramente significativa con  $R_c$ ,  $R_p$  y  $R_s$ .

Validación del modelo de predicción a nivel de planta piloto

**Tabla 13.** Análisis de covarianza de tiempo de corte, rendimientos, recuperaciones y pérdidas, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto.

| VDE                     | Modelo         |                     | Factor             | Cofactores          |                    |                    |                    |                    |                    |
|-------------------------|----------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                         | R <sup>2</sup> | F                   | MC<br>(GL=2)<br>F  | lote<br>(GL=1)<br>F | P<br>(GL=1)<br>F   | G<br>(GL=1)<br>F   | pH<br>(GL=1)<br>F  | ST<br>(GL=1)<br>F  | G/P<br>(GL=1)<br>F |
| <b>t<sub>cutE</sub></b> | 0,639          | 5,31 <sup>***</sup> | 0,48 <sup>ns</sup> | 1,06 <sup>ns</sup>  | 0,08 <sup>ns</sup> | 0,03 <sup>ns</sup> | 3,26 <sup>ns</sup> | 0,49 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup> |
| <b>Rc</b>               | 0,467          | 3,28 <sup>**</sup>  | 0,91 <sup>ns</sup> | 9,11 <sup>**</sup>  | 2,10 <sup>ns</sup> | 2,00 <sup>ns</sup> | 2,95 <sup>ns</sup> | 0,15 <sup>ns</sup> | 2,21 <sup>ns</sup> |
| <b>Rp</b>               | 0,443          | 2,98 <sup>*</sup>   | 0,71 <sup>ns</sup> | 7,18 <sup>*</sup>   | 4,48 <sup>*</sup>  | 4,39 <sup>*</sup>  | 4,57 <sup>*</sup>  | 1,90 <sup>ns</sup> | 4,68 <sup>*</sup>  |
| <b>Rs</b>               | 0,448          | 3,05 <sup>*</sup>   | 0,70 <sup>ns</sup> | 7,35 <sup>*</sup>   | 4,85 <sup>*</sup>  | 4,75 <sup>*</sup>  | 4,76 <sup>*</sup>  | 2,09 <sup>ns</sup> | 5,05 <sup>*</sup>  |
| <b>Fi</b>               | 0,586          | 5,30 <sup>***</sup> | 0,54 <sup>ns</sup> | 8,47 <sup>**</sup>  | 0,02 <sup>ns</sup> | 0,04 <sup>ns</sup> | 0,02 <sup>ns</sup> | 2,86 <sup>ns</sup> | 0,04 <sup>ns</sup> |
| <b>MSq</b>              | 0,331          | 1,48 <sup>ns</sup>  | 0,47 <sup>ns</sup> | 0,02 <sup>ns</sup>  | 0,04 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup> | 0,36 <sup>ns</sup> | 3,47 <sup>ns</sup> | 0,04 <sup>ns</sup> |
| <b>Gq</b>               | 0,263          | 1,12 <sup>ns</sup>  | 0,00 <sup>ns</sup> | 1,12 <sup>ns</sup>  | 3,24 <sup>ns</sup> | 3,33 <sup>ns</sup> | 1,89 <sup>ns</sup> | 0,19 <sup>ns</sup> | 3,31 <sup>ns</sup> |
| <b>Pq</b>               | 0,352          | 0,79 <sup>ns</sup>  | 0,40 <sup>ns</sup> | 3,14 <sup>ns</sup>  | 0,79 <sup>ns</sup> | 0,81 <sup>ns</sup> | 0,70 <sup>ns</sup> | 0,27 <sup>ns</sup> | 0,90 <sup>ns</sup> |
| <b>RMS</b>              | 0,410          | 2,00 <sup>ns</sup>  | 0,27 <sup>ns</sup> | 4,56 <sup>*</sup>   | 0,64 <sup>ns</sup> | 0,75 <sup>ns</sup> | 3,96 <sup>ns</sup> | 4,34 <sup>*</sup>  | 0,70 <sup>ns</sup> |
| <b>RG</b>               | 0,187          | 0,72 <sup>ns</sup>  | 0,18 <sup>ns</sup> | 0,25 <sup>ns</sup>  | 0,19 <sup>ns</sup> | 0,19 <sup>ns</sup> | 0,03 <sup>ns</sup> | 0,22 <sup>ns</sup> | 0,17 <sup>ns</sup> |
| <b>RP</b>               | 0,537          | 1,26 <sup>ns</sup>  | 0,01 <sup>ns</sup> | 0,57 <sup>ns</sup>  | 0,74 <sup>ns</sup> | 0,73 <sup>ns</sup> | 0,97 <sup>ns</sup> | 0,47 <sup>ns</sup> | 0,65 <sup>ns</sup> |
| <b>MSs</b>              | 0,279          | 0,82 <sup>ns</sup>  | 0,38 <sup>ns</sup> | 1,31 <sup>ns</sup>  | 1,73 <sup>ns</sup> | 1,60 <sup>ns</sup> | 0,10 <sup>ns</sup> | 1,12 <sup>ns</sup> | 1,59 <sup>ns</sup> |
| <b>Gs</b>               | 0,588          | 3,03 <sup>*</sup>   | 0,96 <sup>ns</sup> | 7,10 <sup>*</sup>   | 3,25 <sup>ns</sup> | 2,54 <sup>ns</sup> | 0,44 <sup>ns</sup> | 3,21 <sup>ns</sup> | 2,73 <sup>ns</sup> |
| <b>Ps</b>               | 0,761          | 6,39 <sup>***</sup> | 1,69 <sup>ns</sup> | 11,61 <sup>**</sup> | 2,79 <sup>ns</sup> | 2,68 <sup>ns</sup> | 0,19 <sup>ns</sup> | 1,36 <sup>ns</sup> | 2,59 <sup>ns</sup> |

Número de observaciones, N = 36; VDE, variables dependientes de elaboración; MC, método de corte; P, porcentaje de proteína; G, porcentaje de grasa; pH, pH de leche pasteurizada; ST, sólidos totales; G/P, ratio grasa/proteína; R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; F, F-estadístico; GL, grados de libertad; \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; ns, no significativo. Las VDE están explicadas en tabla 3.

## Validación del modelo de predicción a nivel de planta piloto

**Tabla 14.** Análisis de correlaciones entre variables dependientes e independientes de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto.

| VDE                     | P                     | G                    | pH                   | ST                   | G/P                  |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>t<sub>cutE</sub></b> | -0,589 <sup>***</sup> | 0,054 <sup>ns</sup>  | 0,014 <sup>ns</sup>  | -0,309 <sup>ns</sup> | 0,659 <sup>***</sup> |
| <b>Rc</b>               | -0,311 <sup>ns</sup>  | 0,076 <sup>ns</sup>  | -0,046 <sup>ns</sup> | -0,071 <sup>ns</sup> | 0,446 <sup>**</sup>  |
| <b>Rp</b>               | 0,005 <sup>ns</sup>   | 0,354 <sup>*</sup>   | -0,081 <sup>ns</sup> | 0,255 <sup>ns</sup>  | 0,435 <sup>**</sup>  |
| <b>Rs</b>               | 0,013 <sup>ns</sup>   | 0,360 <sup>*</sup>   | -0,086 <sup>ns</sup> | 0,263 <sup>ns</sup>  | 0,433 <sup>**</sup>  |
| <b>Fi</b>               | -0,425 <sup>**</sup>  | -0,199 <sup>ns</sup> | 0,020 <sup>ns</sup>  | -0,192 <sup>ns</sup> | 0,225 <sup>ns</sup>  |
| <b>MSq</b>              | 0,193 <sup>ns</sup>   | -0,058 <sup>ns</sup> | -0,056 <sup>ns</sup> | 0,244 <sup>ns</sup>  | -0,317 <sup>ns</sup> |
| <b>Gq</b>               | 0,299 <sup>ns</sup>   | 0,335 <sup>ns</sup>  | -0,301 <sup>ns</sup> | 0,370 <sup>*</sup>   | 0,078 <sup>ns</sup>  |
| <b>Pq</b>               | -0,186 <sup>ns</sup>  | -0,193 <sup>ns</sup> | -0,240 <sup>ns</sup> | 0,139 <sup>ns</sup>  | -0,044 <sup>ns</sup> |
| <b>RMS</b>              | -0,105 <sup>ns</sup>  | -0,113 <sup>ns</sup> | -0,001 <sup>ns</sup> | 0,098 <sup>ns</sup>  | -0,027 <sup>ns</sup> |
| <b>RG</b>               | 0,031 <sup>ns</sup>   | 0,216 <sup>ns</sup>  | -0,256 <sup>ns</sup> | 0,228 <sup>ns</sup>  | 0,245 <sup>ns</sup>  |
| <b>RP</b>               | -0,270 <sup>ns</sup>  | -0,021 <sup>ns</sup> | -0,126 <sup>ns</sup> | -0,046 <sup>ns</sup> | 0,347 <sup>sn</sup>  |
| <b>MSs</b>              | 0,195 <sup>ns</sup>   | 0,273 <sup>ns</sup>  | -0,022 <sup>ns</sup> | 0,350 <sup>ns</sup>  | 0,057 <sup>ns</sup>  |
| <b>Gs</b>               | -0,519 <sup>**</sup>  | -0,361 <sup>ns</sup> | -0,259 <sup>ns</sup> | -0,361 <sup>ns</sup> | 0,154 <sup>ns</sup>  |
| <b>Ps</b>               | 0,620 <sup>**</sup>   | 0,676 <sup>***</sup> | 0,064 <sup>ns</sup>  | 0,621 <sup>***</sup> | 0,126 <sup>ns</sup>  |

VDE, variables dependientes de elaboración; P, porcentaje de proteína; G, porcentaje de grasa; pH, pH de leche pasteurizada; ST, sólidos totales; G/P, ratio grasa/proteína; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; ns, no significativo. Las VDE están explicadas en tabla 3.

Estos resultados están de acuerdo con Guinee y O'Brien (2010) quienes mencionan que, en general, el rendimiento de queso aumenta linealmente con las concentraciones de grasa y caseína en la leche bovina, y el grado de aumento inducido por el incremento de la caseína es mayor que el inducido por el incremento de la grasa. Además, el contenido de grasa y caseína están influidos por muchos factores, como la raza, la etapa y número de lactación, nutrición, salud animal, y la frecuencia de ordeño (Walstra et al., 2006).

Por otro lado el efecto de la ratio G/P sobre el rendimiento de queso Cheddar fue estudiado por Guinee et al. (2007) quienes elaboraron queso Cheddar a partir de leches con un contenido constante de proteína ( $3.69 \pm 0.09\%$ ) y variando el porcentaje de grasa para dar valores de G/P de 0,87 a 1,43, comprobando que el rendimiento del queso aumentaba en  $\sim 0,45$  kg / 100 kg de leche por cada 0,1 de aumento en G/P. En cuanto al porcentaje de finos (Fi), podemos observar que el modelo es significativo y que ninguno de los factores de composición afecta a este parámetro significativamente. Esto está en relación con los valores reportados en la tabla de correlaciones, excepto para el porcentaje de proteína que tiene una relación inversa significativa con los finos. A medida que se

incrementa el contenido de proteína, el porcentaje de finos disminuye, lo que es lógico, ya que conforme aumenta el contenido de proteína se refuerza el número de enlaces intermicelares y la cuajada se hace más resistente a los esfuerzos mecánicos. Esto fue demostrado por Guinee et al. (1997) al medir la dureza de geles de leche a distintas concentraciones de proteína. Para el resto de parámetros como MSq, Gq, Pq, RMS, RG, RP y MSs se obtuvieron modelos no significativos debido, probablemente, a los rangos estrechos de variabilidad de los factores utilizados. Para Gs y Ps, se obtuvieron modelos significativos, observando una relación inversa significativa de Gs con P. Esta relación también fue observada por Lou y Ng-Kwai-Hang (1992) al coagular leche estandarizada a seis niveles tanto de proteína y grasa (3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8 y 4,0) observando que un mayor nivel de proteína en la leche resultó en una mayor retención de grasa en el queso y menores pérdidas de grasa en el suero. En este mismo sentido Guinee et al. (2007) al coagular leche con 3,7% de proteína y distintos porcentajes de grasa (3 - 5%), observó que a medida que la ratio G/P disminuía, la retención de grasa en queso se incrementaba, es decir Gs disminuía. La menor recuperación de grasa en los quesos con un alto valor de G/P puede atribuirse a un efecto de dilución de la matriz proteica a los niveles de grasa más altos en el gel, atenuando la capacidad de la matriz proteica para retener los glóbulos grasos ocluidos durante el corte y agitación del gel y manejo de cuajada. Por otro lado, Ps presenta relaciones directas significativas con P, G y ST. Esto se debería a que a medida que se incrementa P también lo hace el porcentaje de proteínas del suero de la leche. Así mismo Lou y Ng-Kwai-Hang, (1992) coagulando leche a seis niveles de grasa (3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8 y 4,0), observaron que a medida que se incrementaba G, el contenido de proteína en el queso se reducía, es decir se incrementaba Ps. Sobre este último hecho, Guinee et al. (1997) mencionan que el aumento del contenido de grasa produce un número cada vez mayor de glóbulos grasos dando como resultado que las hebras de gel sean más alargadas para rodear y ocluir dichos glóbulos grasos. Esto conduce a hebras de gel más finas y más débiles que podrían romperse durante las operaciones posteriores a la etapa de coagulación. Suponiendo una leche con glóbulos grasos uniformes con un diámetro promedio de 3.5  $\mu\text{m}$  y una distancia libre media de 4.5  $\mu\text{m}$ , Guinee et al. (1997) estimaron que el

alargamiento efectivo es del orden de 11% en una leche con grasa al 10% (p/p), tendiente a cero en leche desnatada.

### 7.3.3 Comparación de medias de mínimos cuadrados para los rendimientos, recuperaciones y pérdidas

La **Tabla 15** muestra la comparación de medias de mínimos cuadrados para las variables dependientes evaluadas. Como podemos observar, no existen diferencias significativas entre los tres métodos de corte en función de las variables dependientes. Por tanto, los dos modelos de corte en base a G' reproducen bien el método de corte manual. En cuanto a los rendimientos de queso, se tiene que estos en promedio son de 17% (Rp y Rs), estando dentro del rango de variabilidad de los rendimientos de queso fresco encontrados en las referencias. Así Zambrano et al. (2010), obtuvieron rendimientos de cuajada de 14,93 a 18,52% (p/v) al coagular leche de tres genotipos de raza Holstein a 33°C. Bushara et al. (2014) también observaron un rendimiento de queso fresco de 17% (p/v) coagulando leche de vaca a 40 °C. Por otro lado, se observó poco cambio entre el rendimiento del queso presado (Rp) y saldo (Rs).

**Tabla 15.** Comparación de medias de mínimos cuadrados de tiempos de corte, rendimientos y recuperaciones en función del método de corte, obtenidas de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto.

| VDE                     | G'32               | t <sub>G'32</sub>  | t <sub>cut</sub>   | media |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| t <sub>cutE</sub> , min | 31,17 <sup>a</sup> | 31,23 <sup>a</sup> | 31,94 <sup>a</sup> | 31,45 |
| Rc, %                   | 31,65 <sup>a</sup> | 30,35 <sup>a</sup> | 31,62 <sup>a</sup> | 31,21 |
| Rp, %                   | 17,13 <sup>a</sup> | 16,80 <sup>a</sup> | 17,24 <sup>a</sup> | 17,06 |
| Rs, %                   | 17,16 <sup>a</sup> | 16,83 <sup>a</sup> | 17,26 <sup>a</sup> | 17,08 |
| Fi, %                   | 0,53 <sup>a</sup>  | 0,49 <sup>a</sup>  | 0,48 <sup>a</sup>  | 0,50  |
| MSq, %                  | 36,35 <sup>a</sup> | 35,68 <sup>a</sup> | 35,44 <sup>a</sup> | 36,16 |
| Gq, %                   | 18,22 <sup>a</sup> | 18,28 <sup>a</sup> | 18,25 <sup>a</sup> | 18,25 |
| Pq, %                   | 13,04 <sup>a</sup> | 14,06 <sup>a</sup> | 13,94 <sup>a</sup> | 13,68 |
| RMS, %                  | 50,61 <sup>a</sup> | 50,45 <sup>a</sup> | 49,66 <sup>a</sup> | 50,24 |
| RG, %                   | 86,48 <sup>a</sup> | 85,27 <sup>a</sup> | 87,61 <sup>a</sup> | 86,45 |
| RP, %                   | 72,49 <sup>a</sup> | 74,73 <sup>a</sup> | 75,85 <sup>a</sup> | 74,36 |
| MSs, %                  | 6,51 <sup>a</sup>  | 6,50 <sup>a</sup>  | 6,58 <sup>a</sup>  | 6,53  |
| Gs, %                   | 0,32 <sup>a</sup>  | 0,32 <sup>a</sup>  | 0,35 <sup>a</sup>  | 0,33  |
| Ps, %                   | 0,81 <sup>a</sup>  | 0,77 <sup>a</sup>  | 0,78 <sup>a</sup>  | 0,79  |

Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ); Número de observaciones, N = 36. Variables dependientes explicadas en tabla 3.

