UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología

PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE CORTE EN LA ELABORACIÓN DE QUESO MEDIANTE DISPERSIÓN DE RADIACIÓN DE INFRARROJO PRÓXIMO

Memoria presentada por Manuel Castillo Zambudio para optar al grado de doctor

Murcia, Noviembre de 2001

UNIVERSIDAD DE MURCIA
Departamento de Tecnología
de Alimentos, Nutrición y Bromatología

JOSÉ LAENCINA SÁNCHEZ, catedrático y MARIA BELÉN LÓPEZ MORALES, profesora titular, del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, y FREDERICK ALAN PAYNE, catedrático del Departamento de Biosistemas e Ingeniería Agrícola de la Universidad de Kentucky (EEUU)

INFORMAN:

Que **D. MANUEL CASTILLO ZAMBUDIO**, Lcdo. en Ciencia y Tecnología de Alimentos y Lcdo. en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento la Tesis Doctoral titulada: **"Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo"** y consideramos que reúne las condiciones necesarias para su defensa por parte del interesado para optar al Grado de Doctor.

Para que así conste y a los efectos oportunos, lo firmamos autorizando su presentación en Murcia, Octubre de 2001.

Frederick Alan Payne, Ph.D

Dr. José Laencina Sánchez

Dr. María Belén López Morales

UNIVERSIDAD DE MURCIA
Departamento de Tecnología
de Alimentos, Nutrición y Bromatología

JOSÉ LAENCINA SÁNCHEZ, DIRECTOR EN FUNCIONES DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

INFORMA:

Que en Junta de Departamento, se acordó por unanimidad la tramitación de la Tesis Doctoral titulada **"Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo"**, presentada por el Lcdo. en Ciencia y Tecnología de Alimentos y Lcdo. en Veterinaria, D. MANUEL CASTILLO ZAMBUDIO.

Lo que hace constar a los efectos oportunos en Murcia, Noviembre de 2001.

ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO DEL GRUPO ÁREAS DE CIENCIAS DE LA SALUD

No hay nada, a mi juicio, que contribuya a
la grandeza de un país, como su
participación en la expansión de las
fronteras del conocimiento humano, ni
nada que produzca más intensa
satisfacción que la actividad creadora,
por modesta que ella sea.

Severo Ochoa
Murcia, 14 de Mayo de 1990

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

Al Director del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Don José Laencina Sánchez, por su confianza, ánimo, accesibilidad y apoyo constante.

A mis Directores de Tesis: Dra. María Belén López Morales, Dr. José Laencina Sánchez y Dr. Frederick Alan Payne, por su enriquecedora contribución científica al desarrollo de este trabajo, por su disponibilidad de tiempo y por sus continuas y valiosas orientaciones. Y de forma especial a la Dra. María Belén López Morales.

Por su apoyo diario, por su cariño, por sus dosis de moral durante mis estancias fuera y por tantas otras cosas, a todos mis compañeros y amigos del Area de Tecnología de Alimentos: Pepe, Belén, María Dolores, Jose María, Sancho, Mariola, María José, Queru, Antonio Barceló, Dani, Fani, Amarilis, Pilar, Jose María Cayuela, Pilar Acero, Rocío, Belén, Mariano, Teresa, Antonio Vicente y muy especialmente a Mavi y a Charo. A todos y cada uno de ellos mi afectuoso reconocimiento por su contribución a estos 7 inolvidables años de trabajo.

A Antonio Godoy por su colaboración. A Quesos la Algodonera, Quesos Ameco y Central Quesera de Jumilla, por su colaboración. A Caglio Star por las muestras de Cuajo.

A la Universidad Murcia, por la Beca de Formación de Personal Investigador y Docente, y a las entidades financiadoras de los proyectos: Séneca, PB/19/FS/99; AIR2 CT93-1338; CICYT, ALI96-1124-CO2-02; porque han hecho posible la realización de mi Tesis.

To my colleagues and friends from the Department of Biosystems and Agricultural Engineering, University of Kentucky, especially to:

Dr. Frederick A. Payne for his advice, interest and encouragement.

The Department of Agricultural Engineering and its chairs, Dr. Linus R. Walton and Dr. Larry W. Turner for their financial support and confidence.

To all the faculty, staff and personnel, and to my lab friends KC, Kelly, Matt, Grace, DeKui, Ken, and Kzar, for their help and encouragement.

To the people who made our stays in the land of Blue Grass and horses unforgettable, above all to: Fred and Pat, Martín and Virginia, KC and Juen Ping, Tom and Shara and Eric and Destiny.

A mi hermano Luis y a mis padres Pepe y Maribel porque a ellos se lo debo todo. A mis abuelos, tíos y primos por estar ahí. A mis suegros y cuñados, por adoptarme. A Aran y Tere. A mis amigos de siempre, en especial a Nieves.

A ***Inma***, por su gran calidad humana, por *t*oda su paciencia, por *q*uererme tanto y por *m*ucho más.

Esta Tesis Doctoral
está dedicada con gran cariño,

a mi esposa Inma,
y a mi familia.

RESUMEN

La industria quesera demanda el desarrollo de instrumentos de medida en línea, sencillos, sanitarios y no destructivos, que permitan la monitorización del proceso de coagulación de la leche y la predicción de parámetros de control tales como tiempo de coagulación y, en especial, tiempo de corte. La determinación objetiva del tiempo de corte mejora el rendimiento quesero y la homogeneidad del producto.

El objetivo general del presente trabajo ha sido el estudio de un sensor de fibra óptica que determina dispersión de radiación en el infrarrojo próximo, como método de monitorización de la coagulación y selección objetiva del tiempo de corte. A tal fin, se realizan tres experiencias mediante el empleo de sendos diseños de bloque completamente aleatorios, con tres réplicas cada uno. En cada una de estas experiencias se seleccionan diferentes factores y niveles experimentales para estudiar su influencia sobre la coagulación y, especialmente, sobre los algoritmos de predicción del tiempo de corte.

Se demuestra que el empleo de dicho sensor óptico: a) permite el seguimiento a tiempo real de la coagulación de la leche de cabra; b) determina precisa y eficazmente tanto el tiempo de coagulación de Berridge como el tiempo de corte y c) cuando la concentración de proteína varía significativamente, requiere la inclusión de un término proteico en los algoritmos de predicción.

De forma paralela, también se demuestra: a) que el sensor es útil para el estudio de los factores de la coagulación; b) el efecto no lineal de la temperatura sobre la velocidad de coagulación; c) que la energía de activación de hidrólisis de la caseína aumenta con la concentración proteica; d) que el efecto del cloruro cálcico es especialmente importante sobre la fase secundaria de la coagulación e independiente del pH; e) la existencia de interacciones entre distintas variables; f) que la agregación se inicia entre el período de inducción y punto de inflexión de la curva de reflectancia/tiempo; g) que el parámetro óptico T_{max} estima el punto de gelificación con anterioridad al tiempo de coagulación de Berridge, respondiendo como éste a la ecuación de Foltmann, lo que lo convierte en una herramienta potencialmente útil para el estudio de las enzimas coagulantes y h) que el cuajo de cabrito presenta mayor adaptabilidad tecnológica en leche de cabra que el enzima procedente de *M. miehei*.

Por último se demuestra que el valor de la reflectancia difusa tras T_{max} responde tanto a los procesos de agregación micelar como a las reacciones de endurecimiento del gel; fases que coexisten, constituyendo la etapa no enzimática de la coagulación.

Por tanto, la dispersión de la radiación de infrarrojo cercano durante la coagulación contiene información sobre todos los procesos involucrados en la misma, esto es: hidrólisis, agregación y endurecimiento, que justifica su gran utilidad como herramienta de predicción de los tiempos de coagulación y de corte y, por consiguiente, de control de proceso.

SUMMARY

The cheese industry demands the development of simple, sanitary and non-destructive measuring instruments in the line in order to monitor the process of coagulation in the milk and predict control parameters such as clotting time and, above all, cutting time. The objective determination of cutting time improves the cheese yield and the homogeneity of the product.

The general objective of this study is to analyse the use of a fibre-optic sensor to determine light scattering of near infrared radiation in order to monitor milk coagulation and objectively select the cutting time. To this end, three experiments were carried out using completely randomised block designs. Each experiment was replicated three times. In each of them different experimental factors and levels were selected with the aim of providing information concerning the influence of the different factors on clotting and, especially, on the algorithms for predicting cutting time.

It was shown that the use of such a sensor allows real-time monitoring of the coagulation of goat's milk, that the instrument is able to predict precisely and efficiently both the Berridge clotting time and the cutting time, and that it is necessary to include in the prediction algorithms a protein term when the protein concentration varies significantly.

At the same time it was also shown that the sensor is very useful for studying the factors of clotting, that temperature has a non-linear effect on coagulation rate, that the activation energy of casein hydrolysis process is increased with protein concentration, and that the effect of calcium chloride is especially strong during the secondary phase of coagulation, independently of pH. It was seen that there are interactions between various variables, that aggregation commences between the induction period and the inflection point of the reflectance/time curve, and that the optical parameter T_{max} estimates the gelling point before the Berridge clotting time, both responding in the same way to Foltmann's equation. This converts the last parameter into a potentially useful tool for studying coagulating enzymes. Additionally, it was shown that goat rennet presents greater technological adaptability to goat's milk than the enzyme which comes from *M. miehei*.

Finally, it was shown that the diffuse reflectance ratio after T_{max} responds both to micelle aggregation processes and to curd firming reactions. These phases co-exist, constituting the non-enzymatic phase of milk coagulation.

Therefore, the light scattering of near infrared radiation during coagulation of milk contains information concerning all the reactions involved in the process, i.e., hydrolysis, aggregation and hardening. This explains its high degree of usefulness for predicting clotting and cutting time, making it a potential tool for process control.

Resumen…….... I

Summary….……..…… II

Índice general……... III

Índice de tablas……..... IX

Índice de figuras……..…. XIII

Abreviaturas……. XVI

I. INTRODUCCIÓN…….……... 1

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA……. 11

II.1. LA LECHE Y LA ELABORACIÓN DE QUESO……...…..…….. 13

II.1.1. La leche……..….. 13

II.1.2. La elaboración de queso y sus etapas……... 18

II.2. LA COAGULACIÓN DE LA LECHE.….…….….……. 21

II.2.1. Estabilidad coloidal de la leche.…….….... 21

II.2.1.1. *Estabilización electrostática: capa eléctrica doble y teoría DLVO*…….…. 26

II. 2.1.2. *Estabilización estérica*…….……... 30

II. 2.1.3. *Interacciones hidrofóbicas*……..…… 31

II.2.2. Propiedades e interacciones de las caseínas..……... 31

II.2.3. Estructura de las micelas de caseína……..... 35

II.2.4. Desestabilización micelar……..…. 45

II.2.5. Gelificación…….… 51

II.2.6. Coagulación enzimática……..... 59

II.3. CORTE Y DESUERADO DE LA CUAJADA…….…..... 70

II.4. MÉTODOS NO ÓPTICOS DE PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE CORTE…….……... 75

II.4.1. Métodos reológicos……. 77

II.4.2. Métodos térmicos…… 82

II.4.3. Métodos de ultrasonidos……..….. 84

II.5. MÉTODOS ÓPTICOS DE PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE CORTE...……...…….. 87

II.5.1. Principios generales……... 87

II.5.2. Propiedades ópticas de la leche……. 98

II.5.3. Dispersión de radiación de infrarrojo próximo……..……. 100

II.5.4. Métodos ópticos de seguimiento de la coagulación y de predicción del tiempo de corte……..... 107

III. OBJETIVOS……..… 115

IV. PLAN DE TRABAJO Y DISEÑO EXPERIMENTAL…...……... 121

V. MATERIAL Y MÉTODOS……..….. 129

V.1. ANÁLISIS FISICO-QUÍMICO DE LECHE DE CABRA……..… 134

V.1.1. Determinación de componentes mayoritarios……..… 134

V.1.2. Determinación del pH de la leche……..… 134

V.1.3. Determinación de calcio iónico libre……. 135

V.2. TRATAMIENTOS PREVIOS DE LA LECHE……... 135

V.2.1. Desnatado…… 135

V.2.2. Ajuste de la concentración de calcio……. 136

V.2.3. Ajuste de la concentración de proteína…… 136

V.2.4. Ajuste de pH……..... 137

V.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN DE BERRIDGE……... 138

V.4. AJUSTE DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN.. ……...… 139

V.5. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE CORTE……..…. 140

V.6. MONITORIZACIÓN DE LA COAGULACIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN DE RADIACIÓN INFRARROJA…… 141

V.6.1. Equipo de medición…….……..……. 143

V.6.2. Calibración del sensor……..... 145

V.6.3. Obtención del perfil de reflectancia…….. 146

V.6.4. Parámetros de reflectancia difusa….…… 146

V.6.5. Control de errores aleatorios y sistemáticos por dilución.. 148

V.6.5.1. *Error por adición de la disolución de enzima*……. 148

V.6.5.2. *Error por adición de cloruro cálcico*……... 149

V.6.5.3. *Error por ajuste de pH*……. 149

V.6.5.4. *Error por extracción de muestras*…….... 149

V.7. MODELOS CINÉTICOS DE DESCRIPCIÓN DEL INCREMENTO EN REFLECTANCIA DIFUSA……... 150

V.7.1. Ajuste preliminar a modelos cinéticos de primero y/o segundo orden……..……. 150

V.7.2. Modelo matemático de descripción simultánea de agregación y endurecimiento……... 151

V.7.3. Obtención de las constantes cinéticas de agregación y endurecimiento……..…….. 153

V.7.4. Modelo matemático de agregación……..….. 154

V.7.5. Modelo matemático de endurecimiento……..…..…… 157

V.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO…….…….. 158

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…….…….. 161

VI.1. CLASIFICACIÓN DE VARIABLES DE REFLECTANCIA DIFUSA…….….. 163

VI.1.1. Variables de tiempo……...……... 164

VI.1.2. Variables de respuesta…….……. 165

VI.1.3. Variables mixtas….……...……..... 165

VI.2. FACTORES QUE AFECTAN AL PERFIL DE REFLECTANCIA DIFUSA……..…. 165

VI.2.1. Efecto de la composición de la leche sobre los valores de reflectancia…….……..…….. 165

VI.2.2. Efecto de los factores de la coagulación en los parámetros de tiempo y mixtos……...…. 166

VI.2.2.1. *Efecto del tipo de enzima*……...……..... 167

VI.2.2.2. *Efecto de la concentración de enzima*……..... 170

VI.2.2.3. *Efecto del pH*……...…….…….. 175

VI.2.2.4. *Efecto de la concentración de cloruro cálcico*……... 179

VI.2.2.5. *Efecto de la temperatura*….……...….……... 184

VI.2.2.6. *Efecto de la concentración de sustrato*……... 192

VI.2.3. Efecto de los factores de la coagulación en los parámetros de respuesta…...…….…..…. 199

VI.2.3.1. *Efecto del tipo de enzima*……...……. 199

VI.2.3.2. *Efecto de la concentración de enzima*……..... 200

VI.2.3.3. *Efecto del pH*……...……... 203

VI.2.3.4. *Efecto de la concentración de cloruro cálcico* …….. 206

VI.2.3.5. *Efecto de la temperatura*….……..…..……... 207

VI.2.3.6. *Efecto de la concentración de sustrato*……... 212

VI.3. PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN DE BERRIDGE……..……. 213

VI.4. PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE CORTE…….…..…..... 224

VI.4.1. Algoritmos de predicción del tiempo de corte a concentración constante de proteína……..……. 224

VI.4.2. Algoritmos de predicción del tiempo de corte en función de la concentración de proteína…….. 233

VI.4.3. Comparación entre algoritmos de predicción basados en parámetros de tiempo y de respuesta…….…….. 241

VI.5. CINÉTICA DE AGREGACIÓN Y DE ENDURECIMIENTO… 247

VI.5.1. Extensión de la agregación en el punto de inflexión de la curva de reflectancia difusa..……..... 247

VI.5.2. Desdoblamiento de las fases de agregación y de endurecimiento…….……. 248

VI.5.3. Modelización simultánea de agregación y endurecimiento (Modelo *I*)….…….. 251

VI.5.4. Cinética de agregación (Modelo *II*)……..……... 252

VI.5.5. Cinética de endurecimiento (Modelo *III*)..……. 254

VI.5.6. Validación del Modelo *I*……..…….. 255

VI.5.7. Análisis de la varianza de los parámetros cinéticos de agregación y endurecimiento.……..……..... 257

VI.5.8. Efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de agregación y endurecimiento……... 259

VI.5.8.1. *Efecto sobre* k_1 *y* k_2……...…….. 259

VI.5.8.2. *Efecto sobre* R_∞……...……..….. 260

VI.5.8.3. *Efecto sobre* β_1……..... 265

VI.5.9. Efecto de la concentración de proteína en las constantes cinéticas de agregación y endurecimiento……..…….. 267

VI.5.9.1. *Efecto sobre* k_1 *y* k_2……...…… 267

VI.5.9.2. *Efecto sobre* R_∞……...……..…….. 269

VI.5.9.3. *Efecto sobre* β_1……..…….. 271

VI.5.10. Fases de formación de la cuajada…….. 272

VII. CONCLUSIONES……..... 277

VIII. BIBLIOGRAFÍA…….…... 285

IX. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN…….…... 329

IX. 1. ARTÍCULO 1…….…...……... 331

IX. 2. ARTÍCULO 2…….…...……... 331

IX. 3. ARTÍCULO 3…….…...……... 331

IX. 4. ARTÍCULO 4…….…...……... 331

Resumen..... **I**

Summary..... **II**

General index..... **III**

Index of tables..... **IX**

Index of figures..... **XIII**

Abbreviations..... **XVI**

I. INTRODUCTION..... **1**

II. BACKGROUND..... **11**

II.1. MILK AND CHEESE ELABORATION **13**

II.1.1. Milk **13**

II.1.2. Cheese making stages..... **18**

II.2. MILK COAGULATION **21**

II.2.1. Colloidal stability of milk **21**

II.2.1.1. *Electrostatic stabilisation: electrical double layer and DLVO theory* …..…….…… 26

II. 2.1.2. *Steric stabilisation*….....…….……... 30

II. 2.1.3. *Hydrophobic interactions*……..……..…… 31

II.2.2. Casein properties and its interactions..... **31**

II.2.3. Casein micelle structure..... **35**

II.2.4. Micellar destabilisation..... **45**

II.2.5. Gelation..... **51**

II.2.6. Enzymatic coagulation..... **59**

II.3. CURD CUTTING AND SYNERESIS PROCESS..... **70**

II.4. NON OPTICAL METHODS FOR CUTTING TIME PREDICTION 75

II.4.1. Rheological methods..... 77

II.4.2. Thermal methods..... 82

II.4.3. Ultrasonic methods..... 84

II.5. OPTICAL METHODS FOR CUTTING TIME PREDICTION..... 87

II.5.1. General principles..... 87

II.5.2. Optical properties of milk..... 98

II.5.3. Backscatter of near infrared radiation..... 100

II.5.4. Optical methods for monitoring coagulation and cutting time prediction..... 107

III. OBJECTIVES..... 115

IV. WORK PLANNING AND EXPERIMENTAL DESIGN..... 121

V. MATERIAL AND METHODS..... 129

V.1. PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS OF GOAT MILK..... 134

V.1.1. Mayor components determination..... 134

V.1.2. Milk pH determination..... 134

V.1.3. Free calcium ions determination..... 135

V.2. PREVIOUS TREATMENTS OF MILK..... 135

V.2.1. Skimmed..... 135

V.2.2. Calcium chloride adjustment..... 136

V.2.3. Protein concentration adjustment..... 136

V.2.4. pH adjustment 137

V.3. BERRIDGE CLOTTING TIME DETERMINATION..... 138

V.4. CLOTTING TIME ADJUSTMENT 139

V.5. CUTTING TIME DETERMINATION..... 140

V.6. MONITORING OF MILK COAGULATION BY BACKSCATTER OF NEAR INFRARED RADIATION..... 141

V.6.1. Measurement equipment..... 143

V.6.2. Sensor calibration..... 145

V.6.3. Reflectance profile calculation..... 146

V.6.4. Diffuse reflectance parameters..... 146

V.6.5. Control of randomised and systematic errors..... 148

V.6.5.1. *Error due to addition of enzyme dilution*…..... 148

V.6.5.2. *Error due to addition of calcium chloride*..... 149

V.6.5.3. *Error due to pH adjustment*…..... 149

V.6.5.4. *Error due to milk sampling*..... 149

V.7. KINETIC MODELS TO DESCRIBE THE INCREASE IN DIFFUSE REFLECTANCE..... 150

V.7.1. Preliminary adjustment to first and/or second order kinetic models..... 150

V.7.2. Mathematical model for simultaneous description of aggregation and curd firming..... 151

V.7.3. Aggregation and curd firming kinetic constants determination..... 153

V.7.4. Aggregation mathematical model..... 154

V.7.5. Curd firming mathematical model..... 157

V.8. STATISTICAL ANALYSIS..... 158

VI. RESULTS AND DISCUSSION..... 161

VI.1. CLASSIFICATION OF DIFFUSE REFLECTANCE VARIABLES..... 163

VI.1.1. Time-based variables..... 164

VI.1.2. Response-based variables..... 165

VI.1.3. Mixed-based variables..... 165

VI.2. FACTORS AFFECTING THE DIFFUSE REFLECTANCE PROFILE..... 165

VI.2.1. Effect of milk composition on diffuse reflectance values..... 165

VI.2.2. Effect of milk coagulation factors on time-based and mixed-based parameters..... 166

VI.2.2.1. *Effect of type of enzyme*..... 167

VI.2.2.2. *Effect of enzyme concentration*…..... 170

VI.2.2.3. *Effect of pH*…..... 175

VI.2.2.4. *Effect of calcium chloride concentration*…..... 179

VI.2.2.5. *Effect of temperature*..... 184

VI.2.2.6. *Effect of substrate concentration*…..... 192

VI.2.3. Effect of milk coagulation factors on response-based parameters..... 199

VI.2.3.1. *Effect of type of enzyme*..... 199

VI.2.3.2. *Effect of enzyme concentration*…..... 200

VI.2.3.3. *Effect of pH*…..... 203

VI.2.3.4. *Effect of calcium chloride concentration*…..... 206

VI.2.3.5. *Effect of temperature*..... 207

VI.2.3.6. *Effect of substrate concentration*…..... 212

VI.3. BERRIDGE CLOTTING TIME PREDICTION..... 213

VI.4. CUTTING TIME PREDICTION..... 224

VI.4.1. Algorithms for cutting time prediction at constant protein concentration..... 224

VI.4.2. Algorithms for cutting time prediction as a function of protein concentration 233

VI.4.3. Comparison between time-based and response-based algorithms for cutting time prediction..... 241

VI.5. AGGREGATION AND CURD FIRMING KINETICS..... 247

VI.5.1. Extent of aggregation at the inflection point of the diffuse reflectance profile..... 247

VI.5.2. Splitting of aggregation and curd firming phases..... 248

VI.5.3. Simultaneous model for aggregation and curd firming description (Model *I*)..... 251

VI.5.4. Aggregation kinetics (Model *II*)..... 252

VI.5.5. Curd firming kinetics (Model *III*)..... 254

VI.5.6. Model *I* validation..... 255

VI.5.7. Variance analysis of the aggregation and curd firming kinetic parameters..... 257

VI.5.8. Effect of temperature on the aggregation and curd firming kinetic parameters..... 259

VI.5.8.1. *Effect on* k_1 *and* k_2……..…….. 259

VI.5.8.2. *Effect on* R_∞…….....…...……..….. 260

VI.5.8.3. *Effect on* β_1……....……..... 265

VI.5.9. Effect of protein concentration on the aggregation and curd firming kinetic parameters..... 267

VI.5.9.1. *Effect on* k_1 *and* k_2……...……..…….…. 267

VI.5.9.2. *Effect on* R_∞….....……...……..…….. 269

VI.5.9.3. *Effect on* β_1…….....…….. 271

VI.5.10. Gel assembly phases..... 272

VII. CONCLUSIONS..... 277

VIII. REFERENCES..... 285

IX. APPENDIX : PAPERS..... 329

IX. 1. PAPER 1..... 331

IX. 2. PAPER 2..... 331

IX. 3. PAPER 3..... 331

IX. 4. PAPER 4..... 331

Tabla I.*1*.	Capacidad productiva de la industria quesera en la Región de Murcia……...	**6**
Tabla I.*2*.	Destino de la producción de los Quesos de Murcia: *fresco, curado y al vino*……	**6**
Tabla II.1.1.*1*.	Propiedades fisico-químicas de la leche de cabra y vaca…..…	**14**
Tabla II.1.1.*2*.	Componentes mayoritarios de la leche de cabra y vaca……...	**15**
Tabla II.1.1.*3*.	Composición de la leche de distintas razas de cabra explotadas en diferentes países…….....	**16**
Tabla II.1.1.*4*.	Composición media de las fracciones nitrogenadas en leche de cabra en comparación con la leche de vaca…….....	**17**
Tabla II.5.3.*1*.	Reflexión difusa y penetración de la radiación en los productos lácteos……..	**105**
Tabla IV.*1*.	Tratamientos del experimento *I*……...	**127**
Tabla IV.*2*.	Tratamientos del experimento *II*……...	**128**
Tabla IV.*3*.	Tratamientos del experimento *III*…….	**128**
Tabla V.1.1.*1*.	Composición química de la leche de cabra utilizada……	**134**
Tabla V.2.3.*1*.	Ajuste del contenido proteico en leche de cabra en el experimento *III*…….....	**137**
Tabla V.4.*1*.	Análisis de la varianza para validación del ajuste del tiempo de coagulación de Berridge. Efecto de la concentración de calcio y el tipo de enzima sobre el tiempo de coagulación…...	**140**
Tabla VI.1.*1*.	Clasificación de las variables de reflectancia difusa……..…	**164**
Tabla VI.2.2.1.*1*.	Efecto del tipo de enzima sobre los parámetros de tiempo durante la coagulación de leche de cabra……..…	**168**
Tabla VI.2.2.2.*1*.	Efecto de la concetración de enzima sobre los parámetros de tiempo y mixtos durante la coagulación de leche de cabra.....	**171**
Tabla VI.2.2.3.*1*.	Efecto del pH sobre los parámetros de tiempo y mixtos durante la coagulación de la leche de cabra.....	**176**
Tabla VI.2.2.4.*1*.	Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre los	

parámetros de tiempo durante la coagulación de leche de cabra..... **180**

Tabla VI.2.2.5.*1*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y mixtos durante la coagulación de leche de cabra…….. **185**

Tabla VI.2.2.6.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros de tiempo y mixtos durante la coagulación de leche de cabra.. **193**

Tabla VI.2.3.1.*1*. Efecto del tipo de enzima sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra……..... **200**

Tabla VI.2.3.2.*1*. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra…….. **201**

Tabla VI.2.3.3.*1*. Efecto del pH sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra…….. **203**

Tabla VI.2.3.4.*1*. Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra……..…… **206**

Tabla VI.2.3.5.*1*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra en los experimentos *I* y *III*……..... **208**

Tabla VI.2.3.6.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra..... **212**

Tabla VI.3.*1*. Modelo de regresión lineal para la predicción de T_{clot}..... **215**

Tabla VI.4.1.*1*. Modelo *I* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **224**

Tabla VI.4.1.*2*. Modelo *II* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **225**

Tabla VI.4.1.*3*. Modelo *III* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **226**

Tabla VI.4.1.*4*. Modelo *IV* al *VII* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **229**

Tabla VI.4.1.*5*. Efecto de los factores de la coagulación sobre el parámetro β. **231**

Tabla VI.4.2.*1*. Modelo *VIII* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **236**

Tabla VI.4.2.*2*. Modelo *IX* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **237**

Tabla VI.4.2.*3*. Modelo *X* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **237**

Tabla VI.4.2.*4*. Modelo *XI* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **238**

Tabla VI.4.2.*5*. Modelo *XII* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **238**

Tabla VI.4.2.*6*. Modelo *XIII* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **239**

Tabla VI.4.2.*7*. Modelo *XIV* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}..... **239**

Tabla VI.4.2.*8*. Modelo *XV* de regresión no lineal para la predicción de T_{cut}... **240**

Tabla VI.4.3.*1*. Modelo *XVI* de regresión lineal para la predicción de R_{cut}..... **242**

Tabla VI.4.3.*2*. Modelo *XVII* de regresión lineal para la predicción de R_{cut}.... **243**

Tabla VI.5.4.*1*. Parámetros cinéticos de agregación obtenidos mediante ajuste del modelo *II* a los datos experimentales de reflectancia difusa entre T_{max} y T_{2min}..... **253**

Tabla VI.5.5.*1*. Parámetros cinéticos de endurecimiento obtenidos mediante ajuste del modelo *III* a los datos experimentales de reflectancia difusa tras T_{2min} (curvas tipo *A*) o tras T_{2min2}.(curvas tipo *B*)..... **255**

Tabla VI.5.7.*1*. Análisis de la varianza de los parámetros cinéticos de agregación y endurecimiento estimados mediante reflectancia difusa en leche de cabra (grasa como co-variable)..... **257**

Tabla VI.5.8.1.*1*. Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad y los tiempos de vida media de agregación y endurecimiento estimados mediante reflectancia difusa en leche de cabra..... **259**

Tabla VI.5.8.2.*1*. Efecto de la temperatura sobre el ratio final de reflectancia en leche de cabra..... **260**

Tabla VI.5.8.3.*1*. Efecto de la temperatura sobre β_1 en leche de cabra..... **266**

Tabla VI.5.9.1.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre las constantes de velocidad y los tiempos de vida media de agregación y endurecimiento estimados mediante reflectancia difusa en

leche de cabra..... **267**

Tabla VI.5.9.2.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre el ratio final de reflectancia en leche de cabra..... **269**

Tabla VI.5.9.3.*1*. Efecto de la temperatura sobre β_1 en leche de cabra..... **272**

Figura I.*1*.	Distribución de la cabaña lechera en la Región de Murcia.....	**4**
Figura I.*2*.	Contribución de la cabaña lechera de la Región de Murcia al total nacional por especies.....	**4**
Figura II.2.1.*1*.	La leche observada a diferentes aumentos.....	**21**
Figura II.2.1.1.*1*.	Curvas de energía involucradas en la estabilización electrostática.....	**29**
Figura II.2.3.*1*.	Estructura de la micela de caseína: modelo submicelar.....	**37**
Figura II.2.3.*2*.	Estructura de la micela de caseína: modelo de nanoagregados.....	**40**
Figura II.2.3.*3*.	Estructura de la micela de caseína: modelo submicelar modificado por Walstra.....	**41**
Figura II.2.4.*1*.	Dibujo esquemático de la capa filamentosa.....	**47**
Figura II.2.6.*1*.	Dibujo esquemático de la hidrólisis y el inicio de la agregación.....	**63**
Figura II.2.6.*2*.	Factores de la coagulación de la leche.....	**69**
Figura II.4.1.*1*.	Gráfica estándar obtenida mediante un formógrafo.....	**80**
Figura II.5.1.*1*.	Regiones del espectro electromagnético.....	**87**
Figura II.5.1.*2*.	Onda electromagnética de una sola frecuencia, polarizada en el plano.....	**88**
Figura II.5.1.*3*.	Interacciones de la radiación con la materia.....	**90**
Figura II.5.1.*4*.	Reflexión y refracción de la radiación electromagnética.....	**92**
Figura II.5.1.*5*.	Concepto esquemático de la reflexión difusa.....	**94**
Figura II.5.1.*6*.	Medidas de dispersión de la radiación.....	**97**
Figura II.5.3.*1*.	Origen de la señal en el sensor de dispersión de radiación *NIR*.....	**107**
Figura IV.*1*.	Esquema del plan de trabajo.....	**125**
Figura V.*1*.	Diagrama de flujo general de los ensayos.....	**132**
Figura V.*2*.	Técnicas utilizadas.....	**133**
Figura V.6.*1*.	Detalle del sensor de fibra óptica y la cuba de cuajado.....	**142**
Figura V.6.*2*.	Sensor de dispersión de radiación de *NIR*.....	**142**

Figura V.6.1.*1*. Extremo distal del sensor CoAguLite..... **144**
Figura V.6.1.*2*. Equipo de medición de reflectancia difusa..... **145**
Figura V.6.4.*1*. Típico perfil de reflectancia (perfil tipo *A*) y parámetros derivados..... **147**
Figura V.7.2.*1*. Perfil de reflectancia difusa..... **152**
Figura V.7.3.*1*. Aparición de un "hombro" en el perfil de reflectancia tipo *B* **154**
Figura V.7.4.*1*. División del perfil de reflectancia y ajuste a los modelos *II* y *III*..... **156**
Figura VI.2.2.2.*1*. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de tiempo y mixtos..... **171**
Figura VI.2.2.3.*1*. Efecto del pH sobre los parámetros de tiempo y mixtos..... **177**
Figura VI.2.2.4.*1*. Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre los parámetros de tiempo..... **180**
Figura VI.2.2.5.*1*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y mixtos..... **188**
Figura VI.2.2.5.*2*. Efecto no lineal de la temperatura sobre los parámetros de tiempo..... **189**
Figura VI.2.2.5.*3*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y mixtos..... **190**
Figura VI.2.2.5.*4*. Relación tipo Arrhenius entre D_{max} y la inversa de la temperatura absoluta..... **191**
Figura VI.2.2.5.*5*. Efecto de la concentración de sustrato sobre la energía de activación de la hidrólisis de la κ-caseína..... **192**
Figura VI.2.2.6.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros de tiempo y mixtos **196**
Figura VI.2.3.2.*1*. Evolución de R_{cut} en función de la concentración de enzima. **201**
Figura VI.2.3.2.*2*. Efecto de la concentración de enzima en los parámetros de tiempo y de respuesta..... **202**
Figura VI.2.3.3.*1*. Evolución de R_{cut} en función del pH..... **204**

Figura VI.2.3.3.*2*. Efecto del pH sobre los parámetros de tiempo y de respuesta..... **205**

Figura VI.2.3.5.*1*. Efecto lineal de la temperatura sobre el voltaje inicial (V_o)... **209**

Figura VI.2.3.5.*2*. Efecto no lineal de la temperatura sobre los parámetros de respuesta..... **209**

Figura VI.2.3.5.*3*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y de respuesta..... **210**

Figura VI.3.*1*. Recta de regresión de T_{clot} frente a T_{max}..... **216**

Figura VI.3.*2*. Representación gráfica de la diferencia T_{clot}-T_{max}..... **218**

Figura VI.3.*3*. Inicio de la agregación, determinado mediante reflectancia difusa..... **222**

Figura VI.4.1.*1*. Rectas de regresión de T_{cut} frente a T_{max}..... **226**

Figura VI.4.1.*2*. Recta de regresión de t_c frente a t_{drop}..... **228**

Figura VI.4.1.*3*. Efecto de los factores de la coagulación sobre el parámetro β..... **232**

Figura VI.4.2.*1*. Recta de regresión entre la predición de T_{cut} (modelo *XV*) y T_{cut}..... **241**

Figura VI.4.3.*1*. Recta de regresión de R_{cut} frente a R_{max} (modelo *XVI*)..... **242**

Figura VI.4.3.*2*. Predicción del tiempo de corte en base a modelos de tiempo y de respuesta..... **244**

Figura VI.4.3.*3*. Efecto de la concentración proteica sobre la predicción del tiempo de corte..... **246**

Figura VI.5.2.*1*. Efecto de la temperatura y de la proteína: "hombro" en el perfil de reflectancia..... **248**

Figura VI.5.6.*1*. Ajuste de los datos experimentales al modelo *I*..... **256**

a	Radio de una partícula
A	Factor de frecuencia de Arrhenius Constante efectiva de Hamaker Factor colisional Amplitud de una onda electromagnética Absorbancia Concentración de puntos de enlaces de las micelas de caseína que conducen a su agregación a tiempo t_A
A_{30}	Amplitud de la señal del formógrafo a los 30 min
$A_\infty - A_0$	Incremento del ratio de reflectancia debido al proceso de agregación
A_m	Amplitud máxima de la señal del formógrafo
AHS	Modelo de esferas compactas adhesivas
ANOVA	Análisis de la varianza
b	En la ecuación de Foltmann, tiempo de coagulación cuando $[E]\rightarrow\infty$ Longitud del medio o paso óptico
B	Coeficiente de permeabilidad
c	Velocidad de propagación Concentración
C_p	Concentración de proteína
CAE	Código Alimentario Español
CCP	Fosfato cálcico coloidal
CMP	Caseinomacropéptido
cP	Centipoise
d	Distancia
D	Dimensión fractal Coeficiente de difusión Dirección de propagación de una onda electromagnética
D_{max}	Máximo de la primera derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo
D_{2max}	Máximo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo
D_{2min}	Mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo
DLVO	Teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DPBAS	Función $u_{DLVO}(h)$

E	En la ecuación de Storch y Segelcke, actividad enzimática Vector eléctrico de una onda electromagnética
[E]	En la ecuación de Foltmann, concentración de enzima
E_0	Concentración de enzima Amplitud del vector eléctrico de una onda electromagnética
E_a	Energía de activación
EC	*Escherichia coli*
E/L	Relación de volumen entre la disolución de enzima y la leche
ER	Función $u_R(h)$
F	Concentración de puntos de enlace de las micelas de caseína que conduce a endurecimiento del gel a tiempo t_F
$F_\infty - F_0$	Incremento del ratio de reflectancia debido al proceso de endurecimiento
FIR	Infrarrojo lejano
FTIR	Espectrofotometría de infrarrojo medio por Transformada de Fourier
G	Módulo de rigidez
G'	Módulo de almacenamiento o módulo elástico
G''	Módulo de pérdida o módulo viscoso
G*	Módulo complejo de rigidez
G_∞	Valor máximo teórico del módulo de rigidez
GL	Grados de libertad
GLM	Modelo lineal general
h	Distancia entre las superficies de dos partículas
H	Vector magnético de una onda electromagnética
H_0	Hipótesis nula Amplitud del vector magnético de una onda electromagnética
I	Fuerza iónica Intensidad del haz transmitido
I_0	Intensidad del haz incidente
I_R	Intensidad de la radiación reflejada
IDF (FIL)	Federación Internacional de Lechería
IMCU	Unidades internacionales de coagulación de leche

J	Julio
k	Constante de velocidad Constante de Boltzmann Coeficiente de turbicidad Parámetro de Debye-Hückel
k^{-1}	Grosor aproximado de la capa eléctrica doble
k_1	Constante de velocidad del proceso de endurecimiento
k_2	Constante de velocidad del proceso de agregación
k_2^s	Constante de velocidad de agregación lenta
k_f	Constante de velocidad de hidrólisis
K_{20}	Tiempo de coagulación determinado con el formógrafo
K_m	Constante de Michaelis-Menten
l	Distancia hasta la superficie de la partícula
L	Luminosidad
LED	Diodo de emisión de luz
LSM	Media de mínimos cuadrados
M	Concentración molar
M_w	Peso molecular medio
mA	Miliamperio
min	Minuto
MIR	Infrarrojo medio
mM	Concentración milimolar
mV	Milivoltio
n	Exponente de un espectro mecánico en un experimento oscilatorio Número de réplicas Número de partículas por unidad de volumen
n-1	Grados de libertad
n_i	Índice de refracción del medio *i*
N	Número de lotes Número de observaciones
N_m	Número máximo de partículas primarias en una esfera de radio *R*
N_p	Número medio de partículas de un agregado
nabc	Total de observaciones
NIR	Infrarrojo próximo

NLIN	Regresión no lineal
NNPN	Concentración de caseinomacropéptido normalizada
NPN	Concentración de caseinomacropéptido
p	Período
P	Probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico F exceda su valor observado
Pa	Pascal
P_t	"Punto de giro" de la atenuación de ultrasonidos
ppm	Partes por millón
Q_{10}	Coeficiente de temperatura
r	Punto en el que la señal del formógrafo diverge Radio de una partícula Coeficiente de correlación
R	Constante universal de los gases Ratio de reflectancia En modelos cinéticos, ratio de reflectancia a tiempo t'- T_{max} Radio del agregado Resistencia eléctrica
R'	Primera derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo
R''	Segunda derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo
R^2	Coeficiente de determinación
R_0	Resistencia eléctrica inicial
R_{0A}	Ratio de reflectancia a tiempo T_{0A}
R_{0F}	Ratio de reflectancia a tiempo T_{0F}
R_A	Ratio de reflectancia a tiempo (t'-T_{0A})
R_{cut}	Ratio de reflectancia en el tiempo de corte
R_F	Ratio de reflectancia a tiempo (t'-T_{0F})
R_{max}	Ratio de reflectancia a tiempo T_{max}
R_∞	Valor asintótico de reflectancia a tiempo infinito
$R_{\infty A}$	Ratio de reflectancia debido a la agregación a tiempo infinito
$R_{\infty F}$	Ratio de reflectancia debido al endurecimiento a tiempo infinito
RCT	Tiempo de coagulación
$R_\infty - R_{max}$	Incremento total del ratio de reflectancia difusa
s	Segundo
S	Siemens

S	Diferencia entre T_{2min} y T_{2max}. Error estándar de estimación del coeficiente de regresión Turbidez
[*S*]	Concentración de sustrato a tiempo *t*
SC	Suma de cuadrados
SEE	Error estándar de estimación del parámetro
SEP	Error estándar de predicción
SMUF	Ultrafiltrado de leche simulado
t	Tiempo
t'	Tiempo tras la adición de enzima
t*	Tiempo transcurrido tras el tiempo de gelificación
t_A	Tiempo tras T_{max}
t_c	Tiempo de corte visual
t_{drop}	Tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la tangente de la curva de voltaje con respecto al tiempo
t_F	Tiempo tras T_{2min} (curvas tipo *A*) o tras T_{2min2} (curvas tipo *B*)
t_{gel}	Tiempo de gelificación
t_{IP}	Periodo de inducción según Saputra (1992)
T	Temperatura Tiempo requerido tras el punto de gelificación para alcanzar un valor de $G = G_\infty/e$ Transmitancia
T_{0A}	Tiempo tras el que se observa un grado significativo de agregación
T_{0F}	Tiempo tras el que se observa un grado significativo de endurecimiento
T_c	En las ecuaciones de Storch y Segelcke y de Foltmann, tiempo de coagulación
T_{clot}	Tiempo de coagulación de Berridge
T_{cut}	Tiempo de corte
T_{max}	Tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia con respecto al tiempo
T_{2max}	Tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo
T_{2min}	Tiempo desde la adición de enzima hasta el mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo
T_{2min2}	Tiempo desde la adición de enzima hasta el segundo mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo
u_A	Potencial de atracción causado por las fuerzas de van der Waals
u_{DLVO}	Potencial de interacción total (estabilización *DLVO*)

u_R	Potencial de repulsión debido a la capa eléctrica doble
u_S	Potencial de repulsión estérica
u_{Total}	Potencial total de interacción (estabilización *DLVO* y estérica)
v_i	Velocidad de propagación de una radiación en el medio *i*
V_0	Voltaje inicial de la señal de reflectancia difusa
V_A	Energía libre de interacción de van der Waals
V_i	Voltajes sucesivos de la señal de ultrasonidos
V_{max}	Máxima velocidad de hidrólisis enzimática
W	Factor de estabilidad
WA	Función $u_A(h)$
z	valencia química
α	Grado de hidrólisis Atenuación de la señal de ultrasonidos
α_w	Coeficiente de temperatura de la resistencia eléctrica
β	T_{cut} / T_{max}
β_1	En el modelo *I*, incremento de reflectancia difusa debido a la agregación
$\beta_0, \beta_1, \beta_2$ y β_3	Coeficientes de regresión
δ	Angulo de fase
ΔG	Incremento de energía libre de Gibbs
ΔH	Incremento de entalpía
ΔS	Incremento de entropía
Δx	Amplitud de la señal del formógrafo a tiempo *t*
Δx_{max}	Amplitud de la señal del formógrafo a tiempo infinito
ϕ	Altura de la barrera de energía
γ	Deformación tangencial o de cizalla Constante de corrección de la pendiente β_0 en función de la proteína
γ_0	Amplitud de la deformación
Γ	Constante del formógrafo
η	Viscosidad de la fase continua
φ	Fracción de volumen de las partículas primarias del sistema

φ_{ag}	Fracción de volumen media de las partículas de un agregado
λ	Longitud de onda
μ	Viscosidad
μ'	Función de la viscosidad de almacenamiento de energía
μ''	Función de la viscosidad de fricción
μ^*	Módulo complejo de viscosidad
μ^*_∞	Módulo complejo de viscosidad máximo
ν	Frecuencia
θ_1	Ángulo de incidencia
θ_2	Ángulo de refracción
θ_w	Temperatura del hilo caliente
ρ	Factor $\rho = T_{cut}/RCT$ Reflectancia especular
σ	Tensión de cizalla Distancia entre los centros de dos partículas de radio a
σ_0	Amplitud de la tensión de cizalla
τ	Inversa de la constante de velocidad de hidrólisis enzimática Turbicidad
τ_1	Tiempo de vida media de la reacción de endurecimiento del gel
τ_2	Tiempo de vida media de la reacción de agregación
ω	Frecuencia angular
Ω	Ohm
ψ	Potencial electrostático a una distancia l
ψ_o	Potencial electrostático superficial
ζ	Potencial electrocinético o potencial zeta

I. INTRODUCCIÓN

Según el Anuario Estadístico de la Región de Murcia del año 2000, el censo caprino basado fundamentalmente en la explotación de la raza Murciana, ascendió a 146.147 cabezas en 1998, que produjeron un total de 19.788.000 litros de leche, frente a una producción de leche de vaca de 21.121.000 litros, lo que constata la gran importancia del sector caprino en nuestra Comunidad.