Con respecto al porcentaje de finos (Fi), debemos mencionar que hasta la fecha no existe norma FIL, ni AOAC para su determinación. En la práctica se utiliza la metodología propuesta por Raab et al. (1964) que se fundamenta en la centrifugación de la muestra de suero y secado del sedimento obtenido. Este valor se multiplica por cinco para obtener un fino de cuajada con 80% de humedad. En nuestro estudio se ha empleado un tamizado obteniendo un promedio de 0,5% de finos expresados en base al peso de leche, equivalente al 0,7% expresados en base al peso de suero extraído en el momento del drenaje de la cuba. Este porcentaje también es comparable con el encontrado por Sharma et al. (1980) durante la elaboración de queso Cottage, quienes obtienen 0,53 y 0,60% de finos al coagular leche desnatada con un 3,1 y 3,5% de proteína respectivamente. En el mismo sentido, Osl et al. (1992) reportaron valores de finos de 0,26 a 1,15% durante la elaboración de queso Emmental. Por otro lado, Everard et al. (2008) utilizando centrifugación y secado obtiene un porcentaje de finos menor a 0,1%; esto se debe a que dicho autor utilizó un tamiz de 75  $\mu\text{m}$  para separar la cuajada del suero; sin embargo, este tamaño de finos en el suero es muy inferior al que se obtiene en la industria. Con respecto a los porcentajes de materia seca (MSq), grasa (Gq) y proteína en queso (Pq), se obtuvieron en promedio un 36,16, 18,25 y 13,68% respectivamente. Estos valores están de acuerdo con los resultados reportados por Sant'Ana et al. (2013), quien obtuvo 36,03, 17,44 y 15,35% para MSq, Gq y Pq respectivamente, al elaborar queso fresco a partir de leche de vaca. Sin embargo, estas cifras pueden variar según los países de elaboración y el procedimiento de elaboración utilizado llegando en algunos casos a un 49% en MSq, incrementándose aproximadamente Gq y Pq en forma proporcional a MSq (Jimenez et al., 2016). En cuanto a la recuperación de materia seca (RMS), grasa (RG) y proteína (RP), se obtuvieron valores medios de 50,24, 86,45 y 74,36%, respectivamente. Dichos valores son muy próximos a los reportados por Bittante et al. (2013) y Bittante et al. (2014), quienes encuentran valores promedio con desviaciones estándar de  $52,27 \pm 3,44$ ,  $90,11 \pm 3,25$  y  $78,58 \pm 2,16\%$  para RMS, RG y RP respectivamente, al coagular leche de vaca a 35 °C. La pequeña diferencia en los valores medios se debería a que el autor utilizó un tamiz fino para separar la cuajada y el suero, recuperando más materia sólida. En cuanto a la materia seca (MSs), grasa (Gs) y proteína (Ps) en suero, se obtuvieron valores promedio de 6,53, 0,33 y 0,79



respectivamente, valores que están de acuerdo con los datos reportados por Gernigon et al. (2009), quienes compararon sueros de leche obtenidos de elaboraciones de cinco tipos de queso diferente, obteniendo valores promedio para MSs de 5,89 a 6,62% y para Ps de 0,32 a 0,74%. Así mismo, este autor afirma que los valores de MSs pueden variar mucho, incluso para un tipo dado de suero de leche. Por ejemplo, para quesos tipo Cheddar, Hill et al. (1985) encontraron un valor de MSs de 5,90, mientras que Hargrove et al. (1976) observan un valor de 6.70. En el mismo sentido, Ramos, Salas y Chamorro (2015) encontraron valores para MSs, Gs y Ps de 6,68, 0,3 y 0,8 en suero procedente de la elaboración de queso fresco.

#### **7.3.4 Análisis de covarianza de las variables de textura y color**

La **Tabla 16** recoge el análisis de covarianza para los parámetros de textura y color obtenidos de la coagulación de leche de vaca. Como se observa, el método de corte (MC) no tuvo efecto significativo en ninguna de las variables sensoriales evaluadas, lo que refuerza los resultados obtenidos en la evaluación de las variables de elaboración. También se observa que ninguno de los parámetros de composición tomados como variables independientes afectan a los parámetros sensoriales excepto a  $L^*$ , en donde existe un efecto significativo del porcentaje de humedad del queso ( $Hq$ ). Esto está de acuerdo con la tabla de análisis de correlaciones (**Tabla 17**), en donde podemos observar una relación directa y significativa entre estas dos variables. Al respecto, se sabe que la disminución de los valores de  $L^*$  se debe probablemente a una disminución en el número de gotas de suero, lo que reduce el grado de dispersión de la luz (Paulson et al., 1998). Álvarez et al. (2007) también observaron una correlación positiva entre el contenido de humedad y la luminosidad en quesos elaborados con leche de cabra. Como se observa en la **Tabla 17** existen correlaciones significativas de la tensión a la fractura ( $\sigma_f$ ), inversa y directa con  $Hq$  y  $Pq$  respectivamente. Correlaciones similares también fueron observadas por Álvarez et al. (2007) al evaluar la correlación entre la dureza y el contenido de humedad y proteína en quesos elaborados con leche de cabra. Madadlou et al. (2007) observaron también una relación inversa entre el contenido de humedad y el  $\sigma_f$  en quesos bajos en grasa elaborados con crema homogeneizada. Khosrowshahi et al. (2006) estudiaron el efecto de la maduración del queso sobre  $\sigma_f$  y observaron

## Validación del modelo de predicción a nivel de planta piloto

una disminución de  $\sigma_f$  a medida que la proteína disminuía debido a la proteólisis. Este comportamiento también fue observado por Rogers et al. (2009) al evaluar el efecto de la maduración sobre el estrés a la fractura del queso Cheddar, utilizando leches de diferentes ratios G/P (1,2, 0,53 y 0,2).

**Tabla 16.** Análisis de covarianza de parámetros de textura y color, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto.

| VDTC         | Modelo         |                    | Factor             | Cofactores         |                    |                    |                    |
|--------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|              |                |                    | MC                 | Lote               | Hq                 | Gq                 | Pq                 |
|              | R <sup>2</sup> | F                  | (GL=2)<br>F        | (GL=1)<br>F        | (GL=1)<br>F        | (GL=1)<br>F        | (GL=1)<br>F        |
| $\sigma_f$   | 0,424          | 3,68**             | 0,43 <sup>ns</sup> | 6,71*              | 3,46 <sup>ns</sup> | 0,55 <sup>ns</sup> | 3,14 <sup>ns</sup> |
| $\epsilon_f$ | 0,132          | 0,76 <sup>ns</sup> | 0,06 <sup>ns</sup> | 3,27 <sup>ns</sup> | 0,68 <sup>ns</sup> | 0,03 <sup>ns</sup> | 0,41 <sup>ns</sup> |
| <b>L*</b>    | 0,370          | 2,75*              | 0,32 <sup>ns</sup> | 3,79 <sup>ns</sup> | 9,50**             | 0,08 <sup>ns</sup> | 1,02 <sup>ns</sup> |
| <b>a*</b>    | 0,494          | 4,55**             | 0,35 <sup>ns</sup> | 19,75***           | 0,46 <sup>ns</sup> | 0,16 <sup>ns</sup> | 0,96 <sup>ns</sup> |
| <b>b*</b>    | 0,183          | 1,05 <sup>ns</sup> | 0,47 <sup>ns</sup> | 2,60 <sup>ns</sup> | 0,68 <sup>ns</sup> | 0,29 <sup>ns</sup> | 0,62 <sup>ns</sup> |
| <b>C*</b>    | 0,185          | 1,06 <sup>ns</sup> | 0,47 <sup>ns</sup> | 2,65 <sup>ns</sup> | 0,67 <sup>ns</sup> | 0,29 <sup>ns</sup> | 0,62 <sup>ns</sup> |
| <b>h</b>     | 0,371          | 2,76*              | 0,40 <sup>ns</sup> | 11,46**            | 0,43 <sup>ns</sup> | 0,13 <sup>ns</sup> | 0,53 <sup>ns</sup> |

Número de observaciones N = 36; VDTC, variables dependientes de textura y de color; MC, método de corte; Hq, porcentaje de humedad en queso; Gq, porcentaje de grasa en queso; Pq, porcentaje de proteína en queso; R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; F, F-estadístico; GL, grado de libertad; \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; <sup>ns</sup>, no significativo. Las variables dependientes de textura y color (VDTC) están explicadas en el texto.

**Tabla 17.** Análisis de correlaciones entre las variables de composición y las de textura y color del queso.

| VDTC         | Hq                   | Gq                   | Pq                   |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| $\sigma_f$   | -0,345*              | 0,036 <sup>ns</sup>  | 0,466**              |
| $\epsilon_f$ | 0,071 <sup>ns</sup>  | 0,054 <sup>ns</sup>  | 0,133 <sup>ns</sup>  |
| <b>L*</b>    | 0,484**              | -0,031 <sup>ns</sup> | -0,282 <sup>ns</sup> |
| <b>a*</b>    | -0,205 <sup>ns</sup> | 0,208 <sup>ns</sup>  | 0,251 <sup>ns</sup>  |
| <b>b*</b>    | 0,036 <sup>ns</sup>  | 0,149 <sup>ns</sup>  | 0,235 <sup>ns</sup>  |
| <b>C*</b>    | 0,034 <sup>ns</sup>  | 0,15 <sup>ns</sup>   | 0,236 <sup>ns</sup>  |
| <b>h</b>     | 0,192 <sup>ns</sup>  | -0,185 <sup>ns</sup> | -0,203 <sup>ns</sup> |

\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; <sup>ns</sup>, no significativo. Las variables dependientes de textura y color (VDTC) están explicadas en el texto.

### 7.3.5 Media de mínimos cuadrados de las variables de textura y color

La **Tabla 18** muestra la media de mínimos cuadrados de los parámetros de textura y color en función del método de corte, en donde podemos observar que no existen diferencias significativas entre estos parámetros, confirmando que los

tiempos de corte generados por los modelos reproducirían bien el tiempo de corte del maestro quesero. Los parámetros de  $\sigma_f$  y  $\epsilon_f$  tuvieron valores promedio de 20,51 kPa y 0,68 respectivamente. Estos valores están de acuerdo con los valores reportados por Buffa et al. (2004) quienes obtuvieron valores de 24,49 kPa y 0,68 para  $\sigma_f$  y  $\epsilon_f$  respectivamente en quesos elaborados con leche de cabra. El mayor valor de  $\sigma_f$  en el estudio de Buffa et al. (2004) se debería a que estos quesos contenían un mayor valor de MSq (53,04%) comparado con el nuestro (36,16%). En el mismo sentido, Cunha et al. (2006) obtienen valores de 20,29 kPa y 0,57 para  $\sigma_f$  y  $\epsilon_f$  respectivamente en queso fresco. Por otro lado los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  tuvieron valores promedio de 94,58, 0,39 y 11,29 respectivamente, de acuerdo con los valores reportados por Dantas et al. (2016) al elaborar queso fresco con cultivo iniciador, quienes obtienen valores de 95,74, 0,88 y 13,98 para  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  respectivamente. Las pequeñas diferencias en los parámetros estudiados pueden deberse a que en este caso el porcentaje de proteína fue más alto (15,39%) comparado con nuestros experimentos (13,68%), pudiendo aumentar el valor de  $L^*$  (McDermott et al., 2016).

**Tabla 18.** Comparación de medias de mínimos cuadrados de parámetros de textura y color en función del método de corte, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel de planta piloto.

| VDTC                        | G'32               | t <sub>G'32</sub>  | t <sub>cut</sub>   | media |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| $\sigma_f$ , kPa            | 19,97 <sup>a</sup> | 20,45 <sup>a</sup> | 21,11 <sup>a</sup> | 20,51 |
| $\epsilon_f$ , adimensional | 0,68 <sup>a</sup>  | 0,68 <sup>a</sup>  | 0,68 <sup>a</sup>  | 0,68  |
| $L^*$ , adimensional        | 94,62 <sup>a</sup> | 94,6 <sup>a</sup>  | 94,51 <sup>a</sup> | 94,58 |
| $a^*$ , adimensional        | 0,40 <sup>a</sup>  | 0,36 <sup>a</sup>  | 0,41 <sup>a</sup>  | 0,39  |
| $b^*$ , adimensional        | 11,14 <sup>a</sup> | 11,65 <sup>a</sup> | 11,07 <sup>a</sup> | 11,29 |
| $C^*$ , adimensional        | 11,15 <sup>a</sup> | 11,66 <sup>a</sup> | 11,07 <sup>a</sup> | 11,29 |
| $h$ , °                     | 87,95 <sup>a</sup> | 88,22 <sup>a</sup> | 87,91 <sup>a</sup> | 88,03 |

Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ); Número de observaciones,  $N = 36$ . Las variables dependientes de textura y color (VDTC) están explicadas en el texto.

Por otro lado, el parámetro  $b^*$  está estrechamente relacionado con el nivel de  $\beta$ -caroteno y el contenido de grasa; una mayor cantidad de grasa láctea y de  $\beta$ -caroteno da como resultado un aumento del parámetro  $b^*$ . Por lo tanto, la raza y la alimentación del ganado pueden afectar al valor de  $b^*$  (Calderón et al., 2007). Los valores promedio de saturación y tonalidad fueron 11,29 y 88,03° respectivamente, indicando que los quesos tuvieron una coloración ligeramente

amarillenta. El valor de tonalidad está dentro del rango esperable para quesos que es de 40 a 90°, teniendo valores de tonalidad más bajos aquellos que se han dejado madurar por más tiempo, probablemente como consecuencia de la oxidación de las grasas a aldehídos (Wadhvani y McMahon, 2012).

#### **7.4 Conclusiones**

Las calidades de las predicciones del tiempo de corte reológico de las ecuaciones  $G' = f(R, P)$  y  $t_{G'32} = f(R', P)$ , durante la elaboración de queso fresco fueron muy buenas para la temperatura de 32 °C, siendo el SEP para ambas ecuaciones de ~1 min.

No se observaron efectos significativos del método de corte sobre las variables de elaboración, textura y color de los quesos, lo que indica que tanto el modelo  $G' = f(R, P)$  como el modelo  $t_{G'32} = f(R', P)$  reproducirían bien el tiempo de corte dado por el maestro quesero.



## **Capítulo VIII. Validación del modelo de monitorización de la dureza de la cuajada a nivel industrial**

### **8.1 Introducción**

En la actualidad, la industria quesera está cada vez más automatizada, desde el proceso de recepción de la leche hasta el envasado. Sin embargo en la mayoría de las plantas industriales la determinación del momento adecuado para realizar el corte de la cuajada todavía no está automatizada (Payne y Castillo, 2007). En la mayoría de plantas, este tiempo es decidido todavía por un maestro quesero y en otras se trabajan a tiempo fijo, estandarizando el contenido de grasa y proteína de la leche (Donnelly, 2016). Estos métodos pueden ser funcionales, pero necesariamente óptimos porque los factores que afectan la microestructura del gel y a la firmeza de la cuajada pueden variar el tiempo de corte óptimo. Cortar la cuajada confiando en la inspección empírica es precisa y aceptable si la evaluación se realiza de forma adecuada. Se ha afirmado que los maestros queseros pueden seleccionar el tiempo de corte con una gran precisión. Sin embargo, Castillo (2006) menciona que es arriesgado suponer que la dureza de la cuajada y la tendencia del gel a exhibir sinéresis se pueden "optimizar" mediante la inspección empírica. Una forma de optimizar el proceso de cuajado es estandarizar los contenidos de sólidos (grasa y/o proteína) de la leche y las cantidades de cuajo y  $\text{CaCl}_2$  adicionados, determinándose un tiempo constante de corte (Johnson, 2011). Sin embargo, este método se basa en predicciones y no en medidas en tiempo real.