Como se observa en la **Figura I.*1***, el ganado caprino en Murcia sólo supone un 13% del total de la cabaña lechera (bovino, ovino y caprino) mayoritariamente constituida por ganado ovino (83%). Sin embargo, mientras que el ganado ovino murciano sólo alcanza a un 2'7% del censo de ovino nacional**,** el ganado caprino de la Región representa un 4'1% **(Figura I.*2*)**.

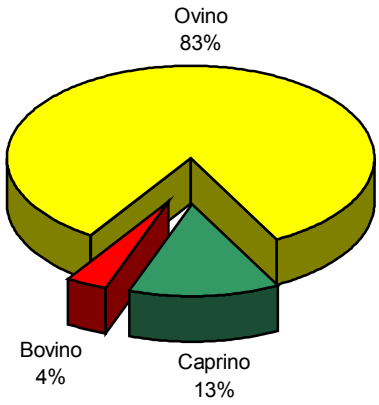

Figura I.*1*. Distribución de la cabaña lechera en la Región de Murcia.
Porcentajes del número total de cabezas. Anuario Estadístico de España (2000).

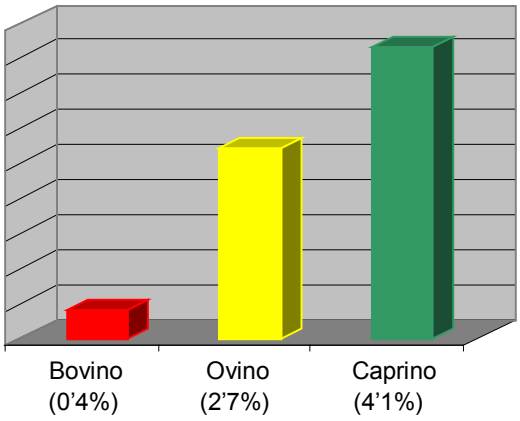

Figura I.*2*. Contribución de la cabaña lechera de la Región de Murcia al total nacional por especies.
Porcentajes del número total de cabezas. Anuario Estadístico de España (2000).

Por Comunidades Autónomas, de un total de 17, Murcia ocupa el decimosexto lugar en cuanto a cabezas de bovino, colocándose en octavo lugar respecto al ovino y en sexto con relación al caprino.

Si consideramos la densidad de ganado caprino (nº de cabezas/km^2), podemos resaltar que la Comunidad Autónoma de Murcia se sitúa en el tercer lugar a nivel nacional, tan sólo superada por las Comunidades andaluza y canaria.

La cabra Murciana destaca por su elevado índice de prolificidad (1'9, en cabras adultas), dado que la práctica totalidad de las cabras adultas tienen 2 o más cabritos por parto. En comparación con cabras centroeuropeas, la raza Murciana muestra mayor fertilidad fuera de la estación sexual, lo que reduce su estacionalidad proporcionando a los queseros cantidades similares de leche durante todo el año. Falagán *et al*. (2000), afirman que la cabaña caprina de Murcia presenta el mejor nivel sanitario de España y que la raza Murciana es la única del mundo que con buen nivel productivo, sólo se ordeña una vez al día.

Por lo que respecta al sector quesero, a principios de los años ochenta existían en Murcia cuatro queserías que tan sólo transformaban en queso el 15% de la producción de leche de cabra, pero gracias al Plan de Fomento de la Industria Quesera Artesana, puesto en marcha en dicha década por la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (hoy Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente), existen en la actualidad 17 queserías (se están construyendo dos nuevas) que transforman el 52% de la leche de cabra producida en la Región **(Tabla I.*1*)**.

El fuerte aumento del número de queserías ha conducido a una elevación de los precios de la leche de cabra y a un aumento considerable de la calidad y variedad de los quesos obtenidos, algunos de los cuales incluso se están exportando de forma estable a los mercados de Estados Unidos, Alemania e Italia **(Tabla I.*2*)**.

Tabla I.*1*. Capacidad productiva de la industria quesera en la Región de Murcia. [1]

Intervalos de producción media (l/día)	Capacidad máxima media de producción (l/día)	Queserías por intervalo de producción
X ≤ 1.000	2.000	2
1.000 < X ≤ 3.000	16.000	8
3.000 < X ≤ 6.000	20.000	4
6.000 < X ≤ 10.000	20.000	2
X > 10.000	30.000	1

[1] Falagán *et al*. (2000).

Tabla I.*2*. Destino de la producción de los Quesos de Murcia: *fresco, curado y al vino*. [1]

Tipo de queso	Destino del consumo (%)		
	Regional	*Nacional*	*Exportación*
Queso de Murcia fresco	60	40	--
Queso de Murcia curado	25	70	5
Queso de Murcia al vino	30	65	5

[1] Falagán *et al*. (2000).

En la orden de 11 de Junio de 1990 (*B.O.R.M*. de 18 de Junio de 1990), se aprueba la reglamentación específica de los quesos de cabra acogidos a la denominación "Productos de Calidad de Murcia", que incluye tres tipos de queso elaborados exclusivamente a partir de leche de cabra Murciana: *fresco, al vino y curado*. Posteriormente, y a fin de redactar el reglamento definitivo que regulará las Denominaciones de Origen, se constituye el Consejo Regulador Provisional de la Denominación de Origen "Quesos de Murcia" que ampara y potencia los Quesos de Murcia Fresco y Curado, y de la Denominación de Origen "Queso de Murcia al vino" (*B.O.R.M*. de 25 de Junio de 1997). Por orden de 11 de Julio de 2001 (*B.O.R.M*. de 21 de Julio de 2001) se aprueba el reglamento definitivo y se constituye el Consejo

Regulador, lo que queda ratificado en el *B.O.E.* (25 de Octubre de 2001). Posteriormente se publica la solicitud de registro de las Denominaciones de Origen en el *D.O.C.E.* (6 de Septiembre de 2001). La importancia cuantitativa del sector caprino en la Comunidad de Murcia, favorecida por las ventajas que reporta la explotación de una raza autóctona como la cabra Murciana de excelentes características productivas, justifica el auge de la industria artesanal quesera, en adelante bajo la protección de las Denominaciones de Origen.

Genéricamente, el queso se define como el producto fresco o maduro obtenido tras la separación del suero después de la coagulación enzimática, ácida o mixta de la leche, con o sin hidrólisis previa de la lactosa. En condiciones normales y para la mayoría de los tipos de elaboración de queso, la separación de la fase sólida (cuajada) y la fase líquida (lactosuero) no es espontánea, siendo necesario el corte del gel, que induce la sinéresis, y la posterior aplicación de tratamientos térmicos y/o mecánicos que faciliten la separación de fases con la obtención del producto (queso) y el subproducto (suero).

El sector quesero requiere el desarrollo de tecnologías de medida en línea que permitan el seguimiento de las fases de producción que condicionan, en mayor medida, la calidad del producto final, contribuyendo así a la mejora del proceso de fabricación y a la normalización del queso obtenido. En este sentido, uno de los parámetros de mayor interés sería la determinación objetiva del tiempo de corte.

Existe un momento óptimo para realizar el corte de la cuajada, en el que las características del gel garantizan un rendimiento quesero y una calidad del producto máximas. Cuando se realiza un corte anticipado, se produce un incremento de “finos” de caseína así como de pérdidas de grasa y proteína en suero por falta de rigidez del coágulo, fenómeno que se acentúa al aplicar cualquier tratamiento mecánico a la cuajada. Por el contrario, la demora en el corte conduce a una mayor retención de suero en el gel como consecuencia de una pérdida de permeabilidad, que provoca alteraciones

durante la fase de maduración debido a un exceso de humedad. Estas razones sugieren la necesidad de un método adecuado de determinación del tiempo óptimo de corte en la fabricación de queso.

Actualmente, en la industria quesera, la selección del tiempo de corte se realiza atendiendo a dos criterios: el corte se efectúa a un tiempo prefijado desde la adición del enzima o se sigue el juicio del operario, basado en una evaluación subjetiva de la cuajada (determinación manual y visual). El corte a un tiempo prefijado es cuestionable por ser numerosos los factores que afectan a la cinética de coagulación y a la dureza de la cuajada y que producen una gran variación en el momento óptimo de corte (Gunasekaran y Ay, 1996). De esta forma, el tiempo de corte prefijado no se ajusta a las características de la materia prima, a los tratamientos previos ni a las condiciones de elaboración, lo que incide de forma negativa en el rendimiento y textura del queso, dificultando así, la obtención de un producto normalizado. La realización del corte en base al juicio subjetivo del maestro quesero puede ser aceptable si la evaluación se realiza correctamente, lo cual depende en gran medida de la experiencia y habilidad del operario responsable (Hori, 1985).

Durante las últimas décadas se han propuesto numerosos equipos basados en la determinación de las propiedades reológicas de leche y cuajada para la monitorización de la coagulación de la leche y/o para la determinación de la dureza óptima de corte (gelógrafo, formógrafo, penetrómetro, viscosímetro, reómetro, texturómetro, Vátimer,…). La mayoría de estos instrumentos someten la cuajada a fuerzas que producen la deformación y ruptura de la misma durante la medida, no siendo, por lo tanto, prácticos para su uso en la línea de producción.

Por este motivo, también han sido propuestos equipos de carácter no destructivo basados en la medida de conductividad térmica, conductividad eléctrica y de ultrasonidos. Por último destacan los métodos ópticos tales como turbidimetría, espectrofotometría, colorimetría, reflectancia difusa, etc., la mayoría de los cuales

quedan reducidos a uso de laboratorio. Los recientes avances en el manejo de la fibra óptica y en el diseño de diminutos circuitos integrados permiten la adaptación, a bajo coste, de la espectrometría de *NIR* (infrarrojo próximo) a la línea de elaboración, mediante el empleo de sensores de reducido tamaño que no dañan la cuajada. La determinación del tiempo óptimo de corte es, si cabe, más importante en las industrias de carácter artesanal, normalmente menos automatizadas, debido a una gran variabilidad composicional entre lotes de leche y a una mayor variación del esquema general de producción (van Hooydonk y van den Berg, 1988). El sector quesero en Murcia está mayoritariamente representado por industrias pequeñas, de carácter familiar y con un reducido nivel de automatización. Recientemente, las empresas del sector han señalado la dificultad de la implantación de métodos objetivos de medida, por el elevado costo, la difícil limpieza y manejo y la facilidad para dañar la cuajada de los sistemas propuestos.

La completa automatización de la producción de queso, requiere el desarrollo de un método de medida en línea efectivo para la predicción del tiempo de corte. La existencia de dicho método permitiría la optimización del proceso de elaboración, mejorando el rendimiento quesero, incrementando la calidad y garantizando una mayor homogeneidad del producto (Payne, 1995; Gunasekaran y Ay, 1996). Por otra parte, la implementación de dicho método redundaría en la mejora de la gestión técnica de las queserías, en aspectos tales como: adaptación del proceso a las características de la materia prima, optimización de la producción con desaparición de tiempos muertos y automatización del proceso. Por el momento no se ha conseguido un sistema completamente eficaz y adecuado para la determinación objetiva del tiempo ideal de corte, si bien es cierto que, algunos métodos entre los que destacan las técnicas térmicas, de ultrasonidos y especialmente las de dispersión de radiación de *NIR*, parecen estar demostrando una utilidad práctica interesante por su carácter no destructivo y su fácil limpieza y manejo, ya que se sirven de sensores específicos que pueden ser instalados en las cubas de cuajado, reduciendo los problemas sanitarios y de mantenimiento.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. LA LECHE Y LA ELABORACIÓN DE QUESO

II.1.1. La leche

El Código Alimentario Español (*CAE*) define la leche natural destinada a consumo humano como "el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño ininterrumpido de las hembras mamíferas, domesticadas, sanas y bien alimentadas" y puntualiza que la denominación genérica de leche sólo hace referencia a la de vaca, debiéndose precisar, en caso contrario, la especie de procedencia. Desde una perspectiva fisico-química, debe ser considerada como un producto de gran complejidad. La leche, líquido blanco, opaco, dos veces más viscoso que el agua, de sabor ligeramente azucarado y de olor poco acentuado, es un sistema complejo

integrado por una disolución acuosa de lactosa, sales y otros muchos elementos, en la que las proteínas séricas se encuentran en disolución coloidal, las micelas de caseína en dispersión coloidal y los glóbulos grasos en estado de emulsión. En la **Tabla II.1.1.*1*** se recogen las características fisico-químicas más relevantes de la leche de cabra comparándolas con las de la leche de vaca.

Tabla II.1.1.*1*. Propiedades fisico-químicas de la leche de cabra y vaca.

Propiedad	Cabra (*Capra hircus*)	Vaca (*Bos taurus*)
Acidez (ºD)	12-18[4]	16-18[1]
Actividad de agua	--	0'993[3]
Calor específico (Kcal kg^{-1} K^{-1})	--	0'93[1, 2]
Conductividad eléctrica a 25ºC (S m^{-1})	0'9[5]	0'5[1, 3]
Conductividad térmica (J m^{-1} s^{-1} K^{-1})	--	0'53[3]
Densidad (kg L^{-1})	1'034[(20ºC): 4]	1'032 [(15ºC): 1, 2]
Fuerza iónica (M)	--	0'08[3]
Índice de refracción 20ºC	--	1'34[1]
pH (20ºC)	6'65[4]	6'50[2,3]
Potencial de oxido-reducción (V)	--	+0'25[2]
Presión osmótica (kPa)	--	700[3]
Punto de congelación (ºC)	-0'58[4]	-0'55[1]
Punto de ebullición (ºC)	--	100'5[2]
Tensión superficial a 20ºC (mN m^{-1})	52[5]	47[7]
Viscosidad (cP)	1'34[(27ºC): 6]	2'10[(20ºC): 2]

[1] Veisseyre (1988), [2] Riel (1991), [3] Walstra y Jenness (1987), [4] Le Mens (1985), [5] Parkash y Jenness (1968), [6] Puri *et al*. (1963), [7] Jenness *et al*. (1974).

La leche contiene multitud de componentes minoritarios entre los que destacan: minerales, enzimas, vitaminas, pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina,…), células diversas (células epiteliales, leucocitos, bacterias, levaduras, mohos), fagos y gases (dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno,…); pero los constituyentes más interesantes

desde un punto de vista tecnológico son, sin duda, los componentes mayoritarios, que se presentan, comparados con los de vaca en la **Tabla II.1.1.*2***. Se muestran datos aproximados ya que la composición química de la leche varía en función de múltiples factores, tales como: período y número de lactación, alimentación, raza, clima, diferencias individuales, etc. (Storry *et al*., 1983; Aleandri *et al*., 1990, Clark, 1993; Tornadijo *et al*., 1998; López *et al*., 1999). Quiles y Hevia (1994) en una revisión monográfica sobre leche de cabra, recogen los factores que influyen sobre la cantidad y la composición de dicha leche.

Tabla II.1.1.*2*. Componentes mayoritarios de la leche de cabra y vaca. [1]

Propiedad	Cabra	Vaca
Extracto seco total	125-145	125-130
Materia grasa	35-50	35-40
Azúcares	40-50	47-52
Caseína	30-32	27-30
Albúmina y globulina	5-7	4-5
Sales	7-9	9-9’5

[1] Veisseyre (1988); g L^{-1}.

La composición de la leche de cabra es mucho más variable que la de vaca, probablemente porque muchos de los datos de la literatura corresponden a un pequeño número de animales y a muestras de leche de composición extrema por las características individuales de los animales o por tratarse de razas muy diferentes (Riel, 1991). En la **Tabla II.1.1.*3*** se proporciona una recopilación de datos de composición química de la leche de diferentes razas de cabra, mientras que en la **Tabla II.1.1.*4*** se resume la composición media de las fracciones nitrogenadas en comparación con las de vaca.

Tabla II.1.1.*3*. Composición de la leche de distintas razas de cabra explotadas en diferentes países.[1]

País	Raza	*S*	*G*	*P*	*L*	*C*	Autor
Alemania	Fawn	12’4	3’9	2’9	4’0	--	Graf *et al*. (1970)
Arabia S.	--	13’0	3’9	4’4	--	0’9	Sawaya *et al*. (1984)
Australia	Saanen	12’2	4’0	3’1	5’0	--	Ranawana y Kellaway (1977)
	Saanen	11’7	3’4	3’2	--	--	Middleton y Fitz-Gerald (1981)
Brasil	--	14’2	4’8	4’0	4’7	0’8	Wolfschoon-Pombo y Masur (1979)
Bulgaria	--	12’9	4’0	3’6	4’4	0’8	Veinoglou *et al*. (1982)
Chile	Anglo-Nubiana	12’9	4’4	3’6	4’1	0’8	Pinto *et al*. (1984)
Egipto	--	--	4’0	3’6	4’5	0’8	El-Zayat *et al*. (1984)
España	Murciano-Granadina	13’7	4’7	3’5	4’7	--	Marques (1977)
	Granadina	12’9	4’5	3’5	--	0’8	Martín-Hernández *et al*. (1988)
	Murciana	15’6	6’1	3’5	--	0’9	Martín-Hernández *et al*. (1988)
	Murciano-Granadina	14’5	5’6	3’6	--	0’9	Juárez *et al*. (1991)
	Murciano-Granadina	--	4’6	3’2	4’4	--	López *et al*. (1995)
	Murciano-Granadina	13’7	6’3	3’3	4’4	--	Castillo *et al*. (1998)
Finlandia	Finesa	12’6	3’9	3’5	4’5	0’8	Uusi-Rauva *et al*. (1970)
Francia	Alpina	11’7	3’1	2’9	--	--	Mahieu *et al*. (1977)
	Saanen	11’7	3’1	2’8	--	--	Mahieu *et al*. (1977)
	Alpina-Saanen	--	3’3	2’9	4’4	--	Grandpierre *et al*. (1988)
Grecia	Indígena	15’1	5’7	3’8	4’9	0’7	Anifantakis y Kandarakis (1980)
	Saanen	11’4	3’2	3’2	4’4	0’8	Anifantakis y Kandarakis (1980)
	--	13’7	4’9	3’7	4’3	0’9	Veinoglou *et al*. (1982)
	Alpina	11’8	3’4	3’4	4’3	0’8	Voutsinas *et al*. (1990)
India	Barbari	--	4’1	3’8	4’8	0’8	Sachdeva *et al*. (1974)
	Jamnapari	--	4’3	3’7	4’7	0’8	Sachdeva *et al*. (1974)
	Barbari	13’4	4’0	5’2	4’5	1’0	Agarwal y Bhattacharya (1980)
	Black Bengal	15’0	5’5	6’4	4’4	0’8	Agarwal y Bhattacharya (1980)
	Jamnapari	13’3	4’7	3’8	4’0	0’8	Qureshi *et al*. (1981)
Irlanda	--	12’3	3’6	3’4	--	0’8	Espie y Mullan (1990)
Italia	--	14’7	5’7	3’8	4’3	0’8	Ghionna *et al*. (1984)
	Alpina-Saanen	11’3	3’1	3’0	4’5	0’8	Mariani *et al*. (1987)
Libia	Maltesa	12’9	4’0	3’8	4’4	0’9	Gnan *et al*. (1985)
Nigeria	Afric.dward	17’9	7’1	4’7	5’6	--	Mba *et al*. (1975)
	Red Sokoto	15’3	4’9	4’4	4’7	--	Mba *et al*. (1975)
	Saanen	12’2	3’4	3’1	4’5	--	Mba *et al*. (1975)
	Afric.dward	18’7	6’9	3’9	6’3	0’8	Akinsoyinu *et al*. (1977)
Noruega	--	11’8	3’5	3’2	4’3	0’8	Arbiza (1986)
Trinidad	British-Alpina	11’5	3’4	2’9	--	0’8	Devendra (1972)
Turquía	Maltesa	11’3	3’5	3’0	--	0’8	Gonç (1982)
USA	Pigmea Africana	21’6	7’8	5’1	5’4	0’8	Jenness (1980)

[1] *S*, % de sólidos totales; *G*, % de grasa; *P*, % de proteína; *L*, % de lactosa; *C*, % de cenizas.

Tabla II.1.1.*4*. Composición media de las fracciones nitrogenadas en leche de cabra en comparación con la leche de vaca.[1]

Raza	*PT*	*PV*	*NNP*	*C*	*PS*	Autor
Alpina	2'9	2'5	0'39	2'0	0'5	Mahieu *et al*. (1977)
Alpina	3'5	3'3	0'22	2'6	0'7	Csapo *et al*. (1984)
Alpina-Saanen	3'1	2'8	0'27	2'3	0'6	Grappin *et al*. (1981)
Anglo-Nubiana	3'1	3'0	0'19	2'4	0'6	Devendra (1972)
Granadina	3'5	3'2	0'27	2'4	0'8	Martín-Hernández *et al*. (1988)
Jamunapari	4'8	4'5	0'16	3'4	1'1	Singh *et al*. (1972)
Murciana	3'6	3'4	0'23	2'6	0'8	Martín-Hernández *et al*. (1988)
Saanen	3'5	3'3	0'22	2'6	0'7	Csapo *et al*. (1984)
Saanen	2'8	2'5	0'31	2'1	0'4	Mahieu *et al*. (1977)
Leche de vaca	3'3	3'3	0'03	2'8	0'5	Luquet (1985)

[1] *PT*, % de proteína total; *PV*, % de proteína verdadera; *NNP*, % de nitrógeno no proteico; *C*, % de caseína; *PS*, % de proteína soluble.

En términos generales, la leche de cabra presenta mayor proporción de nitrógeno no proteico comparada con la de vaca (Grappin *et al*., 1981, Remeuf y Lenoir, 1986). Las micelas tienen mayor diámetro, mayor polidispersión, menor grado de hidratación y mayor proporción de contenido mineral (Trujillo *et al*., 1997). También presenta un mayor contenido graso (Riel, 1991), con glóbulos más pequeños, menos polidispersos y con menor tendencia a la formación de crema (Attaie y Richter, 2000), probablemente por la ausencia de aglutinina.

Los glóbulos grasos presentan una considerable interfase con el suero, por lo que la grasa es más accesible a la acción de las lipasas pero, por alguna razón, la actividad lipolítica es mucho menor en leche de cabra que en leche de vaca (Riel, 1991). El contenido en α-lactoalbúmina es el doble en la leche de cabra, mientras que el de β-lactoblobulina es menor. La cuajada de cabra también es menos firme que la de vaca incluso a igual contenido de caseína (Storry *et al*., 1983).

II.1.2. La elaboración de queso y sus etapas

La leche de vaca se emplea extensamente para la elaboración de queso, aunque también se utiliza la procedente de otras especies como oveja, cabra, búfala, buey, llama, cebú, camello,…(Mendiola, 2000). El código Alimentario Español define el queso como "el producto fresco o maduro obtenido por separación del suero, después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada total o parcialmente, nata, suero de mantequilla o de sus mezclas".

La elaboración de queso, simplificando, no es más que la transición del estado natural de la leche o sol al estado gel. Dicho proceso suele ir seguido de rotura de la estructura del gel con separación, en mayor o menor grado, de las fases sólida (cuajada) y líquida (lactosuero). La cuajada así obtenida da lugar a queso fresco o se somete a un proceso de afinado para la producción de queso maduro o curado. En la elaboración de queso, lógicamente las características de la materia prima son decisivas tanto desde un punto de vista cuantitativo como cualitativo. Los parámetros que definen la aptitud de la leche para la coagulación son numerosos, y serán brevemente compendiados en el apartado **II.2.6**.

Las etapas de la elaboración de queso pueden ser abordadas desde un punto de vista puramente fisico-químico o desde una perspectiva tecnológica. Desde el punto de vista fisico-químico, sólo se distinguen cuatro etapas: coagulación, desuerado, salado y afinado (Brule y Lenoir, 1989), que podemos definir como:

1. *Coagulación*. Modificaciones fisico-químicas de las micelas de caseína, bajo la acción de enzimas proteolíticas o de determinados ácidos, que producen la desestabilización de dichas partículas, dando lugar a la transión sol-gel.

2. *Desuerado*. Sinéresis y evacuación del lactosuero con separación de la fase sólida y la fase líquida. Generalmente se inicia tras la rotura mecánica del

coágulo (corte) y se facilita con tratamiento térmico y/o mecánico (agitación), por moldeado, por aplicación de presión, y por oreo.

3. *Salado*. Fenómenos de transporte de materia conducentes a la incorporación de sal a la cuajada, desde la superficie, en masa o por inmersión en salmuera.

4. *Afinado*. Transformaciones bioquímicas de los componentes de la cuajada, bajo la acción de enzimas, principalmente microbianas. La digestión enzimática de la cuajada modifica su estructura y composición, acentuando el aroma y el sabor y confiriendo a la cuajada nuevas característica, en lo referente al aspecto, la consistencia y el color.

Desde la perspectiva tecnológica, la transformación de la leche en queso, tradicionalmente se divide en las siguientes etapas: tratamiento previo de la leche, coagulación, desuerado, moldeado, prensado, salado y maduración (Mendiola, 2000), si bien, según el tipo de queso, las etapas se pueden ver sometidas a pequeñas modificaciones en intensidad, duración, número y orden. Dichas fases de elaboración se pueden resumir del siguiente modo:

1. *Tratamientos previos*. Conjunto de operaciones a las que se somete la materia prima, previamente a la elaboración de queso y básicamente destinadas a la limpieza (tamizado, filtrado y clarificación por centrifugación), normalización o estandarización (desnatado, adición de caseína en polvo, concentración y ultrafiltración), conservación e higienización de la leche (refrigeración, termización, pasterización, bactofugado, microfiltración y tratamiento por altas presiones) y madurado (adición de cultivos, de Cl_2Ca y de otros aditivos).

2. *Coagulación*. Desestabilización de la fase micelar por adición de enzimas y/o ácidos que determinan la gelificación de la leche, atrapando en su interior el agua, los glóbulos grasos y las bacterias.

3. *Desuerado*. Se corresponde con la sinéresis y la separación de las fases sólida y líquida con obtención de la cuajada. Permite la regularización de la humedad y del contenido en lactosa de la cuajada mediante desmineralizado y deslactosado. Se inicia con el corte del gel, tras el cual, el proceso se regula mediante agitación y/o tratamiento térmico adecuados.

4. *Moldeado*. Llenado de los moldes con la cuajada obtenida tras la separación de la mayor parte del suero.

5. *Prensado*. La cuajada, en el interior de los moldes, es sometida a presión por gravedad (autoprensado) o a presión externa, que proporciona la forma definitiva al queso, permite un desuerado complementario y facilita la estabilización del pH previamente a la maduración.

6. *Salado*. Adición de ClNa a la cuajada, a fin de completar el desuerado, favorecer la formación de la corteza, disminuir la actividad de agua y realzar el sabor propio del queso, enmascarando sabores extraños.

7. *Maduración o afinado*. Proceso de transformación de la cuajada mediante oreo en condiciones controladas de humedad y temperatura que permiten y facilitan la digestión enzimática dirigida o maduración biológica (glicolisis, proteolisis y lipolisis) de la cuajada, que pierde sus características organolépticas iniciales desarrollando las propias del queso.

La descripción detallada de dichas fases no constituye un objeto específico de la presente Memoria de Tesis, excepción hecha de aquellas etapas íntimamente ligadas con el proceso de corte de la cuajada (coagulación y desuerado) que se desarrollan respectivamente en los apartados **II.2** y **II.3**.

II.2. LA COAGULACIÓN DE LA LECHE

II.2.1. Estabilidad coloidal de la leche

En el apartado **II.1.1**, se define la leche como un sistema coloidal integrado por una solución acuosa de lactosa, sales y otros muchos elementos, en la que las proteínas séricas se encuentran en disolución coloidal, las micelas de caseína en dispersión coloidal y los glóbulos grasos se encuentran en emulsión. La leche es un sistema heterogéneo, capaz de dispersar la luz y capaz tanto de fluir como de solidificar (Dickinson, 1992). Muchas de estas propiedades son consecuencia de su estado coloidal. La **Figura II.2.1.*1*** muestra el tamaño relativo de los diversos elementos estructurales polidispersos de la leche.

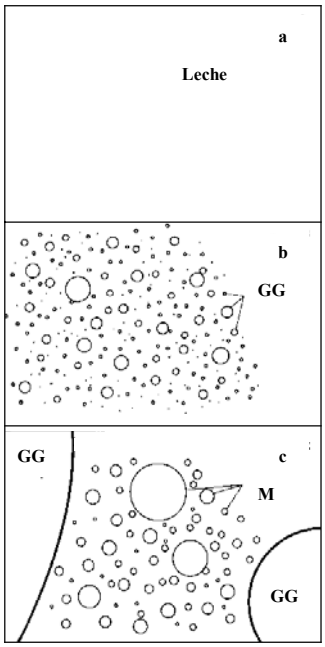

Figura II.2.1.*1*. La leche observada a diferentes aumentos.
(a), a 5x, líquido uniforme; (b), a 500x, gotitas esferoidales de grasa; (c) a 50000x, micelas de caseína. *GG*, Glóbulos grasos; *M*, micelas de caseína.
Reproducido de Walstra y Jenness (1987).

Las dispersiones coloidales son consideradas por diversos autores como un estado de la materia (Dickinson, 1992). Contienen moléculas grandes o partículas pequeñas, siendo por tanto sistemas que ocupan una posición intermedia entre las disoluciones de sustancias de masa molecular relativamente pequeña y las dispersiones groseras (Shaw, 1970). En el estado coloidal, una o más entidades estructurales tienen por lo menos una dimensión comprendida dentro de un determinado rango (Schott, 1987: 1 nm-varios μm; Dickinson, 1992: 1 nm-1 μm; Lewis, 1993: 1 nm-1 mm). Una dispersión coloidal consta, por lo menos, de dos fases separadas: una o más fases dispersas, dispersadas o internas y una fase continua llamada medio de dispersión. Según Shaw (1970), los factores que más contribuyen a la naturaleza de los sistemas coliodales son: tamaño forma y flexibilidad de la partícula, propiedades superficiales e interacciones partícula-partícula y partícula-disolvente. Existen diversas clasificaciones de los sistemas coloidales. En base al estado de la materia tanto de la fase continua como de la dispersa (Schott, 1987) se clasifican en numerosas combinaciones, como p. ej.: sólido-líquido o líquido-líquido. Desde este punto de vista, nos interesan especialmente los soles y las emulsiones:

1. *Sol*. Dispersión coloidal de un sólido en un medio líquido o gaseoso. Los prefijos designan el medio de dispersión: hidrosol, alcosol, aerosol (agua, alcohol y aire respectivamente). La mayoría son líquidos. Si entre las partículas del sol se forman puentes con fuerza mecánica suficiente, dan lugar a un gel (hidrogel, alcogel, aerogel). Si el tamaño de las partículas sólidas supera el límite establecido para las partículas coloidales, se trata de una suspensión. La mayoría de las partículas coloidales presentes, en la leche, se encuentran en estado sol (hidrosol).

2. *Emulsión*. Dispersión o suspensión de gotas de líquido en una fase dispersante también líquida. Así se encuentran en la leche los glóbulos grasos.

Una segunda clasificación debida a Ostwald (Schott, 1987), se basa en la afinidad entre las fases dispersa y dispersante y se aplica principalmente a dispersiones de sólidos en líquidos:

1. *Dispersiones liófilas*. Existe considerable atracción entre la fase dispersa y la fase continua, es decir gran solvatación. Si el medio de dispersión es el agua se dice que el sistema es hidrófilo. Se forman espontáneamente y son termodinámicamente estables y reversibles. Según Dickinson (1992), también se conocen como disoluciones coloidales y desde un punto de vista termodinámico, incluso se pueden considerar como disoluciones verdaderas.

2. *Dispersiones liófobas*. Hay poca atracción entre la fase dispersa y el medio de dispersión y tienen una gran energía libre de superficie, por lo que son termodinámicamente inestables. Suelen ser sistemas irreversibles, que no se pueden reconstruir fácilmente tras la separación de fases. La dispersión no es espontánea. A veces se conocen como dispersiones coloidales. Si la fase continua es acuosa, hablamos de dispersión hidrófoba.

3. *Coloides de asociación*. Formados por moléculas que generalmente son demasiado pequeñas como para que su dispersión se considere coloidal, pero que en medio acuoso tienden a asociarse en estructuras con tamaño suficiente para ser consideradas como partículas coloidales. Son partículas anfifílicas, con grandes restos lióbofos (hidrófobos) "cola" junto con pequeños grupos muy liófilos (hidrófilos) "cabeza", que se asocian formando micelas. Se comportan como coloides liófilos, ya que son termodinámicamente estables y reversibles.

Según Walstra y Jenness (1987) en la leche, los glóbulos grasos son coloides hidrófobos y las micelas de caseína se pueden considerar como intermedios entre los tipos hidrófobo e hidrófilo. Si existen burbujas de aire, y cristales de grasa y lactosa,

pueden considerarse como coloides hidrófobos. Las proteínas del suero se deben considerar como dispersión liófila.

Como vemos, la leche presenta numerosos elementos estructurales de dimensiones coloidales, por lo que podemos considerarla como un coloide múltiple. Sus partículas que varían mucho en composición, poseen carga superficial. Las fases dispersas, como por ejemplo las micelas de caseína, suelen presentan tamaño variable, por lo que el sistema se considera polidisperso. La estabilidad coloidal de la leche, así como la formación, estructura y reología de los productos lácteos, especialmente queso y yogur, dependen principalmente de las interacciones entre las micelas de caseína en diferentes estados de dispersión (Dickinson, 1992). El sistema coloidal en la leche ha sido discutido en mayor extensión por Webb *et al*. (1974), Graf y Bauer (1976), Dickinson y Stainsby (1982), Walstra y Jenness (1987) y Dickinson (1992).

Todas las dispersiones, en sentido estricto, son inestables debido a que el área interfacial tiende a disminuir (Shaw, 1970). Un coloide se considera estable si, tras un cierto período de tiempo, existe escasa agregación y/o sedimentación de partículas. Es decir, si la velocidad de dichos procesos es muy lenta. Centrándonos en los procesos de agregación, por su obvio interés en la elaboración de queso y parafraseando a Dickinson (1992), podemos definir la agregación como un proceso en el que dos o más partículas coloidales se unen mediante fuerzas de distinto origen y magnitud. En general, si la estructura de los agregados o la naturaleza del proceso se conoce suficientemente, se puede distinguir entre coagulación y floculación cuando se forman agregados rígidos o laxos respectivamente. Los agregados producidos por coagulación, presentan distancias intermoleculares de orden atómico mientras que las partículas floculadas se mantienen relativamente separadas. Por ello, las fuerzas establecidas entre las partículas coaguladas son de carácter fuerte y de carácter termodinámicamente irreversible, mientas que las fuerzas que mantienen los flóculos son débiles y generalmente reversibles. Ambos procesos, bajo circunstancias favorables, pueden ser revertidos mediante los procesos respectivos de peptización y de defloculación.

Las partículas coloidales están animadas permanente y espontáneamente por movimientos brownianos. Como consecuencia de la teoría cinética, en ausencia de fuerzas externas todas las partículas suspendidas tienen la misma energía cinética media de traslación, independientemente de su tamaño. La energía cinética media para cualquier partícula es 3/2 *kT*, donde *k* es la constante de Boltzmann (1'4 x 10^{-23} J K^{-1}) y *T* la temperatura absoluta (Shaw, 1970). Los movimientos, que son al azar, están provocados por los choques de las moléculas del sistema dispersante (en nuestro caso agua) sobre las partículas coloidales (micelas de caseína), dependiendo por tanto de la temperatura y del tamaño de las partículas.

En este "paseo tridimensional al azar", dos partículas que se encuentran deberían unirse debido a las fuerzas de cohesión que tienden a disminuir la superficie, por lo que si la dispersión es estable, deben existir otras fuerzas de sentido opuesto que, anulando a las primeras, mantienen la estabilidad del sistema. Las fuerzas que tienen a unir las partículas coloidales suelen ser fuerzas de van der Waals, especialmente fuerzas de dispersión de London. Para dos partículas esféricas idénticas, la energía libre de interacción de van der Waals es aproximadamente (Walstra 1996):

$$V_{\mathrm{A}} = -Ar/12h \qquad \text{(II.2.1.}\mathit{1}\text{)}$$

donde *r* es el radio de la partícula, *h* la distancia interpartícula y *A* la constante efectiva de Hamaker, que varía en función del material de las partículas y del líquido que las separa y que crece en la medida que las diferencias entre las propiedades de ambos materiales aumentan. Si ambas partículas son del mismo material y el líquido que las separa es distinto (como en el caso de las micelas de caseína), *A* siempre tiene valor positivo y las partículas se atraen. Para la mayoría de las partículas, en agua, *A* vale entre 1 y 1'5 *kT* (4-6 x 10-21 J).

Frente a las fuerzas de atracción de van der Valls, existen dos fuentes principales de estabilización en los sistemas coloidales: estabilización electrostática y estabilización

polimérica. En la primera, las fuerzas de repulsión se deben al potencial electrostático establecido entre partículas cargadas. En la segunda, las partículas se mantienen separadas gracias a macromoléculas que pueden estar unidas a la superficie (estabilización estérica) o disueltas en el medio de dispersión en forma de moléculas enrolladas o de red tridimensional laxa (interacción por depleción). En los alimentos es común la estabilización por combinación de mecanismos electrostáticos y estéricos.

II.2.1.1. *Estabilización electrostática*: *capa eléctrica doble y teoría DLVO*

Para comprender la estabilidad de los coloides liófobos, deben estudiarse los fenómenos de atracción y de repulsión, lo que también es conveniente en relación con las micelas de caseína. Según Walstra y Jenness (1987), la carga eléctrica superficial de una partícula procede de la adsorción de iones o de la ionización de grupos funcionales superficiales. Se crea, así, un potencial electrostático superficial (ψ_0), que determina una fuerza de repulsión entre partículas, cuando ψ_0 es del mismo signo, que previene el acercamiento de las mismas. Puesto que la carga depende del pH, también dependen de él, tanto ψ_0 como las fuerzas de repulsión.

La fase acuosa que rodea a las partículas contiene siempre iones, de forma que los cargados opuestamente a la partícula (contra-iones) se acumulan cerca de su superficie y los de igual carga son repelidos (co-iones). La concentración de contra-iones aumenta al acercarnos a la superficie de la partícula. La superficie cargada y la distribución desigual de co-iones y contra-iones cerca de la superficie se conocen como capa eléctrica doble; diferenciándose una región interna inmóvil (capa de Stern) con iones fuertemente adsorbidos y otra región móvil externa (capa difusa o de Gouy-Chapman) formada por iones distribuidos en función del balance entre energía cinética y energía potencial eléctrica.

El potencial eléctrico de las partículas disminuye con la distancia, l, a su superficie. Para partículas coloidales grandes, de bajos potenciales de superficie (< 25

mV para un electrolito 1:1), el potencial se puede estimar mediante la aproximación de Debye-Hückel, según la siguiente relación:

$$\psi \approx \psi_0 e^{-kl} \qquad \text{(II.2.1.1.}\mathit{1}\text{)}$$

donde ψ es el potencial a una distancia l y k es el parámetro de Debye-Hückel. Su recíproco, k^{-1}, es el grosor aproximado de la capa eléctrica doble (longitud de Debye) y representa la distancia a la que ψ cae hasta un valor de $1/e$, equivalente a 0'37 veces ψ_0. El grosor de la capa eléctrica doble depende de la fuerza iónica de la solución. En agua a temperatura ambiente viene dada por:

$$1/k(\text{nm}) \approx 0.3/\sqrt{I} \qquad \text{(II.2.1.1.}\mathit{2}\text{)}$$

donde I es la fuerza iónica dada por:

$$I = 1/2\sum M_i z_i^2 \qquad \text{(II.2.1.1.}\mathit{3}\text{)}$$

donde M es concentración molar y z es la valencia de cada una de las especies iónicas presentes. I en la leche es aproximadamente 0'075-0'08 M (Walstra y Jenness, 1987; Swaisgood, 1996), por lo que el espesor teórico de la doble capa es próximo a 1'1 nm. Para una partícula dada el pH determina en gran parte el valor de ψ_0, mientras que I es responsable de la caída de potencial con la distancia. Con elevada I también disminuye ψ_0 porque los contra-iones pueden asociarse con los grupos ionizados de la partícula neutralizándolos.

El potencial electrocinético o potencial zeta (ζ) puede determinarse sometiendo las partículas a un campo eléctrico. A la superficie cargada se une capa de agua que se desplaza con la partícula, de tal forma que el plano de deslizamiento al que se mide el

potencial se encuentra a una distancia desconocida de la superficie, por lo que ζ es algo menor que ψ_0.