Las técnicas para controlar el cuajado se han estado desarrollando desde la década de 1970 y han sido revisadas por Castillo (2006) y O'Callaghan (2011). Para que sean de utilidad en un entorno industrial, dichas técnicas deben operar en línea dentro de la cuba, ser no destructivas y cumplir con las normas de diseño sanitario (Payne y Castillo, 2007). El objetivo normalmente, es establecer el tiempo de corte óptimo de forma objetiva, por lo que el método debe ser capaz de discernir la firmeza de la cuajada en lugar de, simplemente, detectar el RCT (Janhøj y Qvist, 2010).

La mayoría de métodos en línea miden los cambios de la leche durante la coagulación hasta el tiempo de agregación y solo algunos miden los cambios

hasta el tiempo de gelificación (tiempo hasta  $G' = 1 \text{ Pa}$  o *crossing over*). Por ejemplo, el método del alambre caliente puede medir el punto de gelificación con alta sensibilidad, pero es insensible al proceso de endurecimiento de la cuajada. Sin embargo, las mediciones de reflectancia difusa podrían usarse para monitorizar la firmeza de la cuajada ya que la cantidad de luz reflejada aumenta con el endurecimiento de esta (Castillo et al., 2003b).

Una de las razones por las que las técnicas en línea se utilizan poco en la industria probablemente esté relacionada con las limitaciones de tiempo en la producción de grandes volúmenes de queso, donde no resulta práctico variar el tiempo de corte. Sin embargo, la determinación del momento exacto del corte es muy importante para las empresas ya que se ahorraría dinero si se cortara después del tiempo adecuado y, sobre todo, se preservaría la calidad del producto al cortar en el momento exacto (homogeneidad entre lotes). Otro aspecto importante es la precisión del método empleado para la determinación del momento adecuado para realizar el corte, que no está muy bien documentada para los ensayos industriales, excepto quizás para los métodos basados en la reflectancia del infrarrojo cercano (Janhøj y Qvist, 2010).

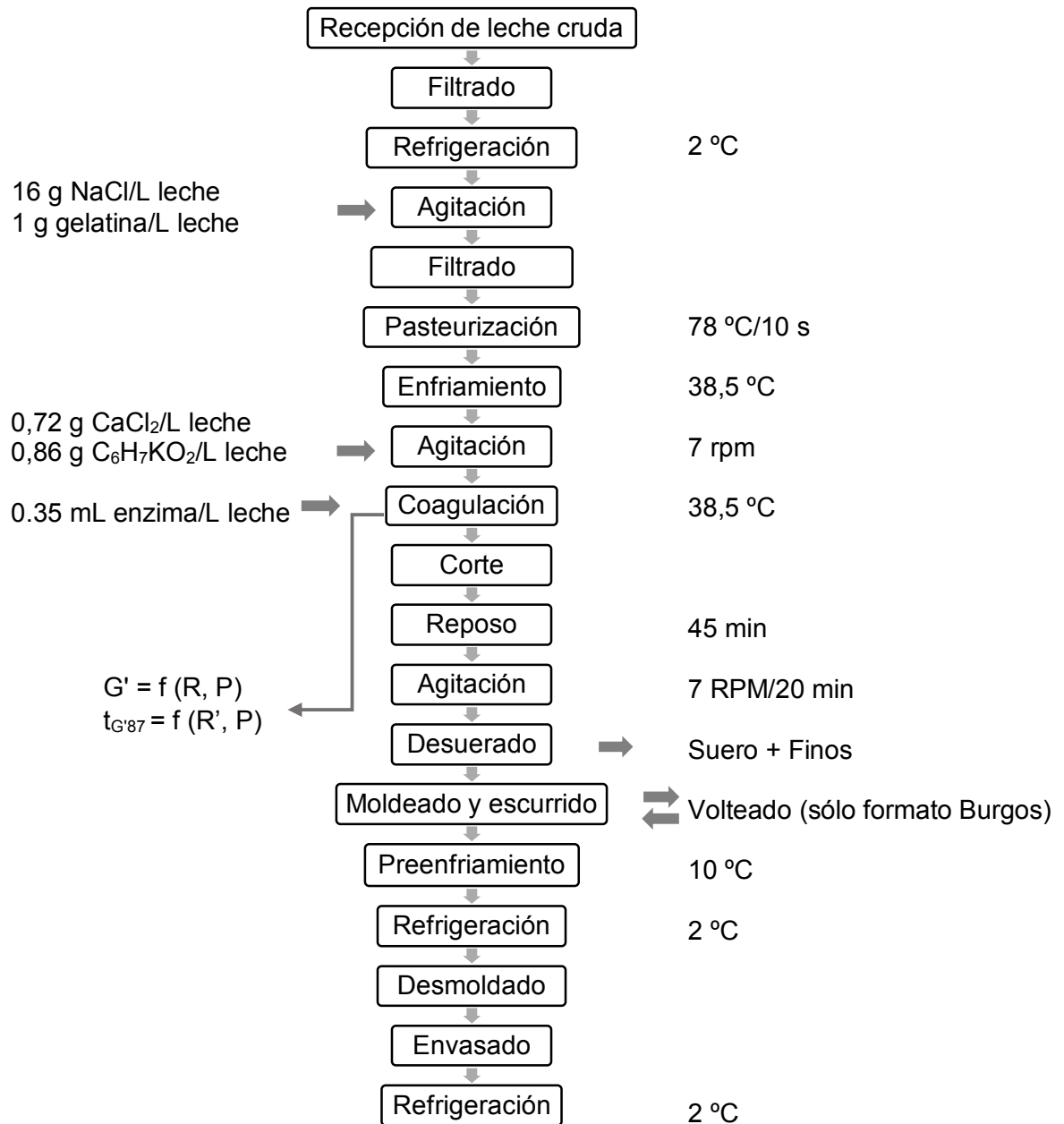
Teniendo como marco de referencia lo anteriormente descrito, se probó el sistema de predicción del módulo elástico de la cuajada en una empresa productora de queso para verificar sus ventajas con respecto al método de corte a tiempo fijo. Por otro lado, se pretende aportar mayor información sobre la aplicación de técnicas en línea de determinación del momento de corte de la cuajada a nivel industrial ya que la que existe es muy escasa. Por lo tanto, el objetivo de este apartado fue aplicar y validar un método de predicción del módulo elástico de la cuajada en una industria quesera.

## **8.2 Materiales y métodos**

Para realizar la validación del modelo de predicción a nivel industrial se aplicó el diseño experimental de la sección 3.3 correspondiente al objetivo específico E.

### **8.2.1 Procedimiento experimental**

A cada unidad experimental se le aplicó el diagrama de flujo de la **Figura 68**.

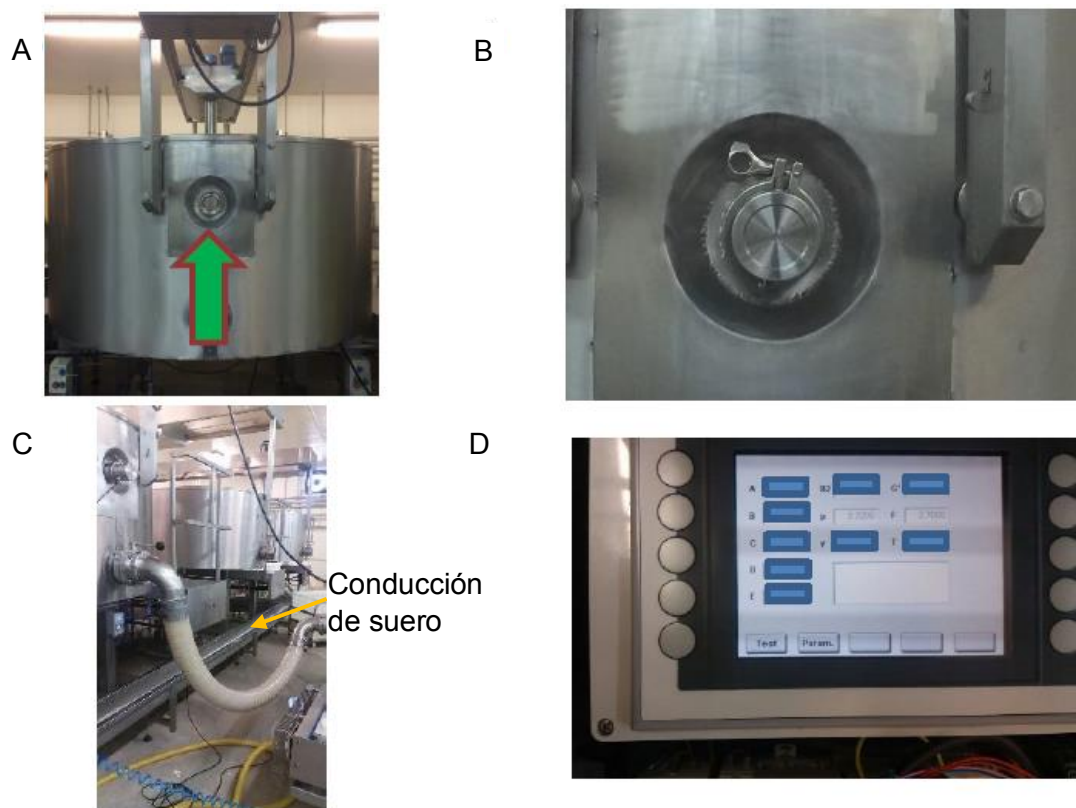


**Figura 68.** Diagrama de flujo de la elaboración de queso fresco a nivel industrial.

La empresa utiliza leche entera de vaca proveniente de granjas locales que se almacena en tanques de refrigeración a 2 °C hasta su utilización. La leche es analizada diariamente antes de proceder a la elaboración de queso, determinándose el contenido de proteína, grasa y sólidos totales en un equipo de análisis Milkana® superior plus (Turquía), que periódicamente es calibrado. La leche es conducida desde los tanques de almacenamiento hacia un deposito donde se mezcla con sal marina (NaCl) a razón de 16 g por litro de leche, para proporcionar sabor al queso fresco, contribuyendo a la conservación del queso,



y gelatina en polvo a razón de 1 g por litro de leche, para mejorar la retención de humedad y retardar el fenómeno de sinéresis durante el almacenamiento. Luego pasa al sistema de pasteurización de placas donde se aplica un tratamiento a 78 °C durante 10 s. Una vez realizada la pasteurización, la leche se enfría y se envía a una cuba quesera de 3500 L de capacidad con doble camisa, cuyo interior se encuentra relleno por poliuretano que sirve como aislante térmico. La temperatura de la leche se mantiene constante mediante dicho aislamiento. El sensor óptico fue instalado en una de sus paredes tal como muestra la **Figura 69**.



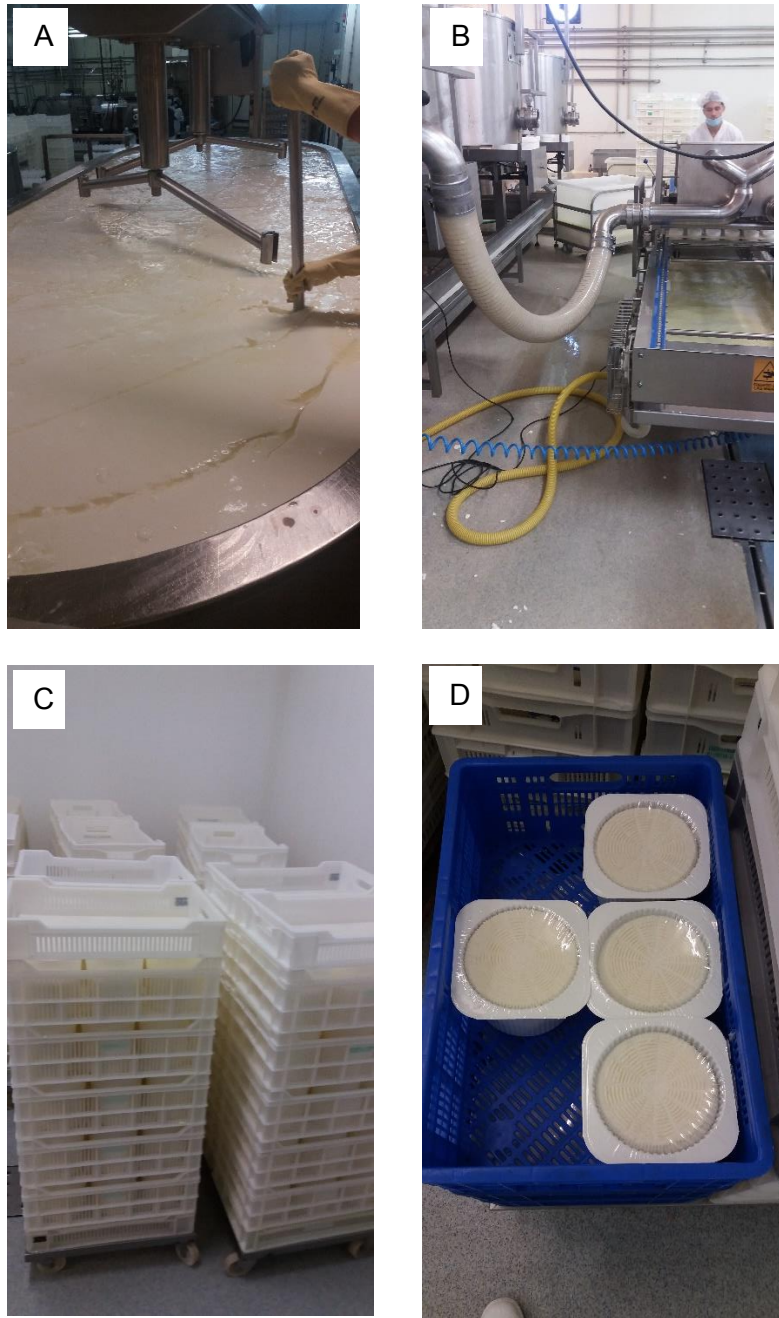
**Figura 69.** PLC conectado a sensor a nivel industrial. A) Perforación practicada en pared de cuba quesera, a través de la doble camisa, para alojar el sensor de dispersión de luz NIR. B) Detalle del sensor instalado en pared de cuba, sujeto con *tri-clamp*. C) Cuba quesera durante el desuerado, donde se observa el sensor con cable de conexión -*water-proof*- a PLC -esquina superior izquierda-. D) PLC mostrando pantalla de parámetros (parámetros han sido ocultados por motivos de confidencialidad).

La leche llega a la cuba con una temperatura próxima a 38,5 °C. Utilizando palas de agitación se mantiene la leche en agitación a una velocidad de 7 rpm durante todo el proceso de llenado. Durante este periodo, se adiciona una solución de

cloruro de calcio anhidro de 120 g por litro de solución, a razón de 0,72 g por litro de leche, para mejorar la coagulación de la leche, y sorbato de potasio ( $C_6H_7KO_2$ ), a razón de 0,86 g por litro de leche, como conservante debido a que el queso fresco, por su alto contenido de humedad y elevado pH, es más susceptible al crecimiento microbiológico. Una vez llena la cuba se procede a adicionar Quimosina recombinante (CHY-MAX plus; EC 3.4.23.4, 200 IMCU·mL<sup>-1</sup>) suministrada por Chr. Hansen Inc. (Chr. Hansen Barcelona, España), a razón de 0,35 mL de enzima por litro de leche. La enzima se almacena en refrigeración a 4 °C. Seguidamente se procede a esperar el tiempo adecuado para la coagulación de la leche, determinándose el tiempo del corte utilizando uno de los tres métodos antes mencionados de forma aleatoria. Una vez alcanzado el tiempo de corte, se procede a realizar el corte manual, utilizando liras de corte horizontales y verticales tal como muestra la **Figura 70A**. Luego, tras la operación de corte de la cuajada, se inicia un periodo de reposo de 45 min para que el grano libere el suero y se produzca la contracción del mismo. Una vez terminado este periodo, se aplica una agitación a 7 rpm por espacio de 20 min para inducir una mayor salida de suero. Posteriormente el suero y los granos de cuajada pasan ya sea a la mesa de enmoldado mecánico (**Figura 70B**) utilizada para el formato más pequeño ó a la mesa de enmoldado manual para los formatos más grandes. En estas mesas también se procede simultáneamente a la separación del suero de los granos de cuajada. La empresa produce cinco formatos de queso fresco, tal como se describe en la sección 8.3, en función de los pedidos que solicitan los clientes.