En la clásica teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek o teoría *DLVO*, se estudia la estabilidad coloidal en función de los cambios de energía libre que ocurren cuando dos partículas del sol se aproximan entre sí y sus capas eléctricas dobles se solapan. Aparecen entonces la energía de interacción repulsiva entre las dos capas y las fuerzas atractivas de van der Waals. El potencial de interacción total (u_{DLVO}) corresponde a:

$$u_{\mathrm{DLVO}}(h) = u_{\mathrm{R}}(h) + u_{\mathrm{A}}(h) \qquad \text{(II.2.1.1.}\textit{4}\text{.)}$$

donde u_{R} es el potencial de repulsión debido a la capa eléctrica doble, u_{A} es el potencial de atracción causado por las fuerzas de van der Waals y h es la distancia entre las superficies. Las fuerzas de van der Waals producen una energía de atracción que disminuye inversamente con h. La energía de repulsión electrostática disminuye en forma exponencial con h. Debido a la combinación de estos dos efectos opuestos, la atracción predomina en las distancias cortas y grandes, mientras que la repulsión puede predominar en las distancias intermedias. La **Figura II.2.1.1.*1*** muestra la representación teórica típica de la función $u_{\mathrm{R}}(h)$ (curva *ER*), de la función $u_{\mathrm{A}}(h)$ (curva *WA*) y de la función $u_{\mathrm{DLVO}}(h)$, curva resultante de la suma algebraica de las curvas *ER* y *WA* (curva *DPBAS*) según Schott (1987). Los valores de energía potencial de interacción positiva indican repulsión y los negativos atracción.

Cuando dos partículas se acercan, las dos atmósferas de contra-iones se empiezan a superponer en el punto *A* (distancia d_{A}), y comienzan a producir una energía de repulsión debida al trabajo necesario para distorsionar las capas difusas y para desplazar moléculas de agua y contra-iones. Si continúan acercándose, aun cuando casi toda la solución de contra-iones esté ya desplazada, la repulsión aumenta la energía potencial de interacción hasta su valor máximo en *B*. Si la altura de la barrera de energía potencial

B excede la energía cinética de las partículas que se acercan, estas no estarán a distancia más próxima que d_B y se alejarán la una de la otra. Una energía positiva neta de unas 25 unidades kT ($kT \approx 4 \times 10^{-21}$ J) es suficiente para mantener las partículas separadas, siendo la dispersión permanentemente estable (estabilización electrostática).

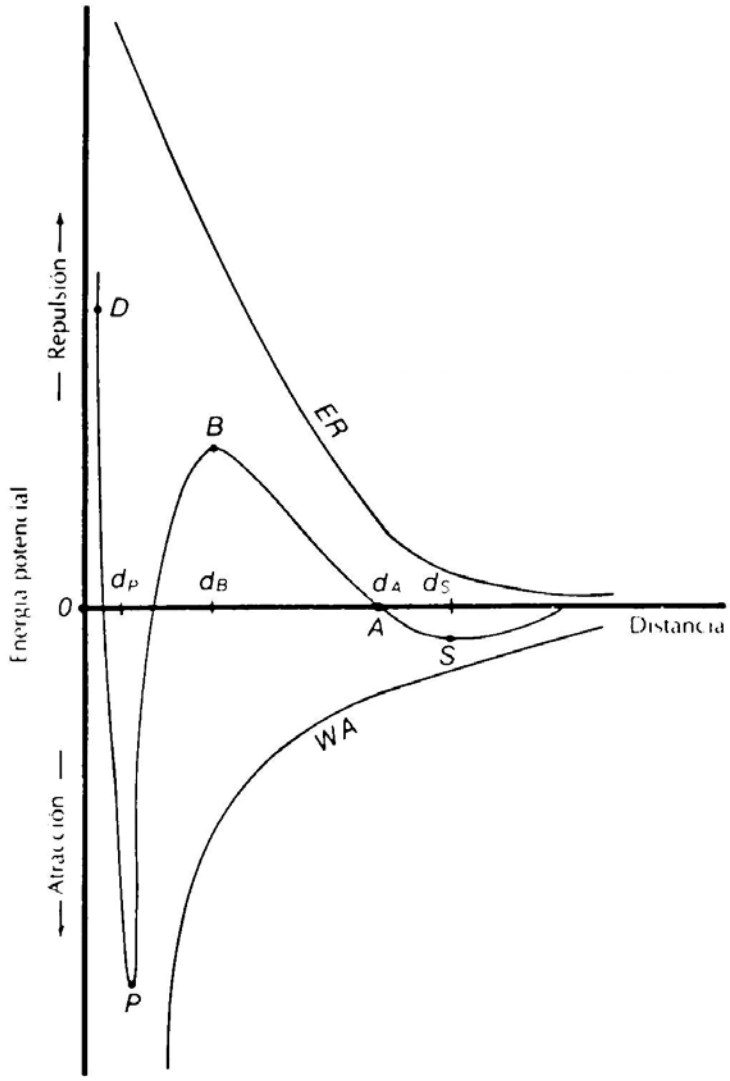

Figura II.2.1.1.*1*. Curvas de energía involucradas en la estabilización electrostática.
WA, energía de atracción de van der Waals entre dos partículas idénticamente cargadas, en función de la distancia entre ellas; *ER*, energía de repulsión electrostática; *DPBAS*, energía neta de interacción; d_P, d_B, d_A y d_S, distancias entre las partículas en los puntos *D*, *P*, *B*, *A* y *S*.
Reproducido de Schott (1987).

Por otra parte, si su energía cinética excede la barrera de energía, las partículas se acercan más allá de d_B porque la atracción de van der Waals supera a la repulsión electrostática. La energía potencial neta de interacción se hace cero y posteriormente se vuelve negativa acercando más a las partículas entre sí. Cuando éstas alcanzan una distancia d_P, la energía de interacción supone el valor mínimo primario, *P*, que corresponde a una situación muy estable donde las partículas se adhieren. Como no es probable que las partículas puedan recibir suficiente energía cinética, ni que ζ pueda aumentar suficientemente para permitirles salir del pozo de energía potencial, quedan fijadas permanentemente (agregación irreversible o coagulación). Cuando la mayoría de las partículas se aglomeran por este proceso el sol coagula. Cualquier distancia menor que d_P produce un aumento muy rápido de energía potencial a lo largo de *PD*, porque las partículas sólidas se interpenetrarían con superposición de orbitales atómicos (repulsión de Born). Según Shaw (1970), otra propiedad característica de las curvas de potencial de interacción es la presencia de mínimos secundarios (*S*), que cuando son suficientemente profundos (mayor de *kT*) deben dar lugar a agregación reversible (floculación).

II.2.1.2. *Estabilización estérica*

En ocasiones, las cadenas moleculares más externas de las partículas coloidales pueden sobresalir de la superficie causando repulsión. Cuando las partículas se aproximan excesivamente, las capas que presentan cadenas sobresalientes “filamentos” penetran unas en otras o se comprimen entre sí, determinando una pérdida de entropía conformacional que produce la repulsión. También existe repulsión por hidratación, si las pilosidades son hidrófilas y contactan íntimamente las cadenas moleculares individuales. El solapamiento de los segmentos macromoleculares de la fina película entre las partículas causa un aumento de la concentración local de los filamentos y, como consecuencia, un aumento de la presión osmótica que favorece una afluencia de moléculas de agua a la región solapada que produce repulsión. El efecto conjunto de ambos procesos se denomina repulsión estérica y su magnitud puede ser considerable,

de hasta unos pocos *kT* por molécula (Walstra y Jenness, 1987). La pilosidad puede alejar de la superficie el plano de deslizamiento de la partícula que se mueve por un líquido, por lo que puede determinar que ζ sea mucho menor que el potencial superficial. Tanto los glóbulos grasos como las micelas de caseína de la leche contienen pilosidades, lo que permite esperar una contribución importante de la repulsión estérica a la estabilidad de la leche.

II.2.1.3. *Interacciones hidrofóbicas*

La asociación entre sí, en solución acuosa, de grupos no polares causada por la tendencia de las moléculas de agua a rechazar moléculas y partículas no polares se conoce como interacción hidrofóbica o "unión hidrófoba" (Lien y Kennon, 1987). Este tipo de interacción es altamente sensible a la temperatura, siendo muy débiles a la 0ºC y aumentando su estabilidad proporcionalmente con la temperatura (Walstra, 1996). Si el surfactante es una proteína, en principio pueden darse las interacciones hidrofóbicas si bien, en este caso, es más probable la repulsión generalmente debida a una combinación de repulsión electrostática y estérica.

II.2.2. Propiedades e interacciones de las caseínas

El factor principal que condiciona las propiedades tecnológicas de la leche y el rendimiento quesero es la concentración de proteínas coagulables, es decir de caseínas, que en leche de cabra es muy variable, contrariamente a lo observado en vaca (Remeuf *et al*., 1989, 1991). Las caseínas son las proteínas mayoritarias de la leche y suponen un 80% de las proteínas totales en la de vaca (Dalgleish, 1993; Lomholt, 1996; Mendiola, 2000) mientras que en cabra constituyen un 73'8% (Quiles y Hevia, 1994). Estudios basados en la movilidad molecular (cromatografía, electroforesis, filtración y ultracentrifugación) han puesto de manifiesto la existencia de diferentes tipos de caseínas (Riel, 1991). Actualmente se clasifican en cuatro tipos diferentes: α_{S1}-, α_{S2}-, β- y κ-caseína (Ruettimann y Ladisch, 1987; Dalgleish, 1993; Lomholt, 1996; Mendiola,

2000). Todas ellas se sintetizan en la glándula mamaria si bien a estos cuatro grupos se les pueden añadir varios grupos de proteínas minoritarias como la γ-caseína, que es un fragmento procedente de la proteolisis de la β-caseína (Eigel, *et al*., 1984; Walstra y Jenness, 1987; Fox y Mulvihill, 1990; Varnam y Sutherland, 1995) y λ-caseína derivada de la α_{S1}-caseína (Fox y Mulvihill, 1990).

Las caseínas se agrupan formando micelas que serán descritas en el apartado **II.2.3**. Lógicamente, la formación de dichas micelas dependerá de los fenómenos de interacción que se establezcan entre ellas, en presencia del ion calcio. De acuerdo con Brule y Lenoir (1989) la composición y estructura primaria de las caseínas les confieren importantes propiedades fisico-químicas de interés funcional como: a) marcado carácter aniónico en medio neutro por la presencia de radicales fosfoserina y/o ácido glutámico; b) insolubilidad en agua a pH_i (pH = 4'6 para la caseína entera o bruta) por la elevada proporción de radicales apolares y c) agregación en medio cálcico de las caseínas α_{S1}, α_{S2} y β por disminución de su carga eléctrica negativa y de su hidrofilia, como consecuencia de la complejación del Ca^{2+} por parte de radicales fosfoserina presentes en la estructura de dichas caseínas. Este comportamiento corresponde a las caseínas consideradas de forma aislada, pero en presencia de κ-caseína en proporción suficiente, cercana al 10%, las demás caseínas son solubles en presencia de calcio.

El poder estabilizante de la κ-caseína se relaciona directamente con la marcada tendencia asociativa típica de todas las caseínas (Darling y Dickson, 1979*b*; Mercier *et al*., 1972). En soluciones puras, a pH neutro y en ausencia de calcio las caseínas presentan una tendencia a polimerizarse en grados variables según el tipo de caseína de que se trate, mayor en el caso de las caseínas β y κ; en las que la repartición desigual de las cargas les confiere características detergentes (Brule y Lenoir, 1989). En medio acuoso se asocian a través de enlaces hidrofóbicos, lo que se traduce en repulsión de las zonas hidrofílicas hacia el exterior de los polímeros caseínicos. La asociación de las caseínas α_S se produce principalmente por enlaces electrostáticos, al presentar éstas un reparto más homogéneo de las cargas.

Cuando se mezclan los diferentes tipos de caseína, su carácter anfifílico y su fosforilación facilita las interacciones entre ellas y con el fosfato cálcico para formar complejos (Varnam y Sutherland, 1995; Swaisgood, 1996). En ausencia de calcio las asociaciones se establecen a partir de las zonas hidrofóbicas y de las cargadas eléctricamente, pero en presencia de calcio intervienen enlaces entre los radicales fosfoserina de las caseínas y los iones Ca^{2+}, y el grado de asociación aumenta considerablemente. Entre 0 y 4ºC sólo las caseínas β y κ son solubles a una concentración 0'03 M de calcio. Sin embargo a esa misma concentración y a temperatura entre 20 y 25ºC sólo es soluble la κ-caseína. Por su baja solubilidad en presencia de calcio, las caseínas α_{S1}, α_{S2} y β se conocen como caseínas "sensibles al calcio".

Recientemente, Swaiswood (1996) ofrece una visión clara y rigurosa de las interacciones tan peculiares que presentan las caseínas entre sí y con los iones de calcio y las sales cálcicas, que contribuyen a la formación de la micelas de caseína y definen sus propiedades funcionales. Las estructuras primaria y terciaria singulares de estas proteínas, que presentan fosforilización postranslacional, dan lugar a la formación de agregados (clusters) aniónicos en las "caseínas sensibles al calcio", mientras que en la κ-caseína, "insensible al calcio" sólo aparece un único residuo fosforilado. La unión del Ca^{2+} a los agregados aniónicos neutraliza la carga en dichas regiones, con la consiguiente deshidratación, que altera el equilibrio de las interacciones hidrofóbicas y de fuerzas de repulsión electrostática, facilitando su interacción.

La estructura primaria de las caseínas revela otra característica singular de estas proteínas, la distribución de residuos hidrofóbicos y polares. La agrupación de los residuos polares y de los hidrofóbicos en regiones separadas de la secuencia primaria sugiere la formación de distintos dominios de naturaleza polar e hidrofóbica, que genera una estructura anfipática. En disoluciones aisladas de caseínas, tanto las β-caseínas como las κ-caseínas se autoasocian para formar grandes complejos esféricos muy similares a una micela de detergente. Los dominios polares de las caseínas sensibles al

calcio presentan una alta proporción de residuos fosfoserilo que, al pH de la leche, portan una gran carga negativa neta. La κ-caseína, insensible al calcio, es también muy anfipática por la presencia de distintos dominios individuales hidrofóbicos y polares, pero sin embargo, el dominio polar de esta caseína no contiene ningún agrupamiento aniónico.

La κ-caseína -en lugar de las agrupaciones aniónicas de fosfoserilo características de las caseínas sensibles al calcio- en el dominio polar contiene residuos serilo y treonilo que aparecen frecuentemente glucosilados, con tri- y tetrasacáridos que incluyen residuos de ácido N-acetilneuramínico aniónicos y actúan como grupos prostéticos fuertemente hidrófilos. Puesto que la κ-caseína no contiene agrupaciones fosfoserilo, no liga Ca^{2+} como las caseínas sensibles a éste. Sin embargo, el dominio polar (fragmento -COOH terminal 106-169, ácido e hidrofílico y conocido como caseinomacropéptido o *CMP*) presenta muchos aminoácidos polares, una elevada carga negativa (restos aminoacídicos ácidos como el ácido glutámico) y ocho residuos prolilo espaciados uniformemente, creándose de esta forma una estructura pilosa abierta y flexible, fuertemente hidratada. Este dominio polar está adherido a un gran dominio altamente hidrofóbico (fragmento NH_2 terminal 1-105 o para-κ-caseína, de carácter básico) con muchos sitios que son potencialmente capaces de interaccionar con otras caseínas. Además, el enlace peptídico Phe-Met en la posición 105-106, que es el límite *N*-terminal del dominio polar, es muy suceptible a la acción hidrolítica de la quimosina, probablemente porque sus residuos prolilo a ambos lados del enlace sobresalen de la superficie y aumentan la flexibilidad de la cadena. Como consecuencia de sus características estructurales diferenciales, existe una serie de propiedades reservadas a la κ-caseína, que condicionan sus interacciones y su funcionalidad:

1. Interacción con las caseínas sensibles al calcio para formar micelas, ya que actúa estabilizándolas frente al Ca^{2+}.
2. Presenta estructura anfipática, pero con un dominio polar inerte que no precipita en presencia de Ca^{2+}.

3. Presencia de una secuencia de reconocimiento específica para la proteolisis limitada por la enzima quimosina, que permite la eliminación selectiva del dominio polar, induciendo la coagulación de las micelas.

Estas tres características morfofuncionales son la base que permite la formación de las micelas de caseína nativa por interacción de las caseínas en presencia de calcio, regulando la estabilidad micelar en función de determinados factores desestabilizantes, que determinan el estado sol/gel de la leche.

II.2.3. Estructura de las micelas de caseína

La caseína de la leche mayoritariamente se encuentra constituyendo partículas conocidas como micelas de caseína (Ruettimann y Ladisch, 1987). La luz dispersada por estas estructuras es la principal responsable del color blanco de la leche (Swaisgood, 1996). Las micelas de caseína son estructuras sólidas y esponjosas de tamaño coloidal dispersas en un medio acuoso (hidrosol), que por presentar gran variabilidad de tamaño se clasifican como sistema polidisperso. Dalgleish (1990) define las micelas de caseína nativa como el coloide de asociación de la leche fresca, si bien Walstra y Jenness (1987) discrepan al considerarlas como una forma intermedia entre los coloides liófilos y los liófobos. La composición, estructura y/o funcionalidad de las micelas de caseína ha sido abordada por Bloomfield y Morr (1973), Bloomfield y Mead (1975), Schmidt y Payens (1976), McMahon y Brown (1984*a*), Ruettimann y Ladisch (1987), Rollema (1992), Creamer *et al*.(1998), Dalgleish (1998), Holt (1998) y Walstra (1999), entre otros.

Las micelas de caseína son básicamente de naturaleza proteína (92%), si bien contienen un 8% de sales, principalmente fosfato cálcico y cantidades significativas de Mg^{2+} y citrato (Varnam y Sutherland, 1995; Swaisgood, 1996). Estos componentes iónicos se conocen conjuntamente como fosfato cálcico coloidal o *CCP* (Fox y Mulvihill, 1990). Como se ha comentado, gracias al grado de fosforilación y a su estructura anfifílica, las moléculas de caseína interaccionan entre sí y con el fosfato

cálcico constituyendo estructuras micelares de tamaño comprendido en leche de vaca entre 90 y 150 nm (Swaisgood, 1996). Las micelas contienen diversos tipos de caseína: α_{S1}-, α_{S2}-, β- y κ-caseína en una proporción molar de 3: 1: 3: 1 (Varnam y Sutherland, 1995; Swaisgood, 1996). La proporción de κ-caseína varía en relación inversa con el tamaño de la micela, mientras que la de β lo hace en forma directa (Riel, 1991). Las micelas exhiben estructura porosa, muy voluminosa (4 mL g^{-1} de caseína), fuertemente hidratada (3'7g H_2O g^{-1} de caseína) (Swaisgood, 1996) y con un ζ de -14 mV (Dickinson, 1992).

La multitud de modelos fundamentalmente diferentes que han sido propuestos sobre la estructura de la micela de caseína constituyen una evidencia clara de la ausencia de unos conocimientos sólidos (Holt, 1998). Los modelos propuestos se clasifican, en general, en tres grupos: modelos de núcleo y corteza, de estructura interna y de subunidades (Ruettimann y Ladisch, 1987; Rollema, 1992). La estructura actualmente considerada, basada en la recopilación de la información disponible, parece inclinarse a favor de un modelo submicelar como el propuesto por Morr (1967) y perfeccionado sucesivamente por Slattery y Evard (1973), Schmidt (1982) y Walstra (1990).

Muchas evidencias conducen a una estructura micelar formada por la asociación de entre 100 y 10000 subunidades aproximadamente esféricas (Dickinson, 1992) de diámetro comprendido ente 10 y 20 nm (Walstra y Jenness, 1987; Dickinson, 1992; Swaisgood, 1996) y que contienen entre 10 y 100 moléculas de caseína (Walstra y Jenness, 1987). La existencia de submicelas se ha fundamentado ampliamente en base a métodos físico-químicos (Creamer, 1991, Kumosinski *et al*., 1991, Rollema, 1992 y Farrel *et al*., 1994) como: la disociación de las micelas en submicelas o el análisis de submicelas de caseinato sódico y su sucesivo crecimiento por adición de calcio. También ha sido defendida esta existencia mediante observación con microscopía electrónica (Schmidt y Buchheim, 1970; Kalab *et al*., 1982 y Carrol *et al*., 1985) y estudio con dispersión de neutrones (Stothart y Cebula, 1982; Lomholt, 1996).

Recientemente, Povey *et al*. (1999) emplean una técnica de espectroscopía de ultrasonidos que permite determinar un tamaño submicelar de 20 nm. Además, la eliminación de calcio en la leche conduce a la desintegración de las micelas en partículas de apariencia submicelar (Buchheim y Welsch, 1973). En la **Figura II.2.3.*1*** se esquematiza un modelo genérico submicelar. El fosfato cálcico y las caseínas sensibles al calcio se unen al participar los grupos fosfoserina en la estructura del fosfato cálcico (Varnam y Sutherland, 1995). Las submicelas poseerían una estructura no uniforme, con un interior de naturaleza hidrofóbica constituido por las partes hidrófobas de las caseínas (Brule y Lenoir, 1989) y una cubierta hidrófila externa, no tan compacta, que contiene la mayoría de los grupos ácidos (carboxílico y fosfórico) de las caseínas (Walstra y Jenness, 1987) y los grupos cargados e hidrófilos de la κ-caseína (Ruettimann y Ladisch, 1987).

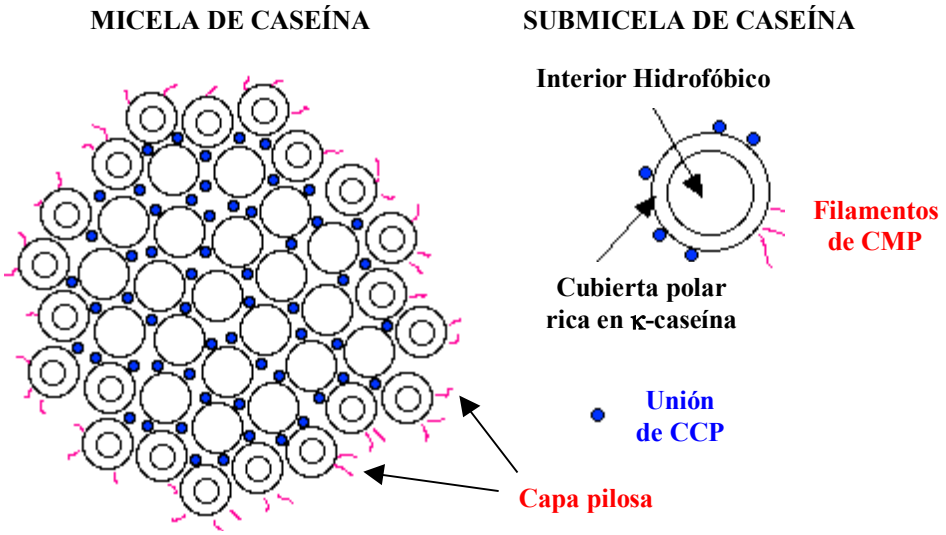

Figura II.2.3.*1*. Estructura de la micela de caseína: modelo submicelar.
Propuesto por Morr (1967) y perfeccionado sucesivamente por Slattery y Evard (1973), Schmidt (1982) y Walstra (1990). *CMP*, caseinomacropéptido; *CCP*, fosfato cálcico coloidal.
Reproducido de Dairy Science and Technology Education Series. Web: www.foodsci.uoguelph.ca.

La estructura interna de la submicela se mantiene, principalmente, mediante las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre las moléculas de caseína individuales (Dickinson, 1992; Swaisgood, 1996) mientras que se cree que las submicelas interactúan por incorporación de los agrupamientos de fosfoserilo aniónicos a la estructura del *CCP* (Swaisgood, 1996). La estructura propuesta por Schmidt (1980, 1982) para el CCP se corresponde con $Ca_9(PO_4)_6$. Estudios de absorción de rayos *X* y espectroscopía infrarroja demuestran que su estructura podría ser muy similar a la que presenta la brusita en cristales triclínicos (Holt, 1985). Los ésteres fosfato de los agregados aniónicos de las submicelas pueden ser, por tanto, parte integral de la matriz de fosfato cálcico-Mg^{2+}-citrato. No obstante, la naturaleza de las uniones entre unas submicelas y otras es aún mal conocida, habiéndose también apuntado la participación de uniones hidrofóbicas y de otras fuerzas, además de la existencia de los puentes salinos de *CCP*, (Fox y Mulvihill, 1990). Seguramente predominan los puentes salinos aunque la importancia relativa de las distintas fuerzas de cohesión depende de la temperatura. Según Dickinson (1992) el *CMP* se localiza en aquellas regiones superficiales de la submicela que están libres de fosfato, mientras que el resto de la cubierta polar de las subunidades está poblada con los residuos de fosfoserina de las caseínas α_{S1}, α_{S2} y β que permiten la unión entre las submicelas a través de puentes de fosfato cálcico. Las submicelas pobres en κ-caseína o carentes de ella, y por tanto ricas en caseínas sensibles al calcio, predominan en el interior de la micela localizándose exteriormente las ricas en κ-caseína.

Gracias a la distribución de los diferentes tipos de caseína en el interior de las submicelas, y a la organización de los diferentes tipos de submicelas entre sí, se forma una estructura micelar en la que según Swaisgood (1996) la κ-caseína también se localiza predominantemente en superficie mientras que las caseínas α_S y β se agrupan en el interior. Sin embargo, la distribución no es excluyente porque las proteínas sensibles al calcio también están accesibles en la superficie. Cuando el dominio polar de la κ-caseína, que no puede interaccionar con el calcio, ocupa una proporción suficiente de la superficie micelar, ésta deja de crecer por lo que cuanto mayor sea el número de

submicelas ricas en la κ-caseína tanto menor será el tamaño micelar. Esta distribución de caseínas contribuye a explicar porque la cantidad de κ-caseína de la micela aumenta linealmente con la relación superficie/volumen, mientras que la cantidad de β-caseína disminuye linealmente. Puesto que los componentes del suero se equilibran lentamente con los de la micela, la adición de κ-caseína reduce el tamaño micelar y la adición de β-caseína produce el efecto contrario.

Los modelos submicelares han evolucionado durante la década de los 60 y como se ha referido anteriormente gozan de amplia aceptación. Pese a que la mayor parte de las pruebas sugiere que las micelas están formadas por asociación de submicelas (Swaisgood, 1996), su existencia no es universalmente aceptada. Holt y Horne (1996), coinciden con las nociones generales de estos modelos pero discrepan del concepto de submicela. Holt (1998) realiza ensayos de disociación controlada de las micelas de caseína. Mientras las fuentes de integridad micelar se mantienen constantes se procede a una eliminación selectiva de *CCP* o a una adición de κ-caseína. En ningún caso se consigue la disociación completa de las micelas en submicelas individuales. En opinión de dicho autor se requiere al menos la modificación de los modelos submicelares, de forma que sea posible la existencia del mismo tipo de uniones entre las submicelas individuales y dentro de ellas.

Estas controversias estimulan la aparición de modelos alternativos como el propuesto por Holt (1995) y Holt y Horne (1996) en el que existen pequeñas formaciones de *CCP* denominadas nanoagregados de fosfato cálcico que interaccionan con los grupos fosfoserina de las caseínas y probablemente con los residuos de glutamina y constituyen centros a partir de los cuales crecen las micelas. La **Figura II.2.3.*2*** representa gráficamente el modelo desarrollado por Holt. Se observa una partícula irregularmente esférica, altamente hidratada, abierta y con una carga superficial negativa.

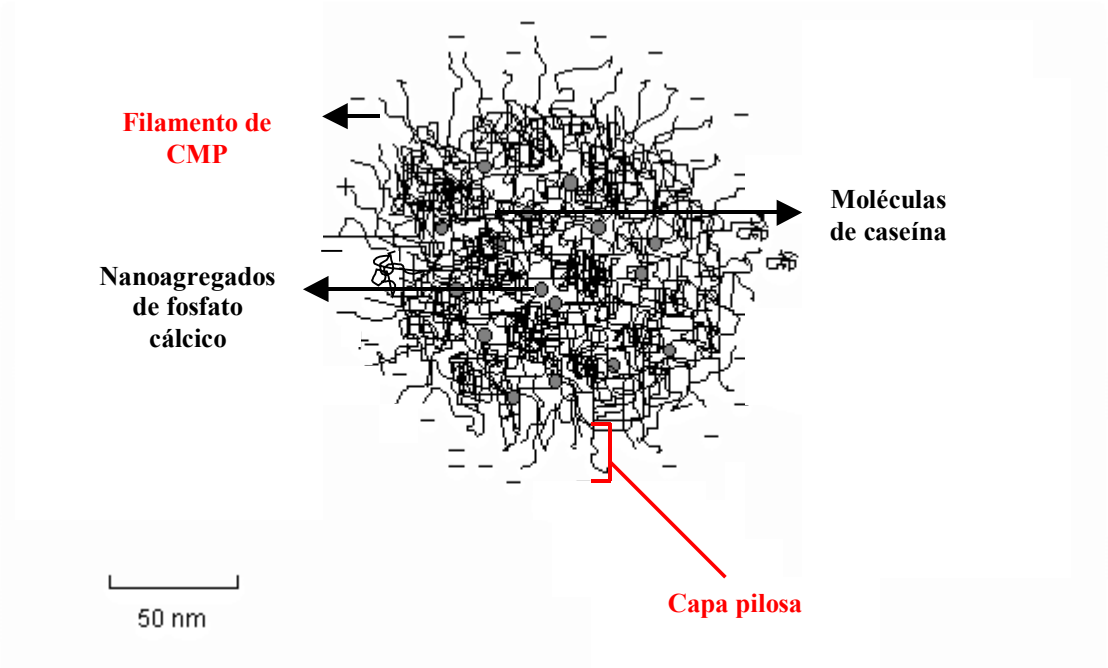

Figura II.2.3.*2*. Estructura de la micela de caseína: modelo de nanoagregados.
Según Holt. Reproducido de Dairy Science and Technology Education Series. Web: www.foodsci.uoguelph.ca. *CMP*, caseinomacropéptido.

Recientemente Horne ha propuesto un modelo de unión dual. Dicho investigador defiende que el ensamblaje de las micelas tiene lugar por polimerización mediante dos tipos de uniones: uniones entre las regiones hidrofóbicas de las caseínas y neutralización y unión de las regiones cargadas negativamente (agrupaciones aniónicas de fosfoserilo) mediante nanoagregados de fosfato cálcico mineral. La integridad micelar se mantienen por una exceso localizado de atracción hidrofóbica sobre la repulsión electrostática (Horne, 2000).

Puesto que el procesado de las muestras para la observación de las micelas al microscopio electrónico produce habitualmente artefactos, McMahon y McManus (1998) emplean una técnica de criopreparación que permite conservar al máximo la estructura nativa de las micelas de caseína. Las imágenes obtenidas muestran que los subagregados de partículas en el interior de las micelas tienen generalmente un tamaño

que oscila entre 2-3 nm, a lo sumo 8-10 nm, no constituyendo según los autores una prueba definitiva de la existencia de las submicelas, por lo que consideran que de existir éstas deben ser menores de 20 nm o deben estar empaquetadas menos densamente, de forma que en las micrografías las proteínas constituyentes de las submicelas aparecen como proteínas individuales. Por su parte Walstra (1999) aporta evidencias tanto a favor como en contra de las submicelas, y sugiere un modelo basado en otro previamente propuesto por van Dijk (1992) que es básicamente un modelo submicelar tradicional con la salvedad de que el *CCP* se encuentra dentro de las submicelas en lugar de actuar como cemento intermicelar **(Figura II.2.3.*3*)**.

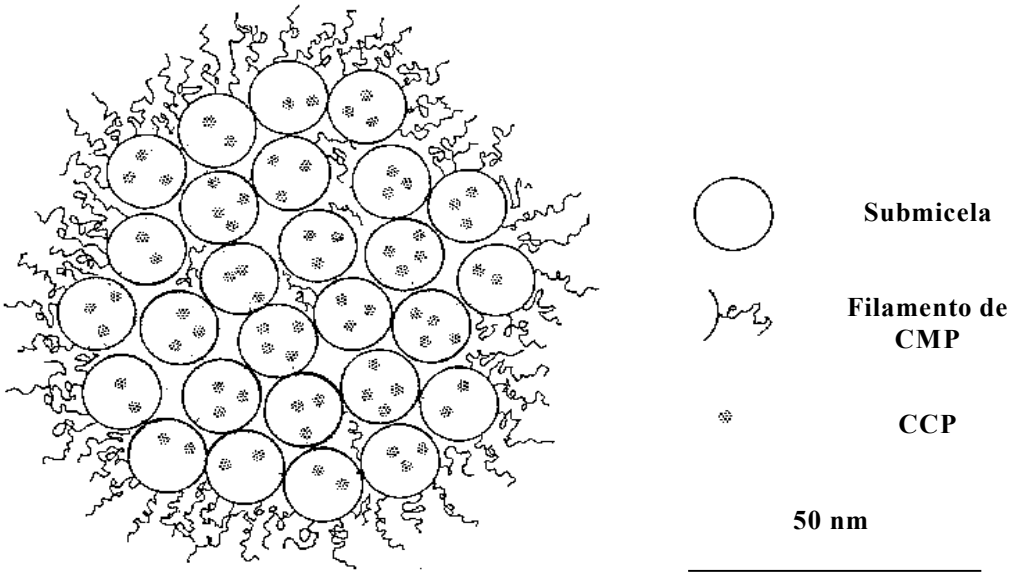

Figura II.2.3.*3*. Estructura de la micela de caseína: modelo submicelar modificado por Walstra.
CMP, caseinomacropéptido; *CCP*, fosfato cálcico coloidal.
Reproducido de Walstra (1999).

Pese a la controversia actual sobre la existencia o no de las submicelas, el modelo submicelar sigue siendo el más ampliamente aceptado. Independientemente de cual sea el modelo definitivo de la estructura micelar, existe un amplio consenso en cuanto a la existencia de la capa o cubierta de filamentos pilosos, en adelante "capa pilosa" (Walstra, 1999). Desde una perspectiva funcional, e independientemente de si su estructura es o no submicelar, las micelas constituyen agregados de caseína con una superficie externa estabilizante. Podemos considerarlas como esferas sólidas con una capa proteica superficial, principalmente de κ-caseína, que confiere a las partículas la estabilidad necesaria para que se mantengan en dispersión coloidal (Dalgleish, 1998).

Swaisgood (1996) afirma que las micelas de caseína no son estructuras estáticas sino que aparentemente todos sus componentes se encuentran en equilibrio dinámico lento con el suero lácteo, por lo que en condiciones adecuadas las caseínas y los componentes salinos se pueden disociar reversiblemente de las micelas. Sorprendentemente, tal disociación puede ocurrir hasta cierto límite sin inducir a cambio aparente alguno de tamaño micelar. A temperaturas cercanas a 0ºC se produce disociación parcial reversible de β-caseína, κ-caseína y *CCP*, si bien a temperatura fisiológica la proporción de caseínas individuales o de submicelas en el suero es extremadamente pequeña. Los principales equilibrios se establecen a dos niveles: entre las moléculas de caseína libre y las del interior de las micelas y entre el *CCP* y el calcio y fosfato disueltos (Brule y Lenoir, 1989).

De acuerdo con Quiles y Hevia (1994), en términos generales las micelas de caseína en cabra son similares a las de vaca. Las micelas de cabra contienen un 15'55% de nitrógeno, 0'78% de fósforo, 0'39% de hexosas y 0'31% de hexosaminas, frente al 15'35, 0'85, 0'38 y 0'36% respectivamente en la leche de vaca. La micela caprina contiene menor proporción de ácido glutámico y más histidina que la de origen bovino. Ono y Creamer (1986) observan que, en comparación con la leche de vaca, en leche de cabra la micela presenta mayor diámetro medio, mayor dispersión de tamaño y mayor mineralización. También observan un menor grado de hidratación en las micelas

caprinas, hecho que podría explicar parcialmente la mayor sensibilidad al calor de este tipo de leche.

Según Raynal y Remeuf (2000), las micelas de caseína son más estables a la refrigeración que las de vaca, observándose menor grado de disociación de caseína y de *CCP* tras el almacenamiento en frío que en ésta última. En leche de cabra observan un descenso del tiempo de coagulación (*RCT*) tras la refrigeración que contrasta con el aumento observado en leche de vaca. Este hecho sugeriría que en leche de cabra la desmineralización causada por el frío ejerce un efecto limitante, de menor entidad, sobre la agregación de las micelas de caseína provocado por su alto grado de mineralización.

Las caseínas integrantes de las micelas en leche de cabra coinciden con las señaladas en leche de vaca: α_{S1}-, α_{S2}-, β- y κ-caseína (Ono y Creamer, 1986; Ono *et al*., 1989; Jaubert y Martin, 1992; Law *et al*., 1992; Law y Tziboula, 1992; Trujillo *et al*., 1998), si bien hasta finales de los 80 se creía que la leche de cabra no contenía caseína α_{S1} (Jenness, 1980; Grosclaude *et al*., 1987; Brignon *et al*., 1989; Mora-Gutiérrez *et al*., 1991). La contribución de estos 4 tipos de caseína al complejo micelar guarda una proporción de 1: 2: 5: 2 (Remeuf y Lenoir, 1985). Los cuatro tipos de caseína son polimórficos (Pirisi *et al*., 1994; Trujillo *et al*., 1997) al igual que en leche de vaca (Riel, 1991).

La β-caseína es la caseína más abundante en leche de cabra (Richardson y Creamer, 1974; Quiles y Hevia, 1994), presentándose en mayor proporción que en vaca (Law y Tziboula, 1992). La β-caseína de cabra es más soluble que la de vaca y a bajas temperaturas se disocia más fácilmente de las micelas (Riel, 1991; Trujillo *et al*., 1997). En leche de cabra Richardson y Creamer (1974) identifican dos tipos distintos de β-caseína que difieren básicamente en su grado de fosforilación: β_1 (5 grupos fosfato) y β_2 (6 grupos fosfato). Chianese *et al*. (1993) dan a conocer cuatro diferentes posibilidades de fosforilación (3, 4, 5 y 6 grupos fosfato), mientras que Trujillo (1996) determina incluso cinco niveles.

El contenido de α_{S1}-caseína es mucho menor en leche de cabra que en leche de vaca (Law y Tziboula, 1992; Quiles y Hevia, 1994). Además su porcentaje es mucho más variable, oscilando entre el 4 y el 26%, frente a unos valores del 36 al 40% en leche de vaca (Clark y Sherbon, 2000). Mientras en leche de vaca el tamaño de la micela ha sido relacionado con el contenido de κ- y β-caseína (Riel, 1991), en la de cabra, se ha sugerido que el contenido de α_{S1}- y κ-caseína es el factor que condiciona el tamaño micelar (Pierre *et al*., 1998). En ambas especies, el contenido de κ-caseína es mayor en aquellas micelas de menores dimensiones (McGann *et al*, 1979; Davies y Law, 1983; Donnelly *et al*., 1984; Tziboula y Horne, 1995). Sin embargo, en leche de cabra las dimensiones de las micelas están influidas por el genotipo de la α_{S1}-caseína (Trujillo *et al*., 1998), que no parece influir significativamente en el diámetro de las micelas en la especie bovina (Lodes *et al*., 1996). Según Pierre *et al*. (1999), el tamaño medio de las micelas en leche de cabra con un contenido alto de α_{S1}-caseína oscila entre 27 y 154 nm, mientras que en variantes sin dicha caseína las dimensiones micelares llegan hasta 215 nm.

Tziboula y Horne (1999) determinan que las dimensiones medias de las micelas de caseína, en leche de cabra con alto y con bajo contenido de α_{S1}-caseína, oscilan respectivamente entre 160-280 y entre 210-320 nm. Pero el genotipo de la α_{S1}-caseína no sólo parece modular el tamaño micelar sino que también influye en el contenido total de caseína de la leche, ya que un descenso del contenido de esta caseína no parece ser compensado con un aumento de las restantes. El genotipo de la α_{S1}-caseína también tiene influencia sobre la fracción no proteica, especialmente sobre el contenido de lactosa, calcio y fósforo total. También observan, estos autores, que la proporción de β- y α_{S2}-caseína disminuye al disminuir el diámetro micelar. Otros investigadores también han mencionado el descenso del tamaño micelar al aumentar el contenido en α_{S1}-caseína (Tziboula, 1995, Trujillo *et al*., 1998).

Al igual que en leche de vaca por su funcionalidad la κ-caseína es la que presenta más interés. Zittle y Custer (1966) la describen como una fracción glicoproteica, soluble en presencia de calcio a cualquier temperatura y con propiedades estabilizantes frente al calcio de las α_S-caseínas bovinas y caprinas. Presenta 171 aminoácidos (frente a los 169 de la de origen bovino) y una similitud del 84% con la κ-caseína de vaca (Trujillo *et al*., 1998). Al igual que la bovina, es una fracción proteica heterogénea que presenta 5 variantes (κ_1-κ_5) con diferente contenido glucídico, frente a las 7 aisladas en la κ-caseína de su homóloga bovina.

Según Trujillo *et al*. (1998) no existen diferencias en cuanto a su hidrólisis. La quimosina y otros enzimas coagulantes la fragmentan en el enlace Phe_{105}-Met_{106}, rindiendo la para-κ-caseína (1-105) o dominio hidrófobo y el *CMP* (106-171) que, al igual que en vaca, es muy polar y presenta carga negativa si bien posee dos grupos fosfato (posiciones 151 y 168) frente al *CMP* bovino, que sólo presenta uno (posición 149), y es rico en prolina e hidroxiaminoácidos.

Por su analogía morfológica la κ-caseína caprina presenta aptitudes funcionales similares a la de vaca. Por su insensibilidad al calcio, y su capacidad de interaccionar con el resto de caseínas en presencia de éste, es capaz de estabilizar las caseínas sensibles al calcio, para que formen micelas capaces de constituir una sistema coloidal estable con la fase acuosa de la leche. Además, su sensibilidad a la hidrólisis enzimática en el punto que separa los dominios polar e hidrofóbico, también le permite actuar como modulador de la coagulación de la leche.

II.2.4. Desestabilización micelar

Las micelas de caseína se encuentran en la leche en forma de dispersión coloidal estable. Si consideramos su tamaño presentan un alto grado de estabilidad al ser capaces de soportar largos períodos de conservación y tratamientos térmicos (estables hasta 140ºC) y mecánicos relativamente severos, siempre y cuando no se produzcan

determinados cambios de origen microbiano o químico. Las micelas se resisten a la asociación irreversible cuando se aproximan (Swaisgood, 1996), animadas por los movimientos brownianos. El hecho de que los gránulos de micelas de caseína obtenidos mediante sedimentación se redispersen espontáneamente en medio acuoso refleja su alta estabilidad. En definitiva, comparadas con casi cualquier otro sistema coloidal sintético, las micelas de caseína son extremadamente estables (de Kruif, 1999). Como se ha mencionado, dicha estabilidad reside en la capa pilosa constituida por los dominios polares de las moléculas de *κ*-caseína (Walstra, 1990; Holt, 1992; Holt y Horne, 1996). Ésta y otras funciones de la *κ*-caseína están reguladas por la estructura tridimensional que la proteína adopta en la cubierta externa micelar, que se desconoce en su mayoría ya que dicha proteína no ha podido ser cristalizada (Swaisgood, 1996; Creamer *et al*., 1998). Actualmente se acepta de forma unánime que los residuos superficiales de *κ*-caseína de la superficie micelar existen de forma natural (Walstra, 1990; Creamer, 1991; Holt, 1992).