Sólo en el caso del formato tipo Burgos, se aplica un volteado una vez pasados ~30 min, después del enmoldado. Una vez enmoldados, los quesos pasan a una cámara de preenfriamiento (2 °C) (**Figura 70C**); sin embargo, debido a la temperatura que presenta el queso inicialmente, la temperatura puede elevarse a 10°C. En ésta cámara, el queso permanece por un intervalo de tiempo aproximado de 6 h. Pasado este tiempo, los quesos ingresan a la cámara de refrigeración a 2 °C, donde esperan para proceder al desmoldado y envasado. El desmoldado se realiza de forma manual, mientras que el envasado es mecanizado. El queso envasado se traslada a la cámara de almacenamiento a

2°C a la espera de ser recogido por los distribuidores (**Figura 70D**). El tiempo de vida útil es de 25 días para todos los formatos.



**Figura 70.** A) Corte de la cuajada. B) Envasado mecanizado. C) Quesos en cámara de preenfriamiento. D) Quesos tipo Burgos en cámara de almacenamiento.

Se tomaron muestras de queso de cada lote de producción, se almacenaron en cámara a 4 °C y se realizaron análisis de pH, proteína, grasa y materia seca según los métodos descritos en 7.2.1. Para los quesos más pequeños, de 200 g (Mini200), se realizaron análisis de textura y color según los

métodos descritos en 7.2.2 y 7.2.3 respectivamente, ya que siempre se producía este tipo de formato.

### 8.2.2 Cálculo de rendimientos

Las variables dependientes de elaboración (VDE), correspondientes a rendimientos y recuperaciones, se calcularon utilizando las fórmulas de la **Tabla 19**. Para determinar el porcentaje de finos (Fi) se emplearon muestras de 5 kg de suero más finos por cada producción.

**Tabla 19.** Variables dependientes de elaboración (VDE) de queso fresco.

| VDE (%)                               | Símbolo | Fórmula                  |
|---------------------------------------|---------|--------------------------|
| <b>Rendimiento</b>                    | Rd      | $(wq/vl) \cdot 100$      |
| <b>Rendimiento a humedad promedio</b> | Rhp     | $Rd \cdot (msa)/(msp)$   |
| <b>Rendimiento de materia seca</b>    | RMS     | $(wmsq/vl) \cdot 100$    |
| <b>Finos</b>                          | Fi      | $(wf/(ws+wf)) \cdot 100$ |
| <b>Materia seca en queso</b>          | MSq     | $(wmsq/wq) \cdot 100$    |
| <b>Recuperación de materia seca</b>   | RMS     | $(wmsq/wmsl) \cdot 100$  |
| <b>Recuperación de grasa</b>          | RG      | $(wgq/wgl) \cdot 100$    |
| <b>Recuperación de proteína</b>       | RP      | $(wpq/wpl) \cdot 100$    |
| <b>Materia seca en suero</b>          | MSs     | $(wmss/ws) \cdot 100$    |
| <b>Grasa en suero</b>                 | Gs      | $(wgs/ws) \cdot 100$     |

Dónde: wq, peso de queso; vl, volúmen de leche; msa, porcentaje de materia seca real; msp, porcentaje de materia seca promedio; wmsq, peso de materia seca en queso; wf, peso de finos; ws, peso de suero; wq, peso de queso; wgq, peso de grasa en queso; wpq, peso de proteína en queso; wmsl, peso de materia seca en leche; wgl, peso de grasa en leche; wpl, peso de proteína en leche; wmss, peso de materia seca en suero; wgs, peso de grasa en suero.

### 8.2.3 Análisis estadístico

En este estudio, los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico SAS (SAS ® 9.4, 2012). El análisis de covarianza (ANCOVA) se realizó mediante el procedimiento del modelo lineal general (GLM) de SAS, mientras que los coeficientes de correlación de Pearson, r, fueron obtenidos por el procedimiento de correlación (CORR). La media de mínimos cuadrados (LSMEANS) y la significación de cada tratamiento se computaron mediante suma de cuadrados de tipo IV. El método de la media de mínimos cuadrados predice diferencias entre todos los tratamientos. En este experimento, las medias fueron consideradas significativamente diferentes a  $p < 0.05$ . Se utilizó el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar de calibración (SEC) para determinar la calidad de la calibración de los modelos de predicción. Para

la validación de los modelos de monitorización se empleó una validación cruzada, determinando el error estándar de predicción (SEP).

### 8.3 Resultados y discusión

#### 8.3.1 Composición y formatos de quesos

En la **Tabla 20** se muestran los formatos de queso producidos, así como las medias de sus pesos netos y de sus porcentajes de materia seca, en donde se puede observar que los formatos de mayor tamaño contienen un porcentaje de materia seca algo superior. Estas diferencias se pueden deber a que estos formatos son envasados en un tiempo posterior al envasado de los pequeños, produciéndose más desuerado en los quesos grandes. Estos valores están de acuerdo con los valores de humedad del queso tipo Burgos, que están comprendidos en el rango de 64 a 80% (Barriga et al., 2015).

**Tabla 20.** Formatos y composición de queso producidos por la empresa láctea.

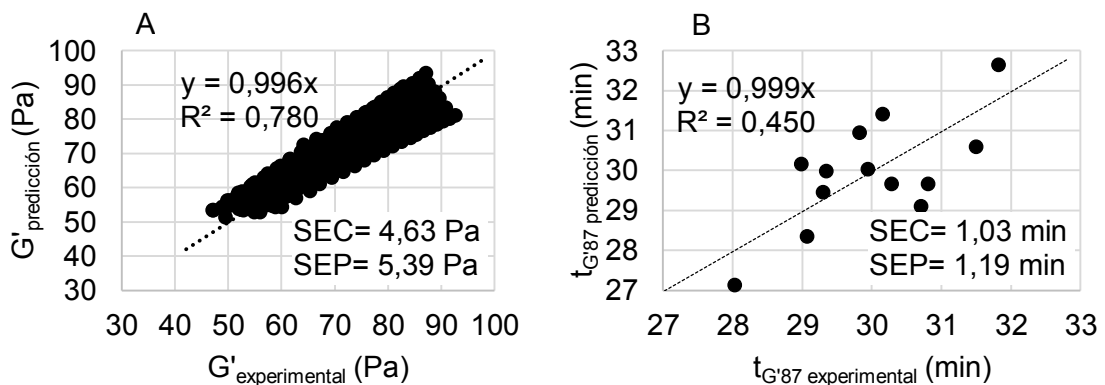
| Formato         | wn $\pm$ DS     | MSq $\pm$ DS     | Pq $\pm$ DS      | Gq $\pm$ DS    | Cq $\pm$ DS     | Enmoldado  |
|-----------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|------------|
| <b>Burgos</b>   | 2,19 $\pm$ 0,10 | 39,06 $\pm$ 2,45 | 14,15 $\pm$ 1,18 | 18,5 $\pm$ 0,8 | 2,85 $\pm$ 0,19 | Manual     |
| <b>Villalón</b> | 2,09 $\pm$ 0,12 | 38,46 $\pm$ 2,59 | 14,38 $\pm$ 1,13 | 20,6 $\pm$ 0,3 | 2,76 $\pm$ 0,12 | Manual     |
| <b>Baby400</b>  | 0,38 $\pm$ 0,02 | 36,28 $\pm$ 1,27 | 13,40 $\pm$ 1,96 | 15,2 $\pm$ 0,6 | 2,66 $\pm$ 0,50 | Manual     |
| <b>Mini250</b>  | 0,24 $\pm$ 0,01 | 37,59 $\pm$ 2,62 | 13,88 $\pm$ 1,68 | 16,5 $\pm$ 1,4 | 2,85 $\pm$ 0,19 | Manual     |
| <b>Mini200</b>  | 0,21 $\pm$ 0,01 | 35,84 $\pm$ 2,81 | 13,00 $\pm$ 1,16 | 15,7 $\pm$ 0,5 | 2,68 $\pm$ 0,34 | Mecanizado |

wn, peso neto (kg); MSq, materia seca en queso (%); Pq, proteína en queso (%); Gq, grasa en queso (%); Cq, cenizas en queso (%); DS, desviación estándar; N=10 por cada formato.

Además, el porcentaje de proteína en queso (Pq) y el porcentaje de grasa en queso (Gq) están dentro de los valores esperados para queso fresco. Así, Evert et al. (2014) determinaron para queso fresco con un contenido de materia seca en queso (MSq) de 37,11% y unos valores de Pq y Gq de 14,12 y 16,32% respectivamente. Por otro lado, los valores de cenizas en queso (Cq) se encuentran también próximos a los encontrados en la literatura, así Sant'Ana et al. (2013) determinan valores de Cq en queso fresco de leche de vaca de 2,21  $\pm$  0,32%.

### 8.3.2 Calibración y validación de ecuaciones de predicción a nivel industrial

Antes de comenzar los experimentos definitivos se realizó una calibración y validación previa de los modelos de predicción del módulo elástico de la cuajada ya que las condiciones de cuajado fueron diferentes de las previamente utilizadas a nivel de planta piloto (p. ej., se varió la temperatura de coagulación de 32 a 38.5 °C así como la proporción y el momento de adición de insumos). Se monitorizó la coagulación de trece lotes de leche de diferente composición, obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 71**.



**Figura 71.** Calibración y validación de los dos modelos de predicción para realizar el corte a 87 Pa: A) modelo  $G'$ , B) modelo  $t_{G'87}$ .

La calibración se realizó desde el minuto 20 tras la adición de la enzima hasta un tiempo de corte de 31 min (i.e., tiempo medio habitual de corte en la empresa), lo que se correspondió con un rango de monitorización del módulo elástico de 53,60 a 87,16 Pa respectivamente, eligiéndose para el corte el valor  $G' = 87$  Pa. Como podemos observar, la calibración del modelo  $G'$  dió un  $R^2$  de 0,78. Según Ward (2011), este valor corresponde a una calibración moderadamente útil (0,7-0,8). Sin embargo, para este mismo modelo, se tiene un valor de SEP de validación cruzada de 5,39 Pa, que puede ser transformado a unidades de tiempo dividiéndolo entre el cambio promedio de  $G'$  en función del tiempo (3,03 Pa/min), dando como resultado un SEP de 1,78 min. Este tiempo es mayor al encontrado en el caso de la calibración a nivel de planta piloto, lo que se debería a que la calibración se realizó a valores de  $G'$  muy por encima del rango establecido a nivel de planta piloto (15 a 40 Pa), en comparación al rango de 53,60 a 87,16 Pa establecido a nivel industrial. Por otro lado, la calibración del modelo  $t_{G'87}$  dió un  $R^2$  de 0,48. Según Ward et al. (2011) este valor

correspondería a una calibración por debajo de la moderadamente útil. Sin embargo, el valor del error estándar de predicción (SEP) de validación cruzada fue de 1,19 min. Esta ligera disminución de la calidad predictiva en comparación con la calibración a nivel de planta piloto, se debería a que el parámetro óptico obtenido de  $R'$  (primera derivada de  $R$ ) que se utilizó en este modelo está más distante del tiempo de corte a 87 Pa. Esta disminución de calidad predictiva fue observada también por Abdelgawad et al. (2014) al comparar las predicciones de  $G'$  a 30 y 60 Pa, en coagulaciones de mezclas de leche de oveja, cabra y vaca. Por otro lado, Abdelgawad et al. (2016) también obtiene un SEP de 1,12 min al predecir  $t_{G'30}$  durante la coagulación de leche de oveja con infección intramamaria subclínica a 35 °C. Sin embargo, como hemos visto, ambas ecuaciones dan SEPs menores a dos minutos que fue el tiempo promedio establecido por O'Callaghan et al. (1999) al comparar la exactitud de los tiempos de corte de varios instrumentos (Gelografo, CoAguLite, Alambre caliente y Vibracional) con respecto al tiempo de corte dado por método reométrico, al coagular leche de vaca a 32 °C.

### **8.3.3 Análisis de covarianza para rendimientos, recuperaciones y pérdidas**

La **Tabla 21** muestra el análisis de covarianza del tiempo de corte, rendimiento y retenciones, obtenidos en la coagulación de leche de vaca a nivel industrial. Como se observa, el método de corte (MC) tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento (Rd), el rendimiento de materia seca (Rms), la recuperación de materia seca (RMS) y la recuperación de proteína (RP). Esto se debería a que a una temperatura de coagulación y a un valor  $G'$  de corte elevados, los métodos de predicción del tiempo de corte reológico empleados tienden a diferir entre sí en sus estimaciones y estas, a su vez, con respecto al tiempo de corte fijo, produciendo rendimientos y recuperaciones diferentes. Esto se confirma al observar la **Tabla 22** de correlaciones, en donde se aprecia una correlación inversa y significativa de Rd, Rms, RMS y RP con MC. Al respecto, Fagan et al. (2007) encontraron un efecto significativo del tiempo del corte sobre el rendimiento quesero al coagular leche a 33 °C, a distintos tiempos de corte, mencionando que el efecto puede ser explicado por valores mayores o menores de RMS y RP.

Validación del modelo de predicción a nivel industrial

**Tabla 21.** Análisis de covarianza de rendimientos y recuperaciones, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel industrial.

|            | Modelo         |                    | Factor             | Cofactores         |                    |                    |                    |                    | Interacción        |
|------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|            |                |                    | MC<br>(GL=2)       | Envasado<br>(GL=1) | P<br>(GL=1)        | G<br>(GL=1)        | G/P<br>(GL=1)      | T<br>(GL=1)        | G/P x MC<br>(GL=2) |
| VDE        | R <sup>2</sup> | F                  | F                  | F                  | F                  | F                  | F                  | F                  | F                  |
| <b>Rd</b>  | 0,56           | 3,49**             | 3,76*              | 2,53 <sup>ns</sup> | 0,00 <sup>ns</sup> | 0,00 <sup>ns</sup> | 0,00 <sup>ns</sup> | 0,76 <sup>ns</sup> | 3,97*              |
| <b>Rms</b> | 0,54           | 3,26**             | 4,22*              | 0,23 <sup>ns</sup> | 0,26 <sup>ns</sup> | 0,22 <sup>ns</sup> | 0,21 <sup>ns</sup> | 0,09 <sup>ns</sup> | 4,44*              |
| <b>Fi</b>  | 0,20           | 0,65 <sup>ns</sup> | 0,75 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup> | 0,33 <sup>ns</sup> | 0,37 <sup>ns</sup> | 0,36 <sup>ns</sup> | 1,79 <sup>ns</sup> | 0,76 <sup>ns</sup> |
| <b>MSq</b> | 0,81           | 8,80***            | 0,17 <sup>ns</sup> | 52,68***           | 3,79 <sup>ns</sup> | 3,83 <sup>ns</sup> | 3,92 <sup>ns</sup> | 8,72**             | 0,18 <sup>ns</sup> |
| <b>RMS</b> | 0,61           | 3,26*              | 5,30*              | 0,06 <sup>ns</sup> | 0,26 <sup>ns</sup> | 0,18 <sup>ns</sup> | 0,20 <sup>ns</sup> | 0,00 <sup>ns</sup> | 5,50*              |
| <b>RG</b>  | 0,48           | 2,30 <sup>ns</sup> | 2,03 <sup>ns</sup> | 7,53*              | 1,13 <sup>ns</sup> | 1,30 <sup>ns</sup> | 1,24 <sup>ns</sup> | 0,85 <sup>ns</sup> | 2,07 <sup>ns</sup> |
| <b>RP</b>  | 0,53           | 3,15*              | 3,80*              | 0,76 <sup>ns</sup> | 0,00 <sup>ns</sup> | 0,02 <sup>ns</sup> | 0,02 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup> | 4,01*              |
| <b>MSs</b> | 0,20           | 0,57 <sup>ns</sup> | 0,24 <sup>ns</sup> | 0,23 <sup>ns</sup> | 0,02 <sup>ns</sup> | 0,02 <sup>ns</sup> | 0,03 <sup>ns</sup> | 0,96 <sup>ns</sup> | 0,24 <sup>ns</sup> |
| <b>Gs</b>  | 0,23           | 0,82 <sup>ns</sup> | 0,45 <sup>ns</sup> | 3,99 <sup>ns</sup> | 0,53 <sup>ns</sup> | 0,50 <sup>ns</sup> | 0,54 <sup>ns</sup> | 0,43 <sup>ns</sup> | 0,47 <sup>ns</sup> |

Número de observaciones N = 36; VDE, variables dependientes de elaboración (explicadas en la Tabla 19); MC, método de corte; G/P, ratio grasa/proteína; P, porcentaje de proteína; G, porcentaje de grasa; T, temperatura media; G/P x MC, interacción G/P por MC; R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; F, F-estadístico; GL, grados de libertad; \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; <sup>ns</sup>, no significativo.



## Conclusiones por objetivos específicos

**Tabla 22.** Análisis de correlaciones entre variables independientes y dependientes, obtenidas en la coagulación de leche de vaca a nivel industrial.

|            | MC                    | Envasado             | G/P                  | P                    | G                    | T                    |
|------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Rd</b>  | -0,567 <sup>***</sup> | -0,271 <sup>ns</sup> | -0,076 <sup>ns</sup> | 0,030 <sup>ns</sup>  | -0,076 <sup>ns</sup> | -0,028 <sup>ns</sup> |
| <b>Rms</b> | -0,529 <sup>**</sup>  | 0,036 <sup>ns</sup>  | 0,063 <sup>ns</sup>  | -0,071 <sup>ns</sup> | 0,040 <sup>ns</sup>  | 0,056 <sup>ns</sup>  |
| <b>Fi</b>  | -0,026 <sup>ns</sup>  | -0,001 <sup>ns</sup> | 0,101 <sup>ns</sup>  | 0,074 <sup>ns</sup>  | 0,169 <sup>ns</sup>  | 0,338 <sup>ns</sup>  |
| <b>MSq</b> | 0,026 <sup>ns</sup>   | 0,750 <sup>***</sup> | 0,273 <sup>ns</sup>  | -0,068 <sup>ns</sup> | 0,336 <sup>ns</sup>  | 0,404 <sup>*</sup>   |
| <b>RMS</b> | -0,518 <sup>**</sup>  | 0,034 <sup>ns</sup>  | 0,050 <sup>ns</sup>  | -0,168 <sup>ns</sup> | -0,033 <sup>ns</sup> | 0,037 <sup>ns</sup>  |
| <b>RG</b>  | -0,173 <sup>ns</sup>  | 0,165 <sup>ns</sup>  | -0,245 <sup>ns</sup> | -0,202 <sup>ns</sup> | -0,335 <sup>ns</sup> | 0,060 <sup>ns</sup>  |
| <b>RP</b>  | -0,434 <sup>**</sup>  | 0,166 <sup>ns</sup>  | 0,166 <sup>ns</sup>  | -0,288 <sup>ns</sup> | 0,041 <sup>ns</sup>  | 0,061 <sup>ns</sup>  |
| <b>MSs</b> | -0,050 <sup>ns</sup>  | -0,185 <sup>ns</sup> | -0,141 <sup>ns</sup> | 0,186 <sup>ns</sup>  | -0,058 <sup>ns</sup> | 0,075 <sup>ns</sup>  |
| <b>Gs</b>  | 0,042 <sup>ns</sup>   | -0,268 <sup>ns</sup> | -0,099 <sup>ns</sup> | 0,375 <sup>ns</sup>  | 0,100 <sup>ns</sup>  | 0,352 <sup>ns</sup>  |

\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; ns, no significativo. Los significados de los parámetros están explicados en el texto.

Acerca de este hecho, Fox et al. (2017) afirma que, si la firmeza del gel en el corte es demasiado baja o demasiado alta, el gel resultante es demasiado débil o demasiado rígido para permitir un corte limpio sin romperse. Cuando el gel es demasiado blando, la estructura del gel no está suficientemente desarrollada y se fractura incluso bajo las pequeñas deformaciones aplicadas al corte suave. En un gel excesivamente firme, el grado de agregación de caseína es relativamente alto y el gel tiende a ser rígido (alto  $G'$ ) y quebradizo (baja deformación por fractura) y susceptible a rotura por la tensión de deformación aplicada durante el corte y agitación normales. Otro aspecto a destacar es que el envasado y la temperatura tienen un efecto significativo en el porcentaje de materia seca (MSq). Como ya se mencionó anteriormente, esto se debería a que los quesos de mayor tamaño son enmoldados manualmente un tiempo después que han sido enmoldados en la mesa mecanizada los quesos más pequeños. Por otro lado, es lógico que al mantener la leche y/o cuajada a una temperatura alta, se tenga más materia seca en la cuajada a consecuencia de una mayor evaporación. La temperatura promedio fue de  $38,45 \pm 0,13^\circ\text{C}$  y la cuba es abierta con una gran área superficial expuesta. Por otro lado, se observan efectos significativos de interacción de la ratio grasa/proteína (G/P) x MC sobre Rd, RMS y RP.

#### 8.3.4 Comparación de medias de mínimos cuadrados para los rendimientos, recuperaciones y pérdidas

La **Tabla 23** muestra la comparación de medias de mínimos cuadrados de las variables de elaboración para los tres métodos de corte, teniendo un rendimiento promedio de 20,46%. Este rendimiento está cerca del límite superior de un queso fresco normal sin hidrocoloides incorporados. Así Ferragina et al. (2013) reportaron un rendimiento máximo de 20,58% para queso fresco elaborado con leche de vaca. Sin embargo, se sabe que la incorporación de hidrocoloides como la gelatina incrementa el rendimiento quesero de un 25 a un 49% con respecto al grupo control, debido a que esta enlaza el agua y proteína de la leche (Kurultay et al., 2000). En este sentido Korish y Abd Elhamid (2012) reportaron rendimientos de 19,7 hasta 28% para queso fresco elaborado con leche desnatada de bufala, utilizando hidrocoloides como carboximetil celulosa y pectina a concentraciones de 0,2 a 0,6%. Alnemr et al. (2016) también reportan incrementos de rendimiento en queso maduro al utilizar mezclas de carragenina, goma garrofin y goma xantana a concentraciones de 0,25 a 0,75 g/ kg de leche. Por otro lado, también se puede observar que el rendimiento (Rd) obtenido con el modelo G'87 es significativamente mayor que el  $t_{G'87}$  y este a su vez mayor que el método a tiempo fijo. Sin embargo, como se ha descrito cada cuba produce diferentes formatos de diferentes contenidos de humedad, por lo que, se hizo necesario llevar estos rendimientos a una humedad promedio que fue de 62,56%, obteniendo el rendimiento Rhd, en donde podemos observar que en este caso no existen diferencias significativas entre el MC que utiliza el modelo  $t_{G'87}$  con el de tiempo fijo. Sin embargo, si existe un incremento significativo de Rhd al utilizar el MC G'87. Este comportamiento también se puede apreciar en el rendimiento en materia seca (Rms); en este caso los valores están dentro del rango esperado para queso fresco. Así Bittante et al. (2014) obtuvieron un valor promedio de Rms de  $7,23 \pm 0,94\%$  al obtener queso fresco de leche de vaca coagulada a 35 °C, mientras que Cipolat-Gotet et al. (2016) obtuvieron un valor medio de  $7,2 \pm 0,9\%$  para las mismas condiciones de elaboración que en el caso anterior. En cuanto al porcentaje de finos (Fi), no se observaron diferencias significativas entre los métodos de corte, dando un promedio de 0,29%, valor que está de acuerdo con lo reportado por Schmitt et al. (2016), quienes obtienen

## Conclusiones por objetivos específicos

un contenido de finos en suero de 0,22 a 0,44% en la elaboración de queso semiduro.

**Tabla 23.** Comparación de medias de mínimos cuadrados de las variables de elaboración en función del método de corte, obtenidas de la coagulación de leche de vaca a nivel industrial.

| VDE (%)    | G'87               | t <sub>G'87</sub>  | t <sub>cutfijo</sub> | media |
|------------|--------------------|--------------------|----------------------|-------|
| <b>Rd</b>  | 21,68 <sup>a</sup> | 20,37 <sup>b</sup> | 19,32 <sup>c</sup>   | 20,46 |
| <b>Rhp</b> | 21,67 <sup>a</sup> | 20,30 <sup>b</sup> | 19,45 <sup>b</sup>   | 20,47 |
| <b>Rms</b> | 8,11 <sup>a</sup>  | 7,60 <sup>b</sup>  | 7,28 <sup>b</sup>    | 7,66  |
| <b>Fi</b>  | 0,26 <sup>a</sup>  | 0,30 <sup>a</sup>  | 0,30 <sup>a</sup>    | 0,29  |
| <b>MSq</b> | 37,19 <sup>a</sup> | 37,07 <sup>a</sup> | 37,40 <sup>a</sup>   | 37,22 |
| <b>RMS</b> | 54,21 <sup>a</sup> | 51,60 <sup>b</sup> | 48,76 <sup>c</sup>   | 51,52 |
| <b>RG</b>  | 92,33 <sup>a</sup> | 87,10 <sup>b</sup> | 88,11 <sup>b</sup>   | 88,77 |
| <b>RP</b>  | 83,26 <sup>a</sup> | 78,92 <sup>b</sup> | 76,49 <sup>b</sup>   | 79,56 |
| <b>MSs</b> | 8,03 <sup>a</sup>  | 8,20 <sup>a</sup>  | 8,09 <sup>a</sup>    | 8,11  |
| <b>Gs</b>  | 0,37 <sup>a</sup>  | 0,41 <sup>a</sup>  | 0,38 <sup>a</sup>    | 0,39  |

Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ); Número de observaciones, N = 36. Las variables dependientes explicadas en el texto.

Por otro lado, observamos que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de materia seca en queso (MSq). Sin embargo, en cuanto a la recuperación de materia seca (RMS) se observa que al utilizar el modelo G'87 se obtiene una RMS significativamente mayor en comparación con el modelo t<sub>G'87</sub> y este a su vez tiene una RMS significativamente mayor que el obtenido utilizar el método de corte a tiempo fijo. Este comportamiento está de acuerdo con las tendencias observadas en Rd, Rhp y Rms, y se explicaría en base a la recuperación de proteína (RP), que aumenta significativamente al utilizar el modelo G'87. Esto explicaría la diferencia de comportamientos entre MSq y RMS ya que una mayor cantidad de proteína retenida al utilizar el modelo G'87 también retendría una mayor cantidad de agua y, por lo tanto, los valores de MSq se mantendrían casi constantes en los tres métodos de corte. Este hecho fue estudiado por Guinee et al. (2007) al coagular leche con diferentes ratios G/P, observando que a medida que la ratio decrecía, el contenido de humedad en el queso se incrementaba, evidenciando la capacidad de la proteína de retener agua. También se han establecido comparaciones de porcentajes de humedad en quesos elaborados con leches de vacas Holstein y Jersey así como sus mezclas (Auldist et al., 2004; Bland et al., 2015), evidenciando que no existían

diferencias significativas en las humedades de los quesos para las leche cuyos ratios G/P se mantenían constantes. De esto se desprende que si el ratio G/P se mantiene constante como p. ej., en una misma época del año, la variabilidad MSq será mínima para diferentes producciones de queso como en nuestro caso. Los promedios de RMS, RG y RP fueron 51,52, 88,77 y 79,56 respectivamente coincidiendo con los datos obtenidos por Cipolat-Gotet et al. (2016) y Bobbo et al. (2016) al coagular leche de vaca, y obtener promedios y desviaciones estándar para RMS, RG y RP de  $52,1 \pm 3,6$ ,  $89,9 \pm 3,6$  y  $78,1 \pm 2,4$  respectivamente.

Por otro lado, no existieron diferencias significativas entre los valores de materia seca en suero (MSs) y grasa en suero (Gs), cuyos promedios fueron de 8,11 y 0,39% respectivamente. Estos valores están de acuerdo con lo reportado por Tarango et al. (2015) para queso fresco, dando para MSs y Gs valores de  $8,6 \pm 0,3$  y  $0,31 \pm 0,10\%$  respectivamente. En este caso, como en el nuestro, se observa un contenido en materia seca alto, probablemente debido a que el salado de la cuajada se realizó antes de drenar el suero.

### **8.3.5 Análisis de covarianza para los parámetros de textura y color**

En la **Tabla 24** se muestra el análisis de covarianza para los parámetros de textura y color de los quesos con formato de 200 g (Mini200) elaborados por la empresa. Como podemos observar, el método de corte (MC) resulta no significativo para los parámetros de textura y color, indicando que los métodos de corte alternativos al de tiempo fijo empleado por la empresa producirían quesos con características sensoriales similares al método de tiempo fijo.

Por otro lado, también se observan efectos significativos del pH del queso sobre los parámetros sensoriales de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $h$ . Esto también se comprueba al observar la **Tabla 25** de correlaciones donde el pH mantiene una correlación significativa directa con  $L^*$  y  $h$ , mientras que con  $a^*$  mantiene una relación significativa inversa. La relación directa con  $L^*$  y  $h$  se debería a que a medida que el pH disminuye la capacidad de retención de agua de la micela de caseína disminuye y, como ya se ha discutido anteriormente, el valor de  $L^*$  varía en forma directa a la cantidad de agua presente en la micela.

## Conclusiones por objetivos específicos

**Tabla 24.** Análisis de covarianza de parámetros de textura y color, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel industrial.

| VDTC                 | Factor         |                    | Cofactores         |                    |                    |                    |                    |
|----------------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                      | Modelo         |                    | MC                 | Hq                 | Gq                 | Pq                 | pHq                |
|                      | R <sup>2</sup> | F                  | (GL=2)<br>F        | (GL=1)<br>F        | (GL=1)<br>F        | (GL=1)<br>F        | (GL=1)<br>F        |
| <b>L*</b>            | 0,36           | 1,56 <sup>ns</sup> | 2,01 <sup>ns</sup> | 1,95 <sup>ns</sup> | 1,16 <sup>ns</sup> | 1,62 <sup>ns</sup> | 6,77*              |
| <b>a*</b>            | 0,61           | 4,52*              | 2,28 <sup>ns</sup> | 1,07 <sup>ns</sup> | 2,28 <sup>ns</sup> | 0,00 <sup>ns</sup> | 9,97**             |
| <b>b*</b>            | 0,28           | 1,08 <sup>ns</sup> | 1,43 <sup>ns</sup> | 1,33 <sup>ns</sup> | 0,60 <sup>ns</sup> | 0,07 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup> |
| <b>C*</b>            | 0,28           | 1,09 <sup>ns</sup> | 1,44 <sup>ns</sup> | 1,33 <sup>ns</sup> | 0,61 <sup>ns</sup> | 0,07 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup> |
| <b>h</b>             | 0,63           | 4,81**             | 2,22 <sup>ns</sup> | 0,94 <sup>ns</sup> | 2,50 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup> | 10,81**            |
| <b>σ<sub>f</sub></b> | 0,22           | 0,74 <sup>ns</sup> | 0,65 <sup>ns</sup> | 0,59 <sup>ns</sup> | 0,26 <sup>ns</sup> | 0,61 <sup>ns</sup> | 3,48 <sup>ns</sup> |
| <b>ε<sub>f</sub></b> | 0,21           | 0,70 <sup>ns</sup> | 0,05 <sup>ns</sup> | 0,01 <sup>ns</sup> | 0,94 <sup>ns</sup> | 0,58 <sup>ns</sup> | 0,87 <sup>ns</sup> |

Número de observaciones, N = 36; VDTC, variables dependientes; MC, método de corte; Hq, porcentaje de humedad en queso; Gq, porcentaje de grasa en queso; Pq, porcentaje de proteína en queso; R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación; F, F-estadístico; GL, grado de libertad; \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; <sup>ns</sup>, no significativo. Las VDTC están explicadas en el texto.

Por otro lado, la relación inversa con a\* se debería probablemente al crecimiento de flora láctica. Estos comportamientos fueron también observados por Dantas et al. (2016) al medir el color en quesos frescos probióticos a diferentes pHs y por Vargas y Arenas (2017) al evaluar el efecto del proceso de acidificación sobre el color de queso Cottage.