Las micelas de caseína, en definitiva, se pueden considerar como un coloide de asociación con un interior formado por los dominios hidrófobos de las diferentes caseínas. Dicho coloide estaría estabilizado gracias a la existencia a una capa filamentosa formada por los fragmentos hidrófilos de *CMP* de la *κ*-caseína, cargados negativamente y por lo tanto fuertemente hidratados, que se agrupan en la superficie de la partícula y se proyectan sobre la fase acuosa **(Figura II.2.4.*1*)**.

Por su estructura, la capa pilosa es calificada de "cepillo polielectrolítico" por de Kruif (1999). Esta cubierta actúa en la superficie de la micela como una interfase entre las caseínas hidrofóbicas del interior y el medio acuoso externo, por lo que, la estabilidad de las micelas nativas de caseína y las interacciones que se establecen entre ellas residen mayoritariamente en su estructura superficial. La *κ*-caseína también se ve involucrada en reacciones de intercambio disulfuro, catalizadas por grupos tiol, con las proteínas del suero durante los tratamientos térmicos, y tras la hidrólisis enzimática controla la coagulación de la leche (Creamer *et al*., 1998).

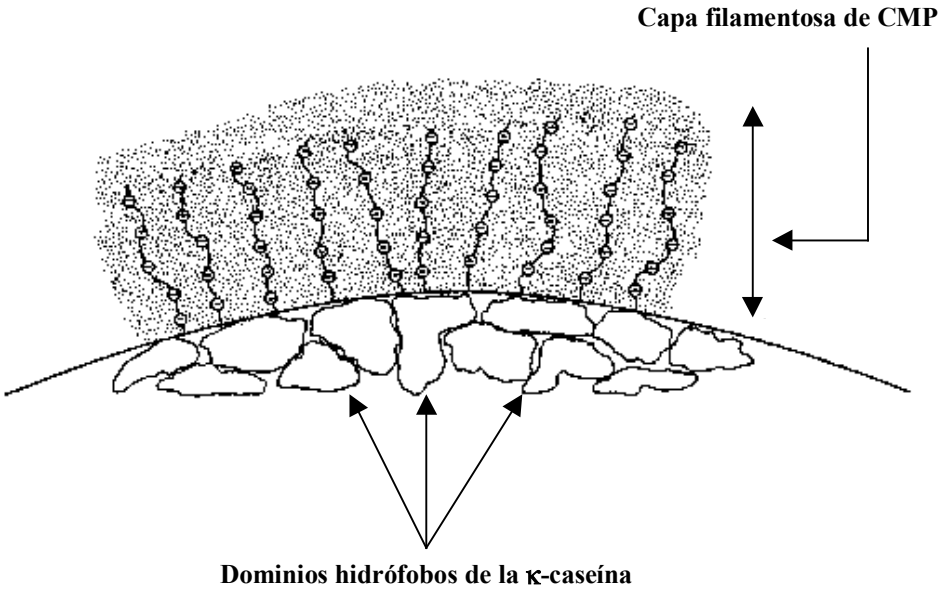

Figura II.2.4.*1*. Dibujo esquemático de la capa filamentosa.
Los pequeños puntos representan los iones salinos en disolución. *CMP*, caseinomacropéptido.
Reproducido de de Kruif (1999).

Parece que existen indicios que permiten a de Kruif y Roefs (1997) suponer que también la *β*-caseína participa en la estabilización micelar, especialmente a bajas temperaturas. La existencia de la capa pilosa ha sido demostrada mediante el cambio del diámetro hidrodinámico micelar, medido mediante reflectancia difusa dinámica durante la coagulación de la leche (Walstra *et al*., 1981). Ésta y sucesivas experiencias han permitido estimar el grosor de la capa pilosa en sistemas micelares muy diluidos en unos 5 nm (Horne, 1984; Holt y Dalgleish, 1986; Griffin, 1987). No obstante, en leche concentrada Horne y Davidson (1986) observan un grosor mayor, de aproximadamente unos 10 nm. Estudios realizados por Holt y Dalgleish (1986) sugieren que un reducido número de moléculas de *κ*-caseína participan en la formación de la capa pilosa, que no debe tener más de 12 nm de espesor.

Lógicamente, el grosor depende de factores tales como la naturaleza de la fase continua, el pH o la hidrólisis enzimática (Dalgleish, 1998), hecho que ha sido confirmado recientemente por de Kruif (1999). Por otra parte y según (Dalgleish, 1998), la superficie micelar debe estar sólo parcialmente cubierta por moléculas de κ-caseína heterogéneamente distribuidas por la superficie. De esta forma, permite la estabilización frente a la aproximación de partículas grandes como otras micelas de caseína, a la vez que los pequeños huecos entre las moléculas de κ-caseína y las soluciones de continuidad debidas a su distribución heterogénea permiten un acceso relativamente sencillo a moléculas de dimensiones similares o menores a las de las proteínas individuales.

La comprensión de la estabilidad micelar en la leche requiere la descripción previa de las fuerzas que actúan entre las micelas (apartado **II.2.1.1**). Horne (1992) sugiere la existencia de cuatro mecanismos diferentes de interacción entre las micelas de caseína: atracción de van der Waals, estabilización electrostática (carga negativa superficial), estabilización estérica (capa filamentosa de *CMP*) y atracción de tipo hidrofóbico causado por la ordenación de las moléculas del solvente sobre las regiones hidrofóbicas de la superficie.

El potencial resultante de la interacción entre las fuerzas atractivas de van der Waals y las de repulsión electrostática se tratan normalmente mediante la teoría *DLVO* (apartado **II.2.1.1**). Puesto que la superficie micelar está cargada, dicha teoría es potencialmente útil para el estudio de la estabilidad micelar, por lo que ha sido aplicada por diferentes autores con dicho fin (Payens, 1966; Green y Crutchfield, 1971; Kirchmeier, 1973). El potencial electrostático superficial (ψ_0) ha sido estimado mediante la determinación de potencial zeta (Green y Crutchfield, 1971; Pearce, 1976; Darling y Dickson, 1979*a, b*). De estos estudios se desprende que los valores de ζ, en general próximos a –20 mV, dependen de la composición de la fase continua y disminuyen en magnitud absoluta a valores entorno a –10 mV como consecuencia de la acción del cuajo. Green (1973) determina para el valor de ζ –17 mV. Dalgleish (1984),

obtiene valores de ζ de –18 mV (a 25ºC) que descienden por debajo de –11 mV por efecto de la hidrólisis enzimática. Este autor también confirma que ζ depende de la concentración de Ca^{2+} y de la temperatura tanto en las micelas nativas como en las hidrolizadas. Más recientemente, Walstra y Jenness (1987) y Dickinson (1992) estiman valores más bajos: –13 mV (20ºC y pH = 6'7) y –14 $\pm$ 1 mV respectivamente.

La aplicación de la teoría *DLVO* presenta una serie de limitaciones para explicar, *per se*, las interacciones existentes entre las micelas y no contempla todos los aspectos de la estabilidad micelar, hecho que ha sido revisado por Dickinson (1992). Por una parte, parece claro que los efectos electrostáticos desempeñan un papel, confiriendo estabilidad a la dispersión micelar; p. ej., la coagulación mediante adición de un ácido podría considerarse un sencillo caso de neutralización de carga, en la que el potencial de superficie de las partículas disminuye conforme desciende el pH hasta el pH_i de 4'6. Otro motivo que sugiere fuertemente la existencia de estabilización electrostática es la reducción del valor de ζ micelar en un 40 a 50% como consecuencia directa de la hidrólisis enzimática. Sin embargo, el valor de ζ de las micelas nativas parece ser demasiado pequeño para conferirles el alto grado de estabilidad que les es propio.

En general los coloides liófobos con un potencial $\zeta < -20$ mV son muy inestables (Darling y Dickson, 1979*b*), por lo el valor ζ de las micelas lácteas es demasiado pequeño para explicar su gran estabilidad sobre las bases de la teoría *DLVO* (van Hooydonk y Walstra, 1987; Dickinson, 1992; McMahon y Brown, 1990). La ausencia de coagulación de las micelas de caseína en presencia de iones divalentes a concentraciones superiores a las establecidas por la regla de Schulze-Hardy, un corolario de la teoría *DLVO*, también indicaría que la estabilización de las micelas no puede ser sólo explicada mediante esta teoría (Payens, 1979). Mediante la teoría *DLVO* Payens (1977) estimó la existencia de una barrera de energía, localizada a una distancia de 0'1 nm de la superficie de la micela, lo que es de difícil interpretación física si consideramos la rugosidad de la micela y el espesor de la capa pilosa. Las deficiencias de ésta teoría para explicar la estabilidad de la micela no deben sorprender, si se tiene en

cuenta que su estructura es porosa y heterogénea y con pilosidades irregularmente distribuidas sobre una superficie no uniforme. No obstante, el hecho de que la teoría *DLVO* no pueda explicar por sí misma la estabilidad micelar no necesariamente significa que las fuerzas electrostáticas no desempeñen una función estabilizante. La estabilidad al etanol de las micelas de caseína depende de la presencia de iones de calcio, lo que indica que las fuerzas electrostáticas tienen importancia en dicha función (Horne, 1992).

Por su estructura filamentosa e hidrófila superficial, cabría esperar que las micelas presentasen también estabilidad de naturaleza estérica. Si añadimos un disolvente menos polar que el agua como etanol fácilmente se produce agregación micelar, lo que sugiere fuertemente la existencia de dicho tipo de estabilización (Payens, 1989). Actualmente se cree que la estabilización estérica es la más importante en las micelas de caseína (Walstra, 1990; de Kruif *et al*., 1992; Holt, 1992; Horne y Davidson, 1993; Holt y Horne, 1996; de Kruif, 1999). Como ya se ha indicado, si las cadenas filamentosas responsables de la estabilización estérica son de naturaleza polielectrolítica, existe también una contribución electrostática a la repulsión estérica. Este es el caso de las cadenas de *CMP* micelares, que previenen la agregación mediante repulsión estérica y electrostática (Dickinson, 1992; Walstra, 1999). Las cadenas que proporcionan estabilización estérica presentan carga. A la fuerza iónica de la leche la capa eléctrica doble es superior a 1'1 nm (apartado **II.2.1.1**), es decir, menor que el espesor propio de la capa pilosa (5-12 nm); lo que significa que es la carga de las cadenas de *CMP* la que contribuye predominantemente a la estabilización tipo *DLVO* más que las cargas internas, que son apantalladas por los contra-iones residentes en el interior de la cubierta de *CMP*. Asumiendo una combinación de interacciones tipo *DLVO* y de estabilización estérica, el potencial total de interacción (u_{Total}) corresponde a:

$$u_{\text{Total}}(h) = u_{\text{R}}(h) + u_{\text{A}}(h) + u_{S}(h) \qquad \text{(II.2.4.}\textit{1}\text{.)}$$

donde u_R es el potencial de repulsión debido a la capa eléctrica doble, u_A es el potencial de atracción causado por las fuerzas de van der Waals, u_S es el potencial de repulsión estérica y h es la distancia entre las superficies de las partículas.

De Kruif (1999) afirma que la estabilidad y extensión de la cubierta filamentosa depende de diversos factores tales como: a) acción de la quimosina que disminuye la densidad de la capa pilosa mediante hidrólisis de la κ-caseína y consiguiente liberación del *CMP*; b) densidad de carga a lo largo de las pilosidades que depende del pH y de la presencia de iones y c) de la polaridad de la fase continua que puede variarse mediante adición de solventes apolares. La capa se colapsará sobre la superficie de la micela, en mayor o menor medida, siempre que disminuya la densidad de la capa pilosa, descienda la densidad de carga por adición de H^+ (ácidos) o de Ca^{2+} o decrezca la polaridad de la fase continua. Como la capa filamentosa sólo es capaz de proporcionar estabilidad si está extendida, la micela disminuye o pierde su estabilidad coloidal y se inicia la agregación.

Por último, ya que las interacciones hidrofóbicas son uno de los mecanismos más importantes de cohesión entre las caseínas de la micela y puesto que desempeñan una importante función al unir unas micelas con otras durante la coagulación, las fuerzas hidrobóbicas podrían también contribuir al potencial de interacción entre las micelas (Lomholt, 1996).

II.2.5. Gelificación

Una vez que la desestabilización del sitema coloidal micelar ha tenido lugar, se produce la coagulación de la leche, es decir una transición sol-gel de carácter generalmente irreversible. En 1949 Bungenberg de Jong define un gel como un sistema coloidal de carácter sólido en el que las partículas coloidales constituyen una estructura coherente embebida por la fase líquida. Posteriormente las descripciones de la palabra gel se sucedieron en definiciones cada vez más intrincadas y excesivamente

preocupadas por aspectos terminológicos, lo que condujo a Flory (1974) a recuperar la cita atribuida a Lloyd en la década de los 20 que considera que gel es aquella condición que se puede reconocer con más facilidad que definir.

Desde un punto de vista estrictamente reológico, podemos definir un gel como un sólido viscoelástico (Horne, 1999). En palabras de dicho autor, esta definición contempla la definición de Bungenberg de Jong en la que la estructura tridimensional es capaz de responder a fuerzas mecánicas de forma similar a la esperada para un sólido y también contiene la definición de Lloyd y la de Flory, cuando se percibe que la red espacial, que soporta el gel, se ha constituido y que las propiedades elásticas del gel dominan a las viscosas. Walstra (1996) completa la definición reológica de un gel al descrbirlo como un material que necesita la aplicación de una tensión o esfuerzo umbral -fuerza/área- para que se produzca deformación permanente "yield strees", que presenta propiedades viscoelásticas y que tiene un módulo moderado (en general $< 10^6$ Pa). Cuando se aplica una tensión reducida el gel se comporta elásticamente, esto es, se deforma instantáneamente y conserva esa forma durante la actuación de la tensión, para recuperar su forma original inmediatamente que la tensión cesa. Con una tensión mayor, el material puede presentar comportamiento viscoso: primero se deforma elásticamente pero después comienza a fluir, y tras eliminar la tensión sólo recupera parcialmente su forma original.

También podemos abordar el concepto de gel desde una perpectiva más estructural. Si un segmento de una cadena polimérica o un agregado de moléculas reacciona con otro y estos se unen, el peso molecular medio (M_w) aumenta al igual que el número de uniones formadas. Con el tiempo M_w va aumentando hasta que se hace "infinito". En dicho momento, que se denomina punto de gelificación, la estructura se ha expandido hasta abarcar todo el espacio que ocupaba el líquido (Ross-Murphy, 1995). Un gel, en general, se puede considerar como una estructura polimérica constituida por un entramado tridimensional "infinito" de cadenas o de agregados, que adquieren dimensiones macroscópicas. El soporte estructural del gel se podría entender

intuitivamente como una macromolécula tan grande y enmarañada que ocupa todo el volumen del líquido inicial y retiene el agua en su interior.

La definición del punto de gelificación se aborda mejor desde una perspectiva reológica. La reología se relaciona con la deformación y flujo de la materia (Aguado, 1999) y estudia la relación entre las fuerzas externas (fuerza por área) ejercidas sobre un material y la consiguiente deformación relativa en función del tiempo (van Vliet, 1999).

Desde un punto de vista reológico, los materiales se clasifican en: *material líquido o viscoso ideal*, cuando la energía aplicada se disipa en forma de calor; *material sólido o elástico ideal*, si la energía aplicada se acumula en las uniones del material y *materiales viscoelásticos*, combinación de los dos anteriores. Según van Vliet (1999), los materiales viscosos ideales comienzan a fluir cuando se aplica una fuerza y tras cesar ésta no recuperan la forma, mientras que los materiales elásticos sufren una deformación instantánea y finalmente recuperan su forma inicial. La leche presenta características viscosas, pero durante la gelificación se trasforma en un gel de características claramente viscoelásticas.

Uno de los ensayos reológicos más utilizados para el estudio de la coagulación de la leche, y que también ha sido propuesto para la determinación del punto de gelificación, es el ensayo dinámico especialmente útil en los ensayos de pequeña deformación. De acuerdo con van Vliet (1999), en un test dinámico o armónico la muestra sufre una deformación tangencial o de cizalla (γ) que varía sinusoidalmente en función del tiempo (t) y de la frecuencia angular (ω):

$$\gamma(t) = \gamma_0 \; sen(\omega t) \qquad \text{(II.2.5.1)}$$

Si la amplitud de la deformación (γ_0) es suficientemente pequeña para que las relaciones entre la fuerza y la deformación permanezcan lineales se demuestra que la

tensión de cizalla (σ), que aparece en la muestra como reacción, es también una función sinusoidal del tiempo, pero desfasada un ángulo (δ), conocido como ángulo de fase:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \ sin(\omega t + \delta) = \sigma_0 [(\cos \delta \text{ sen } \omega t) + (\text{sen } \delta \cos \omega t)] \qquad \text{(II.2.5.2)}$$

Para un sólido elástico ideal, δ se encuentra en fase con γ, porque δ es máximo cuando γ es máxima, siendo δ = 0º. En un líquido viscoso δ se encuentra 90º fuera de fase, porque δ es máximo cuando γ es mínima, siendo δ = 90º (*IDF/FIL*, 1991). Según Bohlin *et al*. (1984), la leche es un fluido viscoso (δ = 90º), mientras que los geles lácteos presentan un δ de aproximadamente 15º. Para una materia viscoelástica 0º < δ < 90º (*IDF/FIL*, 1991). Para un material viscoelástico lineal, σ_0 es proporcional *a* γ_0 y la ecuación (II.2.5.*2*) se puede reorganizar como sigue:

$$\sigma(t) = \gamma_0 \left[\left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) (\cos \delta \text{ sen } \omega t) + \left(\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) (\text{sen } \delta \cos \omega t) \right] \qquad \text{(II.2.5.3)}$$

Así la tensión de cizalla se divide en dos términos, el primero correspondiente al componente elástico en fase con la deformación y el segundo, 90º fuera de fase, o componente viscoso. Para facilitar su estudio necesario definir los módulos de rigidez:

$$G'(\omega) = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \qquad \text{(II.2.5.4)}$$

$$G''(\omega) = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} sin \ \delta \qquad \text{(II.2.5.5)}$$

donde *G*' es el módulo de almacenamiento o módulo elástico y G'' es el módulo de pérdida o módulo viscoso. Insertando las ecuaciones (II.2.5.*4*) y (II.2.5.*5*) en la (II.2.5.*3*) obtenemos:

$$\sigma(t) = \gamma_0 \left[(G' \text{sen } \omega t) + (G'' \cos \omega t) \right] \qquad \text{(II.2.5.6)}$$

El componente elástico, el módulo de almacenamiento, se asocia con el almacenamiento y la liberación de energía durante un período de aplicación de la deformación. El componente viscoso, el módulo de pérdida, se relaciona con la disipación de energía en forma de calor.

De las ecuaciones (II.2.5.*4*) y (II.2.5.*5*) se deduce que:

$$tan\, \delta(\omega) = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \qquad \text{(II.2.5.7)}$$

El parámetro tan δ se conoce como factor de pérdida. Un valor alto de dicho factor (G'' > G' y por tanto tan δ > 1 y δ > 45º) significa que el material es relativamente más viscoso que elástico. Un aumento del factor de pérdida se interpreta como una relajación de enlaces que conduce a un comportamiento más viscoso y menos elástico (Zoon *et al*., 1988*a*).

Podemos definir las funciones de viscosidad dinámica correspondientes al almacenamiento de energía (μ') y a la fricción (μ''):

$$\mu' = \frac{G''}{\omega} \qquad \text{(II.2.5.8)}$$

$$\mu'' = \frac{G'}{\omega} \qquad \text{(II.2.5.9)}$$

Las parejas de variables *G*', *G*'', μ' y μ'' se agrupan definiendo variables complejas, G^* o módulo complejo de rigidez y μ^* o módulo complejo de viscosidad:

$$G^* = G' + iG'' \qquad \text{(II.2.5.}10\text{)}$$

$$\mu^* = \mu' + i\mu'' \qquad \text{(II.2.5.}11\text{)}$$

Para un material viscoso ideal, μ'' = 0 y por tanto $\mu^* = \mu' = \mu$, donde μ es la viscosidad. Para un material elástico ideal G'' = 0, luego $G^* = G' = G$, siendo G el módulo de rigidez.

En los ensayos dinámicos las variables G', G'' y δ, obtenidas mediante un reómetro, permiten analizar la transición del estado sol al estado gel. En el estado fluido G'' será mayor que G' (Ross-Murphy, 1995). Tras el período de latencia inicial, tanto G'' como G' empiezan a crecer, siendo G' la que más rápido lo hace. Lógicamente, y tras un determinado intervalo de tiempo, se produce un cruzamiento y G' supera a G''. Posteriormente, G' continúa creciendo pero G'' alcanza un máximo parabólico y después empieza a disminuir.

Son numerosos los criterios reológicos que han sido propuestos para la estimación del punto de gelificación. A menudo G^* es referido informalmente como la dureza del gel, al ser proporcional al número de enlaces formados (Carlson *et al*., 1987*d*, Ross-Murphy, 1995). Por debajo del punto de gelificación G^* es cero y tras dicho punto su valor aumenta lentamente al principio y rápidamente después, hasta alcanzar una meseta. De esta forma se puede estimar el punto de gelificación como el momento en el que G^* empieza a ser detectable. Se puede considerar el punto de gelificación como el momento en el que la señal procedente de la muestra supera el ruido de fondo. Otros criterios serían cuando G' es mayor que un valor umbral predeterminado o cuando G' se vuelve mayor que G'' (o δ se hace menor que 1, lo que tiene lugar en el denominado punto de cruce).

Según Almdal *et al*. (1993) en un gel G' y G'' deben ser independientes de ω, es decir, deben mostrar un espectro mecánico (comportamiento de G' y de G'' en función

de ω en una representación doble-logarítmica) plano en un experimento oscilatorio. Puesto que para la disolución de un polímero *G*' debe ser proporcional a ω^2 y *G*''a ω, el paso de sol a gel requiere el cambio del exponente en una representación doble-logarítmica de ω *vs*. *G*' o *G*'', de 2 a valores próximos a 0 para G', y de 1 hasta aproximadamente 0 para *G*''.

Winter y Chambon (1986) sugieren un criterio más adecuado para estimar el punto de gelificación cuando en un ensayo dinámico de barrido de frecuencias tanto *G*' como *G*'' presentan un comportamiento exponencial con un exponente *n* igual y del mismo signo. Es decir, en el punto de gelificación $G' = K_1\omega^n$ y $G'' = K_2\omega^n$, si bien las constantes de proporcionalidad K_1 y K_2 no son generalmente iguales. El punto de gelificación determinado mediante el criterio de Winter-Chambon no necesariamente corresponde con el punto de cruce de un ensayo dinámico realizado a una única frecuencia.

Los geles se forman de distinta manera dependiendo de la naturaleza del material que gelifica. Walstra (1990) clasifica los geles en dos grupos: geles poliméricos y geles de partículas. Los geles poliméricos se estudian frecuentemente mediante la "teoría del caucho" en la que se asume que las cadenas de polímeros entrelazadas son muy largas y pueden adoptar un gran número de conformaciones. La deformación del gel disminuye el número de conformaciones posibles y disminuye también la entropía (geles entrópicos). En cambio los geles particulados pueden formarse mediante agregación, inducida por cambios de pH, fuerza iónica, cualidades del disolvente, etc. En estos geles la pérdida de entropía durante la deformación es despreciable, y *G*' se debe a la deformación de los enlaces, un efecto entálpico; este tipo de geles son frecuentemente de naturaleza fractal. La relación entre el número medio de partículas de un agregado (N_p) y el radio del agregado *R* es:

$$N_P = (R/r)^D \qquad \text{(II.2.5.}\textit{12}\text{)}$$

donde r es el radio de las partículas primarias y D es una constante < 3, llamada dimensión fractal. Puesto que es menor de 3, los agregados se vuelven más ligeros (rarificados) al aumentar de tamaño. La fracción de volumen media de las partículas en un agregado (φ_{ag}) viene dado por la relación:

$$\varphi_{ag} \equiv \frac{N_p}{N_m} = \frac{(R/r)^D}{(R/r)^3} = (R/r)^{D-3} \qquad \text{(II.2.5.}\textit{13}\text{)}$$

en la que N_m es el número de partículas primarias que una esfera del mismo radio puede contener asumiendo un empaquetado compacto. Lógicamente cuando φ_{ag} disminuye R aumenta. Cuando φ_{ag} se iguala a la fracción de volumen de las partículas primarias del sistema φ, los agregados contactan dando lugar a la formación del gel, lo que define precisa e inequívocamente el punto de gelificación. Si el punto de gelificación así descrito coincide con el momento en el que el reómetro exhibe por primera vez una respuesta mensurable a la aplicación de una deformación, entonces nos debemos preguntar como se produce el incremento del módulo de rigidez en la estructura (Horne, 1999). Además de la teoría fractal otras teorías consideran la gelificación desde un punto de vista distinto. Así de Kruif *et al*. (1992) describen las micelas de caseína como esferas compactas que se vuelven "adhesivas" como consecuencia de la hidrólisis. Según este modelo, conocido como teoría *AHS* (adhesive hard sphere), el cambio inicial de viscosidad es consecuencia no de la agregación sino del incremento de las fuerzas de interacción que transforman a las micelas en esferas "pegajosas". En opinión de Horne (1999) este modelo es termodinámico en origen y por carecer de una escala específica de tiempo, no aporta información sobre la dinámica de formación de la red tridimensional proteica. Además, como en la teoría fractal, el desarrollo del módulo de rigidez durante la coagulación también parece estar fuera del ámbito de este modelo.

Walstra (1999) recientemente ha compendiado las características de los geles de caseína. Se puede inducir la gelificación de la leche mediante disminución del pH hasta el pH_i de las caseína (4'6), disminuyendo así la repulsión electrostática de las capas

dobles o mediante adición de una enzima proteolítica que elimina la capa de filamentos de *CMP* de la κ-caseína micelar, disminuyendo de esta forma la repulsión estérica. De esta manera parece que se forman agregados fractales ($D \approx 2'3$). En los geles de caseína existe una relación lineal entre el logaritmo del módulo y el logaritmo de la concentración de caseína en concordancia con su naturaleza fractal. Las micelas de caseína, que constituyen el gel, son deformables y las uniones que se establecen entre ellas son flexibles, por lo que los geles de caseína son bastante débiles y moldeables.

A temperaturas superiores a 20ºC, los geles enzimáticos de caseína, inician el proceso de sinéresis. La sinéresis acompaña a la reestructuración de la red tridimensional de partículas, que implica cierto grado de desagregación y formación de nuevos enlaces. En las zonas internas que no pueden expulsar el suero la reestructuración también ocurre, lo que condiciona la aparición de regiones más o menos densas. Esto se conoce como microsinéresis, que lleva unido un aumento de la permeabilidad y el estiramiento de las cadenas de la red proteica.

II.2.6. Coagulación enzimática

El proceso de coagulación de la leche es una fase esencial en la elaboración de cualquier tipo de queso, ya que el resto de fases de elaboración se ven, en mayor o menor medida, condicionados por el tipo de coagulación que se haya realizado y por las condiciones en las que ésta tiene lugar. Por este motivo la coagulación afecta considerablemente al rendimiento y la calidad del producto (van Hooydonk y Walstra, 1987). Desde un punto de vista tecnológico y en base al agente empleado para inducir la coagulación, ésta puede ser ácida, enzimática o mixta.

En el proceso de coagulación enzimática se distinguen claramente dos fases: la fase de desestabilización del sistema coloidal micelar, conocida como fase primaria o enzimática y la fase de formación del gel o no enzimática, que ocurre como

consecuencia de la agregación de las micelas desetabilizadas y las reacciones de consolidación y endurecimiento del gel.

La fase de desestabilización enzimática se produce como consecuencia de la acción hidrolítica de proteasas -de origen animal, vegetal, microbiano o de ingeniería genética- sobre el enlace Phe_{105}-Met_{106} de la κ-caseína, en la superficie de la micela. Dicha acción, que probablemente se realiza de forma aleatoria (van Hooydonk y Walstra, 1987; Dalgleish, 1988*a*), conduce a la liberación del dominio polar de la proteína, el *CMP*, con disminución de la densidad de la capa pilosa y colapso de la misma. En definitiva, la pérdida del *CMP* superficial produce un efecto doble. En primer lugar, una disminución de un 40-50% del potencial ζ que reduce considerablemente la repulsión electrostática; en segundo lugar, un descenso de unos 5 nm en el radio hidrodinámico (Walstra *et al*., 1981) que refleja el colapso de la capa pilosa con pérdida de la repulsión estérica. Según Lomholt (1996) parece que la estructura interna de la micela no se ve modificada por la acción enzimática.

Varios autores han demostrado que la hidrólisis de la κ-caseína se ajusta a una cinética de Michaelis–Menten (Garnier, 1963; Carlson, 1982; Dalgleish, 1993):

$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{Km + [S]} \qquad \text{(II.2.6.1)}$$

donde

V_{max} = máxima velocidad de hidrólisis (por saturación de los centros del enzima con el sustrato),
K_m = constante de Michaelis-Menten y
$[S]$ = concentración de sustrato a tiempo t.

Cuando se cumple $[S] >> K_m$, entonces $-d[S]/dt = V_{max}$, esto es, la reacción de hidrólisis se aproxima a una cinética de orden cero y la velocidad es independiente de la concentración de sustrato, mientras que si $K_m >> [S]$ la reacción es de orden uno, por lo que la velocidad de hidrólisis es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Van Hooydonk y Walstra (1987) revisan los parámetros cinéticos de la hidrólisis realizada por la quimosina en diferentes sustratos. Para la hidrólisis enzimática desarrollada por la quimosina sobre la κ-caseína presente en la leche se sugieren valores de K_m entre 0'001 y 0'05 mM. Según Stryer (1988) y Lehninger (1987), el valor de K_m para un enzima determinado depende de cada sustrato particular y de su estructura, así como del pH, la temperatura y la fuerza iónica.

Si se analiza la variedad de efectos observados en la bibliografía -en relación con la influencia de la concentración de proteína sobre el *RCT* y la diversidad de condiciones experimentales en las que los trabajos de investigación han sido realizados (ajuste/no ajuste del pH, proporción constante o no de la relación enzima/proteína, método de ajuste proteico,…)-, obviamente, no podemos saber con certeza el orden de la reacción enzimática bajo el que ha sido realizada la hidrólisis en cada caso. Es decir, que en la leche se podrían dar situaciones en las que la cinética de la hidrólisis podría, bajo determinadas condiciones, reducirse a una reacción de orden cero o de orden uno, en función de la relación entre K_m y $[S]$, que depende a su vez de numerosos factores.

Parece más frecuente que en la leche $K_m >> [S]$, lo que reduciría la hidrólisis a una reacción de orden uno, de acuerdo con numerosos autores que afirman que habitualmente una reacción de primer orden describe de forma correcta la reacción de hidrólisis enzimática (van Hooydonk *et al*., 1984, 1986*a*; van Hooydonk y Walstra, 1987; Lomholt, 1996; López *et al*., 1997*a*; Mellema *et al*., 1999). Pero también hay autores como van Hooydonk *et al*. (1984), Saputra (1992), Hyldig (1993) y Lomholt (1996) que observan que la constante de velocidad de hidrólisis no sólo no aumenta con la concentración de proteína (cinética de orden uno), ni se mantienen constante (cinética de orden cero), sino que más bien disminuye. Este inesperado descenso en la constante

de hidrólisis ha sido atribuido por van Hooydonk *et al*. (1984) a una disminución de la velocidad efectiva de difusión de la enzima debido al aumento de la concentración proteica, lo que coincide con Muhr y Blanshard (1982) que afirman que la velocidad de difusión de un soluto en una disolución de polímeros depende de la concentración de dichos polímeros, y con lo publicado por Vélez-Ruiz y Barbosa-Cánovas (1998) y Reddy y Datta (1994), que señalan un aumento del coeficiente de consistencia de la leche concentrada y/o reconstituida en función de su contenido en sólidos.

Van Hoooydonk *et al*. (1984) propuso un modelo de difusión, en base a un modelo de primer orden, para describir la hidrólisis enzimática de la κ-caseína en leche, en el que la velocidad de difusión de la enzima hacia la superficie de las micelas de caseína controla la velocidad de la reacción y el sustrato, unido a la superficie micelar, se desplaza más despacio que la molécula de la enzima. Estos resultados son similares a los obtenidos posteriormente por Saputra (1992).

La fase de formación del gel o no enzimática se inicia con la agregación de las micelas desestabilizadas por la acción enzimática para formar una red tridimensional que va endureciéndose hasta dar lugar al gel definitivo. Peri *et al*. (1990) afirma que la agregación empieza al mismo tiempo que la hidrólisis, aunque Dalgleish (1979) discrepa considerando que la agregación no comienza hasta que un 86-90% de la κ-caseína ha sido hidrolizada. Dicho autor asegura que una micela individual no puede participar en la agregación hasta que la hidrólisis afecta al menos a un 97% de su κ-caseína.

La **Figura II.2.6.*1*** muestra de forma esquemática el ataque de la quimosina (pequeños círculos) sobre las micelas de caseína (círculos grandes). En general, la mayor parte de los autores coinciden en señalar que el inicio de la agregación tiene lugar entre el 60 y el 80% de hidrólisis (Carlson *et al*., 1987*a*, *b*; Dalgleish, 1993; Lomholt y Qvist, 1997).

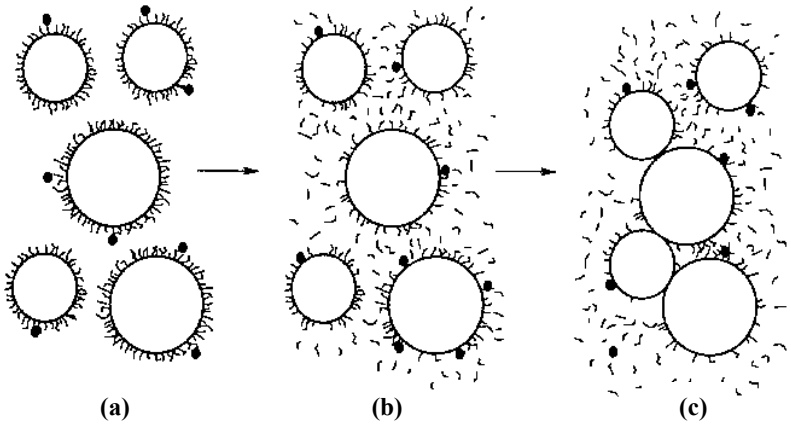

Figura II.2.6.*1*. Dibujo esquemático de la hidrólisis y el inicio de la agregación.
Reproducido de Dalgleish (1993).

En la **Figura II.2.6.*1*** se ilustran momentos diferentes de la reacción. En **(*a*)** el *CMP* de la cubierta pilosa se encuentra intacto y la quimosina acaba de ser añadida; en **(*b*)**, tras un determinado tiempo, una cantidad importante de la *κ*-caseína ha sido hidrolizada y el *CMP* ha sido liberado a la disolución, pero la porción intacta de la cubierta pilosa aún es capaz de prevenir la agregación; en **(*c*)** la mayor parte de la *κ*-caseína ha sido hidrolizada y las micelas han iniciado el proceso de agregación.

Una vez que Payens (1976) y Payens *et al*. (1977) utilizaron por primera vez la ecuación de von Smoluchowski (1917) para describir la cinética de agregación, diversos autores proponen diferentes modelos basados en dicha ecuación. Lomholt (1996) ha realizado una amplia y rigurosa revisión de los mismos.

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

(debida a von Smoluchowski) asume la ausencia de cualquier barrera energética ($u_{\mathrm{TOTAL}} = 0$) , esto es:

$$u_{TOTAL}(h) = u_R(h) + u_A(h) + u_S(h) = 0 \qquad \text{(II.2.6.2)}$$

siendo u_{TOTAL} el potencial total, u_{R} el potencial de repulsión debido a la capa eléctrica doble, u_{A} el potencial de atracción causado por las fuerzas de van der Waals, u_{S} el potencial de repulsión estérica y h la distancia entre las superficies de las partículas. Por la ausencia de una barrera de energía cualquier colisión conduce a un contacto permanente. El modelo asume que las partículas están animadas por movimiento brownianos y supone que la agregación sólo está controlada por la difusión. En el caso de un sol monodisperso y diluido de partículas esféricas de radio a la teoría de agregación rápida predice que la velocidad de agregación inicial debe seguir una cinética de segundo orden (Higuchi *et al*., 1987; Dickinson, 1992, Walstra, 1996):

$$-\frac{dn}{dt} = k_2 n^2 = 4\pi D\sigma n^2 \approx 8\pi Dan^2 \qquad \text{(II.2.6.3)}$$

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

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \qquad \text{(II.2.6.4)}$$

se obtiene el valor de la constante de agregación rápida:

$$k_2 = \frac{4kT}{3\eta} \qquad \text{(II.2.6.5)}$$

donde η (igual a μ) es la viscosidad de la fase continua. La condición de no-existencia de una barrera de energía no se sostiene cuando se aplica a las micelas de caseína. De hecho, Lomhlot *et al*. (1998) han estimado recientemente un valor para la barrera de energía contra la agregación >25 kT a la concentración normal de la leche. Esta barrera de energía es suficientemente alta para garantizar la estabilidad de las micelas (apartado **II.2.1**). Tras la hidrólisis de la κ-caseína la barrera de energía disminuye hasta 11 kT. Cuando las partículas presentan una barrera de energía ésta tienen que ser sobrepasada antes de que tenga lugar la agregación. Por este motivo la constante de segundo orden experimental suele ser menor que la que predice la ecuación (II.2.6.5). Entonces la constante de velocidad de agregación lenta (k_2^S) se puede expresar mediante la relación $k_2^S = k_2 / W$, donde W es el factor de estabilidad que corrige la constante de velocidad de agregación rápida cuando, como es el caso en las micelas de caseína, sólo una fracción de las colisiones conduce a agregación (Lomholt, 1996). El valor de W depende de $u_{\mathrm{TOTAL}}(h)$ y equivale a:

$$W \approx Ae^{(\phi/kT)} \qquad \text{(II.2.6.6)}$$

donde A es el factor colisional y ϕ es la altura de la barrera de energía. Lomholt (1996) hace una amplia revisión de modelos de agregación, todos ellos basados en la ecuación de von Smoluchowski (1917). Los modelos comparados sólo difieren en el mecanismo de descripción del cambio de la leche desde un sistema estable a otro capaz de sufrir agregación. A tal fin, ensaya diferentes expresiones para la constante de velocidad de agregación, que cambia durante el proceso de agregación en función de diversos factores como el tamaño de los agregados, el número de sitios de enlace, la barrera de energía, etc., sustituyéndolas en la ecuación de von Smoluchwski (1917).

La naturaleza del proceso de endurecimiento que finaliza la formación del gel con consolidación del mismo no es bien conocida. Así, McMahon *et al*. (1984*a*, *b* y *c*) afirman que en el punto crítico de gelificación, las partículas independientes que se movían y colisionaban de forma aleatoria, repentinamente cesan de moverse en libertad porque la organización de la red primaria dificulta los movimientos y colisiones aleatorios. En el momento de la coagulación sólo un 89% (Dalgleish, 1981) o un 90% (Fox y Mulvihill, 1990) de las micelas se han incorporado a la estructura tridimensional por lo que las micelas libres podrían tanto reaccionar con la matriz proteica como con otra partícula libre.

Knoop (1977) demuestra mediante microscopía la existencia de agregación continua de micelas de caseína durante las primeras 24 horas y Gunasekaran y Ay (1994) aseguran que la agregación continúa tras la formación del coágulo. Green *et al*. (1978) observan mediante microscopía y viscosimetría que cuando se alcanza el *RCT* la red primaria se sostiene mecánicamente porque las micelas agregadas se mantienen unidas mediante puentes, sin contacto directo entre las micelas. Pero esos puentes, cuya naturaleza exacta se desconoce, sufren un lento proceso de contracción, que acerca a las micelas entre sí hasta que contactan entre ellas y finalmente se funden unas con otras.

Por lo tanto existen una serie de procesos, distintos en cuanto a su naturaleza, como: incorporación no aleatoria de micelas a la red primaria una vez que se ha sobrepasado el punto de gelificación, lenta contracción de puentes inicialmente formados y fusión de las micelas, reorganización de la red con rotura de enlaces y formación de otros nuevos que podrían, individualmente o en conjunto, producir un aumento del número y del tipo y/o la fuerza de las uniones entre las caseínas que resultaría en incremento de la dureza del gel.

La reacción de endurecimiento, sea cual sea su naturaleza, ha sido mayoritariamente estudiada mediante la monitorización de los módulos de rigidez

durante el tiempo. El primer modelo para la descripción matemática del endurecimiento fue propuesto por Scott-Blair y Burnett (*1963b*):

$$G = G_{\infty} e^{-T/(t-t_{gel})} \qquad \text{(II.2.6.7)}$$

donde G es el módulo de rigidez, G_{∞} es el valor máximo teórico de G, T es el tiempo requerido tras el punto de gelificación para alcanzar un valor de $G = G_{\infty}/e$, e es la base de los logaritmos naturales, t es tiempo y t_{gel} es el tiempo de gelificación.

Este modelo se propuso inicialmente para ajuste de los datos experimentales de G obtenidos mediante un torsiómetro y posteriormente ha sido empleado para reproducir los datos de G obtenidos mediante el tromboelastógrafo y el formógrafo, así como los módulos de rigidez obtenidos mediante ensayos oscilatorios.

Posteriormente Tuszynski (1971) asume que la reacción de endurecimiento es autocatalítica:

$$\frac{dG}{dt^*} = kG\left(G_{\infty} - G\right) \qquad \text{(II.2.6.8)}$$

donde $t^* = t - t_{gel}$, los parámetros G , G_{∞}, t y t_{gel} poseen la misma significación que en el modelo anterior y k es la constante de velocidad.

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

$$G = G_{\infty}\left(1 - e^{-k\left(t-t_{gel}\right)}\right) \qquad \text{(II.2.6.9)}$$

donde G, G_{∞}, t y t_{gel} ya han sido definidos en los modelos anteriores y k es la constante de velocidad de reacción de primer orden. A diferencia de los dos modelos anteriores

que poseen una fase de aceleración seguida de otra de desaceleración, éste posee una sola fase (Noël *et al*., 1989). El modelo de Douillard ha sido empleado posteriormente por Tokita *et al*. (1980, 1981) y confirmado por Carlson *et al*. (1987*d*) entre otros.

La aplicación del modelo de Douillard ha sido amplia, habiéndose contrastado para ajuste de datos experimentales de *G* determinados con métodos tanto lactodinamométricos como reométricos. Los tres modelos de descripción del endurecimiento del gel comentados (Scott-Blair y Burnett, Tuszynski y Douillard) han sido empleados para la reproducción de datos experimentales de naturaleza óptica (Korolczuk, 1988).

La coagulación enzimática de la leche se ve afectada por numerosos factores que podríamos clasificar en dos grupos:

1. Factores tecnológicos directos, que en general son de fácil manipulación de forma previa al proceso de coagulación. Entre estos encontramos la temperatura, la concentración y el tipo de enzima, la adición de Cl_2Ca y el pH de la leche.

2. Factores que definen la actitud de la leche para la coagulación, que podemos dividir en dos subgrupos: a) Factores inherentes a la leche como la concentración de *CCP*, la relación Ca/(fosfato + citrato), la relación Ca/nitrógeno, la concentración de caseína, la dimensión de las micelas, la presencia/ausencia de mamitis y la presencia/ausencia de calostros. b) Tratamientos tecnológicos previos de la leche como la concentración (ultrafiltración, adición de caseína, etc.), la homogeneización, la aplicación de altas presiones, los tratamientos térmicos y la refrigeración.

Todos estos factores ejercen efectos de naturaleza e intensidad diversa sobre las distintas fases de la coagulación, tal y como se resume en la **Figura II.2.6.*2***.

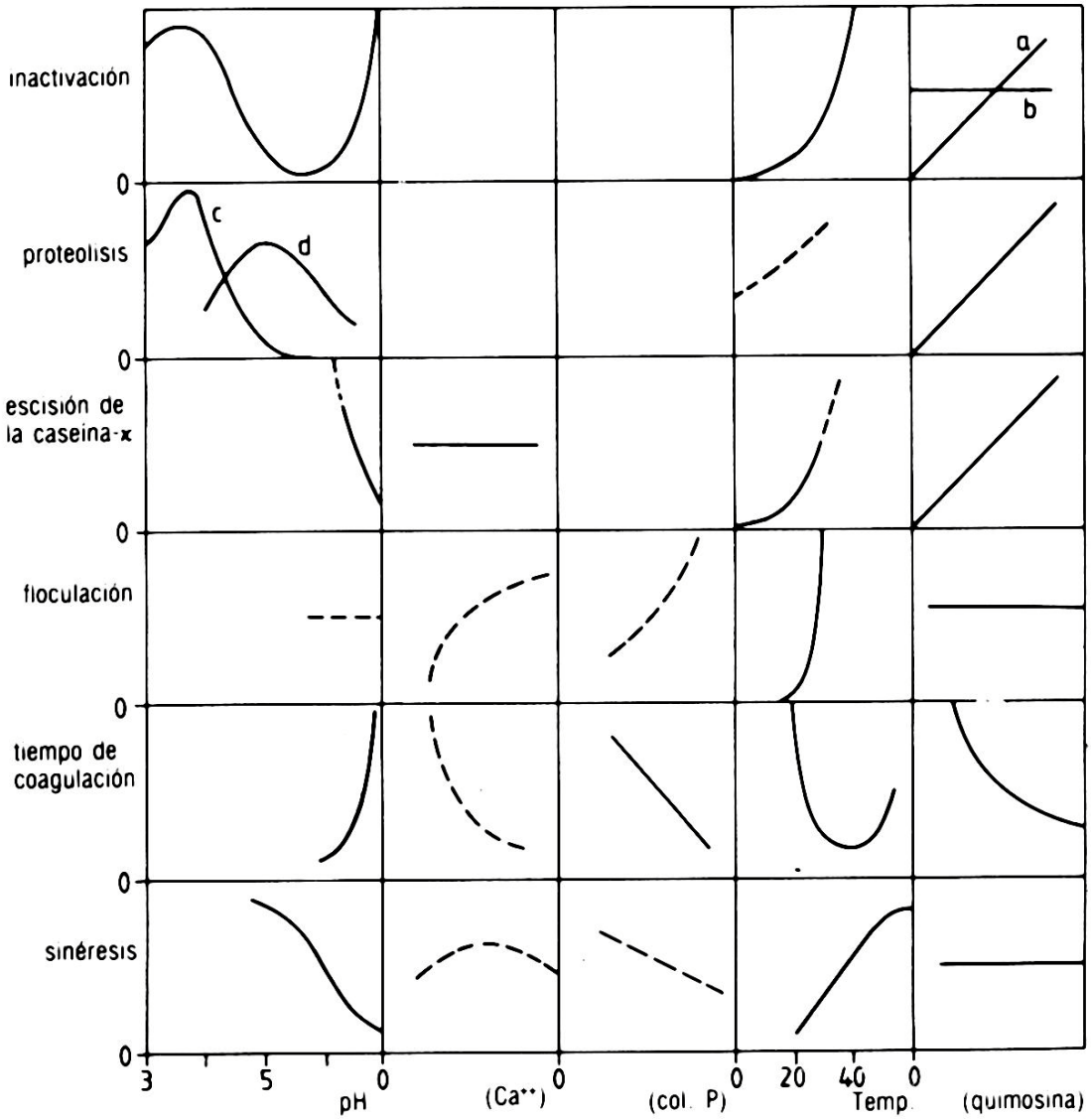

Figura II.2.6.*2*. Factores de la coagulación de la leche.
Efectos del pH, de la concentración de Ca^{2+}, del contenido de fosfáto cálcico coloidal, de la temperatura y de la concentración de quimosina, en la proteolisis, en la escisión de la κ-caseína, en la floculación de las micelas de paracaseína, en el tiempo de coagulación y en la velocidad de sinéresis. (*a*) A pH 3'5; (*b*) a pH 7; (*c*) durante tiempos breves en la proteína soluble; (*d*) durante un mes, por ejemplo, en el queso. Los espacios blancos significan efecto ausente o escaso. Las líneas de trazos son estimaciones aproximadas sólo con fines ilustrativos.
Reproducido de Walstra y Jenness (1987).

II.3. CORTE Y DESUERADO DE LA CUAJADA

Un gel enzimático mantenido en reposo, después de un tiempo variable y según las condiciones de su formación, al mismo tiempo que disminuye de volumen sufre una exudación espontánea en superficie en forma de pequeñas gotitas de lactosuero que lentamente se unen por coalescencia para constituir una fina capa líquida alrededor del coágulo (Weber, 1989). Este fenómeno mediante el cual se concentra el coágulo por eliminación de agua y de constituyentes solubles se denomina sinéresis, fenómeno común en la mayoría de los geles. El control de la sinéresis y especialmente la intensidad y velocidad del desuerado, influyen directamente sobre la humedad del queso afectando a las propiedades químicas, reológicas y organolépticas del mismo y condicionando las pérdidas de grasa y proteína en el suero (Castillo *et al*., 2000*a*).

Durante la coagulación enzimática las micelas conservan su estructura y la cuajada retiene la mayor parte del calcio y del fósforo (Dumais *et al*., 1991). Su carácter es fuertemente contráctil, elástico, cohesionado y poco permeable (Weber, 1989). Pese a que el coágulo enzimático presenta una alta contractibilidad, su pobre permeabilidad le confiere una escasa capacidad para el desuerado espontáneo (Veisseyre, 1988; Weber, 1989; Dumais *et al*., 1991) y una alta capacidad para los trabajos mecánicos. Por tanto, para que se inicie el desuerado es necesario realizar el corte de la cuajada enzimática y someter la mezcla de suero y cuajada a trabajo mecánico y/o tratamiento térmico.

El desuerado, definido en el apartado **II.1.2**, consta de dos etapas: el desuerado principal donde se elimina la mayor parte del lactosuero y que transcurre desde el corte del gel hasta el final del moldeado y el desuerado complementario que es principalmente debido al salado y secundariamente al oreo (Weber, 1989).

Según este último autor, las funciones básicas del desuerado son la obtención de la cuajada y la regulación de la humedad, del contenido en minerales y del contenido en lactosa de la cuajada. La desmineralización consiste en la solubilización progresiva del

calcio asociado a la caseína, que se produce bajo la acción del ácido láctico procedente de la fermentación de la lactosa. La cantidad de calcio que permanece en la cuajada condiciona las propiedades físicas del coágulo y el afinado. El deslactosado determina la proporción de lactosa que permanece en la cuajada, que a su vez influye sobre la desmineralización y el afinado. La intensidad de la desmineralización y el deslactosado dependen del tipo de coagulación, de la actividad de la fermentación láctica y de los factores del desuerado.

La intensidad y la cinética del desuerado dependen del equilibrio entre causas predisponentes y limitantes. Las causas predisponentes son la presión endógena o interna, ejercida por el suero retenido en la cuajada y favorecida por la contracción del coágulo (presión de contracción) y la presión externa debida a la gravedad y a los tratamientos mecánicos. Entre las causas que inhiben el desuerado se encuentra la resistencia al flujo, es decir, una baja permeabilidad. Según describe Spreer (1991), la sinéresis provoca en primer lugar la aparición de una tensión de contracción que estrecha las cavidades repletas de suero. Como consecuencia aumenta la presión a la que está sometido el suero (presión de contracción). Esta presión hace que se expulse el suero de las cavidades, dificultando su salida la resistencia que ofrece la red de paracaseinato. La magnitud de esta resistencia depende de la consistencia y permeabilidad del coágulo así como de la vía que emprenda el suero en su salida.

La cinética de la sinéresis corresponde a una reacción de primer orden (Peri *et al*., l985). Castillo *et al*. (2000*a*) confirman que la cinética de desuerado se ajusta a un proceso de primer orden y amplían dicho comportamiento cinético al proceso de eliminación de los componentes principales del suero (grasa, proteínas solubles y lactosa) a partir de la cuajada.

Weber (1991) clasifica los factores que afectan al desuerado en tres grupos:

1. Factores directos, que intervienen tras la formación del coágulo y que son de naturaleza física. A este grupo pertenecen los tratamientos mecánicos de la cuajada (corte, agitación y prensado) y los tratamientos térmicos (cocción).

2. Factores indirectos, que son responsables de la coagulación y determinan las propiedades de la cuajada e indirectamente su desuerado. Destacan la acidez de la cuajada y el enzima coagulante.

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

El corte de la cuajada es, por tanto, uno de los factores directos que afectan al desuerado, que supone la aplicación de presión mecánica en la cuajada para dividir el coágulo en porciones iguales, a fin de aumentar la relación superficie volumen favoreciendo la exudación del lactosuero (van den Bijgaart, 1988).

Al permitir la separación de las fases sólida y líquida, más o menos rápida, el corte de la cuajada condiciona la amplitud del desuerado, por lo que constituye un factor especialmente decisivo (Weber, 1989). El corte debe ser muy cuidadoso, en función de la fragilidad del coágulo. Los cuchillos o hilos de las liras de corte deben diseñarse de forma que no provoquen roturas innecesarias de la cuajada y deben manipularse lentamente, para realizar un corte limpio y disminuir al máximo la formación de "polvo de cuajada o finos de caseína", que son posteriormente drenados con el lactosuero disminuyendo el rendimiento final. Puesto que la pérdida de grasa y de finos se produce fundamentalmente en superficie por el tamaño de los glóbulos y de las partículas de finos, un corte limpio evita pérdidas de grasa y finos en comparación con un corte abrupto. Esto se debe a que si cortamos en cubos con caras de 1 cm^2, la superficie real de dicha cara aumenta si el corte es abrupto. El tamaño de los cubos de cuajada "granos" regula la intensidad del desuerado, de tal manera que los quesos frescos, que

requieren menos desuerado, se cortan en granos grandes y los quesos curados, se cortan en granos pequeños que intensifican el desuerado.

Por tanto, según el tipo de queso a elaborar, las características de la materia prima y las condiciones de coagulación, el maestro quesero debe elegir el momento óptimo de corte, el tamaño más adecuado de grano y fijar las condiciones de desuerado. En un coágulo de 1 m^3 el troceado en fragmentos cúbicos de 10 cm de arista desarrolla una superficie de exudación de 600000 cm^2 mientras que un troceado en fragmentos de 1 cm de arista proporciona una superficie de desuerado de 6000000 cm^2, que multiplica las posibilidades teóricas de desuerado por diez (Veisseyre, 1988).

Vemos por tanto, que el corte de la cuajada no sólo es imprescindible para el inicio del desuerado, sino que también influye sustancialmente al desarrollo del mismo, afectando decisivamente, entre otros factores, a la composición química del suero (Castillo *et al*., 1996) y por lo tanto de la cuajada. Una vez alcanzado el punto de gelificación, la dureza del gel evoluciona aumentando con el tiempo (Scott-Blair y Burnett, 1963*b*; Tuszynski, 1971; Douillard, 1973; Tokita *et al*., 1980, 1981; Carlson *et al*., 1987*d*). Por tanto debemos seleccionar el momento de dureza óptimo para el corte de la cuajada. Numerosos autores han convenido en las desventajas de una selección inapropiada del tiempo de corte, T_{cut}, (Bynum y Olson, 1982; Mayes y Sutherland, 1984; Hori, 1985; van Hooydonk y van den Berg, 1988; Hori *et al*., 1989; Payne *et al*., 1993*b*; Gunasekaran y Ay, 1996; Passos *et al*., 1999; Castillo *et al*., 2000*b*).

Para evitar los finos el corte debe hacerse cuando la cuajada está todavía fuertemente mineralizada, pero aún no ha alcanzado un grado excesivo de endurecimiento (Weber, 1989). Un corte prematuro de la cuajada, cuando ésta es excesivamente frágil, da lugar a una pérdida de rendimiento por aumento de finos y de grasa en el suero, mientras que un corte tardío produce un aumento de humedad de la cuajada y una disminución de calidad (Mayes y Sutherland, 1984; Hori, 1985; Riddell-Lawrence y Hicks, 1989; Payne *et al*., 1993*b*; Gunasekaran y Ay, 1996; Passos *et al*.,

1999; Castillo *et al*., 2000*b*). El aumento de la humedad se encuentra en relación con el llamado factor ρ (T_{cut} /*RCT*). Una dosis de cuajo y un factor ρ pequeños determinan poca cohesión en la cuajada por debilidad de los enlaces intermicelares. En estas condiciones, cuando ρ aumenta la cuajada se endurece debido al reforzamiento de los enlaces intermoleculares, y en consecuencia la sinéresis aumenta. Sin embargo, cuando el cuajo se emplea a dosis altas (1/10000; 0'3 mL L^{-1}), generalmente alcanzadas en la industria quesera, los enlaces se forman rápidamente, provocando un aumento rápido de la dureza del coágulo que le confiere una impermeabilidad creciente con el tiempo, por lo que al aumentar ρ la cuajada retiene más humedad (Weber, 1989).

Estudios en planta piloto realizados por Bynum y Olson (1982) y por Banks y Muir (1984) revelan que el rendimiento quesero no varía significativamente si se selecciona un T_{cut} menor que el óptimo. Según Bynum y Olson (1982), el procesado de una cuajada con un 30% más de dureza de lo normal aumenta el rendimiento quesero. Mayes y Sutherland (1984) afirman que conforme aumenta el tiempo comprendido entre la coagulación de la leche y el momento de corte, en leche coagulada bajo condiciones constantes, aumenta el rendimiento quesero por redistribución de la grasa. El rendimiento aumenta continuamente con el aumento de T_{cut}, pero con el aumento de T_{cut} en más de un 16% se corre un gran riesgo de que los beneficios económicos derivados del aumento de rendimiento se vean contrarrestados con los efectos negativos del aumento de humedad y de la pérdida de calidad.

Sin embargo, según dichos autores, cuando el corte se realiza más de un 10% antes la repercusión económica de las pérdidas de finos superaría los costes de un sistema de monitorización valorado en AU $16000. Otra conclusión de este trabajo es que las desviaciones por debajo del tiempo óptimo de corte, son más críticas en relación con el rendimiento y la calidad que las desviaciones por encima del tiempo óptimo.

De estos resultados se desprende que si al prolongar el momento del corte existe un aumento continuo del rendimiento y una pérdida de calidad; ambos factores pueden

ser optimizados mediante un método de predicción de T_{cut} adecuado con el fin de obtener el rendimiento máximo sin poner en peligro la calidad. Van Hooydonk y van den Berg (1988), afirman que según el tipo de cuba, se requiere diferente precisión en el control de T_{cut} para obtener la distribución de tamaños de partículas deseados. Estos autores estiman que la repetibilidad de un sistema objetivo de monitorización de T_{cut} debe ser de un minuto.

II.4. MÉTODOS NO ÓPTICOS DE PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE CORTE

En la industria se siguen habitualmente dos métodos de selección de T_{cut}. Generalmente el corte se realiza a un tiempo predeterminado o mediante la determinación subjetiva de las características de la cuajada, realizada por el maestro quesero en base a la estimación visual (Castillo *et al*., 2000*b*). Existen multitud de factores relativos tanto a la materia prima y sus tratamientos previos como al proceso de coagulación, que afectan al *RCT* condicionando la dureza de la cuajada y por tanto el tiempo óptimo de corte. El corte a un tiempo prefijado es cuestionable porque los factores que afectan a la dureza de la cuajada no permanecen constantes (Gunasekaran y Ay, 1996) y no son tenidos en consideración. El corte a un tiempo prefijado habitualmente oscila entre 2 y 3 veces el *RCT* determinado visualmente en cuba -tiempo de toma-, lo que equivale a unos 20 o 30 minutos en general.

Sin embargo, realizar el corte en base a la evaluación subjetiva del maestro quesero puede constituir una práctica adecuada y aceptable, si el maestro tiene suficiente experiencia y la realiza adecuadamente (Hori, 1985). La determinación de T_{cut} del maestro quesero se basa, principalmente, en la evaluación empírica y por tanto subjetiva de las propiedades reológicas del coágulo (rigidez, textura, elasticidad,…) mediante observación visual y táctil. Las pruebas que constituyen más frecuentemente el criterio de decisión visual son:

1. La cuajada se separa fácil y limpiamente de la pared de la cuba al presionarla con la palma de la mano, con los dedos o con un cuchillo o espátula de acero inoxidable.

2. Al marcar la palma de la mano sobre la superficie del coágulo, ésta se unta de suero, pero sin que se observen restos de cuajada adheridos a la piel.

3. Al introducir con trayectoria inclinada un cuchillo o espátula de acero inoxidable en la cuajada, y realizar un movimiento de palanca ascendente, el coágulo se fractura limpiamente, como si fuese de "porcelana", observándose que los lados que limitan el corte son lisos y que en el suero expelido y recogido en el interior del corte es amarillo, con pocos finos y transparente.

4. Una varilla de acero inoxidable se introduce y se deja descender verticalmente hasta que se detiene y no se balancea hacia los lados.

Como se ha mencionado anteriormente, todos estos métodos pretenden la evaluación reológica del gel de forma empírica. El entrenamiento no resulta en absoluto fácil. Por ende, la subjetividad de los métodos implica la existencia de considerables diferencias entre las estimaciones de diferentes maestros, aunque estos estén bien entrenados. Como consecuencia, la heterogeneidad de la rigidez seleccionada para el corte conduce a una resistencia diferente a los tratamientos mecánicos que afecta a la humedad, el rendimiento y la calidad.

El interés por la selección óptima de T_{cut} ha motivado a numerosos investigadores para el estudio y desarrollo de equipos que pretenden determinar, de forma objetiva, el tiempo óptimo de corte. La mayoría de los métodos propuestos se relacionan con la monitorización de la coagulación y del aumento de la dureza de la cuajada, puesto que pretenden reproducir el método visual.

Dependiendo de sus posibilidades de uso los podemos dividir en métodos on-line y métodos off-line. Atendiendo a la intensidad del daño que causan en la cuajada, los podemos calificar de destructivos o de no destructivos. Por último, en función de su naturaleza proponemos la siguiente clasificación: métodos reológicos, térmicos, de ultrasonidos y ópticos. En esta clasificación hemos contemplado los métodos que han derivado en medida efectiva de la dureza y/o determinación de T_{cut}, por lo que otros métodos de monitorización de la coagulación de menos interés para la predicción de T_{cut} no se contemplan, como p. ej., los métodos basados en la medida de la conductividad eléctrica (Dejmek, 1989; Paquet *et al*., 2000).

II.4.1. Métodos reológicos

Los métodos reológicos propuestos para la monitorización de la evolución de la dureza del gel son los más numerosos. Durante la coagulación aumentan tanto la viscosidad como el módulo de rigidez. La dureza de la cuajada está directamente relacionada con el módulo de rigidez, que representa la relación entre el esfuerzo y la deformación (Carlson *et al*., 1987*d*). Dado que el tiempo óptimo de corte se relaciona directamente con la resistencia a la deformación del coágulo, cabe esperar que éste pueda evaluarse mediante las propiedades reológicas de la cuajada. Por este motivo la mayoría de los métodos y equipos propuestos para el estudio y la selección de T_{cut} son reológicos.

El estudio reológico de la cuagulación es complejo ya que durante este proceso se produce un cambio de estado físico con formación del gel, que además va cambiando de estructura. El gel se comporta como un material viscoelástico, siendo a veces difícil distinguir entre las propiedades viscosas y elásticas. Estas dificultades han fomentado la aparición de parámetros reológicos empíricos, como firmeza y resistencia al corte. La firmeza, se corresponde más bien con un parámetro sensorial, el cual ha sido aplicado a diversos parámetros reológicos. Generalmente, ha sido determinada de forma empírica y

expresada en unidades arbitrarias. Fenómenos similares son los constituidos por propiedades más o menos ambiguas como dureza, índice de dureza, etc,…

Se han propuesto numerosos instrumentos de base reológica para la monitorización de la evolución del gel con la pretensión de determinar la rigidez óptima para cortar la cuajada. Dentro de este grupo podemos destacar los penetrómetros, los sistemas de cuerpos suspendidos, los métodos nanométricos y los viscosímetros de torsión y por último los métodos dinámicos.

Los penetrómetros se usan para medir la fuerza o para determinar la profundidad de penetración de un instrumento de deformación o probeta (cuchillo, disco de tamiz, etc.) en un determinado punto del gel (Burgess, 1978; Storry y Ford, 1982*a*). Estos instrumentos son destructivos y en general off-line.

Los sistemas de cuerpos suspendidos miden la resistencia del gel a un instrumento de deformación (una bola, un cono) que permanece colgado y es subido lentamente durante la coagulación (Steinsholt, 1973; Clark y Srinivasan, 1989). Al igual que los penetrómetros, estos métodos también son destructivos e imprimen deformaciones complejas y mal definidas (muy empíricos). Además sólo permiten la medida en un punto en un momento determinado, lo que supone serias limitaciones para el empleo en estudios cinéticos.

Los métodos manométricos y viscosimétricos de torsión en general obedecen al principio de ensayo armónico, en mayor o menor grado, y permiten realizar mediciones continuas.

Entre los métodos manométricos destacan instrumentos como el Instron, el viscosímetro Brookfield, el aparato manométrico de Vanderheiden y el “tubo en U”, entre otros. Tanto el instrumento de medida universal (Instron) como el viscosímetro Brookfield (Helipath) realizan ensayos periódicos, no armónicos (Noël *et al*., 1989). El

primero realiza compresiones cíclicas a velocidad constante y el segundo efectúa un cortado helicoidal vertical. El aparato manométrico de Vanderheiden (1976), un sistema de transmisión de presión, ha sido evaluado por Kowalchyk y Olson (1978) y posteriormente modificado por Hatfield (1981). Consiste en dos diafragmas yuxtapuestos, de los cuales uno realiza un movimiento oscilatorio (1'6 mm cada 20 s) que se transmite a través de la leche o el gel hasta el diafragma receptor. La fuerza transmitida por el gel es proporcional a su rigidez. Este equipo puede ser implantado directamente en la cuba de cuajado.

Otros instrumentos manométricos como el Vatimer y el Ermartic, que también se basan en la transmisión de presión, han surgido como modificaciones del aparato manométrico de Vanderheiden. El Vatimer, propuesto por Richardson *et al*. (1985), mide la resistencia a la oscilación vertical de un disco de acero inoxidable y permite realizar medidas en continuo, en la cuba de cuajado. El Ermartic, también está diseñado para instalación en la cuba y está equipado con un sistema para extraer el dispositivo de medida para el corte (van Hooydonk y van den Berg, 1988). Dicho método ha sido posteriormente modificado para su aplicación en seis cubas simultáneamente por Ustunol y Hicks (1990). El "tubo en U" de Scott-Blair constituye otro método manométrico que permite cuantificar la viscosidad y el módulo de rigidez G (Scott-Blair y Burnett, 1958).

Los viscosímetros de torsión poseen una cuba que contiene leche en la cual se sumerge un cilindro. Estos métodos han sido ampliamente utilizados para la determinación de *RCT* y T_{cut}. También ha sido empleado como sistema de referencia para el estudio comparativo de sistemas objetivos de T_{cut} (Payne *et al*., 1993*b*). En el caso del tromboelastógrafo (Olson y Bottazzi, 1977) la cuba está dotada de un movimiento de rotación sinusoidal. El cilindro, colgado de un hilo de torsión, actúa como detector permitiendo el seguimiento de la resistencia del gel a la deformación. De este aparato deriva el formógrafo (McMahon y Brown, 1982), que constituye uno de los instrumentos de uso más generalizado para monitorización de la coagulación. El

formógrafo dispone de diez canales de lectura. Cada canal comprende un péndulo que se sumerge en una de las diez muestras de leche y que se une a un contrapeso por el extremo opuesto. El péndulo y el contrapeso se conectan a un sistema óptico (espejo). Los dispositivos comunes a todos los canales son una fuente de luz, un sistema de registro con papel fotosensible y un sistema oscilatorio para las muestras. Mientras la leche permanece líquida, los movimientos oscilatorios lineales 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 causa un movimiento sincrónico del péndulo, que se transmite al espejo y produce una señal típica en el papel fotosensible **(Figura II.4.1.*1*)**.

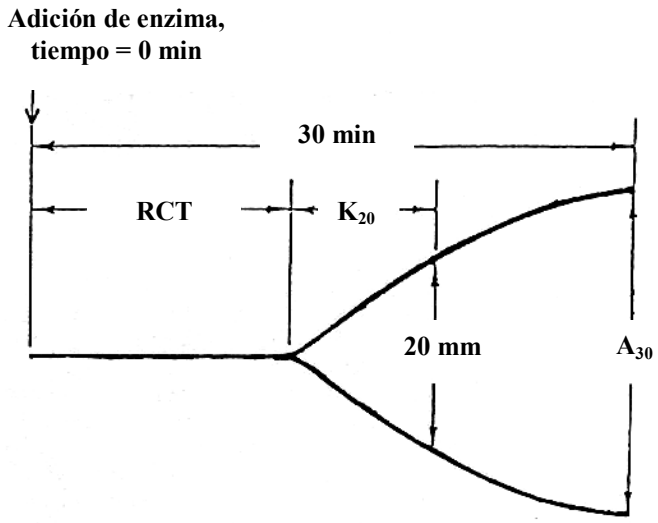

Figura II.4.1.*1*. Gráfica estándar obtenida mediante un formógrafo.
RCT, tiempo de coagulación; K_{20}, tiempo desde *RCT* hasta que la amplitud es 20 mm; A_{30}, amplitud a los 30 min.

Como se observa en la **Figura II.4.1.*1***, inicialmente el registro es lineal. En el momento de la coagulación la línea diverge como consecuencia del inicio de los movimientos del espejo. El *RCT* se determina por la distancia desde el punto de origen

hasta el punto en el cual la línea diverge (*r*). Tras el punto de divergencia, las líneas se van separando, monitorizando la evolución de la dureza del gel. El tiempo transcurrido desde *r* hasta que las líneas se separan 20 mm constituye el parámetro K_{20}, que permite determinar objetivamente T_{cut} y realizar estudios cinéticos del endurecimiento. La dureza en el minuto 30 (A_{30}) viene dada por los mm de separación de las líneas (amplitud) en ese momento y la amplitud máxima constituye la dureza máxima o A_m. Los valores de amplitud pueden ser transformados en valores de *G* mediante la siguiente relación (Carlson *et al*., 1987*d*):

$$G = \Gamma \frac{\Delta x}{\Delta x_{max} - \Delta x} \qquad \text{(II.4.1.1)}$$

donde *G* es el módulo de rigidez, Γ es la constante del equipo y Δx, Δx_{max} representan respectivamente la amplitud a tiempo *t* y a tiempo infinito. Por último el torsiómetro de Scott-Blair, más conocido en su versión industrial de Plint, somete al cilindro a oscilaciones periódicas (Plint *et al*., 1967).

Los ensayos dinámicos han cobrando importancia en las últimas dos décadas (Bohlin *et al*., 1984). Su fundamento ha sido comentado en el apartado **II.2.5**. Instrumentos como el viscoelasticímetro *GTV-INRA* (Gervais, 1983) y los reómetros realizan ensayos armónicos que permiten la obtención directa y continua de los módulos complejo, viscoso y elástico de rigidez. Por este motivo se han convertido en el método reológico de elección para el análisis del comportamiento viscoelástico de los geles y para realizar estudios cinéticos de endurecimiento. El viscoelasticímetro *GTV-INRA* puede ser implantado en la cuba. Los reómetros permiten la determinación del *RCT* y la predicción de T_{cut}. López *et al*. (1998) usando un reómetro Bohlin *CVO*, equipado con un cilindro concéntrico tipo "double-gap" no encuentran un valor único de los módulos reológicos en T_{cut}, pero determinan la existencia de correlación lineal entre T_{cut} y el tiempo de la máxima velocidad de incremento de *G*' (tiempo hasta el máximo de *dG*'/*dt*), lo que indica que las propiedades evaluadas empíricamente por el quesero se

relacionan directamente con las propiedades reológicas de la cuajada. El valor de G^* en el momento de corte oscila entre 7 y 10 Pa, a pH 6'7 y desciende al disminuir el pH.

Pese a que algunos de los métodos reológicos han sido adaptados para su empleo directo en cuba industrial o de planta piloto, la mayoría están limitados a uso laboratorial. Muchos de ellos tienen el inconveniente de ser empíricos y de presentar unidades arbitrarias. La medida de la rigidez en continuo es posible con algunos de ellos, siendo habitual que sólo realicen un registro o que midan en el mismo punto todo el tiempo, lo cual puede introducir artefactos de medida. Normalmente, este tipo de instrumentos somete la cuajada a esfuerzos y deformaciones rompiéndola, lo que determina la expulsión de suero que podría variar los resultados. Como puede verse y en términos generales, no parecen indicados para uso en línea de producción, ya que los que están adaptados para su aplicación en cuba suelen exhibir uno o más de los siguientes inconvenientes: destructivos, voluminosos, difíciles de instalar, de manejo complicado, de difícil limpieza, etc.

II.4.2. Métodos térmicos

Hori (1985) propone un método continuo y no destructivo, el método "hot wire", basado en la transferencia de calor desde un hilo de platino caliente hacia la leche circundante. Un hilo de platino inmerso verticalmente en la leche (0'1 mm de diámetro, 106 mm de longitud) se calienta mediante corriente eléctrica continua, actuando así como fuente constante de calor. La temperatura de dicho hilo se determina cada 5 s y se registra mediante un sistema automático de adquisición de datos, que está directamente conectado a un ordenador de sobremesa. Puesto que la resistencia de los materiales conductores aumenta linealmente con la temperatura (dentro de un rango limitado de temperaturas), la temperatura del hilo caliente se calcula mediante la expresión

$$\theta_w = \frac{R/R_0 - 1}{\alpha_w} \qquad \text{(II.4.2.1)}$$

donde α_w es el coeficiente de temperatura de la resistencia (3'8166 10^{-3} K^{-1}), R es la resistencia a un tiempo dado y R_0 es la resistencia inicial (1'36489 Ω).

La temperatura del hilo caliente es sensible al proceso de formación de la cuajada. Durante los primeros minutos tras la adición de enzima dicha temperatura es independiente del tiempo pero, coincidiendo con el *RCT* visual, ésta aumenta drásticamente hasta que alcanza un valor de equilibrio. La porción lineal inicial de la curva de incremento de temperatura *versus* tiempo sugiere la reacción de hidrólisis de la κ-caseína, mientras que la porción convexa se relaciona con la fase secundaria de la coagulación.

El sensor térmico es capaz de detectar el *RCT* y monitorizar todo el proceso de coagulación a tiempo real. La temperatura del hilo caliente, referida a la temperatura inicial del mismo, se correlaciona con la viscosidad cinemática de la leche. Por tanto, la determinación de la temperatura permite la obtención de la viscosidad cinemática que, a su vez, permite el seguimiento de la velocidad de coagulación de las micelas. Otros autores han empleado el método desarrollado por Hori. De Cindio *et al*. (1986) comparan los *RCT* determinados mediante tromboelastógrafo y formógrafo con los obtenidos de forma visual y con el método del hilo caliente. Según estos autores, el método térmico resulta más indicado tanto por su simplicidad como por su precisión y aporta, a diferencia de los demás métodos, información sobre la fase de hidrólisis.

Bellón *et al*. (1988) desarrollan un instrumento llamado "coagulómetro" para la medida del tiempo de coagulación, basado en el comportamiento térmico de la leche. Consta de una sonda de acero inoxidable conectada a un sistema electrónico. El cuerpo del sensor contiene dos sondas de temperatura de platino. Una mide la temperatura de la leche y el otro determina el tiempo de coagulación. Los autores sugieren la posibilidad de ampliar las prestaciones del instrumento para determinar T_{cut} y para el estudio de la aptitud de la leche para la coagulación.

Dos instrumentos térmicos basados en el método de hilo caliente han sido recientemente desarrollados para la monitorización de la coagulación de la leche y se encuentran disponibles en el mercado: el Rheocatch™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Saitama, Japan) y el Optiset™ (Stoelting, Inc., Kiel, WI). Sin embargo, Gunasekaran y Ay (1994) afirman que la efectividad de los métodos térmicos no ha sido bien documentada. Por dicho motivo Passos *et al*. (1999) desarrollan un nuevo sensor térmico para la determinación de T_{cut}. El sensor consta de una aguja hipodérmica de 30 mm de longitud y 0'55 mm de diámetro. En su interior se coloca un termopar tipo *T*, en el eje longitudinal, así como un hilo caliente de 0'08 mm de diámetro flexionado por su extremo y colocado a ambos lados del termopar. Ambos circuitos son independientes. El funcionamiento es similar al del hilo caliente propuesto por Hori. Mediante este instrumento se monitorizó la coagulación de 16 cubas y se comparó el T_{cut} determinado por el maestro quesero con la predicción del sensor, obteniéndose un *SEP* de 1'9 min.

Recientemente, Raynal y Remeuf (2000) estudian el efecto del almacenamiento en refrigeración a 4ºC sobre las características fisico-químicas y la aptitud para la coagulación de leche de cabra oveja y vaca. En dicho estudio se monitoriza la coagulación mediante un prototipo de sensor patentado en 1996 que combina una sonda térmica, basada en el principio "hot wire" con una sonda óptica de transmisión.

II.4.3. Métodos de ultrasonidos

Se han realizado numerosos intentos para estudiar la aplicación de los ultrasonidos a la leche y/o al estudio de la coagulación (Hueter *et al*., 1953; Fitzgerald y Winder, 1961; Everson y Winder, 1968; Bachman *et al*., 1980; Saraf y Samal, 1984; Miles *et al*., 1990; Benguigui *et al*., 1994). En 1992 Lee *et al*. emplean la espectroscopía de ultrasonidos en la caracterización de las propiedades viscoelásticas en queso y masa panaria. Al comparar los resultados del método de ultrasonidos con los obtenidos a partir de un viscosímetro de platos paralelos observan una gran concordancia entre las propiedades reológicas medidas con ambos métodos.

Gunasekaran y Ay (1994, 1996) proponen un método no destructivo y continuo basado en la aplicación de ultrasonidos para la determinación de T_{cut}. El equipo consta de dos transductores de 1 Mhz de frecuencia, de los cuales uno actúa como emisor de ultrasonidos y otro como detector. Ambos están conectados a un emisor-receptor de ultrasonidos, a su vez conectado a un ordenador personal a través de un osciloscopio. Para evitar efectos de difracción, los transductores se sumergen en la leche a 25 mm de distancia, en el centro del tanque (24 x 17 x 12 cm).

En esta experiencia se emplea la técnica de pulso-eco. El emisor produce un pulso que viaja la distancia d = 25 mm y produce una señal que es detectada por el receptor dando lugar al primer pico de la señal. A la vez, en el receptor se produce un eco que viaja nuevamente hasta el emisor, donde produce otro eco que viaja hasta que es detectado por el receptor como el segundo pico y así sucesivamente. Por tanto, la distancia recorrida por las ondas entre picos sucesivos de la señal es d = 50 mm. Así, podemos calcular la velocidad (m s^{-1}) como:

$$c = \frac{2d}{(t_2 - t_1)} \qquad \text{(II.4.3.}\mathit{1}\text{)}$$

donde $(t_2 - t_1)$ es el tiempo necesario para que un pulso de ultrasonidos viaje la distancia $2d$. La atenuación de la señal α (en neper/m), se calcula como

$$\alpha = (1/2d)[\ln(V_1/V_2)] \qquad \text{(II.4.3.}\mathit{2}\text{)}$$

donde V_1 y V_2 son los voltajes correspondientes a picos sucesivos de la señal.

Estos autores realizan la coagulación de leche desnatada reconstituida en diferentes condiciones de temperatura, concentración de enzima y de Cl_2Ca. Durante la coagulación la velocidad de propagación de los ultrasonidos disminuye inicialmente y después comienza a aumentar lenta e irregularmente, no siendo posible distinguir entre

los diferentes tratamientos. Los datos de atenuación, sin embargo, sufren un decrecimiento regular durante la coagulación (la pérdida de energía es menor en un medio elástico) y además ofrecen significación estadística entre tratamientos, motivo por el cual se selecciona la atenuación para la monitorización de la coagulación.

El descenso en la atenuación es más pronunciado en los estadíos iniciales. Se obtiene así un parámetro de tiempo o "punto de giro" (P_t) que identifica el momento en el que la atenuación se hace lenta. El punto P_t se define como el tiempo en el que la primera derivada de la curva de atenuación frente al tiempo alcanza el valor 0'1 neper m^{-1} min^{-1}. Estos autores observan una gran correlación entre P_t y *RCT* y sugieren la utilidad de dicho parámetro para el estudio de la eficacia de las enzimas coagulantes. Finalmente, si se compara la predicción de los T_{cut} obtenidos mediante ultrasonidos (P_t + 20 min) con los T_{cut} visuales, no se observan diferencias significativas entre los dos grupos.

Recientemente, y dado el creciente uso de los ultrasonidos en los alimentos, Mulet *et al*. (1999) estudian el efecto de la temperatura en la velocidad de los ultrasonidos en queso cheddar y observan una fuerte correlación entre la velocidad y la temperatura en este tipo de queso a 1 MHz.

Otro grupo de instrumentos lo constituye los viscosímetros de ultrasonidos, que permiten seguir el producto del coeficiente de viscosidad por la densidad hasta un estadío avanzado de la formación del gel (Bachman *et al*., 1978a, b; 1980; Marshall *et al*., 1982). Un instrumento de respuesta similar a los viscosímetros de ultrasonidos emplea una lámina vibrante y es conocido como gelógrafo (Schar y Fluckiger, 1982). Su señal, por estar más relacionada con la viscosidad que con la dureza, rápidamente se estabiliza tras el punto de gelificación, lo que reduce su sensibilidad como instrumento de determinación de T_{cut}.

II.5. MÉTODOS ÓPTICOS DE PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE CORTE

II.5.1. Principios generales

Olsen (1990) define los métodos ópticos de análisis como aquellos que miden la radiación electromagnética que emana de la materia o que interacciona con ella. Se incluyen, de esta forma en la definición, todos los campos del espectro electromagnético **(Figura II.5.1.*1*)**, que abarca un gran intervalo de longitudes de onda y frecuencias, que comprende desde las radiaciones de alta energía como los rayos gamma hasta las de baja energía como las ondas de radio.

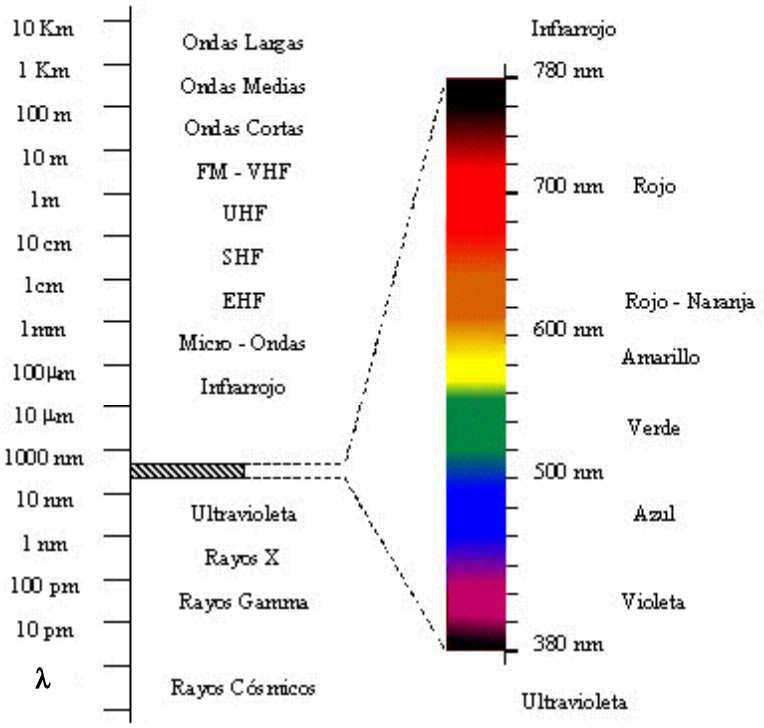

Figura II.5.1.*1*. Regiones del espectro electromagnético.

Pero la definición anterior es excesivamente amplia, ya que la región más interesante para los métodos ópticos (200 nm a 25 μm) sólo engloba las regiones del ultravioleta cercano, visible, infrarrojo cercano e infrarrojo medio (*MIR*).

El modelo clásico de onda sinusoidal permite explicar muchas de las propiedades de las radiaciones electromagnéticas, en base a parámetros como longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud. Al contrario que otros fenómenos sinusoidales, como las ondas sonoras, la radiación electromagnética no requiere un medio material de apoyo para transmitirse. No obstante, el modelo ondulatorio no explica adecuadamente los fenómenos relacionados con la absorción y la emisión de energía radiante, para lo cual se requiere la contribución del modelo corpuscular, en el que la radiación electromagnética se contempla como un flujo de partículas discretas o paquetes ondulatorios de energía, denominados fotones, cuya energía es proporcional a la frecuencia de radiación. Este punto de vista doble y complementario de la radiación electromagnética da lugar a la dualidad onda-corpúsculo que se racionaliza por medio de la mecánica ondulatoria (Skoog *et al*., 2001). En la **Figura II.5.1.*2*** se representa una onda electromagnética, y sus parámetros característicos.