**Tabla 25.** Análisis de correlaciones entre las variables de composición y las de textura y color del queso.

| VDTC                 | Hq                   | Gq                   | Pq                   | pHq                  |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>σ<sub>f</sub></b> | 0,001 <sup>ns</sup>  | -0,057 <sup>ns</sup> | -0,020 <sup>ns</sup> | -0,372 <sup>ns</sup> |
| <b>ε<sub>f</sub></b> | 0,197 <sup>ns</sup>  | -0,008 <sup>ns</sup> | -0,160 <sup>ns</sup> | 0,348 <sup>ns</sup>  |
| <b>L*</b>            | 0,208 <sup>ns</sup>  | -0,119 <sup>ns</sup> | -0,182 <sup>ns</sup> | 0,404*               |
| <b>a*</b>            | -0,014 <sup>ns</sup> | -0,333 <sup>ns</sup> | -0,115 <sup>ns</sup> | -0,565**             |
| <b>b*</b>            | -0,082 <sup>ns</sup> | -0,201 <sup>ns</sup> | -0,074 <sup>ns</sup> | -0,001 <sup>ns</sup> |
| <b>C*</b>            | -0,082 <sup>ns</sup> | -0,201 <sup>ns</sup> | -0,074 <sup>ns</sup> | -0,002 <sup>ns</sup> |
| <b>h</b>             | 0,003 <sup>ns</sup>  | 0,342 <sup>ns</sup>  | 0,123 <sup>ns</sup>  | 0,582**              |

\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; <sup>ns</sup>, no significativo. Los significados de los parámetros están explicados en el texto.

### 8.3.6 Comparación de medias de mínimos cuadrados para los parámetros de textura y color

La **Tabla 26** muestra la comparación de medias de los parámetros de textura y color de los quesos, en donde podemos observar que no existen diferencias significativas entre las medias de los parámetros de color y textura, lo que

## Conclusiones por objetivos específicos

significa que los métodos de corte  $G'_{87}$  y  $t_{G'87}$  producen quesos con características similares a los quesos obtenidos con el método de corte a tiempo fijo. Los parámetros  $\sigma_f$  y  $\varepsilon_f$  tuvieron un valor promedio de 21,16 kPa y 0,69 respectivamente. Estos valores están de acuerdo con los reportados por Buffa et al. (2004) quienes obtuvieron 24,49 kPa y 0,68 para  $\sigma_f$  y  $\varepsilon_f$  respectivamente en quesos elaborados con leche de cabra. El valor ligeramente mayor de  $\sigma_f$  en este caso se debería a que estos quesos contenían más msQ (53,04%) comparado con el queso de 200 g (**Tabla 20**). En el mismo sentido, Cunha et al. (2006) obtienen valores de 20,29 kPa y 0,57 para  $\sigma_f$  y  $\varepsilon_f$  respectivamente en queso fresco. Por otro lado, los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  tuvieron valores promedio de 94,91, 0,18 y 10,92 respectivamente, de acuerdo con los valores reportados por Dantas et al. (2016) al elaborar queso fresco con cultivo iniciador, quienes obtienen valores de 95,74, 0,88 y 13,98 para  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  respectivamente. El porcentaje de proteína observado por dichos autores fue más alto (15,39%), comparado con el contenido de los quesos pequeños producidos por la empresa (13,00%), pudiendo aumentar el valor de  $L^*$  (McDermott et al., 2016). El valor de  $b^*$  que se relaciona con el contenido de beta caroteno y grasa, a su vez, puede estar influido por el tipo de alimentación del ganado.

**Tabla 26.** Comparación de medias de mínimos cuadrados de parámetros de textura y color, obtenidos de la coagulación de leche de vaca a nivel industrial.

| <b>VDTC</b>                    | <b>G'87</b>        | <b>t<sub>G'87</sub></b> | <b>t<sub>cutfijo</sub></b> | <b>Media</b> |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|----------------------------|--------------|
| $\sigma_f$ , kPa               | 20,85 <sup>a</sup> | 21,36 <sup>a</sup>      | 21,28 <sup>a</sup>         | 21,16        |
| $\varepsilon_f$ , adimensional | 0,68 <sup>a</sup>  | 0,69 <sup>a</sup>       | 0,69 <sup>a</sup>          | 0,69         |
| <b>L</b> , adimensional        | 95,10 <sup>a</sup> | 94,85 <sup>a</sup>      | 94,77 <sup>a</sup>         | 94,91        |
| <b>a*</b> , adimensional       | 0,14 <sup>a</sup>  | 0,16 <sup>a</sup>       | 0,23 <sup>a</sup>          | 0,18         |
| <b>b*</b> , adimensional       | 10,79 <sup>a</sup> | 10,85 <sup>a</sup>      | 11,13 <sup>a</sup>         | 10,92        |
| <b>C*</b> , adimensional       | 10,79 <sup>a</sup> | 10,85 <sup>a</sup>      | 11,14 <sup>a</sup>         | 10,93        |
| <b>h</b> , °                   | 89,28 <sup>a</sup> | 89,16 <sup>a</sup>      | 88,82 <sup>a</sup>         | 89,09        |

Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ); Número de observaciones,  $N = 36$ . Variables dependientes explicadas en el texto.

Los valores promedio de saturación y tonalidad fueron 10,93 y 89,09° respectivamente. Los quesos tuvieron una coloración ligeramente amarillenta, estando el valor de tonalidad dentro del rango esperable para quesos que es de 40 a 90°, teniendo valores de tonalidad más bajos aquellos que se han dejado madurar por más tiempo, probablemente como consecuencia de la oxidación de

las grasas a aldehídos (Wadhvani y McMahon, 2012).

### **Conclusiones**

Las calidades de predicción de los modelos  $G' = f(R, P)$  y  $t_{G'87} = f(R', P)$  fueron satisfactorias para la temperatura de 38,5 °C.

Los resultados sugieren que se podría mejorar el rendimiento quesero al utilizar los métodos de corte en base a la dureza de la cuajada.

No existieron efectos significativos del método de corte sobre las variables de textura y color de los quesos, lo que indica que los métodos de corte propuestos reproducirían bien los atributos texturales y de color, así como el contenido de humedad de los quesos elaborados por la empresa.

## Capítulo IX. Conclusiones por objetivos específicos

- A. Se logró desarrollar dos modelos matemáticos que reproducen eficientemente el valor del módulo elástico de la cuajada de leche en polvo reconstituida,  $G'$ , en un rango de valores de 10 a 40 Pa, uno a temperatura y proteína variables en un rango de temperatura de 30 a 40 °C y niveles de proteína de 3,4 a 5,1%, obteniendo un SEP = 2,09 Pa, y otro modelo a proteína variable, el cual fue validado a la temperatura de 30 y 40 °C, obteniendo SEPs de 1,44 y 2,81 Pa respectivamente, recomendándose el modelo a proteína variable,  $G' = f(R, P)$ , pues en la industria quesera la variabilidad de temperatura es controlada.
- B. Se obtuvo una muy buena calibración (SEC ~1,44 Pa) y validación (SEP ~1,75 Pa equivalente a ~1 min) del modelo matemático  $G' = f(R, P)$ , coagulando leche de vaca a 30, 31 y 32 °C a nivel de laboratorio, en el rango de valores de 15 a 40 Pa. Si se opera la cuba a 31 °C, la variación de temperatura en su interior no deberá exceder ~0,39 °C para mantener su calidad predictiva.
- C. Se logró desarrollar, implementar, calibrar (SEC ~1,34 Pa) y validar (SEP ~1,67 equivalente a ~1 min) un sistema de adquisición de datos (DAS), el cual permite transformar la señal recibida en valores de módulo elástico  $G'$ , para lo cual se coaguló leche de vaca a 30, 31 y 32 °C a nivel de laboratorio, en el rango de 15 a 40 Pa.
- D. Se logró validar las ecuaciones de predicción de tiempo de corte reológico,  $G' = f(R, P)$  y  $t_{G'32} = f(R', P)$ , realizando coagulaciones de leche de vaca a 32 °C a nivel de planta piloto y cortando la cuajada a un valor estimado de 32 Pa, no encontrando diferencias significativas en cuanto a rendimientos, retenciones y características de textura y color en los quesos elaborados con respecto a los resultados proporcionados cuando se usa el tiempo de corte visual, lo que quiere decir que ambos modelos reproducirían bien el tiempo de corte dado por el maestro quesero.



- E. Se logró validar las ecuaciones de predicción de tiempo de corte reológico,  $G' = f(R, P)$  y  $t_{G'87} = f(R', P)$ , realizando coagulaciones de leche de vaca a 38,5 °C a nivel industrial y cortando la cuajada a un valor estimado de 87 Pa, encontrando incrementos significativos en los rendimientos producidos al cortar a  $G'87$ , pero no en las características de textura y color, sugiriendo una tendencia a la mejora de los rendimientos al utilizar el tiempo de corte reológico, sin afectar el componente sensorial.

## Capítulo X. Referencias bibliográficas

- 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(1), 157-168.
- Abdelgawad, A. R., Rovai, M., Caja, G., Leitner, G., & Castillo, M. (2016). Evaluating coagulation properties of milk from dairy sheep with subclinical intramammary infection using near infrared light scatter. A preliminary study. *Journal of Food Engineering*, 168, 180-190.
- Abdulsalam, G. & Khaleel, S. (2014). Free Space Optical Communications - Theory and Practices. In M. Khatib (Ed.). *Contemporary Issues in Wireless Communications*. (159-212). Palestine: Intech Open Science.
- Ak, M. M., & Gunasekaran, S. (1992). Stress-Strain Curve Analysis of Cheddar Cheese under Uniaxial Compression. *Journal of Food Science*, 57(5), 1078-1081.
- Alecrim, M. M., Palheta, R. A., Teixeira, M. F. S., & Oliveira, I. M. D. A. (2015). Original article Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 151-157.
- Alnemr, T., Helal, A., Hassan, A., & Elsaadany, K. (2016). Utilizing the Functions of Hydrocolloids as Fat Mimetic to Enhance the Properties of Low-fat Domiati Cheese. *Journal of Food Processing & Technology*, 7(11).
- Álvarez, S., Rodríguez, V., Ruiz, M. E., & Fresno, M. (2007). Correlaciones de textura y color instrumental con la composición química de quesos de cabra canarios. *Archivos de Zootecnia*, 56(1), 663-666.
- Anandha, M. (2014). *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods*. New York, USA: Springer Science.
- Anema, S. G. (2008). On heating milk, the dissociation of k -casein from the casein micelles can precede interactions with the denatured whey proteins. *Journal of Dairy Research*, 75, 415–421.
- Anema, S. G., Kim Lee, S., & Klostermeyer, H. (2007). Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of ??-casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 99-106.
- Ansari, S. M., Coletta, A., Skeby, K. K., Sørensen, J., Schiøtt, B., & Palmer, D. S. (2016). Allosteric-Activation Mechanism of Bovine Chymosin Revealed by Bias-Exchange Metadynamics and Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B*, 120, 10453–10462.
- 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(4), 1984-96.
- 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.

- Auldust, M. J., Johnston, K. A., White, N. J., Fitzsimons, W. P., & Boland, M. J. (2018). A comparison of the composition , coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. *Journal of Dairy Research*, *71*, 51-57.
- Bamelis, F. R., & De Baerdemaeker, J. G. (2006). Use of the Foodtexture Puff Device to monitor milk coagulation. *Journal of dairy science*, *89*(1), 29-36.
- Bansal, N., Fox, P., & McSweeney, P. (2007). Aggregation of Rennet-Altered Casein Micelles at Low Temperatures. *J. Agric. Food Chem*, *55*, 3120-3126.
- Bansal, N., Fox, P., & McSweeney, P. (2008). Factors that affect the aggregation of rennet-altered casein micelles at low temperatures. *International Journal of Dairy Technology*, *61*(1), 56-61.
- Bauer, R., Hansen, M., Hansen, S., Ogendal, L., Lomholt, S., Qvist, K., & Horne, D. (1995). The structure of casein aggregates during renneting studied by indirect Fourier transformation and inverse Laplace transformation of static and dynamic light scattering data, respectively. *J. Chem. Phys.*, *103*, 2725–2737.
- Bittante, G. (2011). Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. *Journal of Dairy Science*, *94*(12), 5821-5832.
- Bittante, G., Cipolat-Gotet, C., & Cecchinato, A. (2013). Genetic parameters of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *Journal of Dairy Science*, *96*(12), 7966-7979.
- Bittante, G., Ferragina, A., Cipolat-Gotet, C., & Cecchinato, A. (2014). Comparison between genetic parameters of cheese yield and nutrient recovery or whey loss traits measured from individual model cheese-making methods or predicted from unprocessed bovine milk samples using Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, *97*(10), 6560-6572.
- Bland, J. H., Grandison, A. S., & Fagan, C. C. (2015). The effect of blending Jersey and Holstein-Friesian milk on composition and coagulation properties. *International Journal of Dairy Technology*, *68*(3), 454-457.
- Bobbo, T., Cipolat-Gotet, C., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2016). The nonlinear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation properties, curd firmness modeling, cheese yield, and curd nutrient recovery. *Journal of Dairy Science*, *99*(7), 5104-5119.
- Bohren, C., & Huffman, D. (2004). Absorption and Scattering of Light by Small Particles. Morlenbach, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J., & Cabane, B. (2010). How to squeeze a sponge: Casein micelles under osmotic stress, a SAXS study. *Biophysical Journal*, *99*(11), 3754-3762.
- Bremer, L. (1992). Fractal Aggregates in Relation to Formation and Properties of Particle Gels (PhD Thesis), Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

- Bremer, L. G. B., Bijsterbosch, B. H., Walstra, P., & van Vliet, T. (1993). Formation, properties and fractal structure of particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 46, 117-128.
- Bremer, L. G. B., van Vliet, T., & Walstra, P. (1989). Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 85(10), 3359-3372.
- Brinkhuis, J., & Payens, T. A. (1984). The influence of temperature on the flocculation rate of renneted casein micelles. *Biophysical Chemistry*, 19(1), 75-81.
- Budelli, E., Bernal, M., Lema, P., Fink, M., Negreira, C., Tanter, M., & Gennisson, J. L. (2014). Use of shear wave elastography for monitoring enzymatic milk coagulation. *Journal of Food Engineering*, 136, 73-79.
- Buffa, M., Guamis, B., Pavia, M., & Trujillo, A. J. (2004). Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *International Dairy Journal*, 11, 927-934.
- Bushara, I., Ahamed, M. M. M., Mahmoud, K. E. H., Khair, M. A. M., & Elbushra, O. E. (2014). Assessment of Rural Dairy Products in North Kordofan State , Sudan. *Global Journal of Animal Scientific Research*, 2(1), 1-9.
- Castillo, M. (2001). Cutting time prediction during cheese making by near infrared light backscattering (PhD thesis), University of Murcia, Spain.
- Castillo, M. (2006). Cutting time prediction methods in cheese making. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*, 1-7.
- Castillo, M., González, R., Payne, F. A., Laencina, J., & López, M. B. (2005). Optical monitoring of milk coagulation and inline cutting time prediction in Murcian al Vino cheese. *Applied Engineering in Agriculture*, 21(3), 465-471.
- Castillo, M., Lucey, J. A., & Payne, F. A. (2006). The effect of temperature and inoculum concentration on rheological and light scatter properties of milk coagulated by a combination of bacterial fermentation and chymosin. Cottage cheese-type gels. *International Dairy Journal*, 16(2), 131-146.
- Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., & Lopez, 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(8), 551-562.
- Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., Laencina, J. S., & López, M.B. (2003a). Modelling casein aggregation and curd firming in goats' milk from backscatter of infrared light. *The Journal of dairy research*, 70(3), 335-48.
- 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. *The Journal of dairy research*, 70(2), 205-215.

- Castillo, M., Payne, F. A., Wang, T., & Lucey, J. A. (2006). Effect of temperature and inoculum concentration on prediction of both gelation time and cutting time. Cottage cheese-type gels. *International Dairy Journal*, 16(2), 147-152.
- Catarino, I., Martins, A. P. L., Duarte, E., Schwinden, E., Norberta, M., & Pinho, D. (2013). Rennet coagulation of sheep milk processed by ultrafiltration at low concentration factors. *Journal of Food Engineering*, 114(2), 249-254.
- Chen, S., Agboola, S., & Zhao, J. (2003). Use of Australian cardoon extract in the manufacture of ovine milk cheese – a comparison with commercial rennet preparations. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 799-807.
- 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(6), 2612-2623.
- Choi, J., Horne, D. S., & Lucey, J. a. (2011). Determination of molecular weight of a purified fraction of colloidal calcium phosphate derived from the casein micelles of bovine milk. *Journal of dairy science*, 94(7), 3250-61.
- 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.
- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., Pazzola, M., Dettori, M. L., Bittante, G., & Vacca, G. M. (2016). Potential influence of herd and animal factors on the yield of cheese and recovery of components from Sarda sheep milk, as determined by a laboratory bench-top model cheese-making. *International Dairy Journal*, 63, 8-17.
- Claeys, W., Ludikhuyze, L., Van loey, A., & Hendrickx, M. (2001). Inactivation kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase, and denaturation kinetics of  $\beta$ -lactoglobulin in raw milk under isothermal and dynamic temperature conditions. *Journal of Dairy Research*, 68(1), 95-107.
- Corredig, M., & Salvatore, E. (2016). Enzymatic Coagulation of Milk. In P. McSweeney & P. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*. (pp. 287-303). New York, USA: Springer Science+Business Media New York.
- Corredig, M., Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2004). The application of ultrasonic spectroscopy to the study of the gelation of milk components. *Food Research International*, 37(6), 557-565.
- Cunha, C. R., Viotto, W. H., & Viotto, L. A. (2006). Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat «Minas Frescal» cheese manufacture: Effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. *International Dairy Journal*, 16(3), 215-224.
- Dalgleish, D. (1983). Coagulation of renneted bovine casein micelles: Dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 50(3), 331-340.