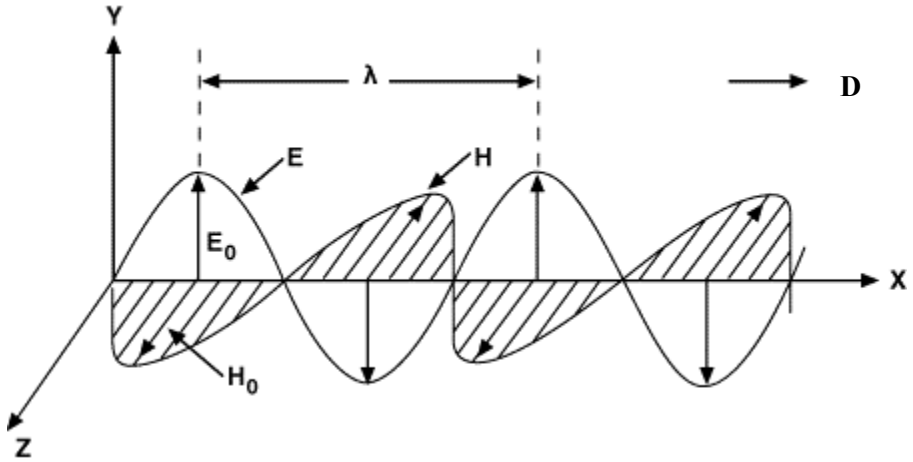

Figura II.5.1.*2*. Onda electromagnética de una sola frecuencia, polarizada en el plano.
E, vector eléctrico; *H*, vector magnético; E_0, amplitud del vector eléctrico; H_0, amplitud del vector magnético; λ, longitud de onda; *D*, dirección de la propagación.

La longitud de onda, λ, se define como la distancia lineal entre dos puntos equivalentes de ondas sucesivas o como la longitud de un ciclo. La amplitud, A, es la longitud del vector en el máximo de la onda. El período, p, es el tiempo, en segundos, necesario para el paso de sucesivos máximos o mínimos por un punto fijo en el espacio. La frecuencia, ν, es el número de ciclos por segundo y es la inversa de p. La frecuencia en ciclos por segundo, multiplicada por la longitud de onda en metros por ciclo, nos proporciona la velocidad de propagación, c, en metros por segundo. La ν de una radiación electromagnética es su única característica verdadera, ya que λ y c dependen de la naturaleza del medio de propagación.

Olsen (1990) divide los métodos ópticos de análisis en dos grupos: los espectroscópicos y los no espectroscópicos. Los métodos espectroscópicos miden la intensidad y longitud de onda de la radiación electromagnética. Todos estos métodos miden espectros, que son debidos a transiciones entre estados de energía característicos. El principal mecanismo de interacción energética, en estos métodos, es la absorción o la emisión, con la excepción de la espectroscopía Raman, basada en un tipo especial de interacción dispersiva y la espectropolarimetría, que determina la polarización en función de la longitud de onda. Estos métodos se identifican cómodamente ya que suelen llevar el prefijo "espectro".

Sin embargo, los métodos no espectroscópicos no se relacionan con las transiciones de energía, sino que se fundamentan en la interacción que se establece entre la radiación electromagnética y la materia, lo cual produce un cambio de la dirección o de las propiedades físicas de la radiación. Las interacciones concretas que tienen lugar entre materia y radiación en los métodos no espectroscópicos son la refracción, la reflexión, la dispersión refractiva, la dispersión, las interferencias, la difracción y la polarización. A este grupo de métodos pertenecen la refractometría, la difracción de rayos X, la polarimetría, la turbidimetría y la nefelometría, entre otras.

La mayoría de los métodos de utilidad para el seguimiento de la coagulación de la leche se basan en interacciones como absorción, reflexión, refracción y dispersión. Cuando una radiación alcanza determinada materia, pueden suceder diferentes procesos (Abdou, 1987): 1) la intensidad de la radiación emergente es idéntica a la de la incidente, sin que se produzca absorción de la radiación; 2) puede haber reflexión, refracción (transmisión) y/o dispersión; 3) la intensidad de la radiación emergente es inferior a la del haz incidente (cierto grado de absorción). Como consecuencia de la absorción las especies aumentan su energía desde el estado basal hasta un estado excitado; pero se mantienen en dicho estado sólo un breve lapso de tiempo (10^{-8}-10^{-9} s), ya que se relajan a niveles energéticos menores mediante cesión de energía en forma de fotones (emisión) o más frecuentemente por disipación de calor, lo que podría provocar un ligero aumento de la temperatura del medio (generalmente despreciable). La emisión es, por tanto, el proceso inverso a la absorción. En la **Figura II.5.1.*3*** se presentan las interacciones más habituales de la radiación electromagnética con la materia.

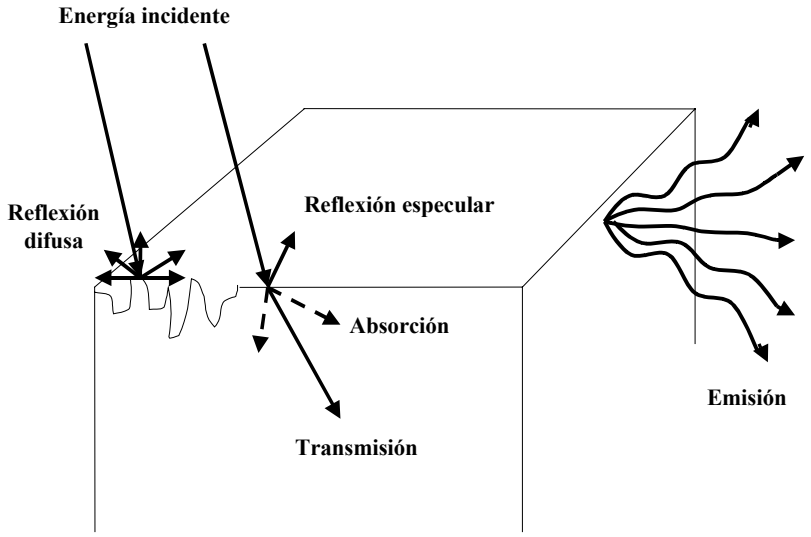

Figura II.5.1.*3*. Interacciones de la radiación con la materia.

Uno de los fenómenos de interacción que nos interesa, es la absorción. Cuando la radiación atraviesa un material, determinadas frecuencias se eliminan por absorción, proceso por el que la energía radiante se transfiere a los átomos, iones o moléculas que componen la muestra. Las partículas pasan de esta forma de su estado normal a un estado excitado y permitido de energía superior (Skoog *et al*., 2001). Para que se produzca la absorción es necesario que la energía de la radiación incidente iguale la diferencia de energía existente entre el estado basal y uno de los estados excitados de las especies (Abdou, 1987). La fracción de radiación absorbida se rige por la ley de Lambert, que predice el efecto del espesor del medio en la absorción de la radiación y por la ley de Beer, que establece el efecto de la concentración (Olsen, 1990) y que pueden representarse en conjunto mediante la expresión:

$$\log \frac{I_0}{I} = abc \qquad \text{(II.5.1.}\mathit{1}\text{)}$$

donde I_0 es la intensidad del haz incidente, I es la intensidad del haz transmitido, a es la constante de proporcionalidad, conocida como absortividad o coeficiente de extinción, b es la longitud del medio o paso óptico y c es la concentración de la especie absorbente. Si c se expresa en moles por litro y b en centímetros, la absortividad se denomina absortividad molar. El parámetro log (I_0/I) corresponde a la absorbancia, A, mientras que I/I_0 es la transmitancia, T, por lo que $A = -\log T$.

Otra fenómeno de interés lo constituye la refracción que se produce cuando la radiación incide en ángulo en la interfase entre dos medios transparentes de densidades distintas (Skoog *et al*., 2001). Consiste en el cambio de dirección de la radiación electromagnética cuando pasa de un medio a otro debido a la diferencia de la velocidad de propagación entre los medios (Olsen, 1990). Siempre que la radiación pasa de un medio dieléctrico a otro ésta se refleja en parte y se refracta (o transmite) en parte, tal y como se indica en la **Figura II.5.1.*4***.

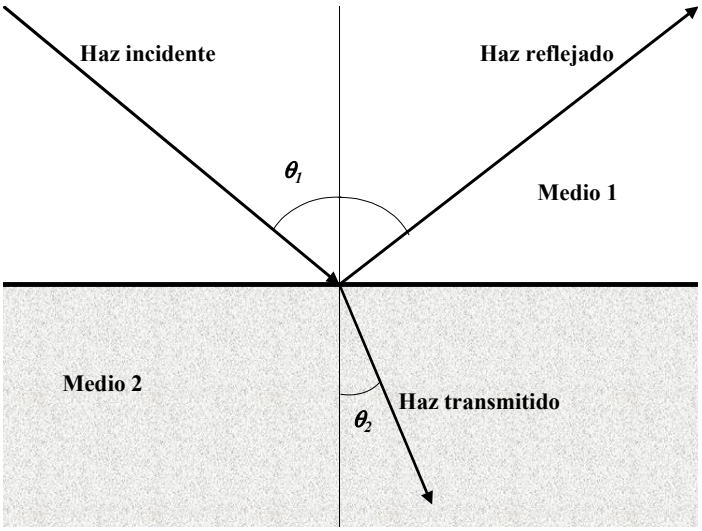

Figura II.5.1.*4*. Reflexión y refracción de la radiación electromagnética.

Cuando la radiación pasa de un medio (1) a otro (2), la magnitud de la refracción viene dada por la ley de Snell:

$$\frac{\operatorname{sen}\theta_1}{\operatorname{sen}\theta_2} = \frac{v_1}{v_2} \qquad \text{(II.5.1.}2\text{)}$$

donde θ_1 es el ángulo de incidencia, θ_2 es el ángulo de refracción, v_1 es la velocidad de propagación en el medio 1 y v_2 es la velocidad de propagación en el medio 2.

Si el medio 1 es el vacío y la radiación pasa del vacío al medio 2, sen θ_1/sen θ_2 es una constante conocida como índice de refracción (n_2) del medio 2, que depende de la composición del medio, de la longitud de onda y de la temperatura (Matissek *et al.*, 1998). El fenómeno de reflexión se produce cuando la radiación incide en la interfase entre dos materiales con diferente índice de refracción (Olsen, 1990). La naturaleza del fenómeno está muy relacionada con la calidad de las superficie. El ángulo de incidencia

coincide con el de reflexión siempre que la superficie sea lisa (reflexión especular), mientras que si la superficie es rugosa o irregular se produce reflexión difusa. En la espectrometría de reflexión de superficies sólidas pulidas, es frecuente expresar el poder de reflexión como reflectancia, ρ, que es la relación entre la intensidad de las radiaciones reflejada e incidente:

$$\rho = \frac{I_R}{I_0} = \frac{(n_2 - n_1)^2}{(n_2 + n_1)^2} \qquad \text{(II.5.1.3)}$$

donde I_0 es la intensidad del haz incidente, I_R es la intensidad reflejada y n_1 y n_2 son los índices de refracción correspondientes a los dos medios. Según el tipo de espectrometría de reflexión, la reflectancia puede expresarse de diferentes formas. La reflectancia es mayor cuanto mayor es la diferencia entre el índice de refracción de los dos medios.

La reflexión, como se ha comentado, depende de la calidad de la superficie. Si la superficie es lisa se produce la reflexión de espejo o especular, pero si es irregular la radiación se desvía en todas las direcciones de forma difusa (Saputra, 1992). La radiación transmitida por el interior de la partícula encuentra, a su vez, superficies internas orientadas aleatoriamente y se puede reflejar. Una fracción de esa radiación reflejada es transmitida nuevamente hacia la superficie inicial **(Figura II.5.1.5)** y se conoce con el nombre de "reflexión interna".

Este tipo de reflexión es dispersa y junto a la reflexión superficial constituye la reflexión difusa. La reflexión difusa es también determinada por la densidad de las partículas y por la posición de las superficies ópticas. Birth y Hecht (1987) determinan que la reflexión difusa es proporcional a la densidad e inversamente proporcional al radio de distribución de la radiación. La estructura y el contenido de agua también pueden influir sobre la redistribución de la radiación en el material.

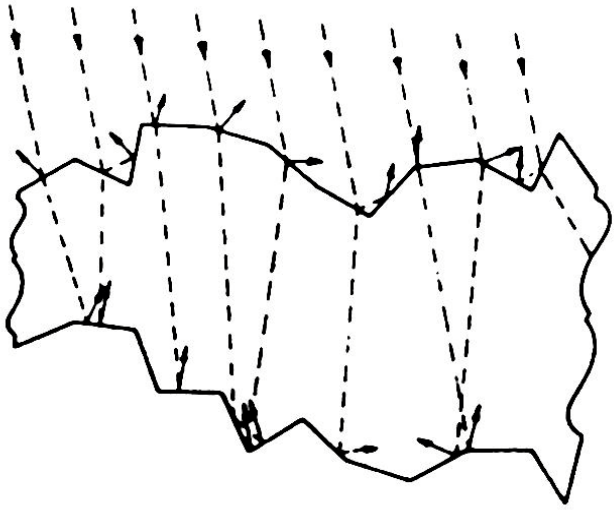

Figura II.5.1.5. Concepto esquemático de la reflexión difusa.
Según Birth (1976). Reproducido de Saputra (1992).

Otro de los fenómenos de interacción entre la radiación y la materia es la dispersión de la radiación. Para comprender el fenómeno de la dispersión, podemos representar la transmisión de la radiación como una retención momentánea de dicha energía por átomos, iones y moléculas y la posterior reemisión de la radiación en todas las direcciones cuando las partículas recuperan su estado inicial (Skoog *et al*., 2001). Cuando las partículas son atómicas o moleculares (pequeñas con respecto a λ), la interferencia destructiva elimina la mayor parte de la radiación reemitida, excepto la que se desplaza en la dirección inicial del haz incidente. Por tanto la trayectoria del haz parece no cambiar. Sin embargo, una observación cuidadosa nos permite detectar una fracción muy pequeña de la radiación, la radiación dispersada, que se transmite en todas las direcciones a partir de la trayectoria inicial y que aumenta de intensidad con el tamaño de la partícula. La interacción de la radiación electromagnética con las partículas pequeñas induce oscilaciones en sus cargas eléctricas, produciendo dipolos que emiten ondas secundarias en todas las direcciones (Olsen, 1990).

La dispersión de la radiación depende principalmente de cuatro factores: 1) el número 2) el tamaño de las partículas, 3) la longitud de onda de la radiación incidente y 4) la diferencia entre el índice de refracción de las partículas y el disolvente (Lochte-Watson *et al*., 1998). En la dispersión parte de la energía se emite sin ningún cambio de longitud de onda (Olsen, 1990).

Esta radiación secundaria podría haberse empleado para explicar los fenómenos de refracción y reflexión, si bien sólo es necesario introducir el término de dispersión cuando las dimensiones de las partículas son del mismo o de menor orden de magnitud que la longitud de onda del haz incidente y los índices de refracción del medio y de las partículas son distintos. De hecho, si las partículas son mayores de aproximadamente 2λ, el análisis de ondas demuestra que únicamente se produce refracción y reflexión. Puede observarse, por tanto, que los fenómenos de reflexión, refracción y dispersión de la radiación son procesos fuertemente relacionados desde este punto de vista, jugando el tamaño de las partículas un papel muy importante. En general podemos considerar que la luz que no se absorbe se dispersa, y que la dispersión, en función del tamaño de las partículas, puede resolverse en transmisión o en reflexión. Por tanto el término dispersión es más general e incluye a los otros dos.

Así, existe un tamaño máximo de la partícula que produce dispersión en función de la longitud de onda. Por ejemplo, para longitudes de onda de 10, 0'5 y 0'001 μm, correspondientes a las regiones del infrarrojo, visible y rayos *X*, el tamaño máximo aproximado de la partículas que producen dispersión es respectivamente 15, 0'75 y 0'002 μm. En general, todos los estados de la materia son potencialmente capaces de producir dispersión.

Según el tamaño de las partículas se producen diferentes tipo de dispersión (Skoog *et al*., 2001). La dispersión por moléculas o agregados de moléculas bastante menores que λ produce dispersión Rayleigh de igual frecuencia que la radiación incidente. Su intensidad es proporcional al inverso de la cuarta potencia de λ, a las

dimensiones de las partículas dispersantes y al cuadrado de la polarizabilidad de las partículas. Si las partículas son de dimensiones coloidales la dispersión es suficientemente intensa como para ser captada por el ojo humano, dando lugar al efecto Tyndall. Este tipo de dispersión se presenta cuando las dimensiones de las partículas son superiores al 10% de λ e inferiores a 3/2 λ, desapareciendo la dispersión a mayores tamaños (Olsen, 1990). En este tipo de dispersión la distribución de intensidades no es homogénea, desviándose en el mismo sentido que la radiación incidente. Otro tipo de dispersión es la Raman, en la que parte de la radiación dispersada sufre cambios cuantizados de frecuencia.

Cuando aparecen partículas coloidales dispersas en el medio pueden ocurrir los procesos de dispersión de la radiación junto a los de reflexión difusa. Los procesos de dispersión y de reflexión de la radiación juegan un papel muy importante en técnicas como la tubidimetría y la nefelometría (Olsen, 1990). Este autor afirma que el criterio que decide si la desviación de la radiación es debida a la dispersión o a la reflexión se basa en los tamaños relativos de la longitud de onda de la radiación empleada y de las partículas. Si las partículas dispersadas o en suspensión son aproximadamente del mismo orden de magnitud o menores que la longitud de onda del haz incidente tendrá lugar la dispersión, mientras que la reflexión se producirá si las partículas son de dimensiones superiores a la longitud de onda.

La diferencia debe ser tenida en cuenta en el caso de medidas de tipo cuantitativo como en la turbidimetría y la nefelometría, porque puede afectar a la sensibilidad de la medida tanto como a la forma de realizarla.

La tubidimetría mide la disminución de la intensidad de la radiación emitida por la fuente al atravesar la disolución (transmisión), mientras que la nefelometría mide directamente la radiación dispersada en una dirección en ángulo con el haz incidente (Olsen, 1990) **(Figura II.5.1.*6*)**.

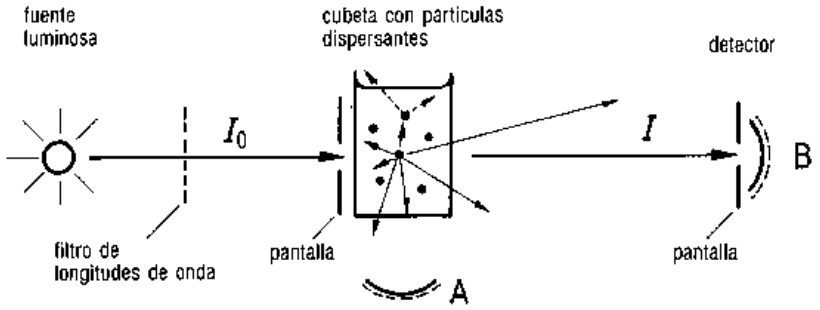

Figura II.5.1.*6*. Medidas de dispersión de la radiación.
El detector *A* mide la radiación dispersada; el *B* la turbidez (log I_0/I, donde I_0 es la intensidad de la radiación incidente). La dispersión múltiple se indica con flechas discontinuas.
Reproducido de Walstra y Jenness (1987).

Como se aprecia en la **Figura II.5.1.*6*** ambos métodos constituyen una forma de medida de la dispersión de la radiación. Esto es así porque la intensidad de la radiación transmitida a través de una muestra que no absorbe es la intensidad de la radiación incidente menos la intensidad de la radiación dispersada (Lomholt, 1996). La turbidimetría permite medir la concentración de las partículas, ya que sigue una ecuación análoga a la ley de Beer, donde existe un término equivalente a la absorbancia que se conoce como turbidancia o turbidez *S*. La constante de proporcionalidad *k* es designada como coeficiente de turbicidad. A veces se emplea otra constante de proporcionalidad τ conocida como turbicidad, e igual 2'303 *k*. Los términos *b* (paso óptico) y *c* (concentración) son sinónimos a los de la ley de Beer. Como en dicha ley, en la equivalente para la turbidez existen desviaciones que deben ser tenidas en cuenta. En la nefelometría, la relación entre la concentración y la intensidad de radiación dispersada no es tan sencilla y suele establecerse empíricamente.

Por otra parte, se encuentran los métodos de dispersión dinámicos, que en vez de medir la dispersión de la radiación en función del ángulo de dispersión y de la concentración de soluto, se interesan más por los cambios de intensidad en la dispersión de la radiación procedentes de los movimientos aleatorios de difusión de las partículas

coloidales, lo que permite obtener información sobre la movilidad de las partículas que actúan como dispersantes de la radiación (Horne, 1995).

II.5.2. Propiedades ópticas de la leche

El índice de refracción es característico de cada sustancia, pero también depende de la longitud de onda y de la temperatura, por lo que su determinación se realiza a 20ºC y empleando la longitud de onda de la línea *D* del sodio (589'3 nm), lo que se indica por n_D^{20} (Walstra y Jenness, 1987). Se determina habitualmente dividiendo la velocidad de la luz en el vacío y por su velocidad en el medio. Por conveniencia, se suelen medir tomando el aire como referencia en lugar del vacío. Entonces el índice de refracción viene dado por la relación entre la velocidad de la luz en el aire y en el medio, si bien se puede transformar en índice de refracción con respecto al vacío multiplicándolo por el índice de refracción del aire respecto al vacío (1'00027) (Skoog *et al*., 2001). Para la leche, $n_D^{20} \approx 1.338$. Su valor viene determinado por el *n* del agua ($n_D^{20} \approx 1.3330$) y por el de las sustancias disueltas. Las partículas de tamaño ¼ superior a λ no contribuyen a *n*, lo cual supone que para la radiación visible las partículas mayores de 100 nm (glóbulos grasos, cristales de lactosa, burbujas de aire) no influyen, pero si lo hacen las micelas de caseína. El *n* en los productos lácteos puede ser calculado a partir de sus solutos.

El reciente interés por los fenómenos de absorción, fluorescencia y dispersión de la radiación en la leche es más cuantitativo que cualitativo (Lochte-Watson *et al*., 1998). Walstra y Jenness (1987) revisan la absorción de la radiación electromagnética en la leche. La leche absorbe escasamente la radiación visible. La riboflavina del suero lácteo, que presenta su máxima absorbancia a λ = 470 nm y una extinción específica de 0'05 cm^{-1} (absorbancia de 0'05 para un paso óptico de 1 cm), le proporciona un color amarillo-verdoso. Parte de la energía absorbida se emite como radiación fluorescente ($\lambda \approx$ 530 nm). El β-caroteno de la grasa láctea es el responsable del color amarillo (máxima absorción a λ = 460 nm y extinción específica muy variable y de aproximadamente 3

cm^{-1}). Los anillos aromáticos de las proteínas (restos de tirosina y de triptófano) y los dobles enlaces de la grasa absorben en el ultravioleta, respectivamente a $\lambda \approx 280$ nm y $\lambda \approx 220$ nm. La leche es muy opaca a la radiación infrarroja ya que presenta numerosas bandas de absorción acuosa a $\lambda > 1200$ nm (excepto cerca de $\lambda = 1700$ nm). Otras fuertes bandas de absorción son la de CH_2, próximas a 3450 nm (especialmente lípidos); la de los ésteres alifáticos cercanas a 5700 nm (especialmente lípidos); la de los enlaces peptídicos, próximas a 6500 nm (especialmente proteínas); la de los grupos COOH, a 5900 nm y la de los grupos OH, alrededor de 3500 y 600 nm (principalmente lactosa), si bien existen otras muchas. Estas bandas de absorción son la base para la estimación de los principales componentes de la leche. La radiación de infrarrojo próximo (*NIR*) ha sido empleada como método sencillo y rápido de análisis químico en productos agrícolas. En la industria láctea se ha usado para determinación de grasa, proteína y lactosa (Ben-Gera y Norris, 1968). La espectroscopía de infrarrojo próximo ha sido también empleada en el análisis de los componentes de leche de cabra (Díaz-Carrillo *et al*., 1993).

Por otra parte, Wong *et al*. (1988) afirma que las proteínas de la leche absorben radiación a 220-380 nm, mientras que la grasa lo hace a 400-520 nm. El efecto de la grasa y la proteína en la absorción y dispersión de radiación ha sido abordado por varios autores, desde diferentes puntos de vista (Goulden, 1957; Ben-Gera y Norris, 1968; Gruen y Tao, 1985; Casal *et al*., 1988; Payne *et al*., 1993*a*; Kamishikiryo-Yamashita *et al*., 1994; Kuaye, 1994; Lochte-Watson *et al*., 1998; Crofcheck *et al*., 2000).

El tamaño y la concentración de los glóbulos de grasa afecta considerablemente a la absorción (Ben-Gera y Norris, 1968), por lo que ésta se ve considerablemente modificada por la homogeneización de la leche. Goulden (1957) refiere la existencia de picos de absorción diferentes en la leche homogeneizada que son similares a los picos de absorción del agua. Crofcheck *et al*. (2000) mide el contenido en grasa de leche desnatada mediante un sensor de fibra óptica en modo de transmisión. Al aumentar la distancia entre el detector y la fuente de radiación, la intensidad de radiación que llega

al detector disminuye exponencialmente. El coeficiente de extinción aumenta linealmente con la concentración de grasa a 900 nm. Estos autores desarrollan tres algoritmos diferentes, uno de ellos basado en el coeficiente de extinción, que permiten determinar la concentración de grasa en el rango de concentración 0'05-0'2%.

Como es de esperar, por el gran número de componentes que contienen la leche, ésta no sólo absorbe radiación a multitud de longitudes de onda, sino que también produce su dispersión debido al estado coloidal de las proteínas, la emulsión de la grasa y la distribución de tamaño de las partículas (Wong *et al*., 1988).

II.5.3. Dispersión de radiación de infrarrojo próximo

La región del infrarrojo se ha venido usando, cada vez más, para análisis espectroscópico en las industrias agrícolas y de alimentos durante las últimas décadas (McQueen *et al*., 1995). La radiación infrarroja no es suficientemente energética para producir transiciones electrónicas, pero es capaz de inducir transiciones en los estados vibracionales y rotacionales asociados al estado electrónico basal de la molécula (Skoog *et al*., 1995).

Para que la radiación infrarroja sea absorbida por una molécula, ésta debe poseer una frecuencia rotatoria o vibratoria idéntica a la de la radiación incidente y también debe haber un cambio neto en la magnitud o dirección del momento del dipolo como resultado de la interacción. En ese caso habrá una transferencia neta de energía, con absorción de la misma, que aumenta la amplitud de vibración o la frecuencia de rotación (Abdou, 1987). La longitud de onda más larga (de menor energía) de la radiación que induce un cambio del movimiento vibratorio de una molécula origina una banda fundamental, si bien, pueden haber múltiplos de la frecuencia de banda, conocidos cono sobretonos o armónicos. Todas las moléculas orgánicas e inorgánicas absorben radiación en la región del infrarrojo, excepto algunas especies homonucleares cuyo

momento dipolar no sufre un cambio neto durante la vibración, como O_2, Cl_2 y N_2 (Skoog *et al*., 1995).

La región infrarroja del espectro (750 nm a 1000 μm), que se extiende entre la visible y la de microondas, se divide en otras tres: *NIR*, región del infrarrojo próximo que ocupa la franja desde los 750 nm a los 2500nm; *MIR*, región del infrarrojo medio o fundamental que se prolonga desde los 2500 nm hasta los 25 μm y *FIR*, región del infrarrojo lejano que llega hasta los 1000 μm (Olsen, 1990). Las leyes de absorción que rigen la espectroscopía *NIR* y *MIR* se basan en la relación de Lambert-Beer, ya comentada (Wilson, 1995).

La región *FIR* ofrece información acerca de las transiciones rotacionales, modos vibracionales de las redes cristalinas y vibraciones del esqueleto de grandes moléculas (Olsen, 1990). El uso de la región del infrarrojo lejano, aunque potencialmente es bastante útil, ha estado limitado como consecuencia de dificultades experimentales en relación con las fuentes de radiación y el empleo de filtros, lo cual está siendo mitigado, en parte, por la introducción de los nuevos espectrómetros de transformada de Fourier (Skoog *et al*., 2001).

La región *MIR* es a la que normalmente nos referimos por defecto y proporciona gran cantidad de información, tanto cualitativa como cuantitativa, sobre la estructura molecular y los grupos funcionales (Olsen, 1990). La absorción molecular en esta región resulta en la excitación de modos vibracionales fundamentales (van de Voort, 1992). Según Grappin (1993), la energía de vibración que caracteriza a un grupo químico depende de la fuerza del enlace y de la masa de los dos átomos del grupo. Las frecuencias de las vibraciones fundamentales, que tienen lugar generalmente en la región *MIR*, presentan frecuencias armónicas o combinaciones de frecuencias que constituyen las bandas de absorción en la región *NIR*. En la espectroscopía *MIR* se emplean equipos diferentes de los usados en las regiones del visible y del *NIR*. En la actualidad la mayoría de los instrumentos nuevos de espectroscopía *MIR* son del tipo

transformada de Fourier (Skoog *et al*., 2001). Precisamente las prestaciones de estos equipos y el descenso de su precio han causado un incremento del número y el tipo de las aplicaciones de la región fundamental, por el considerable aumento de la relación señal/ruido y de los límites de detección.

La región *NIR* se caracteriza por que la mayoría de las bandas de absorción son debidas a sobretonos o combinaciones de las bandas vibracionales de tensión del enlace de hidrógeno. Como se trata de sobretonos o de bandas de combinación, sus absortividades molares son pequeñas y con bajos límites de detección (Skoog *et al*., 2001). Los sobretonos y combinaciones son de uno a tres órdenes de magnitud más débiles que las bandas fundamentales (Saputra,1992). Además, los espectros de absorción presentan bandas anchas y que se solapan, procedentes de numerosos sobretonos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales, lo que hace difícil asignar las bandas a los distintos grupos funcionales (Rodríguez-Otero *et al*., 1997).

En la región habitualmente utilizada (1000-2500 nm) se observan sobretonos de vibraciones fundamentales menores de 5000 a 8000 nm. Las vibraciones fundamentales de longitud de onda mayor, p. ej.: 15000 nm, para ser observadas, requieren sobretonos quintos o sextos que son de baja intensidad (Wetzel, 1983). Principalmente vemos sobretonos de las vibraciones fundamentales de las uniones químicas que contienen hidrógeno unido a átomos de carbono, oxígeno o nitrógeno (Kaye, 1954; Wheeler, 1959; Whetsel, 1968; Krikorian y Mahpour, 1973; Wetzel, 1983; Weyer, 1985), lo que limita las estructuras químicas que son observables en esta región que son comunes a muchos compuestos orgánicos. En definitiva, esta región es particularmente útil para el análisis cuantitativo de varios grupos funcionales y emplea instrumentos similares a los que se usan en la región visible.

A diferencia de la espectroscopía *MIR,* el uso más importante de la radiación *NIR* es el análisis cualitativo rutinario de especies como agua, proteínas, hidrocarburos de bajo peso molecular, y grasas en productos agrícolas y alimentos, empleándose para

ello, tanto medidas de reflexión difusa como de transmisión, si bien, la reflexión difusa es con mucho la más empleada (Skoog *et al*., 2001).

En los productos lácteos, Goulden (1957) determina por primera vez el espectro de absorción *NIR* de caseína, lactosa y grasa de leche en polvo. Ben-Gera y Norris (1968) estudian el efecto del contenido de grasa en la leche sobre su espectro infrarrojo, aplicando por primera vez la regresión lineal múltiple para determinar cada componente. Rodríguez-Otero *et al*. (1997) han revisado ampliamente la evolución y empleo de esta técnica en la industria láctea.

Walstra y Jenness (1987) realizan una revisión de los fenómenos de reflexión y de dispersión de la radiación en la leche. La dispersión de la radiación se debe principalmente a los glóbulos grasos y a las micelas de caseína. La dispersión originada por las seroproteínas y por las células somáticas es casi despreciable respectivamente por su escaso tamaño y por su baja concentración. La leche descremada dispersa menos radiación porque tiene menos partículas, pero a longitudes de onda cortas su reflexión es mayor que la de la leche entera por la ausencia de absorción del caroteno. La homogeneización de la leche incrementa la reflexión difusa. Las micelas de caseína son menores que los glóbulos grasos y dispersan menos radiación, pero la intensidad de dispersión se acentúa al bajar la longitud de onda y cuando aumenta el contenido en *CCP*. Los datos de dispersión en la leche son realmente difíciles de interpretar por la polidispersión de las micelas de caseína y de los glóbulos grasos. Por su parte la reflexión difusa de la leche es el resultado de múltiples dispersiones en las partículas hasta un cierto espesor o paso óptico (de varios milímetros).

Pese a que la mayoría de los análisis *NIR* en leche se suelen realizar en la región de 1100 a 2400 nm, Sasic y Ozaki (2001) apuntan que la región de longitud de onda más corta, dentro de la región *NIR*, también podría ser considerada tanto para análisis cualitativos como cuantitativos. Esto refleja el interés creciente por el empleo de longitudes de onda entre 750-1000 nm.

Podemos analizar el efecto individual de los diferentes componentes de la leche sobre la dispersión de la radiación. La leche contiene agua, grasa, proteínas, lactosa, citratos y compuestos inorgánicos. Aunque cada constituyente desempeña al menos un papel minoritario en la dispersión de la radiación, predomina el papel de la grasa y las proteínas (Crofcheck *et al*. 2000). Ya que la caseína es la proteína más abundante en la leche, a partir de la distribución de tamaños de las micelas de caseína y de los glóbulos grasos se puede interpretar de forma orientativa su importancia relativa en la desviación de la radiación en leche de cabra.

Las micelas de caseína caprina tienen un mayor diámetro medio y mayor grado de polidispersión, mayor contenido mineral y menor grado de hidratación que las de vaca (Trujillo *et al*., 1998). Tziboula y Horne (1999) encuentran que la leche con alto y con bajo contenido de α_1-caseína presenta diámetros comprendidos respectivamente entre 160-280 nm y 210-320 nm. Attaie y Richter (2000) comparan el diámetro medio de los glóbulos grasos en cabra y de vaca y observan que los primeros son menores (2760 nm) frente al tamaño medio de los de vaca (3510 nm). Según estos últimos autores, los glóbulos grasos en cabra oscilan entre 730 y 8580 nm. Teniendo en cuenta que la medida se realiza a 880 nm y atendiendo a los tamaños de partículas que determinan la dispersión (apartado **II.5.1**) se puede esperar que la dispersión de tipo Rayleigh sea despreciable frente a la dispersión de partículas grandes que procede de las micelas de caseína y de los glóbulos grasos de diámetro más pequeño. Por otra parte se presupone que los procesos de dispersión de la luz en los glóbulos grasos mayoritariamente terminarán produciendo procesos de reflexión difusa. También deben producirse en la leche procesos de dispersión múltiple.

Cuando una radiación alcanza la superficie de un líquido turbio como la leche, la radiación que no sale nuevamente al exterior penetra en su interior. Cuanto mayor es la dispersión, la reflexión difusa y la absorción menor es la penetración. En la **Tabla II.5.3.*1*** se proporcionan ejemplos de penetración de la radiación en productos lácteos.

Tabla II.5.3.*1*. Reflexión difusa y penetración de la radiación en los productos lácteos. [1]

Parámetro medio	Longitud de onda (nm)	Leche descremada	Leche entera	Leche homogeneizada
Reflexión difusa (%)	450	48	43	52
	550	49	53	63
	750	32	46	58
Penetración (mm) hasta una intensidad del 10%	440	5	3	2
	580	14	8	5
Hasta una intensidad del 1%	440	13	7	6
	580	36	24	18

[1] Walstra y Jenness (1987).

La penetración se define aquí como la distancia de propagación en el interior del líquido para que se reduzca en un factor dado la intensidad de la radiación.

Una de las técnicas de interés en la región *NIR* es la dispersión de la radiación infrarroja. Horne (1995) opina que normalmente es necesario obtener información cuantitativa sobre las partículas coloidales o sobre sus interacciones, sus cambios o su relación estructural durante la formación de geles. Según este autor, las diferentes técnicas de medida de la dispersión de la radiación constituyen la herramienta para realizar dichos estudios.

Dentro de los métodos de dispersión encontramos la espectrometría de reflectancia en la región *NIR*, que se ha convertido en la herramienta más importante para el análisis cuantitativo de componentes de sólidos finamente divididos. Se produce una reflectancia difusa en la que la radiación penetra en la capa superficial de las partículas, excita los modos de vibración de las moléculas del analito y luego se dispersa en todas las direcciones, dando lugar a un espectro de reflectancia.

Como método de dispersión, también resulta de interés la técnica empleada en este estudio para el seguimiento de la coagulación y la predicción de T_{cut}. Puede clasificarse dentro de los métodos ópticos no espectroscópicos y tiene como base principal la dispersión de la radiación en la región *NIR*. La radiación procedente de la fuente de emisión (*LED*, 880 nm) se propaga mediante reflexión interna total a lo largo de una fibra óptica hasta la interfase de la superficie pulida de la fibra con la leche. Esta luz, al llegar a la interfase, puede ser absorbida, reflejada o transmitida a través de la misma hasta llegar el interior del cuerpo de la leche.

La radiación que se refleja en la interfase puede hacerlo de forma especular en la superficie pulida de la fibra, o bien de forma difusa en las partículas de la leche presentes en la interfase. La parte de la radiación que no es reflejada se absorbe o penetra en el interior de la leche. La radiación así transmitida, constituye la fuente real de radiación que posteriormente se determina y no contiene, por tanto, la radiación que se refleja de forma especular o de forma difusa en la superficie de la interfase **(Figura II.5.3.*1*)**.

La radiación, una vez en el interior de la leche, es absorbida o bien dispersada en todas las direcciones por las partículas coloidales. En el caso de las grandes partículas de grasas y de las superficies irregulares de gran tamaño (agregados, racimos y cadenas de caseína que producen el crecimiento de la red tridimensional), la dispersión conduce a fenómenos de reflexión difusa. La radiación difusa originada de esta forma (radiación dispersada y difusamente reflectada) es captada por una segunda fibra óptica, que está distanciada lo suficiente para evitar recoger los haces generados mediante reflexión especular o reflexión difusa en la superficie de la interfase.

La radiación difusa captada por esta fibra es conducida hasta un fotodetector de silicio y transformada en un ratio de reflectancia, en el que se expresa la intensidad de la radiación reflejada y/o dispersada en cada momento, con respecto a la intensidad de la radiación reflejada o dispersada por término medio antes del inicio de la reacción

enzimática, puesto que nuestro objetivo es encontrar un parámetro de tiempo que refleje un cambio en la intensidad de la radiación difusa y esté relacionado con el crecimiento de la red tridimensional del gel. Dicho parámetro contiene información sobre el desarrollo de la coagulación y permite la predicción de T_{cut}.

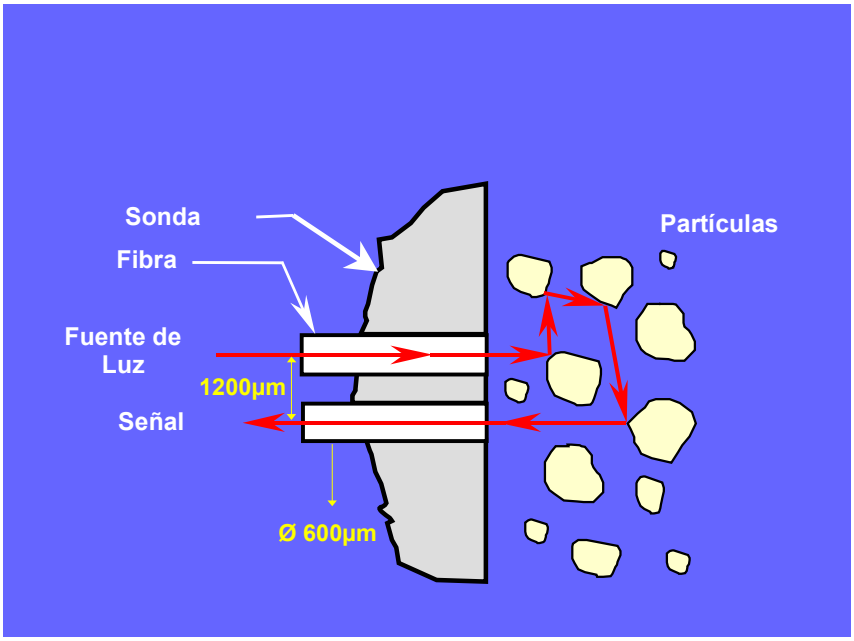

Figura II.5.3.*1*. Origen de la señal en el sensor de dispersión de radiación *NIR*.

II.5.4. Métodos ópticos de seguimiento de la coagulación y de predicción del tiempo de corte

Son numerosos los métodos basados en las propiedades ópticas de la leche que han sido empleados para el estudio de los mecanismos, etapas, cinética y factores de la coagulación tanto ácida como enzimática. Algunos de ellos se han aplicado o incluso han sido específicamente desarrollados con la pretensión de realizar un seguimiento

continuo capaz de aportar información del proceso de coagulación a tiempo real. Otros han demostrado su utilidad en la determinación de *RCT* y/o de T_{cut}.

Libbey y Ashworth (1960) miden la absorbancia a 600 nm durante la reacción de cuajo con caseinato sódico. En 1977, Guthy y Novak emplean un contador óptico de partículas y un viscosímetro para profundizar en el conocimiento de la fase de hidrólisis enzimática de la caseína. Holt (1975) emplea medidas de turbidez (dispersión) en función de la longitud de onda para determinar el tamaño de las micelas de caseína. Parker y Dalgleish (1977) emplean también la turbidimetría para estudiar la cinética de agregación proteica. Mediante el empleo de técnicas de dispersión, Dalgleish (1979) determina el peso molecular medio de las micelas de caseína. Hardy *et al*. (1985) determinan el efecto de las concentraciones de enzima, de calcio y de grasa y el efecto de la temperatura en la dispersión de la radiación mediante nefelometría.

Horne (1987) determina la dimensión fractal de los agregados de caseína mediante medidas de turbidez, en función de la longitud de onda. Jablonka *et al*. (1988) emplea una técnica de dispersión de la radiación para monitorizar la precipitación de una disolución de leche desnatada mediante un ácido mineral. McMahon y Brown (1990), por su parte, miden los cambios en la dispersión de la radiación mediante turbidimetría a 600 nm durante la coagulación enzimática de la leche y encuentran que el tiempo de coagulación teórico se corresponde con el punto de inflexión de las curvas de turbidez.

Banon y Hardy (1991) combinan la turbidimetría con el empleo de un gelógrafo y observan que durante la coagulación ácida de la leche las medidas de viscosidad se pueden correlacionar con la señal de turbidez. Bringe y Kinsella (1990) refieren el seguimiento turbidimétrico del proceso de coagulación ácida de la caseína. Scher y Hardy (1993) estudian, mediante dispersión cuasielástica de la radiación, la variación de la distribución de tamaño de las micelas de caseína tras la hidrólisis, y de forma simultánea observan la evolución de la turbidez. Inmediatamente tras la hidrólisis, tanto la turbidez como el tamaño medio de las micelas decrece, si bien, seguidamente se

aprecia un aumento de ambos parámetros. *Eleya et al*. (1995), mediante un método turbidimétrico basado en reflexión de la radiación, y mediante viscosimetría capilar, comparan la coagulación ácida (glucono-δ-lactona) de leches de cabra, oveja y vaca, a varias temperaturas (15-30ºC). Para una misma temperatura encuentran que la menor turbidez en los geles corresponde a los de cabra.

Bauer *et al*., (1995) estudian la agregación durante la coagulación enzimática de la leche mediante métodos de medida estáticos y dinámicos de dispersión de la radiación y obtienen la evolución durante el tiempo de parámetros estructurales de los agregados como el número medio de micelas de caseína o el radio hidrodinámico, entre otros. Lomholt *et al*. (1998) obtienen parámetros cinéticos de la coagulación enzimática mediante determinación de la turbidez a diferentes longitudes de onda (500-1100 nm). Mellema *et al*. (1999) examinan los mecanismos de la hidrólisis enzimática mediante dispersión de la radiación a 780 nm y viscosimetría.

Un grupo de autores emplea colorímetros para el seguimiento de la coagulación. Hardy y Fanni (1981) aplican por primera vez la fotometría de reflexión al estudio de la coagulación enzimática. Mediante un colorímetro, que proporciona un espectro de reflexión en el visible; observan que la luminosidad L aumenta tras la adición de enzima. Dybowska y Fujio (1996*a*, *b*) emplean un colorímetro para monitorizar la coagulación ácida de la leche y señalan que el aumento de la temperatura y de la concentración de acidulante acelera el inicio de la gelificación y la velocidad de agregación/gelificación. López (1993), contrariamente a lo observado por Hardy y Fanni (1981), determina un descenso de L durante la coagulación.

También se ha propuesto el empleo de refractómetros para la monitorización de la coagulación láctea. Korolczuk *et al*. (1986) conectan un refractómetro a un viscosímetro (Rheomat 30) para comparar sus señales durante la coagulación enzimática. Dichos autores señalan una fuerte correlación entre el punto de inflexión de las curvas refractométricas y el tiempo de gelificación calculado mediante las curvas

viscosimétricas. Según Famelart y Maubois (1988), que emplean un viscosímetro y un refractómetro para el seguimiento de la coagulación ácida de la leche, tanto la viscosidad como el índice de refracción dependen del pH, y sugieren que un refractómetro puede ser adecuado como sensor no-destructivo para la monitorización de la coagulación láctica. Korolczuk (1988) estudia nuevamente la señal refractométrica durante la coagulación enzimática y los resultados muestran que la evolución de la señal con respecto al tiempo, tras el punto de inflexión, se ajusta a las ecuaciones de Scott-Blair y Burnett (1963*b*), Tuszynski (1971) y Douillard (1973). Korolczuk y Maubois (1988) estudian el efecto de diversos factores de la coagulación enzimática, conectando el refractómetro a un ordenador. Determinan que el punto de inflexión de la curva refractométrica se correlaciona con el pH, la concentración de calcio y la temperatura.

Pero sin duda, la introducción de sensores de fibra óptica (de transmisión, o de dispersión), capaces de monitorizar "on-line" la coagulación, despierta mayor interés en la industria quesera por la posibilidad que ofrecen de racionalizar el control del proceso de coagulación y de corte. Payne *et al*. (1990) han desarrollado un sensor de fibra óptica de reducido tamaño, que es permite monitorizar la coagulación mediante la evolución de la dispersión de radiación de infrarrojo próximo, instrumento que ha sido patentado por Payne y Hicks (1992).

Ustunol *et al*. (1991) estudian el comportamiento de 8 enzimas coagulantes mediante un sensor de fibra óptica a 950 nm. Dichos investigadores también dividen la evolución del perfil de reflectancia difusa durante la coagulación en tres secciones: período de inducción, período sigmoidal y período logarítmico. Saputra *et al*. (1992) comparan diversas longitudes de onda en la región *NIR* mediante análisis de componentes principales, y seleccionan aquellas que resultan más apropiadas para la monitorización de la liberación de *CMP* durante la hidrólisis de la leche. Ustunol *et al*. (1993) determinan un aumento de la pendiente de incremento del ratio de reflectancia difusa (950 nm) al aumentar la concentración de enzima y la temperatura y al disminuir el pH. Payne *et al*. (1993*b*) siguen la evolución de la coagulación enzimática de la leche

de vaca mediante un sensor de dispersión de radiación *NIR* (940 nm) y paralelamente determinan el T_{cut} formográfico (K_{20}), encontrando una alta correlación entre T_{max} (punto de inflexión de la curva de reflectancia frente al tiempo) y K_{20}. El ensayo también sugiere la necesidad de introducir un parámetro de concentración proteica para la predicción de T_{cut}.

Payne *et al*. (1993*a*) observan que la reflectancia difusa a 820 nm varía linealmente con la concentración de grasa de la leche en un rango que va desde el 1% al 5%. Remeuf *et al*. (1993) compara el funcionamiento de un sensor de transmisión *NIR* con un formógrafo en leche entera y desnatada, y encuentra una buena correlación entre el punto de inflexión de la la señal óptica y el *RCT* formográfico (*r*, determinado mediante formógrafo). Saputra (1992) desarrolla una técnica de monitorización y predicción del grado de hidrólisis enzimática en leche, mediante reflectancia difusa *NIR*. En 1995, Payne desarrolla un algoritmo para la predicción de T_{cut}. Se observa que $T_{cut} = \beta\, T_{max}$, donde β es una constante que permite ajustar la predicción a la selección subjetiva de T_{cut} realizada visualmente por el quesero.

Payne *et al*. (1996) estudia la señal de ruido en los sensores de fibra óptica y su efecto en la precisión del instrumento, estableciendo una desviación estándar de 10 s para la determinación de T_{max}. Sugieren que el ruido puede ser minimizado mediante un aumento del área total de la fibra y con un descenso de la intensidad de la fuente de emisión. López *et al*. (1997*b*) analizan la evolución de la reflectancia difusa (900 nm) en leche de cabra coagulada con diferentes enzimas, no encontrando diferencias significativas entre el tiempo de coagulación de Berridge (T_{clot}) y el punto de inflexión de la curva de reflectancia.

Recientemente, Lochte-Watson *et al*. (1998) analizan el efecto del pH, la grasa, la proteína y el calcio sobre la reflectancia difusa de la leche, en el rango de longitudes de onda entre 350 y 990 nm, y determinan que la reflectancia difusa aumenta linealmente con la concentración de grasa y de proteína y decrece con el pH. Payne *et al*. (1998)

observan en la elaboración de queso cottage a nivel industrial que durante la coagulación se produce un incremento lento de la reflectancia difusa durante las primeras tres horas, y que aumenta rápidamente al final del proceso. Un algoritmo que contiene T_{max} y la pendiente a tiempo T_{max}, predice T_{cut} con error estándar de predicción (*SEP*) de 8'7 min. Laporte *et al*. (1998) investigan una sonda de reflexión *NIR* que opera en el espectro (1100-2500 nm), para monitorizar la coagulación de leche y la comparan con un sensor térmico.

Crofcheck *et al*. (1999) monitorizan los cambios de reflectancia difusa durante la elaboración de queso cottage en una planta elaboradora y comprueban que un modelo que contiene T_{max} y un parámetro obtenido por diferencia de los tiempos correspondientes a los máximos de la primera y la segunda derivadas predice el valor de T_{cut} seleccionado por el quesero con un *SEP* de 6'4 min. O'Callagan *et al*. (1999*a*) compara diferentes sensores "on-line" para predicción de T_{cut} (sensor "CoAguLite" de reflectancia difusa *NIR* (880 nm), sensores "Gelograph" y "TxPro" de transmisión *NIR* (850 y 680 nm respectivamente), sensor térmico "hot- wire" y sensores vibracionales "Viscolite" y "Sofraser"). Las seis técnicas de monitorización de la coagulación y determinación de T_{cut} se comparan entre sí y con medidas reológicas de endurecimiento del gel (*G*' y *G*'') a diferentes velocidades de coagulación. Todos los sensores permiten reproducir tanto *RCT* como T_{cut} (determinado con el reómetro).

En la Exhibición Mundial de Procesado de Alimentos de París (2000) se presentaron dos instrumentos ópticos de transmisión *NIR*, recientemente desarrollados por el *INRA* ("Optigraph" y "*MSC* 1000"). El gelógrafo "Gelograph *M*", que inicialmente se desarrolló en base a la medición viscosimétrica dió paso al "Gelograph *NT*" que se basa en la transmisión *NIR* y que determina *RCT*, permitiendo la selección de T_{cut}. El "Gelograph *NT*" ha sido sustituido ahora por el "Optigraph" que es un instrumento de laboratorio que puede analizar diez muestras a la vez recientemente patentado por Picque *et al*. (1996). El "*MSC* 1000" se corresponde con la versión "on-line" del "Optigraph", aún no disponible. Castillo *et al*. (2000*b*) confirman la capacidad

de los sensores de reflectacia difusa (*NIR*) para la predicción de T_{cut} en leche de cabra (*SEP*= 84'5 s) y predicen T_{clot} con un *SEP* de 0'89 min. Raynal y Remeuf (2000) estudian la coagulación en leche de cabra, vaca y oveja mediante un sensor mixto que combina una sonda térmica y un sensor óptico de transmisión *NIR*.

III. OBJETIVOS

Las características fisico-químicas de la leche (especialmente pH, porcentaje de proteína y concentración de calcio) fluctúan de forma habitual en la práctica industrial. Como consecuencia - especialmente en industrias artesanales de pequeño tamaño que no estandarizan la leche -, las condiciones de elaboración deben ser ajustadas en función de las características tanto de la materia prima como de la variedad de queso a elaborar con el fin de optimizar el proceso productivo, aumentando tanto la calidad del queso como el rendimiento empresarial. En este sentido, uno de los puntos más críticos en la elaboración del queso es la determinación del momento idóneo para el corte de la cuajada. Como consecuencia de la gran subjetividad de los métodos de determinación del tiempo de corte tanto a nivel artesanal como industrial, y siendo la elección del momento más adecuado de gran importancia para la mejora del rendimiento y la homogeneidad del producto final, se planteó como objetivo general de la presente

memoria de Tesis Doctoral el estudio de la dispersión de radiación infrarroja como método para la predicción del tiempo de corte, a través de la consecución de los siguientes objetivos específicos:

1. Monitorizar la coagulación de la leche de cabra mediante el empleo de un sensor de fibra óptica, basado en la medida de la dispersión de radiación de infrarrojo próximo a 880 nm.

2. Analizar la curva de reflectancia difusa obtenida durante la coagulación de la leche de cabra, así como su primera y segunda derivadas con respecto al tiempo.

3. Obtener, a partir del perfil de reflectancia-tiempo, los parámetros de mayor interés para la predicción del tiempo de corte y para la caracterización del proceso de coagulación y establecer un análisis comparativo de dichos parámetros con los parámetros más habituales de control de la coagulación.

4. Clasificar las variables consideradas en base a sus magnitudes y comportamiento frente a los factores de la coagulación.

5. Analizar el efecto de los factores que determinan la variación del tiempo de corte (concentración de cloruro cálcico y de enzima coagulante, tipo de enzima, temperatura, pH y concentración proteica de la leche) sobre la evolución de la reflectancia difusa y parámetros derivados, estableciendo posibles interacciones entre ellos.

6. Desarrollar un modelo matemático mediante el empleo de regresión no lineal, que describa el incremento de reflectancia difusa durante la coagulación de la leche y que permita obtener y estudiar las constantes cinéticas de agregación de las micelas de caseína y de endurecimiento del gel.

7. Seleccionar aquellas variables de reflectancia y los factores experimentales más adecuados para la predicción del tiempo de corte, a fin de establecer los algoritmos necesarios para el control automático del corte de la cuajada en la elaboración de queso de cabra.

La consecución de dichos objetivos supone la primera aportación para la transferencia de dicha tecnología a la industria quesera regional y nacional, contribuyendo a solucionar problemas e inquietudes profundamente arraigados en dicha industria, manifestados de forma reiterada por empresas del sector.

IV. PLAN DE TRABAJO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron tres experiencias, a fin de abordar los objetivos propuestos en esta memoria de Tesis Doctoral. Los trabajos experimentales se desarrollan conjuntamente en colaboración con el Departamento de Biosistemas e Ingeniería Agrónoma de la Universidad de Kentucky y en la Unidad Docente de Tecnología de Alimentos adscrita al Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia.

Los resultados obtenidos han dado lugar a cuatro artículos que han sido publicados o se encuentran en revisión en revistas del sector lácteo destacadas a nivel internacional (*International Dairy Journal* y *Journal of Dairy Research*). Dichos artículos aparecen recogidos al final de esta memoria de Tesis.

Según Hunter *et al*. (1997) el propósito de un experimento estadístico es comparar la respuesta de diversas variables a uno o más factores, cada uno de los cuales presenta dos o más niveles, considerando que las combinaciones de factores y niveles constituyen los tratamientos que son aplicados a las unidades experimentales. Los cuatro conceptos clave son aleatoriedad, réplica, bloque y estructura de tratamiento factorial. Los tratamientos se asignan a las unidades experimentales en orden aleatorio para eliminar el sesgo procedente de fuentes desconocidas de variación. Las réplicas son necesarias para estimar la variación residual y para mejorar la estimación del efecto de los tratamientos. Los bloques constituyen la manera de manejar las fuentes conocidas de variación. Y por último, la estructura de tratamientos factorial permite estudiar en el mismo experimento el efecto de un número de factores.

Cada experimento consiste en un diseño completamente aleatorio con dos o tres factores (*A* y *B* o *A*, *B* y *C*), con *a* niveles para el factor *A*, *b* niveles para el *B*, *c* niveles para el factor *C* y con tres réplicas ($n = 3$). Se considera que cada combinación de niveles de factores es un tratamiento y que se cuenta con *n* observaciones para cada tratamiento. El total de observaciones corresponde a *nabc*.

El orden de realización de cada uno de los ensayos simples, constituyentes de cada experimento, se asigna mediante la generación de números aleatorios. Este tipo de diseño experimental, permite estudiar las posibles interacciones de los factores, a la vez que ahorra tiempo y esfuerzo.

Para lograr el nivel de exactitud de este tipo de experimentos, se necesitarían más unidades experimentales si los factores fueran estudiados a través de varios experimentos de un solo factor. Dado que los diversos factores se combinan en un único experimento el resultado tiene un campo de aplicación más amplio (Daniel, 1995).

En la **Figura IV.*1*** se reflejan gráficamente las relaciones existentes entre los objetivos planteados, los experimentos desarrollados y los artículos resultantes incluidos en esta memoria. La descripción de cada uno de los experimentos realizados se detalla a continuación.

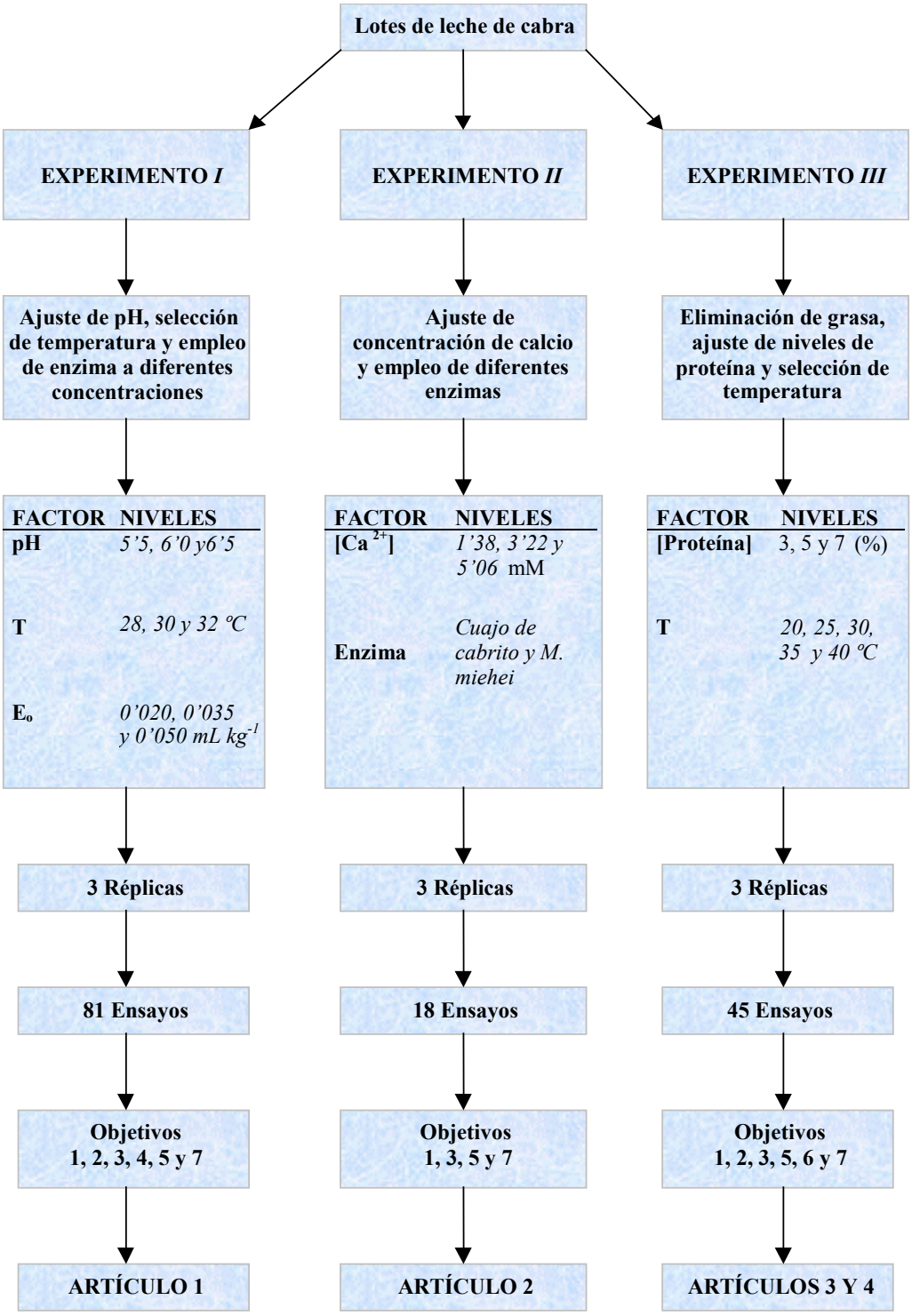

Figura IV.*1*. Esquema del plan de trabajo.

Experimento *I*.- Este experimento corresponde a un diseño completamente aleatorio con tres factores (pH, concentración de enzima y temperatura) y tres réplicas. La leche se ajusta a tres niveles de pH (5'5, 6'0 y 6'5) y se coagula a tres niveles de temperatura (28, 30 y 32ºC) usando tres niveles de concentración enzimática (0'020, 0'035 y 0'050 mL kg^{-1}). Se realizan un total de 81 ensayos (*nabc* = 3^4). Dicho experimento se desarrolla íntegramente en la Universidad de Kentucky (*EEUU*) y contribuye a la consecución de los objetivos 1, 2, 3, 4, 5 y 7. Los detalles referentes al material y metodología empleados, así como los resultados y discusión se desarrollan ampliamente en el **Artículo 1** adjunto a esta memoria de Tesis.

Experimento *II*.- El segundo experimento es un diseño completamente aleatorio con dos factores (tipo de enzima y concentración de cloruro cálcico) y tres réplicas. La leche se coagula a tres niveles de concentración de calcio (1'38, 3'22 y 5'06 mM) mediante dos enzimas distintas (cuajo líquido de cabrito y enzima coagulante derivada de *Mucor miehei*). Se realizan un total de 18 ensayos (*nab* = 3^2 * 2). El experimento se ejecuta en su totalidad en la Universidad de Murcia, contribuyendo especialmente a los objetivos 1, 3, 5 y 7. La descripción pormenorizada del material y métodos empleados, y la discusión de los resultados obtenidos se recogen en el **Artículo 2**.

Experimento *III*.- El último de los experimentos que constituyen esta memoria se basa en un diseño completamente aleatorio con dos factores (concentración de proteína y temperatura) y tres réplicas. La leche se ajusta a tres niveles de concentración proteica (3, 5 y 7%) y se coagula a cinco niveles de temperatura (20, 25, 30, 35 y 40ºC). Los 45 ensayos realizados en la Universidad de Kentucky (*nab* = 3^2 * 5) contribuyen al logro de los objetivos 1, 2, 3, 5, 6 y 7. Los materiales y métodos se detallan íntegramente en el **Artículo 3**. Los resultados relativos a los objetivos 1, 2, 3, 5, y 7 y su discusión se recoge en el **Artículo 3**, reservándose al **Artículo 4**, el análisis y discusión de los resultados referentes al objetivo 6. En las **Tablas IV.*1***, **IV.*2***, y **IV.*3***, se presentan los tratamientos correspondientes a la última réplica de los experimentos *I*, *II* y *III*, reflejándose el orden aleatorio de realización de los ensayos.

Tabla IV.*1*. Tratamientos del experimento *I* . [1]

			Combinación de niveles de factores		
Tratamiento	**Orden de ejecución**	**Lote**	*pH*	*T (ºC)*	E_0 *(ml kg^{-1})*
3	1	9	6’5	36	0’05
14	2	9	6	32	0’035
17	3	9	6	28	0’035
18	4	9	6	28	0’05
26	5	9	5’5	28	0’035
9	6	9	6’5	28	0’05
25	7	9	5’5	28	0’02
20	8	9	5’5	36	0’035
19	9	9	5’5	36	0’02
23	10	10	5’5	32	0’035
13	11	10	6	32	0’02
16	12	10	6	28	0’02
2*	13	10	6’5	36	0’035
2**	28	11	6’5	36	0’035
22	14	10	5’5	32	0’02
10	15	10	6	36	0’02
8	16	10	6’5	28	0’035
1	17	10	6’5	36	0’02
4	18	10	6’5	32	0’02
6	19	10	6’5	32	0’05
21	20	10	5’5	36	0’05
12	21	10	6	36	0’05
11	22	11	6	36	0’035
27	23	11	5’5	28	0’05
15	24	11	6	32	0’05
24	25	11	5’5	32	0’05
5	26	11	6’5	32	0’035
7	27	11	6’5	28	0’02

[1] Datos correspondientes a la tercera réplica.
[*] Inconcluso por corte del suministro eléctrico.
[**] Repetido al final de la serie.

Tabla IV.*2*. Tratamientos del experimento *II*. [1]

			Combinación de niveles de factores	
Tratamiento	**Orden de ejecución**	**Lote**	*Tipo de enzima*	*[Cl_2Ca]*
1	1	6	*M. miehei*	1'38
5	2	6	Cabrito	3'22
3	3	6	*M. miehei*	5'06
4	4	6	Cabrito	1'38
2	5	7	*M. miehei*	3'22
6	6	7	Cabrito	5'06

[1] Datos correspondientes a la tercera réplica.

Tabla IV.*3*. Tratamientos del experimento *III*. [1]

			Combinación de niveles de factores	
Tratamiento	**Orden de ejecución**	**Lote**	*Proteína (%)*	*T (ºC)*
1	1	11	3	20
9	2	11	5	35
10	3	11	5	40
12	4	11	7	25
13	5	11	7	30
7	6	11	5	25
5	7	11	3	40
14	8	11	7	35
2	9	11	3	25
8	10	11	5	30
6	11	11	5	20
11	12	11	7	20
3	13	11	3	30
15	14	11	7	40
4	15	11	3	35

[1] Datos correspondientes a la tercera réplica.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de los trabajos de investigación, que desarrollan los objetivos planteados, se realiza la puesta a punto de técnicas complementarias de laboratorio necesarias para el estudio y caracterización de un sensor de dispersión de radiación *NIR*, como método de predicción del tiempo de corte. Posteriormente, los resultados obtenidos se emplean para el desarrollo de modelos cinéticos que describen el incremento de reflectancia difusa durante la coagulación. En este apartado se recoge un resumen de las técnicas utilizadas de mayor interés o de aquellas que han sido modificadas en relación con los métodos originales. Los detalles relativos al material y métodos empleados específicamente en cada experimento, incluido el diseño experimental, el diagrama de flujo del procesado de muestras y el análisis estadístico, se pormenoriza en cada uno de los artículos correspondientes, del capítulo **IX**. En el diagrama de bloques de la **Figura V.*1*** se representa de forma esquemática el procedimiento seguido en las tres experiencias realizadas. En la **Figura V.*2*** se muestran las diferentes técnicas puestas a punto y/o utilizadas durante este trabajo.

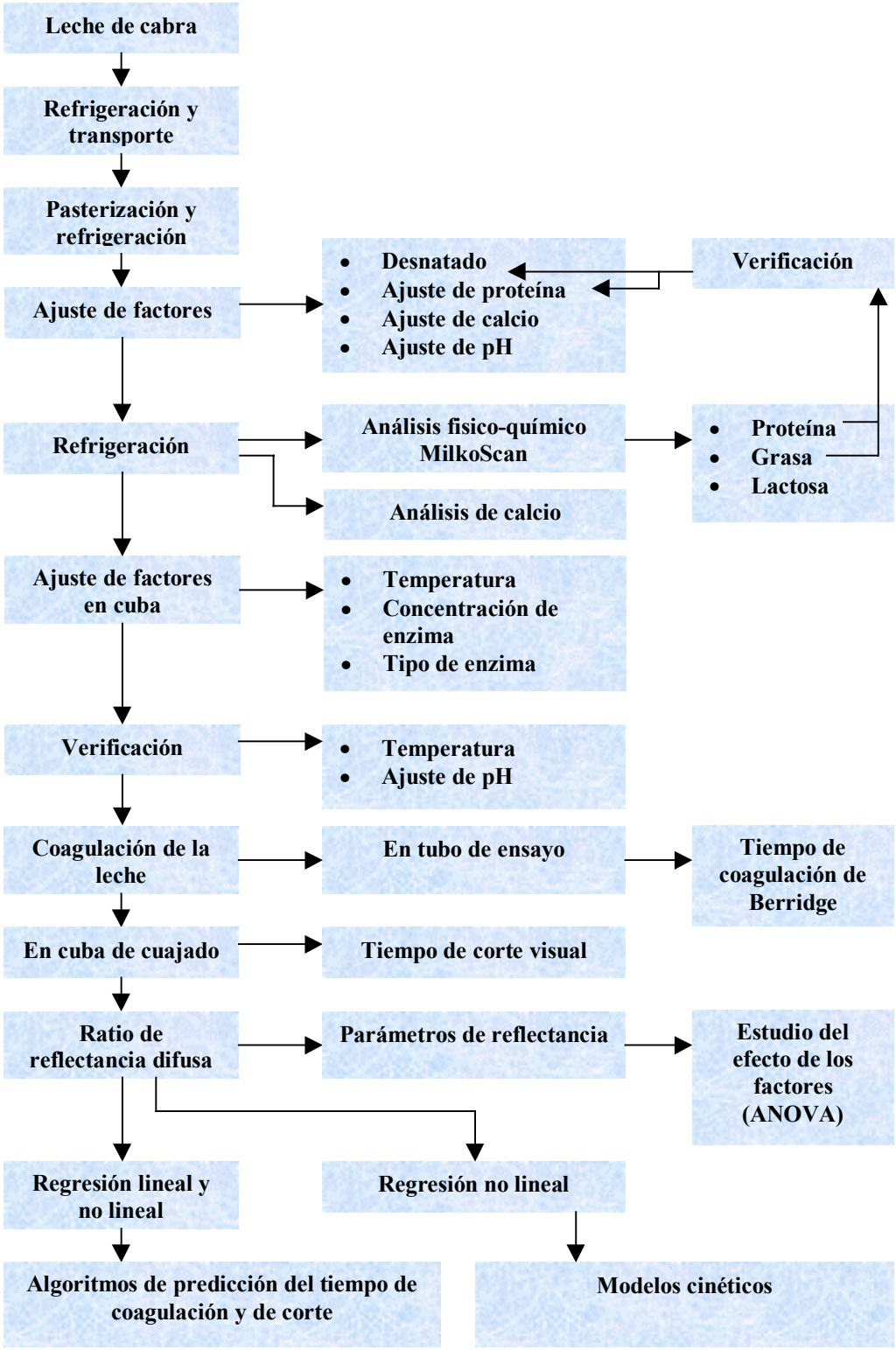

Figura V.*1*. Diagrama de flujo general de los ensayos.

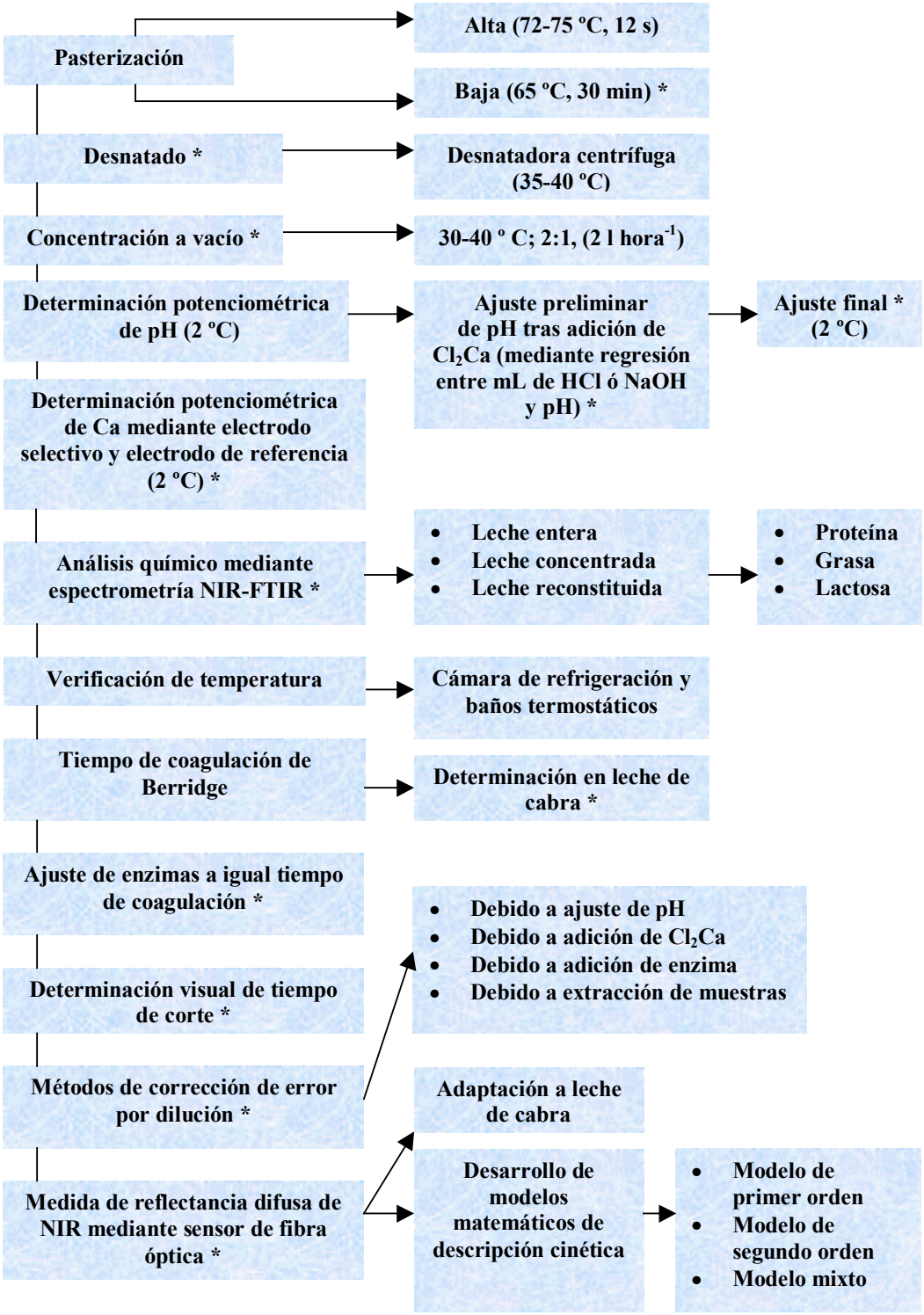

Figura V.2. Técnicas utilizadas. *, puesta a punto en este trabajo.

V.1. ANÁLISIS FISICO-QUÍMICO DE LECHE DE CABRA

V.1.1. Determinación de componentes mayoritarios

El análisis de los componentes mayoritarios (proteína, grasa y lactosa) de la leche empleada en los experimentos *I* y *III* del presente estudio se realiza mediante espectrometría de infrarrojo medio por Transformada de Fourier (*FTIR*) (MilkoScan *FT* 120, Foss Electric *A*/*S*, Hilleroed, Denmark; http://www.foss.dk). El equipo, que posee una exactitud ≤ 1'0% (%, *CV*) y una precisión de 0'25% (%, *CV*), fue previamente calibrado con 12 muestras de leche de cabra suministradas por *DQCI* Services (Mounds View, *MN*, *EEUU*; http://www.dqci.com). Para el análisis por espectrometría de infrarrojo de las muestras del experimento *II* se utiliza un MilkoScan (mod. 133-*B*, Foss Electric *A*/*S*, Hilleroed, Denmark) que tiene una exactitud ≤ 1'0% (%, *CV*) y una precisión de 0'5% (%, *CV*), calibrado con muestras de leche de cabra. La composición química media de la leche utilizada en los diferentes experimentos realizados se presenta en la **Tabla V.1.1.*1***.

Tabla V.1.1.*1*. Composición química de la leche de cabra utilizada.

Experimento	*N*[a]	Proteína (%)	Grasa (%)	Lactosa (%)
I	8	4'77 ± 0'11	5'49 ± 0'15	4'31 ± 0'04
II	8	3'35 ± 0'02	4'83 ± 0'27	4'66 ± 0'07
III	3	4'85 ± 0'42	4'88 ± 0'74	--

[a] *N*: número de lotes.

V.1.2. Determinación del pH de la leche

El pH de las muestras de leche se determina con un electrodo combinado de vidrio (mod. 81-04, Orion Research Inc., Boston, *MA*, *EEUU*; http://www.thermoorion.com)

conectado a un analizador de iones (mod. *EA* 940, Orion Research Inc., Boston, *MA*) con compensación automática de temperatura. El pH-metro se calibra a dos puntos con soluciones estándar de pH 7'00 y 4'01 (Orion Research Inc., Boston, *MA*). La resolución de este pH-metro es ± 0'01 unidades de pH, con un rango de trabajo de 0-14 y de 0-100ºC para la temperatura.

V.1.3. Determinación del calcio iónico libre

El calcio iónico libre en las muestras de leche se analiza mediante un electrodo selectivo de calcio (mod. 93-20, Orion Research Inc., Boston, *MA*, *EEUU*) y un electrodo de referencia (mod. 90-01, Orion Research Inc, Boston, *MA*), ambos conectados a un analizador de iones (mod. EA 940, Orion Research Inc., Boston, *MA*). El equipo tiene una precisión de ± 4%, un rango de trabajo de 0 a 40ºC y se calibra diariamente a dos puntos. Las disoluciones patrón de calcio son 10^{-4} y 2×10^{-3} M, preparadas a partir de una disolución de calcio estándar 0'1 M (Orion Research Inc., Boston, *MA*). Para mantener constante la fuerza iónica se añade, tanto a las muestras como a los estándares, una disolución de ajuste de fuerza iónica (*ISA*, Orion Research Inc., Boston, *MA*) a un ratio 50:1. El electrodo selectivo de calcio se calibra a 2ºC, realizándose todas las determinaciones a dicha temperatura.

V.2. TRATAMIENTOS PREVIOS DE LA LECHE

V.2.1. Desnatado

La leche de cabra empleada en el experimento *III* se desnata a 35-40ºC el mismo día de la recogida, mediante el empleo de una desnatadora centrífuga eléctrica (Subitas *DE* 085, The Coburn Company, Inc, Whitewater, Wisconsin, *EEUU*, http://www.coburnco.com). Para mejorar la eficacia del proceso se añadió un agente antiespumante (Antifoam 1520-*US*, Dow Corning Corp., Midland, *MI*, *EEUU*,

http://www.dow.com) a una concentración de silicona activa de 10 ppm, con el fin de impedir la formación de espuma tanto durante el proceso como en la concentración posterior de la leche desnatada.

V.2.2. Ajuste de la concentración de calcio

En el experimento *II*, tanto en los lotes de leche empleados para realizar el análisis de reflectancia (50 L/lote) como en los utilizados para el ajuste de la actividad coagulante (5 L/lote), se fija la concentración de calcio a tres niveles: 1'38, 3'22 y 5'06 mM. Para evitar variaciones incontroladas del pH, el ajuste de la concentración de calcio se realiza previamente al del pH en el mismo día de recogida de la leche. La cantidad de calcio anhidro, necesaria para la obtención de las diferentes concentraciones ensayadas, se pesa (± 0'1 mg) y disuelve en agua destilada hasta alcanzar un volumen constante de 2 mL kg^{-1} de leche. Dicha disolución se añade a la leche y se agita hasta su completa homogeneización refrigerándose a 2ºC. En los experimentos *I* y *III* se añade, también en el día de recepción de la leche, una disolución de concentración constante de calcio (156 mg kg^{-1} de leche en 40 mL de agua destilada, en el experimento *I* y 1'5 mL de una disolución 5'77 M de calcio en agua destilada en el experimento *III*) y siempre antes del ajuste de pH. La adición, en cada una de las tres experiencias, de un volumen determinado de la disolución de calcio pertinente, permite mantener constante la relación de volumen entre la disolución de enzima y la leche (*E*/*L*).

V.2.3. Ajuste de la concentración de proteína

En el experimento *III* se ajustaron las concentraciones de proteína a niveles de 30, 50 y 70 g kg^{-1}. La leche de cada lote (44 L/lote) se desnata y se pasteuriza a 65ºC durante 30 minutos, y seguidamente se concentra a baja temperatura (30-40ºC), en un evaporador de planta piloto, para obtener un porcentaje próximo a un 10% de proteína. La leche desnatada y evaporada, se refrigera a 2ºC. Los procesos mencionados se realizan el mismo día de la recepción de la leche. Para cada réplica, se prepara una

disolución salina que corresponde a un ultrafiltrado de leche simulado (*SMUF*) según Jenness y Koop (1962), empleado para diluir la leche evaporada hasta los niveles de concentración proteica deseados. La concentración de proteína de la leche se determina mediante espectrometría de infrarrojo, tras la calibración del equipo, y se calcula la proporción de mezcla de la solución salina y la leche concentrada. El volumen de muestra a reconstituir se corrige a fin de compensar la variación de la relación de volumen (*E*/*L*) debida a la extracción de alícuotas para análisis (apartado **V.6.5.4**). La leche reconstituida se ajusta a pH 6'8 y posteriormente se verifica su concentración proteica mediante análisis **(Tabla V.2.3.*1*)**.

Tabla V.2.3.*1*. Ajuste del contenido proteico en leche de cabra en el experimento *III*. [1]

Lote [a]	Leche [b]		Leche [b] desnatada concentrada	Leche reconstituida [c]		
				Nivel de proteína		
	Proteína	Grasa	Proteína	3	5	7
1 (8)	5'01 ± 0'01	4'14 ± 0'02	9'71 ± 0'02	3'06 ± 0'01	5'06 ± 0'02	7'08 ± 0'05
2 (9)	4'38 ± 0'03	4'89 ± 0'01	9'80 ± 0'03	3'05 ± 0'01	5'03 ± 0'01	7'04 ± 0'01
3 (11)	5'17 ± 0'01	5'61 ± 0'02	9'74 ± 0'02	3'23 ± 0'03	5'27 ± 0'05	7'37 ± 0'04

[1] Valores de grasa y proteína expresados como porcentajes. Corresponde a la Tabla 1 del artículo 3.
[a] Numeración real del lote, entre paréntesis.
[b] Media de 2 medidas.
[c] Media de 10 medidas.

V.2.4. Ajuste de pH

En los experimentos *I* y *II*, tras la recepción y pasterización, la leche se refrigera y seguidamente se le añade la dosis correspondiente de cloruro cálcico. Una vez estabilizado el pH, y a 2ºC, se realiza la valoración con HCl 1 M. Se obtiene así una recta de regresión entre el pH y los mL de HCl 1 M, con el fin de predecir la cantidad de

ácido necesaria para ajustar al pH deseado las muestras de leche, en función del pH inicial de cada lote de leche de volumen constante. Tras la adición de ácido, las muestras se mantienen refrigeradas a 2ºC durante por lo menos 12 horas para permitir la estabilización del pH, e inmediatamente antes de su coagulación se realiza, si es necesario, el ajuste final de cada muestra, por adición de HCl 1 M ó NaOH 1 M.

En el experimento *III*, primeramente se desnata, pasteuriza y condensa la leche y posteriormente se reconstituye en muestras de contenido proteico preestablecido (3, 5 o 7%). Las muestras se refrigeran inmediatamente y tras la adición de cloruro cálcico y estabilización del pH, se obtiene de forma análoga a la anteriormente descrita una recta de regresión entre el pH y los mL de NaOH 1 M para cada una de las concentraciones de enzima utilizadas, lo que permite estimar el volumen de base a añadir para el ajuste de pH. Por último se realiza un ajuste preciso del pH de cada muestra a 2ºC antes de la realización de cada ensayo.

Tras el ajuste definitivo de pH, en todos los experimentos se realiza una corrección de la relación de volumen (*E*/*L*) de la forma descrita en el apartado **V.6.5.3**. En el experimento *I*, en el que se utilizan diferentes niveles de temperatura, se realiza una verificación del valor real de pH a la temperatura de ensayo, para la consideración estadística de dicho efecto.

V.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN DE BERRIDGE

Para la medida del tiempo de coagulación de Berridge en las muestras de leche de cabra se seleccionó por su precisión y simplicidad la norma *IDF* (*FIL*) 110*A* (1987), utilizada según protocolo en todos los casos, excepto en el experimento *I* en el que se introdujeron pequeños cambios, con el fin de comparar los parámetros de tiempo obtenidos mediante reflectancia difusa y el tiempo de coagulación de Berridge. En cada tubo de ensayo, en vez de 1 mL de dilución de enzima como especifica la norma, se

añadieron 50 μL para asegurar el mismo efecto de dilución tanto en los tubos de coagulación como en la cuba de cuajado (apartado **V.6.5.1**). La leche de cabra se coagula a la temperatura correspondiente a cada ensayo realizado, en vez de a la temperatura de 30ºC especificada por la norma.

V.4. AJUSTE DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN

En el experimento *II*, se compara el proceso de coagulación empleando dos enzimas diferentes: cuajo líquido de cabrito con 156 mg L^{-1} de quimosina activa (Grandine®, System Bio Industries, Sanofi, Division Culture et Enzymes, Paris, *F*) y enzima coagulante procedente de *M. miehei* con 143 *IMCU* mL^{-1} (Caglio Star España S.A., Murcia, http://www.proquiga.es). Con leche recogida en la misma granja y procesada de forma análoga a la empleada en los ensayos de reflectancia difusa en dicho experimento, se realizó el ajuste de las dos enzimas ensayadas a tiempos de coagulación similares. Para ello, se selecciona la concentración de cada enzima para la obtención de un tiempo de coagulación de Berridge de 470 ± 30 s, para leche de cabra con una concentración de cloruro cálcico de 5'06 mM.