- Dalgleish, D. (1993). The Enzymatic Coagulation of Milk. In P. Fox (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. (pp. 69-100). London, UK: Springer Science+Business Media Dordrecht
- Dalgleish, D. G. (1980). A mechanism for the chymosin-induced flocculation of casein micelles. *Biophysical Chemistry*, 11(2), 147-155.
- Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles- review and possible improvements. *Soft Matter*, 7(6), 2265-2272.
- 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(1), 449-467.
- Dalgleish, D. G., & Holt, C. (1988). A geometrical model to describe the initial aggregation of partly renneted casein micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 123(1), 80-84.
- Dalgleish, D. G., Brinkhuis, J., & Payens, T. A. J. (1981). The Coagulation of Differently Sized Casein Micelles by Rennet. *European Journal of Biochemistry*, 119(2), 257-261.
- Dantas, A. B., Jesus, V. F., Silva, R., Almada, C. N., Esmerino, E. A., Cappato, L. P., ... Cruz, A. G. (2016). Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 18-30.
- Darling, D., & Van Hooydonk, A. (1981). Derivation of a mathematical model for the mechanism of casein micelle coagulation by rennet. *Journal of Dairy Research*, 48(2), 189-200.
- Dauphas, S., Mouhous-Riou, N., Metro, B., MacKie, A. R., Wilde, P. J., Anton, M., & Riaublanc, A. (2005). The supramolecular organisation of  $\beta$ -casein: Effect on interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 387-393.
- De Kruif, C. (1993) The turbidity of renneted skim milk. *Journal of Colloid and Interface Science*, 156, 38-42.
- De Kruif, C. G. (1992). Casein micelles: diffusivity as a function of renneting time. *Langmuir*, 8(12), 2932-2937.
- De Kruif, C. G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9, 183-188.
- 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., Jeurnink, T., & Zoon, P. (1992). The viscosity of milk during the initial stages of renneting. *Neth. Milk Dairy J.*, 46, 123-137.
- De Vries, R., van Knegsel, A., Johansson, M., Lindmark-Månsson, H., van Hooijdonk, T., Holtenius, K., & Hettinga, K. (2015). Effect of shortening or omitting the dry period of Holstein-Friesian cows on casein composition of milk. *J. Dairy Sci.*, 98, 8678-8687.

- Dejmek, P. (1987). Dynamic rheology of rennet curd. *J. Dairy Sci.*, 70, 1325-1330.
- Douillard, R. (1973). Rheological analysis of curd formation. *J. Texture Studies*, 4, 158-165.
- Dwyer, C., Donnelly, L., & Buckin, V. (2005). Ultrasonic analysis of rennet-induced pre-gelation and gelation processes in milk. *The Journal of dairy research*, 72(3), 303-10.
- Dybowska, B., & Fujio, Y. (1996) Effect of temperature and glucono- $\delta$ -lactone (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. *Milchwissenschaft*, 51, 557–560.
- Eck, A. (1990). El queso. Barcelona, España: Editorial Omega.
- Egger, L., Nicolas, M., & Pellegrino, L. (2016). Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 963-968.
- Esteves, C. L. C., Lucey, J. A., Wang, T., & Pires, E. M. V. (2003). Effect of pH on the Gelation Properties of Skim Milk Gels Made From Plant Coagulants and Chymosin. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2558-2567.
- 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(7), 2575-82.
- Fagan, C. C., Castillo, M., Payne, F. a, O'Donnell, C. P., & O'Callaghan, D. J. (2007). Effect of cutting time, temperature, and calcium on curd moisture, whey fat losses, and curd yield by response surface methodology. *Journal of dairy science*, 90(10), 4499-4512.
- Fagan, C. C., Castillo, M., Payne, F. A., O'Donnell, C. P., Leedy, M., & O'Callaghan, D. J. (2007). Novel online sensor technology for continuous monitoring of milk coagulation and whey separation in cheesemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8836-8844.
- Fagan, C. C., Ferreira, T. G., Payne, F. A., O'Donnell, C. P., O'Callaghan, D. J., & Castillo, M. (2011). Preliminary evaluation of endogenous milk fluorophores as tracer molecules for curd syneresis. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5350-5358.
- Fagan, C. C., Leedy, M., Castillo, M., Payne, F. A., O'Donnell, C. P., & O'Callaghan, D. J. (2007). Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 61-67.
- Ferragina, a, Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, a, & Bittante, G. (2013). The use of Fourier-transform infrared spectroscopy to predict cheese yield and nutrient recovery or whey loss traits from unprocessed bovine milk samples. *Journal of dairy science*, 96(12), 7980-90.
- Foltmann, B. (1959). On the enzymatic and coagulation stages of the renneting process. *Proc. 15th Int. Dairy Congr. (London)* 2, 655–661.

- Foltmann, B. (1971). The biochemistry of prorennin (prochymosin) and rennin (chymosin). In H.A. McKenzie (eds.), *Milk Proteins: Chemistry and Molecular Biology II*. (pp. 217–254). New York, USA: Academic Press.
- Fox, P., & Guinee, T. (2013). Cheese Science and Technology. In Y. Park and G. Haenlein (Eds.), *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. (pp. 357-389). Iowa, USA: John Wiley & Sons, Ltd.
- Fox, P., & McSweeney, P. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., McSweeney, P. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Maryland, USA: Aspen Publishers.
- Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., McSweeney, P. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. New York, USA: Springer Nature.
- Fox, P., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. y O'Mahony, J. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. New York, USA: Springer International Publishing Switzerland.
- Frishammar, J., Söderholm, P., Bäckström, K., Hellsmark, H., & Ylinenpää, H. (2015). The role of pilot and demonstration plants in technological development: synthesis and directions for future research. *Technology Analysis and Strategic Management*, 27(1), 1-18.
- Gaygadzhiev, Z., Massel, V., Alexander, M., & Corredig, M. (2012). Addition of sodium caseinate to skim milk inhibits rennet-induced aggregation of casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 405-411.
- Gernigon, G., Piot, M., Beaucher, E., Jeantet, R., & Schuck, P. (2009). Physicochemical characterization of Mozzarella cheese wheys and stretchwaters in comparison with several other sweet wheys. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5371-5377.
- Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2014). LWT - Food Science and Technology Commercial application of high-pressure processing for increasing starter-free fresh cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 498-505.
- Guinee, T. P., Gorry, C. B., O'Callaghan, D. J., O'Kennedy, B. T., O'Brie, N., & Fenelon, M. A. (1997). The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 50(3), 99-106.
- Guinee, T. P., Mulholland, E. O., Kelly, J., & Callaghan, D. J. O. (2007). Effect of Protein-to-Fat Ratio of Milk on the Composition, Manufacturing Efficiency, and Yield of Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 110-123.
- 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(6), 581-596.
- Gunasekaran, S., Mehmet, A. (2003). *Cheese Rheology and Texture*. Florida, USA: CRC Press.



- Harboe, M. Broe M. and Qvist, K. (2010). The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. In B. Law, A. Tamime (Eds.), *Technology of Cheesemaking*. (pp. 98-129). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Hardy, J., & Fanni, J. (1981). Application of Reflection Photometry to the Measurement of Milk Coagulation. *Journal of Food Science*, 46(6), 1956-1957.
- Hass, R., Munzke, D., Ruiz, S. V., Tippmann, J., & Reich, O. (2015). Optical monitoring of chemical processes in turbid biogenic liquid dispersions by Photon Density Wave spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 407, 2791-2802.
- 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.
- Hill, R. (1970). The effect of the modification of arginine side chains in casein on the coagulation of rennin-altered casein. *Journal of Dairy Research*, 37(2), 187-192.
- Holter, H. (1932). Über die Labwirkung. *Biochem. Zeitschr.* 255, 160-168
- Hori, T. (1985). Objective measurements of the process of curd formation during rennet treatment of milks by the hot wire method. *J. Food Sci.*, 50, 911-917.
- Horne, D. (2014). Casein micelle structure and stability. In H. Singh, M. Boland, & A. Thompson (Eds.), *Milk proteins: From expression to food* (2nd ed., pp. 169–200). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Horne, D. S., & Davidson, C. M. (1993). Direct observation of decrease in size of casein micelles during the initial stages of renneting of skim milk. *International Dairy Journal*, 3(1), 61-71.
- Horne, D. S., & Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 148-153.
- Horne, D., & Banks, J. (2004). Rennet-induced Coagulation of Milk. In P. Fox, P. McSweeney, T. Cogan y T. Guinee (Eds.), *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. (pp. 47-70). London, UK: Elsevier Ltd.
- Huppertz, T. (2013). Chemistry of the Caseins. In P. McSweeney y P. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* (pp. 135-159). New York, USA: Springer Science+Business Media New York.
- Hurley, M. J., O'Driscoll, B. M., Kelly, A. L., & McSweeney, P. L. H. (1999). Novel assay for the determination of residual coagulant activity in cheese. *International Dairy Journal*, 9(8), 553-558.
- Hussain, R., Gaiani, C., & Scher, J. (2012). From high milk protein powders to the rehydrated dispersions in variable ionic environments : A review. *Journal of Food Engineering*, 113(3), 486-503.
- Hyslop, D. (1993). Enzyme-induced coagulation of casein micelles: A number of different kinetic models. *Journal of Dairy Research*, 60(4), 517-533.

- Hyslop, D. (2003). Enzymatic coagulation of milk. In P. Fox y P. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry-I proteins*. (pp. 839-878). New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Hyslop, D., & Qvist, K. (1996). Application of numerical analysis to a number of models for chymosin-induced coagulation of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 63(2), 223-232.
- Iametti, S., Giangiacomo, R., Messina, G., & Bonomi, F. (1993). Influence of processing on the molecular modifications of milk proteins in the course of enzymic coagulation. *Journal of Dairy Research*, 60(2), 151-159.
- Jacob, M., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1).
- Jacques, S. L. (2013). Corrigendum: Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine and Biology*, 58(14), 5007-5008.
- Jamrozik, J., & Schaeffer, L. R. (2012). Test-day somatic cell score, fat-to-protein ratio and milk yield as indicator traits for sub-clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 129(1), 11-19.
- Janhøj, T. & Qvist, K. (2010). The Formation of Cheese Curd. In B. Law y A. Tamime (Eds.), *Technology of Cheesemaking*. (pp. 130-165). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Jaros, D., Seitler, K., & Rohm, H. (2008). Short communication 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.
- Jiménez, J. y Macarulla, J. (1984). *Fisico-Química Fisiológica*. Madrid, España: Ed. Interamericana- Mc Graw-Hill.
- Jimenez-Maroto, L. A., Lopez-Hernandez, A., Borneman, D. L., & Rankin, S. A. (2016). A comparison of fresh, pasta filata , and aged Hispanic cheeses using sensory, chemical, functional, and microbiological assessments. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2680-2693.
- Johnson, M. (2011). Preparation of Cheese Milk. In J. Fuquay, P. Fox y P. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy sciences*. (pp. 544-551). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Karlsson, A. O. Å., Ipsen, R., & Ardo, Y. (2007). Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal*, 17, 1053-1062.
- Karlsson, A. O., Ipsen, R., Schrader, K., & Ardo, Y. (2005). Relationship Between Physical Properties of Casein Micelles and Rheology of Skim Milk Concentrate. *J. Dairy Sci.*, 88, 3784-3797.
- Kethireddipalli, P., & Hill, A. R. (2015). Rennet Coagulation and Cheesemaking Properties of Thermally Processed Milk: Overview and Recent Developments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43), 9389-9403.

- Khosrowshahi, A., Madadlou, A., Ebrahim zadeh Mousavi, M., & Emam-Djomeh, Z. (2006). Monitoring the chemical and textural changes during ripening of Iranian White cheese made with different concentrations of starter. *Journal of dairy science*, 89(9), 3318-25.
- Klandar, A. H., Lagaude, A., & Chevalier-Lucia, D. (2007). Assessment of the rennet coagulation of skim milk: A comparison of methods. *International Dairy Journal*, 17(10), 1151-1160.
- Korish, M., & Abd Elhamid, A. M. (2012). Improving the textural properties of Egyptian kariesh cheese by addition of hydrocolloids. *International Journal of Dairy Technology*, 65(2), 237-242.
- Korolczuk, J. (1988). Refractometric signal evolution during rennet coagulation of milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 42, 313–322.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21(6), 805-815.
- Koutina, G., Knudsen, J. C., & Skibsted, L. H. (2015). The effect of pH on calcium and phosphorus distribution between micellar and serum phase after enrichment of skim milk with calcium D-lactobionate. *Dairy Sci. & Technol.*, 95, 63-74.
- Koutina, G., Knudsen, J. C., Andersen, U., & Skibsted, L. H. (2015). Influence of colloidal calcium phosphate level on the microstructure and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 654-659.
- Kübarssepp, I., Henno, M., Kärt, O., & Tupasela, T. (2005). A comparison of the methods for determination of the rennet coagulation properties of milk. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, 55(4), 145-148.
- Kurultay, S., Öksüz, Ö., & Simsek, O. (2000). The effects of hydrocolloids on some physico-chemical and sensory properties and on the yield of Kashar cheese. *Food / Nahrung*, 44(5), 377-378.
- Lagaude, A., Fernandez, L., Cuq, J. L., & Marchesseau, S. (2004). Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method. *International Dairy Journal*, 14(12), 1033-1039.
- Lagoueyte, N., Lablee, J., Lagaude, A. y Tarodo de la fuente, B. (1994). Temperature affects microstructure of renneted milk gel. *Journal of Food Science*, 59 (5), 956-959.
- Le Feunteun, S., & Mariette, F. (2007). Impact of casein gel microstructure on self-diffusion coefficient of molecular probes measured by <sup>1</sup>H PFG-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10764-10772.
- Leite, B. R., Tribst, A. A., & Cristianini, M. (2015). High pressure homogenization of porcine pepsin protease: Effects on enzyme activity, stability, milk coagulation profile and gel development. *PLoS ONE*, 10(5), 1-17.

- Leite, B. R., Tribst, A. A., & Cristianini, M. (2017). Comparative study among rheological, near-infrared light backscattering and confocal microscopy methodologies in enzymatic milk coagulation: Impact of different enzyme and protein concentrations. *Food Hydrocolloids*, 62, 73-82.
- Létang, C., Piau, M., & Verdier, C. (1999). Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*, 41(2), 121-132.
- Lomholt, S. B., Worning, P., Øgøndal, L., Qvist, K. B., Hyslop, D. B., & Bauer, R. (1998). Kinetics of the renneting reaction followed by measurement of turbidity as a function of wavelength. *Journal of Dairy Research*, 65(4), 545-554.
- Lou, Y., & Ng-Kwai-Hang, K. F. (1992). Effects of protein and fat levels in milk on cheese and whey compositions. *Food Research International*, 25(6), 445-451.
- Lucey, J. (2011). Rennet-Induced Coagulation of Milk. In J. Fuquay, P. Fox y P. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy sciences* (pp. 579-584). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Lucey, J. (2016). Acid Coagulation of Milk. In P. McSweeney y P. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 1B: Proteins: Applied Aspects* (pp. 309-328). New York, USA: Springer Science+Business Media New York.
- Lucey, J. A. (2002). Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281-294.
- Lyndgaard, C. B., Engelsen, S. B., & Berg, F. W. J. Van Den. (2012). Real-time modeling of milk coagulation using in-line near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 345-352.
- Maciel, G., Hammershøj, M., Frederiksen, P. D., Sørensen, J., Bakman, M., Poulsen, N. A., & Larsen, L. B. (2015). Dairy processing and cold storage affect the milk coagulation properties in relation to cheese production. *Dairy Science and Technology*, 95(1), 101-114.
- Madadlou, A., Mousavi, M. E., Khosrowshahi asl, A., Emam-Djome, Z., & Zargaran, M. (2007). Effect of cream homogenization on textural characteristics of low-fat Iranian White cheese. *International Dairy Journal*, 17(5), 547-554.
- Mark, H., & Workman, j. (2003). *Statistics in spectroscopy*. California, USA: Elsevier Academic Press.
- McDermott, A., Visentin, G., McParland, S., Berry, D. P., Fenelon, M. A., & De Marchi, M. (2016). Effectiveness of mid-infrared spectroscopy to predict the color of bovine milk and the relationship between milk color and traditional milk quality traits. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3267-3273.
- McMahon, D. J., & Oommen, B. S. (2008). Supramolecular Structure of the Casein Micelle. *Journal of Dairy Science*, 91(5), 1709-1721.
- McMahon, D., Brown, R., & Ernstrom C A (1984a) Enzymic coagulation of milk casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 67, 745-748.

- McMahon, D., Brown, R., & Ernstrom C. (1984b) Effects of calcium, phosphate, and bulk culture media on milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 67, 930–938.
- McSweeney, P. (2007). Cheese problems solved. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Mellema, M., Heesakkers, J. W. M., Van Opheusden, J. H. J., & Van Vliet, T. (2000). Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry. *Langmuir*, 16(17), 6847-6854.
- 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(1), 25-50.
- Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). (2014). Estadística láctea anual. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/estadistica-industrias-lacteas/estadistica-lactea-anual/default.aspx#para1>
- Mohammadi, V., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Ebrahimi, R., & Abbasvali, M. (2014). Ultrasonic techniques for the milk production industry. Measurement: *Journal of the International Measurement Confederation*, 58, 93-102.
- Møller, K. K., Rattray, F. P., Sørensen, J. C., & Ardö, Y. (2012). Comparison of the hydrolysis of bovine  $\kappa$ -casein by camel and bovine chymosin: A kinetic and specificity study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(21), 5454-5460.
- Müller-Buschbaum, P., Gebhardt, R., Roth, S. V, Metwalli, E., & Doster, W. (2007). Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophysical journal*, 93(3), 960-8.
- Nájera, A. I., De Renobales, M., & Barron, L. J. R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: A multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345-352.
- Nicolau, N., Buffa, M., & O'Callaghan, D. J. (2015). Estimation of clotting and cutting times in sheep cheese manufacture using NIR light backscatter. *Dairy Sci. & Technol.*, 95, 495-507.
- Nicolau, N., Castillo, M., Buffa, M, O'Callaghan, D., & Guamis, B. (2010). Estudio de la coagulación de leche de oveja mediante monitorización con un sensor óptico. Actas del VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Logroño, España. ISBN: 978-84-7359-654-1.
- Nishiura, A., Sasaki, O., Aihara, M., Takeda, H., & Satoh, M. (2015). Genetic analysis of fat-to-protein ratio, milk yield and somatic cell score of Holstein cows in Japan in the first three lactations by using a random regression model. *Animal Science Journal*, 86(12), 961-969.
- O'Callaghan, D. (2011). Gel firmness and its measurement. In: JW. Fuquay, PF. Fox, PLH. McSweeney (Eds). Encyclopedia of Dairy Sciences. vol 1. (pp 585–590). Oxford, UK: Elsevier Ltd.

- O'Callaghan, D. J., O'Donnell, C. P., & Payne, F. A. (1999). Comparison of on-line techniques for determination of curd setting time using cheesemilks under different rates of coagulation. *Journal of Food Engineering*, 41(1), 43-54.
- O'Callaghan, D. J., O'Donnell, C. P., & Payne, F. A. (2000). On-line sensing techniques for coagulum setting in renneted milks. *Journal of Food Engineering*, 43(3), 155-165.
- 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(2), 65-74.
- On-Nom, N., Grandison, a S., & Lewis, M. J. (2010). Measurement of ionic calcium, pH, and soluble divalent cations in milk at high temperature. *Journal of dairy science*, 93(2), 515-23.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2015). OECD-FAO Agricultural Outlook 2015, OECD Publishing, Paris.
- Orlien, V., Boserup, L., & Olsen, K. (2010). Casein micelle dissociation in skim milk during high-pressure treatment: Effects of pressure, pH, and temperature. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 12-18.
- Ozbekova, Z., & Kulmyrzaev, A. (2017). Fluorescence spectroscopy as a non destructive method to predict rheological characteristics of Tilsit cheese. *Journal of Food Engineering*, 210, 42-49.
- Palmer, D. S., Christensen, A. U., Sørensen, J., Celik, L., Qvist, K. B., & Schiøtt, B. (2010). Bovine Chymosin : A Computational Study of Recognition and Binding of Bovine  $\kappa$ -Casein. *Biochemistry*, 49, 2563-2573.
- Paulson, B. M., McMahon, D. J., & Oberg, C. J. (1998). Influence of Sodium Chloride on Appearance, Functionality, and Protein Arrangements in Nonfat Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 81(8), 2053-2064.
- Paura, L., Jonkus, D., & Ruska, D. (2012). Evaluation of the milk fat to protein ratio and fertility traits in Latvian Brown and Holstein dairy cows. *Acta Agriculturae Slovenica*, 100(SUPPL.3), 155-159. Recuperado a partir de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84866852444&partnerID=tZOtx3y1>
- Payens, T. (1976) On the enzyme - triggered clotting of casein; a preliminary account. *Neth. Milk Dairy J.*, 30, 55-9.
- Payens, T. A. J., Wiersma, A. K., & Brinkhuis, J. (1977). On enzymatic clotting processes I. kinetics of enzyme-triggered coagulation reactions. *Biophysical Chemistry*, 6(3), 253-261.
- Payne, F. A., & Castillo, M. (2007). Light Backscatter Sensor Applications in Milk Coagulation. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*, (778057190), 1-5.

- Payne, F., Hicks, C., & Shen, P. (1993). Predicting optimal cutting time of coagulating milk using diffuse reflectance. *J. Dairy Sci.* 76(1),48–61.
- Payne, F., Madangopal, S., Hicks, C. & Shearer, S. (1990). Fiber optic milk coagulation sensor for cut-time detection. Food Processing Automation Conference, American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph. Michigan, Publication 02-90, 173.
- Pearce, L., Smythe, B., & Crawford, R. (2012). Pasteurisation of milk: the heat inactivation kinetics of milk borne pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. *J Dairy Sci*, 95, 20–35.
- 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(1), 101-108.
- Pretto, D., Kaart, T., Vallas, M., Jõudu, I., Henno, M., Ancilotto, L., ... Pärna, E. (2011). Relationships between milk coagulation property traits analyzed with different methodologies. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4336-4346.
- Ramos, C., Salas, V., & Chamorro, E. (2015). Instrumental Evaluation a Cheese Texture Made From Concentrated Whey By Ultrafiltration. *Rev Soc Quim Perú*, 81(3), 273-282.
- Renfu, Lu. (2016). Light Scattering Technology for Food Property, Quality and Safety Assessment. Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group.
- Rogers, N. R., Drake, M. A., Daubert, C. R., McMahon, D. J., Bletsch, T. K., & Foegeding, E. A. (2009). The effect of aging on low-fat, reduced-fat, and full-fat Cheddar cheese texture. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4756-4772.
- Sakkas, L., Moutafi, A., Moschopoulou, E., & Moatsou, G. (2014). Assessment of heat treatment of various types of milk. *Food Chemistry*, 159, 293-301.
- Sandra, S., & Corredig, M. (2013). Rennet induced gelation of reconstituted milk protein concentrates: The role of calcium and soluble proteins during reconstitution. *International Dairy Journal*, 29(2), 68-74.
- Sandra, S., & Dalgleish, D. G. (2007). The effect of ultra high-pressure homogenization ( UHPH ) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skimmed milk. *International Dairy Journal*, 17, 1043-1052.
- Sant'Ana, A. M. S., Bezerril, F. F., Madruga, M. S., Batista, A. S. M., Magnani, M., Souza, E. L., & Queiroga, R. C. R. E. (2013). Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7442-7453.
- Sanz, T., Salvador, A. & Hernández, M. (2017). Creep–Recovery and Oscillatory Rheology of Flour-Based Systems. In J. Ahmed, P. Ptaszek and S. Basu (Eds.), *Advances in Food Rheology and Its Applications*. (pp. 277-295). Duxford, UK: Elsevier Ltd.
- Saputra, D. (1992). Analysis of enzymatic hydrolysis of milk using diffuse reflectance of near infrared radiation (Ph.D. Thesis), University of Kentucky, Kentucky.

- Saputra, D.; Payne, F.A.; Lodder, R.A.; Shearer, S.A. (1992). Selection of near-infrared wavelengths for monitoring milk coagulation using principal component analysis. *Trans. ASAE*, 35, 1597–1605.
- Sbodio, O. y Revelli, G. (2012). Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el “monitoreo” online del proceso. Avances en la Argentina. *Revista de investigación agropecuaria*, 38(3), 236-246.
- Sbodio, O., Tercero, E. J., Coutaz, R., & Martinez, E. (2002). Optimizing Processing Conditions for Milk Coagulation Using the Hot Wire Method and Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 67(3), 1097-1102.
- Schmidt, D. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In P. Fox (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry*, 1, 61–86. London, UK: Appl. Sci. Publ.
- Schmitt, C., Sturm, B., Grupa, U., & Hensel, O. (2016). Analysis of the influence of different factors on the quality of a curd-whey mixture during pumping. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 88-97.
- Schönbach, C., Ranganathan, S., & Brusic, V. (2008). New York, USA: Immunoinformatics. Springer Science+Business Media, LLC.
- Schulz, D., Senge, B., & Krenkel, K. (1997) Beitrag zur Beschreibung des Strukturierungsverhaltens von Milch bei der Labgerinnung. 1. Mess- und Auswerteverfahren. *Milchwissenschaft*, 52, 243–246.
- Scott Blair, G. & Burnett, J. (1958). Physical changes in milk caused by the action of rennet I. *Dairy Res.* ,25, 297-303.
- Scott, R., Robinson, R. & Wilbey, R. (1998). *Cheesemaking Practice*. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, Inc.
- Senge, B., Schulz, D., & Krenkel, K. (1997) Structure formation in milk during rennet coagulation. *Applied Rheology*, 7, 153–160.
- Shah, M. A., & Mir, S. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking : a review. *Dairy Sci. & Technol*, 94, 5-16.
- Sharma, H. S., Bassette, R., Mehta, R. S., & Dayton, A. D. (1980). Yield and Curd Characteristics of Cottage Cheese Made by the Culture and Direct-Acid-Set Methods. *Journal of Food Protection*, 43(6), 441-446.
- Sharma, S. K., & Hill, A. R. (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., Hill, A., Goff, H. & Yada, R. (1989) Measurement of coagulation time and curd firmness of renneted milk using a Nametre viscometer. *Milchwissen- schaft*, 44, 682–685.
- Sinaga, H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2016). Partial renneting of pasteurised bovine milk: Casein micelle size, heat and storage stability. *Food Research International*, 84, 52-60.



- Stockmayer, W.H. (1943). Theory of molecular size distribution and gel formation in branched chain polymers. *J. Chem. Phys.* 11, 45–55.
- 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(4), 549-556.
- Tarango-Hernández, S., Alarcón-Rojo, A. D., Robles-Sánchez, M., Gutiérrez-Méndez, N., & Rodríguez-Figueroa, J. C. (2015). Short communication: Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7635-7639.
- Taterka, H., & Castillo, M. (2015). The effect of whey protein denaturation on light backscatter and particle size of the casein micelle as a function of pH and heat-treatment temperature. *International Dairy Journal*, 1-7.
- Taterka, H., & Castillo, M. (2018). Analysis of the preferential mechanisms of denaturation of whey protein variants as a function of temperature and pH for the development of an optical sensor. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 226-235.
- Temizkan, R., Yasar, K., & Hayaloglu, A. A. (2014). Changes during ripening in chemical composition, proteolysis, volatile composition and texture in Kashar cheese made using raw bovine, ovine or caprine milk. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2643-2649.
- Tornberg, E. (2017). Influence of Fibers and Particle Size Distribution on Food Rheology. In J. Ahmed, P. Ptaszek and S. Basu (Eds.), *Advances in Food Rheology and Its Applications*. (pp. 177-208). Duxford, UK: Elsevier Ltd.
- 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*, 94(12), 5770-5775.
- Troch, T., Lefébure, É., Baeten, V., & Colinet, F. (2017). Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 21, 1-12.
- Tunick, M. (2014). *The Science of Cheese*. New York, USA: Oxford University Press.
- Tuszynski, W.B. (1971). A kinetic model of the clotting of casein by rennet. *J. Dairy Res.*, 38, 113-125.
- Tyagi, A., Kumar, A., Kumar, A., Chandola, A., Grover, S., & Kumar, V. (2016). LWT - Food Science and Technology Functional expression of recombinant goat chymosin in *Pichia pastoris* bioreactor cultures: A commercially viable alternate. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 217-224.
- Udabage, P., McKinnon, I., & Augustin M. (2003). The use of sedimentation field-flow fractionation and photon correlation spectroscopy in the characterization of casein micelles. *J. Dairy Res.*, 70, 453–59

- Van Hooydonk A. & Van Den Berg G. (1988). 'Control and determination of the curd-setting during cheesemaking'. Brussels: International Dairy Federation. (IDF B-DOC 225).
- Van Vliet, T. (2014). *Rheology and Fracture Mechanics of Foods*. Boca raton, USA: Taylor & Francis Group
- Vanderheiden, G. (1976). An apparatus for continuously monitoring the structural rigidity of a gel. *CSIRO Food Res Quart*, 36, 45–47
- Vargas-uscategui, R., & Arenas-clavijo, A. (2017). The acidification process effect on the Cottage cheese color. *Agron. Mesoam*, 28(3), 677-690.
- 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(5), 1548-1555.
- Vasbinder, A. J., Van Mil, P. J. J. M., Bot, A., & De Kruif, K. G. (2001). Acid-induced gelation of heat-treated milk studied by diffusing wave spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 245-250.
- Verruck, S., Schwinden, E., Maria, C., Müller, O., Fritzen-freire, C. B., Dias, R., & Castanho, D. M. (2015). Influence of Bifidobacterium Bb-12 on the physicochemical and rheological properties of buffalo Minas Frescal cheese during cold storage. *Journal of Food Engineering*, 151, 34-42.
- Wadhvani, R., & McMahon, D. J. (2012). Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2336-2346.
- Walstra, P. (2003). *Physical Chemistry of Foods*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Walstra, P., Bloomfield, V. A., Jason Wei, G., & Jenness, R. (1981). Effect of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 669(2), 258-259.
- Walstra, P., Wouters, J. y Geurts, T. (2006). *Dairy Science and Technology*. Boca raton, USA: Taylor & Francis Group
- Wang, W., Zhang, L., Li, Y., & Feng, Z. (2012). Heat-induced protein aggregates and difference in the textural properties of whole milk gel. *Journal of Food Quality*, 35, 247-254.
- Ward, A., Nielsen, A. L., & Møller, H. (2011). Rapid assessment of mineral concentration in meadow grasses by near infrared reflectance spectroscopy. *Sensors*, 11(5), 4830-4839.
- Waugana, A., Singh, H., & Bennett, 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.
- Westhoff, D. C. (1978). Heating Milk for Microbial Destruction: A Historical Outline and Update. *Journal of Food Protection*, 41(2), 122-130.
- Yguerabide, J., & Yguerabide E. (1998). Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications. *Analytical biochemistry*, 262, 137-156.

## Referencias bibliográficas

---

- Zambrano, G., Eraso, Y., Solarte, C., & Rosero, C. (2010). Kappa casein genotypes and curd yield in Holstein cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23, 422-428.
- Zhong, Q., & Daubert, C. R. (2004). Kinetics of rennet casein gelation at different cooling rates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 279(1), 88-94.
- Zoon, P., van Vliet, T. & Walstra, P. (1988). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 2. Effect of temperature. *Netherlands Milk Dairy J.*, 42, 271–294.