Posteriormente se diseña un experimento de bloques completamente aleatorio con dos niveles correspondientes al tipo de enzima y tres correspondientes a la concentración de cloruro cálcico (1'38, 3'22 y 5'06 mM), para verificar el ajuste del tiempo de coagulación. El experimento completo (6 ensayos) se realiza de forma aleatoria y por triplicado con el mismo lote de leche y posteriormente se repite con otros dos lotes diferentes, obteniéndose en total nueve valores de tiempo de coagulación por tratamiento.

El análisis de varianza determina que la variabilidad de dicho parámetro se debe mayoritariamente al lote de leche y a la concentración de cloruro cálcico, no siendo significativo el efecto de las réplicas ni el del tipo de enzima. Independientemente del

tipo de enzima utilizado, el tiempo de coagulación obtenido para cada concentración de cloruro cálcico no varía en más de 25 s, pese a lo cual las medias de mínimos cuadrados correspondientes a las tres concentraciones de calcio analizadas fueron significativamente diferentes **(Tabla V.4.*1*)**.

Tabla V.4.*1*. Análisis de la varianza para validación del ajuste del tiempo de coagulación de Berridge. Efecto de la concentración de calcio y el tipo de enzima sobre el tiempo de coagulación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Estadístico *F*
Modelo	4	37250	17’1***
Lote	1	5532	10’2***
Tipo de enzima	1	190	0’348ns
Concentración de calcio	2	31418	28’8***
Error	47	25622	
Total corregido	51	62872	

	T_{clot} medio (s) [a]	Límite superior (s) [b]	Límite inferior (s) [b]
[Cl_2Ca] (mM)			
1’38	531c	520	542
3’22	503d	491	515
5’06	472e	461	483
Tipo de enzima			
Enzima microbiano	504f	495	513
Cuajo de cabrito	500f	491	509

[a] T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge.
[b] Límites del intervalo de confianza al 95%.
[c-f] Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P < 0’05).
*** Significativo al 99%; ns No significativo al nivel 0’05.

V.5. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE CORTE

Para la determinación visual del tiempo de corte en cuba de laboratorio (experimentos *I* y *III*) se fabricaron varillas de vidrio de puntas redondeadas, con

diámetros y longitudes variables dentro de un amplio rango, de entre las cuales, previamente a la realización de cada experimento, se seleccionó una. La observación de la textura de la cuajada con la ayuda de la varilla se inicia a partir de T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la primera derivada del perfil de reflectancia con respecto al tiempo, y cuando ésta se mantiene en posición vertical durante un período de 3 s tres veces consecutivas, se procede a la observación visual de la cuajada, mediante realización de cortes y separación de la pared de la cuba con un cuchillo. El tiempo de corte se determina cuando el corte de la cuajada es limpio y homogéneo y la cuajada se separa fácilmente y sin romperse de la pared de la cuba, no quedando restos de cuajada adherida al cuchillo. En el experimento *II*, realizado a nivel piloto en cuba de 10 L, la determinación del tiempo de corte se realiza como se ha descrito, pero sin asistencia de la varilla y comprobando que tras presionar la superficie de la cuajada con la mano no quedan en ella restos de cuajada sino de suero.

V.6. MONITORIZACIÓN DE LA COAGULACIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN DE RADIACIÓN INFRARROJA

Las muestras de leche usadas para monitorización de la reflectancia difusa se coagularon en una pequeña cuba de acero inoxidable (15 cm × 13’3 cm × 15 cm) tal como aparece en la **Figura V.6.*1***, equipada con una tapa recubierta con aislante térmico para reducir el enfriamiento superficial de la muestra por evaporación. A la cuba se le practica una perforación en la pared para la inserción del sensor óptico **(Figuras V.6.*1* y V.6.*2*)**.

La temperatura de la leche se controla por inmersión de la cuba en baños termostáticos (Lauda *RM* 20, Brinkman Instrument Inc., Westbury, *NY*, *EEUU*, precisión ± 0’01ºC; http://www.brinkmann.com o Digiterm 100, *J.P.* Selecta, S.A., Barcelona, precisión ± 0’05ºC: http://www.sefes.es/selecta/).

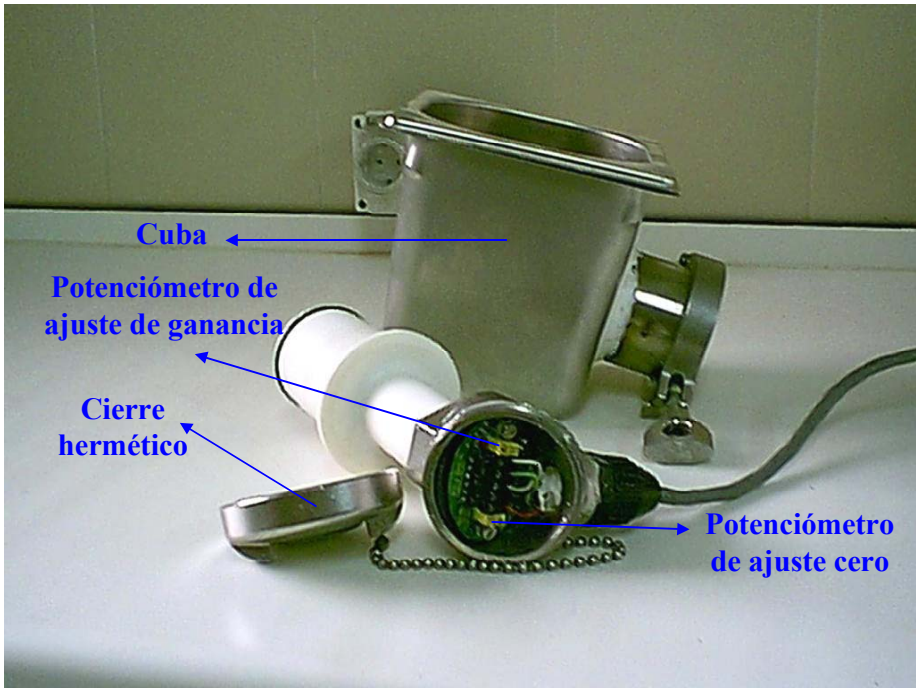

Figura V.6.*1*. Detalle del sensor de fibra óptica y la cuba de cuajado.

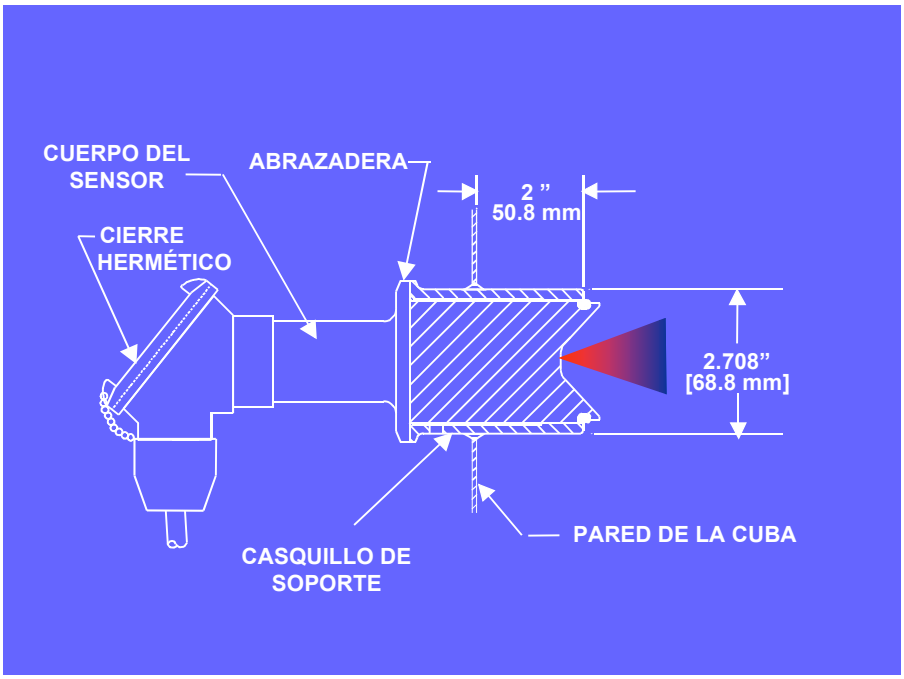

Figura V.6.*2*. Sensor de dispersión de radiación de *NIR*.

El equilibrio térmico de la muestra se comprueba mediante determinación de la temperatura de agua y leche con un termómetro digital (mod. 5831 *A*, Omega Engineering Inc., Stamford, *CT*, *EEUU*, precisión ± 0'2ºC; http://www.omega.com o mod. 3206, Digitron Instrumentation Limited, Mead Lane, Hertford, Herdfordshire, *U.K.*, precisión ± 0'3ºC; http://www.digitron.co.uk) y con un Data-logger portátil (mod. *SF*12, Digitron Instrumentation Limited, Mead Lane, Hertford, Herdfordshire, *U.K.*) conectado a un termopar (mod. *TKSFL-S* Digitron Instrumentation Limited, Mead Lane, Hertford, Herdfordshire, *U.K.*, precisión ± 0'5ºC). Tras la adición de la enzima la leche se agita durante un minuto para distribuir la enzima de forma homogénea. La monitorización de la coagulación mediante el sensor de fibra óptica se inicia a partir de que se añade la enzima.

V.6.1. Equipo de medición

Para la monitorización de la reflectancia difusa se emplean sensores de fibra óptica (mod. 3 y 4*A*, CoAguLite, Reflectronics, Inc., Lexington, *KY*, *EEUU*; http://www.reflectronics.com). Dichos sensores están especialmente diseñados para su instalación en la pared de la cuba de cuajado como se observa en las figuras del apartado **V.6 (Figuras V.6.*1* y V.6.*2*)**. Las piezas metálicas están fabricadas en acero inoxidable (316 *SS*). En el modelo de sensor 4*A* se sustituye el cuerpo metálico por uno fabricado con material plástico de alto peso molecular, que proporciona aislamiento térmico a los componentes ópticos y electrónicos. Por su diseño, el sensor es compacto, rígido, sanitario (estándar sanitario, 3*A*, 46-01), resistente a la corrosión y hermético.

Los sensores CoAguLite **(Figura V.6.1.*1*)** cuantifican la reflectancia difusa que es linealmente convertida en una señal de 4-20 mA, que a través de una resistencia de 250 Ω, proporciona un voltaje de 1 a 5 V. El sensor requiere para su funcionamiento de 10-24 voltios de corriente continua y consta de una fibra óptica de 600 μm de diámetro que transmite, hasta la muestra de leche, luz de 880 nm de longitud de onda procedente de un diodo de emisión de luz, y de una segunda fibra del mismo grosor, que conduce la

reflectancia difusa producida por las partículas de la muestra hasta un fotodetector de silicio (mod. *TSL* 245 detector, Texas Instrument Incorporated, Dallas, *TX*, *EEUU*; http://www.ti.com).

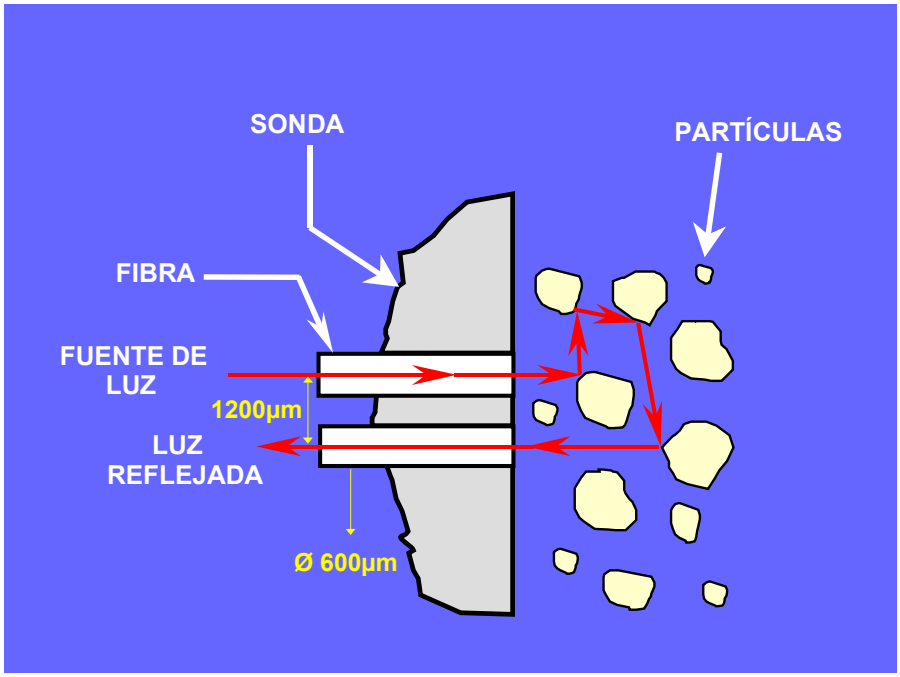

Figura V.6.1.*1*. Extremo distal del sensor CoAguLite.

El sistema de adquisición de datos se compone de un ordenador personal (486; pentium) equipado con un convertidor analógico digital (*DAS* 802, Keithley Instrument Inc., Cleveland, *OH*, *EEUU*; http://www.keithley.com). El sistema está programado para adquisición y procesado de datos a tiempo real usando Visual Basic 4.0 (Microsoft Corporation, Redmond, *WA*) (http://www.microsoft.com) y *VTX* 1.1 (Keithley Instrument Inc., Cleveland, *OH*). El conjunto del equipo aparece en la fotografía de la **Figura V.6.1.*2***.

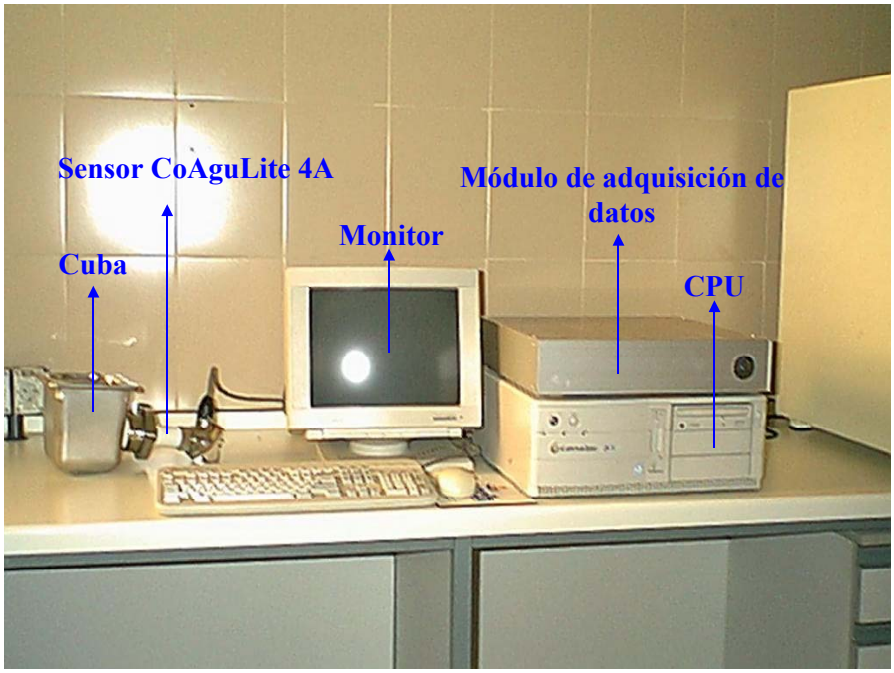

Figura V.6.1.*2*. Equipo de medición de reflectancia difusa.

V.6.2. Calibración del sensor

Se recomienda que el equipo permanezca conectado durante al menos una hora antes de proceder a su calibración, para permitir que se alcance el equilibrio térmico entre el *LED* y el fotodetector. La calibración se realiza ajustando la señal de salida del sensor para conseguir suficiente respuesta durante la coagulación. Puesto que la señal de salida del sensor está comprendida entre 4 y 20 mA, la señal obtenida en ausencia de reflectancia (reflectancia cero) debe ajustarse mediante el potenciómetro situado en el cabezal exterior de la sonda, indicado en la **Figura V.6.*1***.

La señal tras la coagulación no debe ser superior a 5 V (20mA). El blanco (señal en leche de cabra sin coagular) debe ajustarse a un voltaje aproximadamente igual al 25% de la escala total (8 mA). Colocando una tapa negra de goma en el extremo distal del sensor se ajusta la señal correspondiente al valor de reflectancia cero, equivalente a un potencial de 1 V (4 mA), mientras que la ganancia correspondiente a la reflectancia

habitual en leche de cabra se ajusta con el sensor inmerso en leche, a una señal aproximada de 2 V (25% de incremento de señal).

Durante la coagulación la señal aumenta habitualmente hasta aproximadamente un 50% de la escala total, lo que proporciona al sistema suficiente flexibilidad para trabajar con productos con mayor grado de reflectancia difusa, que puede variar en función de la temperatura, el pH, la grasa y el tamaño del glóbulo graso.

V.6.3. Obtención del perfil de reflectancia

El voltaje se mide cada 2 s, en función de la intensidad de reflectancia, almacenándose cada 6 s la media de tres medidas. Los primeros 10 registros de voltaje (1 minuto de datos), corregidos con respecto al valor cero de reflectancia (1 V) y promediados, constituyen el voltaje inicial (V_0). El sistema calcula, a tiempo real un ratio de reflectancia construyendo un perfil de reflectancia con respecto al tiempo.

El ratio de reflectancia (R) se calcula mediante división del voltaje medido a cada tiempo (menos 1 V correspondiente al cero de reflectancia) por V_0. También se calcula a tiempo real la primera derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo (R'), empleando lotes de 4 minutos de las medidas más recientes (41 puntos). La pendiente de cada lote de datos se calcula mediante regresión lineal cada 6 s, y se asigna al punto medio de cada lote de datos. De forma análoga se obtiene la segunda derivada (R'').

V.6.4. Parámetros de reflectancia difusa

Los parámetros objeto de estudio obtenidos a partir del perfil del ratio de reflectancia en función del tiempo son:

- T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la primera derivada (min).

- D_{max}, máximo valor de la primera derivada (min^{-1}).
- D_{2max}, máximo valor de la segunda derivada (min^{-2}).
- D_{2min}, mínimo valor de la segunda derivada (min^{-2}).
- R_{max}, ratio de reflectancia a tiempo T_{max} (adimensional).
- T_{2max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la segunda derivada (min).
- T_{2min}, tiempo desde la adición de enzima hasta el mínimo de la segunda derivada (min).
- T_{2min2}, tiempo desde la adición de enzima hasta el segundo mínimo de la segunda derivada (min).
- S, diferencia entre T_{2min} y T_{2max} (min).
- R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual (adimensional).
- V_0, voltaje inicial (V).

El perfil de reflectancia y sus parámetros derivados (ensayo 15 del experimento *III*) se representan, a título de ejemplo, en la gráfica de la **Figura V.6.4.*1***.

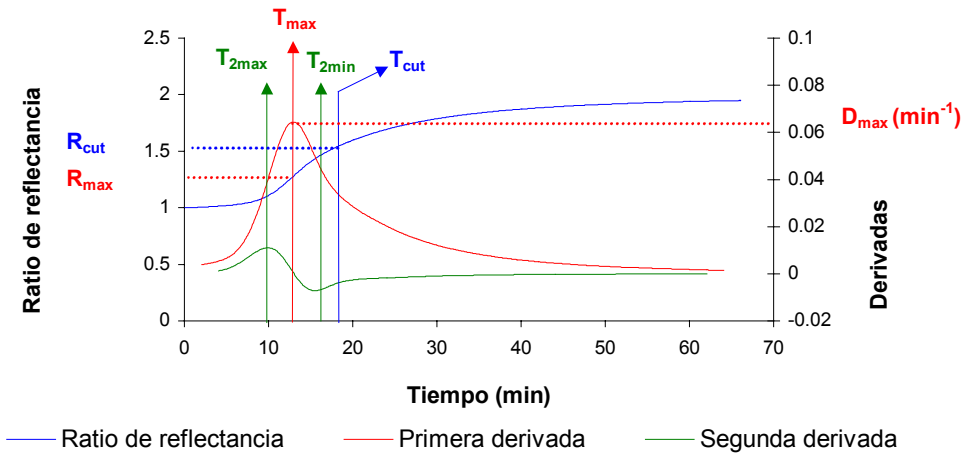

Figura V.6.4.*1*. Típico perfil de reflectancia (perfil tipo *A*) y parámetros derivados.
Test 15, réplica 3, lote 3, proteína 7%, 40ºC. V_o = 1'85; T_{max} = 12'9; T_{2max} = 9'90; T_{2min} = 15'5; S = 5'60; D_{max} = 0'0644; R_{max} = 1'27; T_{cut} = 18'8, R_{cut} =1'56.

V.6.5. Control de errores aleatorios y sistemáticos por dilución

V.6.5.1. *Error por adición de la disolución de enzima*

La dilución de la leche causa un incremento de *RCT* (Cheryan *et al*., 1974; Ruegg *et al*., 1974; Dalgleish, 1980; Fox, 1984). Los parámetros de tiempo procedentes del perfil de reflectancia son muy sensibles a los errores producidos por dilución de la muestra, que disminuyen la concentración de las micelas de caseína, por lo que es conveniente reducir dichos errores en lo posible.

Para poder comparar, a diferentes concentraciones de enzima (experimento *I*), T_{clot} y los parámetros de tiempo obtenidos al monitorizar mediante reflectancia la coagulación en la cuba de cuajado, se requiere que la relación de volumen entre la disolución de enzima y la leche (*E*/*L*) se mantenga constante, para las diferentes concentraciones de enzima utilizadas, tanto en cuba de cuajado como en tubo de ensayo.

En el experimento *I*, se ensayaron concentraciones de enzima de 0’020, 0’035 y 0’050 mL kg^{-1} de leche. Previamente a la realización de cada réplica, se preparan disoluciones estándar en tampón acetato (pH 5’5) de quimosina recombinante (EC 3.4323.4, isozima *B*, Chr. Hansen Inc., Milwaukee, *WI*, EEUU; http://www.chr-hansen.com), que se mantienen refrigeradas hasta su uso (2ºC).

Las diluciones de enzima se estandarizan de forma que 10 mL suministraran respectivamente 0’04, 0’07 y 0’10 mL de quimosina recombinante a la muestra de 2 kg de leche de cabra utilizada para monitorizar la reflectancia en la cuba de cuajado y a la vez 50 µL proporcionaran respectivamente $2'0 \times 10^{-4}$, $3'5 \times 10^{-4}$, $5'0 \times 10^{-4}$ de quimosina a 10 mL de leche utilizada para la determinación del tiempo de coagulación de Berridge en los tubos de ensayo.

De esta forma el efecto de dilución, medido como relación *E*/*L* es de 5×10^{-3}, tanto en las muestras usadas para medir la reflectancia como en las utilizadas para la determinación del tiempo de coagulación de Berridge. La relación *E*/*L* también se mantiene constante en los experimentos *II* y *III* mediante dilución de las cantidades de enzima correspondientes a cada ensayo en una cantidad prefijada de agua destilada.

V.6.5.2. *Error por adición de cloruro cálcico*

Por otra parte, el volumen de dilución de cloruro cálcico añadido a cada muestra también se mantiene constante, mediante la preparación de diferentes concentraciones de cloruro cálcico en agua destilada.

V.6.5.3. *Error por ajuste de pH*

También el ajuste de pH realizado en todos los experimentos produce dilución de la leche, en una magnitud variable en función del pH inicial y de la concentración de calcio y de tampones naturales de la misma, que condicionan la adición de diferentes volúmenes de HCl y/o NaOH 1M. Por ello, se asegura un ratio de dilución constante mediante la adición del volumen de HCl y/o NaOH 1M necesario para la realización del ajuste, pero manteniendo constante el volumen total añadido por litro de leche mediante la adición de agua destilada.

V.6.5.4. *Error por extracción de muestras*

La extracción de alícuotas de la muestra en el experimento *III*, una vez se ha realizado el ajuste del pH y de la concentración de proteína, produce un descenso en el volumen total de muestra equivalente al aumento de la relación *E*/*L*, lo que se evita con la preparación de un volumen de muestra que excede al volumen necesario para realizar el ensayo, en el volumen del total de las alícuotas.

V.7. MODELOS CINÉTICOS DE DESCRIPCIÓN DEL INCREMENTO EN REFLECTANCIA DIFUSA

El ajuste de los datos de reflectancia difusa a los modelos teóricos presentados en este apartado se lleva a cabo exclusivamente con los datos experimentales posteriores al punto de inflexión de la curva de reflectancia (T_{max}).

V.7. 1. Ajuste preliminar a modelos cinéticos de primero y/o segundo orden

La reacción de agregación corresponde a una cinética de segundo orden (von Smoluchowski, 1917; Payens, 1976, 1979; Dalgleish, 1979; McMahon y Brown, 1984*b*; Walstra y van Vliet, 1986; Carlson *et al*., 1987*b*; Fox, 1988; Gatti y Pires, 1995; Gatti *et al*., 1995, 1996; Pires *et al*., 1997, 1999; Lomholt *et al*., 1998), por lo que se intenta ajustar los datos experimentales de reflectancia a un modelo de reacción de segundo grado.

Como dicho ajuste resulta inadecuado, se considera que la reflectancia puede ser más bien un reflejo del endurecimiento del gel de caseína, que sigue una cinética de primer orden (Douillard, 1973; Olson y Bottazzi, 1977; Tokita *et al*., 1982*a*; Carlson *et al*., 1987*d*; Niki *et al*., 1994*b*) por lo que se realiza el ajuste del perfil de reflectancia a una reacción de este tipo, aunque también sin éxito.

Se postula entonces la posibilidad de que ambas reacciones condicionaran simultáneamente la evolución de la reflectancia difusa durante la coagulación de la leche, lo que conduce al desarrollo de seis modelos diferentes que combinan, partiendo de diversos supuestos, la cinética de agregación (segundo orden) y de endurecimiento (primer orden). Sólo uno de los modelos propuestos fue capaz de reproducir fielmente los valores experimentales de reflectancia.

V.7.2. Modelo matemático de descripción simultánea de agregación y endurecimiento

Son numerosos los modelos matemáticos que han sido desarrollados para la descripción cuantitativa de la agregación de las micelas de caseína o del endurecimiento de la cuajada. La mayoría de los autores no diferencian ambos procesos, desde un punto de vista cinético, centrándose o en la cinética de agregación o en la de endurecimiento, excepto Carlson *et al*. (1987*b*, *d*) que analizan las dos reacciones aunque de forma separada.

El modelo cinético propuesto (modelo *I*) se basa en que la formación de la cuajada consiste en dos reacciones diferentes que ocurren simultáneamente. Se considera que la primera reacción, que corresponde a la agregación de las micelas de caseína, sigue una cinética de segundo orden, mientras que por el contrario, el endurecimiento del gel de caseína se ajusta a una cinética de primer orden.

La hipótesis inicial para la obtención de este modelo combinado es que el aumento total del ratio de reflectancia se debe a la evolución en paralelo de estos dos procesos:

$$(R_\infty - R_{\max}) = (A_\infty - A_0) + (F_\infty - F_0) \qquad \text{(V.7.2.}I\text{)}$$

donde

(R_∞ - $R_{\max}$) es el incremento total del ratio de reflectancia difusa **(Figura V.7.2.*1*)**.

(A_∞ - A_0) es el incremento en el ratio de reflectancia difusa debido al proceso de agregación.

(F_∞ - F_0) es el incremento del ratio de reflectancia debido al proceso de endurecimiento.

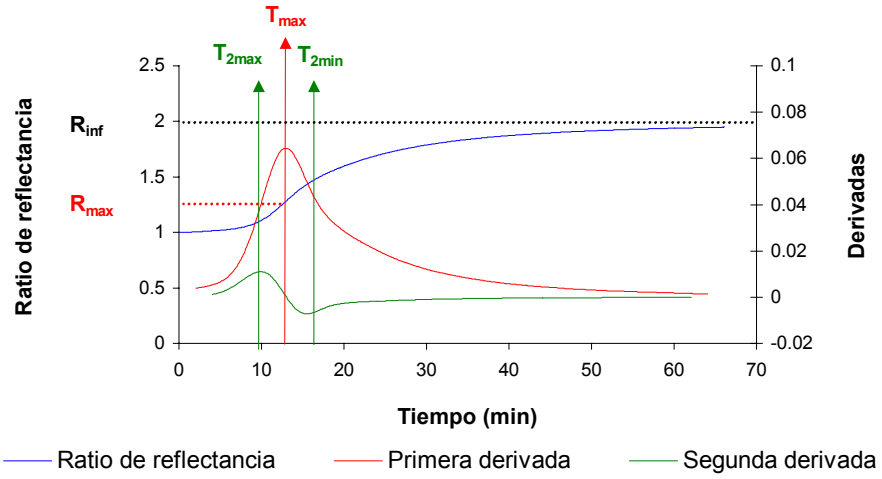

Figura V.7.2.*1*. Perfil de reflectancia difusa.
T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{2max}, tiempo hasta el máximo de la segunda derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada; R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_∞ (R_{inf} en la figura), ratio asintótico de reflectancia. Datos correspondientes al experimento *III*, test 15, réplica 3, lote 3, proteína 7%, 40ºC. V_o = 1'85; T_{max} = 12'9; T_{2max} = 9'90; T_{2min} = 15'5; S = 5'60; D_{max} = 0'0644; R_{max} = 1'27; T_{cut} = 18'8; R_{cut} =1'56.

El desarrollo de la hipótesis inicial, presentado en el **Artículo 4**, conduce a la obtención del siguiente modelo matemático:

$$R = R_{max} + \left[\beta_1 \left(1 - \frac{1}{(1 + \beta_1 k_2 (t' - T_{max}))} \right) \right] + \left[\{(R_\infty - R_{max}) - \beta_1\} \{1 - e^{-k_1 (t' - T_{max})}\} \right] \quad (V.7.2.2)$$

donde *t'* es tiempo transcurrido desde la adición de enzima y *R* es el ratio de reflectancia a tiempo *t'*- T_{max}. El modelo propuesto contiene cuatro parámetros: R_∞, valor asintótico del ratio de reflectancia a tiempo infinito; β_1, incremento de reflectancia difusa debido a la agregación; k_1, constante cinética del proceso de endurecimiento y k_2, constante cinética de la reacción de agregación. Por motivos prácticos se asume que los dos procesos empiezan al mismo tiempo. Puesto que el endurecimiento de la cuajada

comienza un poco después que la agregación, se comete un error, que se considera despreciable comparado con el beneficio derivado de mantener la simplicidad del modelo.

V.7.3. Obtención de las constantes cinéticas de agregación y endurecimiento

El ajuste del modelo *I* a los datos experimentales mediante regresión no lineal proporciona múltiples soluciones, por lo que es necesario estimar las constantes cinéticas de las reacciones de agregación y endurecimiento mediante un método alternativo, para su posterior sustitución en el modelo *I*, a fin de obtener para cada curva de reflectancia el valor de los dos parámetros restantes. Con este objetivo se decide fragmentar la curva de reflectancia de forma fácilmente reproducible, ajustando el tramo inicial mayoritariamente dominado por la agregación a un modelo de segundo orden y el segundo segmento controlado fundamentalmente por el endurecimiento a un modelo de primer orden.

El criterio de fragmentación se basa en la presencia o ausencia de un segundo máximo en la segunda derivada del perfil de reflectancia y en la forma de la curva, especialmente en relación con la aparición de una irregularidad (hombro) en función de la concentración de proteína y la temperatura de coagulación. Como resultado, las curvas de reflectancia se clasificaron en dos grupos. Aquellos perfiles con un solo máximo en su primera derivada (curva tipo *A*, **Figura V.7.2.*1*** del apartado anterior) y los que tienen dos (curva tipo *B*, **Figura V.7.3.*1***). Tanto en las curvas tipo *A* como en las tipo *B* los datos comprendidos entre T_{max} y T_{2min} que reflejan fundamentalmente el proceso de agregación se ajustan a una cinética de segundo orden (modelo *II*, apartado **V.7.4**). En las curvas tipo *A* los datos monitorizados tras T_{2min} se ajustan a una reacción de primer orden (modelo *III*, apartado **V.7.5**) porque predomina la reacción de endurecimiento de la cuajada. En los perfiles tipo *B*, los datos obtenidos tras T_{2min2} (que se considera equivalente, en su significado cinético, al parámetro T_{2min}, cuando se presentan dos máximos en la primera derivada) son los que se ajustan al modelo *III*.

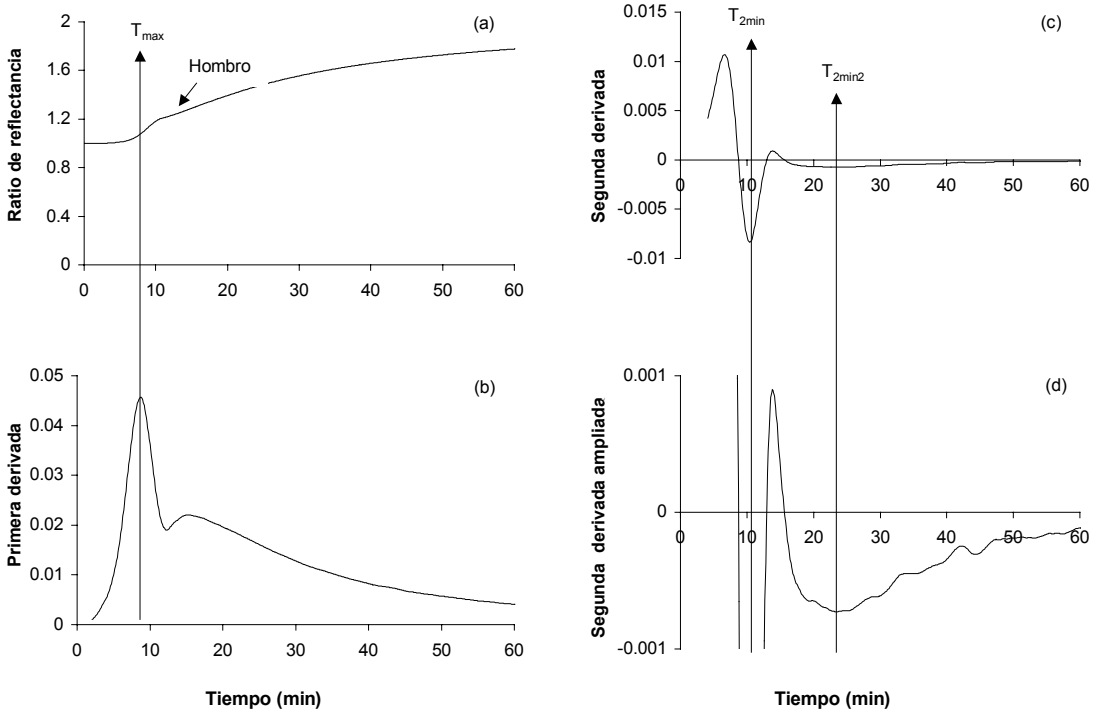

Figura V.7.3.*1*. Aparición de un "hombro" en el perfil de reflectancia tipo *B*.
(*a*), Perfil de reflectancia tipo *B*; (*b*), primera derivada con respecto al tiempo; (*c*), segunda derivada; (*d*), segunda derivada ampliada. T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo; T_{2min2}, tiempo hasta el segundo mínimo de la segunda derivada. Datos correspondientes al experimento *III*, test 3, réplica 3, lote 3, proteína 3%, 30ºC. V_o = 1'19; T_{max} = 8'70; T_{2max} = 6'60; T_{2min} = 10'4; S = 3'80; T_{2min2} = 23'5; D_{max} = 0'046; R_{max} = 1'12; T_{cut} = 18'8, R_{cut} =1'37. Corresponde a la Fig. 3 del artículo 4.

V.7.4. Modelo matemático de agregación

Aunque la teoría de floculación rápida de von Smoluchowski (1917) ofrece limitaciones debido a las aproximaciones asumidas, proporciona una herramienta útil para la estimación de la constante de velocidad de incremento de la reflectancia difusa durante la fase de agregación. Dos han sido las razones por las que se selecciona este simple modelo, en detrimento de complicadas expresiones también basadas en la cinética de von Smoluchowski (1917) pero que consideran la existencia de una barrera de energía. En primer lugar, que aun cuando existen numerosas razones que indican una

correlación entre la dispersión de la luz medida a una longitud de onda y el grado de polimerización, la naturaleza de dicha correlación no ha sido completamente establecida (Lomholt *et al*., 1998). En segundo lugar, que nuestro objetivo sólo era estimar el valor de k_2, para reducir el número de soluciones del modelo *I*, por lo que no era deseable introducir más parámetros. Se parte, por tanto, de una expresión cinética de segundo orden:

$$-\frac{dA}{dt_{\mathrm{A}}} = k_2 A^2 \qquad \text{(V.7.4.}\mathit{1}\text{)}$$

donde k_2 es la constante experimental de velocidad de segundo orden, y A es la concentración de puntos de enlace entre las micelas de caseína que conducen a agregación de las mismas a tiempo t_{A} (tiempo transcurrido tras $T_{\max}$). Mediante el desarrollo de dicha ecuación, que aparece en el **Artículo 4**, se deduce el modelo *II*:

$$R_{\mathrm{A}} = R_{\infty\mathrm{A}} - \left[\frac{R_{\infty\mathrm{A}} - R_{0\mathrm{A}}}{1 + \left(R_{\infty\mathrm{A}} - R_{0\mathrm{A}}\right)k_2\left(t' - T_{\max}\right)}\right] \qquad \text{(V.7.4.}\mathit{2}\text{)}$$

donde R_{A} es el ratio de reflectancia a tiempo (t'-$T_{0\mathrm{A}}$), t' es el tiempo tras la adición de enzima, $T_{0\mathrm{A}}$ es el tiempo en que se observa un grado significativo de agregación ($T_{\max}$ tanto en curvas tipo *A* como *B*) y $R_{0\mathrm{A}}$ es el ratio de reflectancia a tiempo $T_{0\mathrm{A}}$. El modelo *II* describe el cambio de reflectancia durante la coagulación debido a la agregación, asumiendo que el aumento de la señal óptica es proporcional a la desaparición de los puntos de enlace presentes en las micelas de caseína durante la evolución de la reacción de agregación, y consta de dos parámetros: $R_{\infty\mathrm{A}}$, valor asintótico de reflectancia debido a agregación a tiempo infinito y k_2. Como se comenta en el apartado **V.7.3**, tanto en las curvas tipo *A* como en las *B* se considera que la agregación domina sobre los datos comprendidos entre $T_{\max}$ y $T_{2\min}$, por lo que dicha sección se ajusta al modelo *II*, como se observa en la **Figura V.7.4.*1***, donde se representa la división de un perfil de reflectancia tipo *A* previa al ajuste de cada segmento resultante al modelo cinético correspondiente.

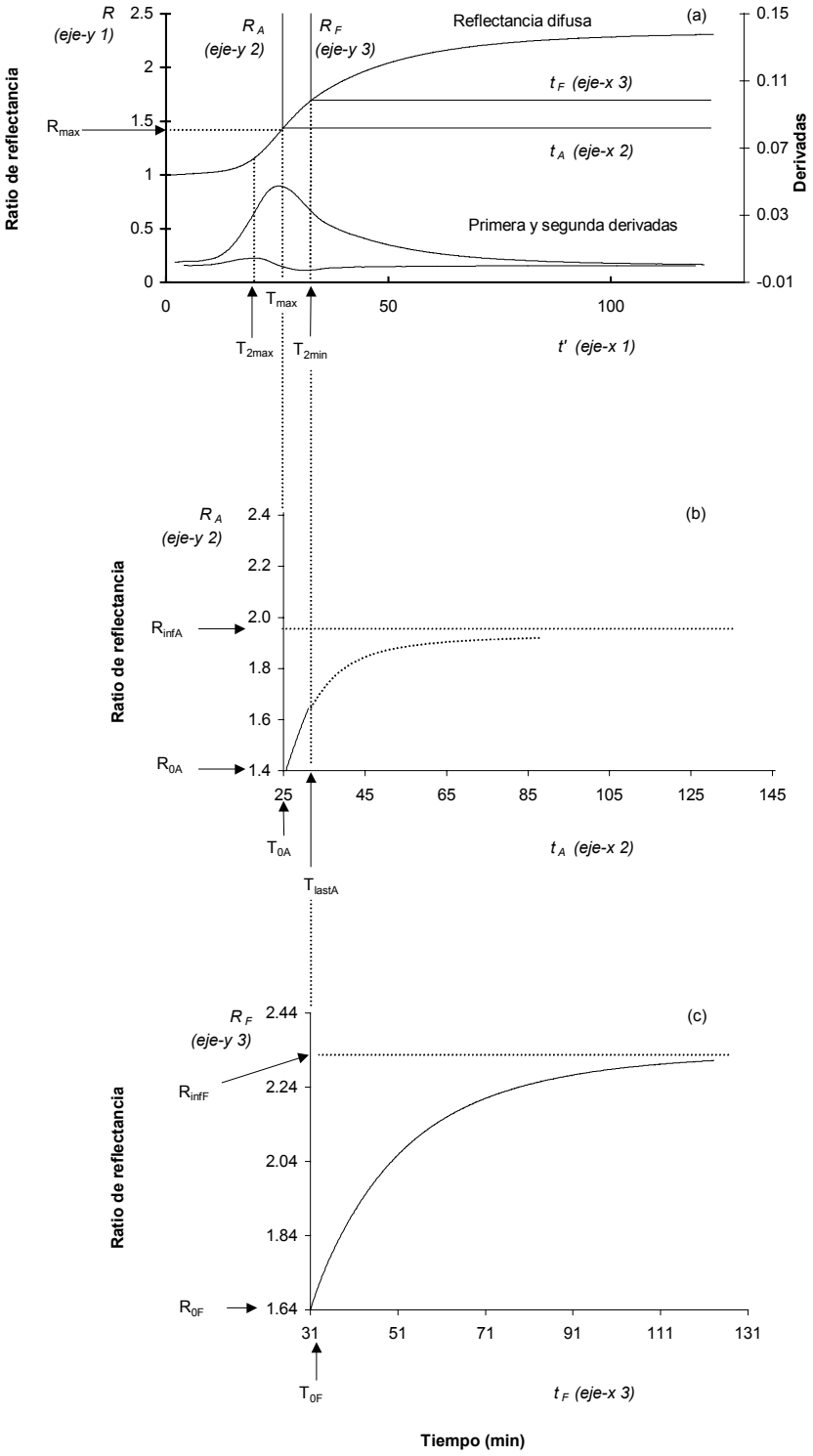

Figura V.7.4.*1*. División del perfil de reflectancia y ajuste a los modelos *II* y *III*.
R, ratio de reflectancia; el resto de los parámetros se describen en el texto (ver apartados V.7.3, V.7.4 y V.7.5). Corresponde a la Fig. 4 del artículo 4.

En la gráfica **(*a*)** de la **Figura V.7.4.*1*** se añade un eje adicional tras T_{max} (eje 2), que indica el tiempo relativo cero parar el proceso de agregación (T_{0A}) y otro tras T_{2min} (eje 3), que indica el tiempo relativo cero para el endurecimiento (T_{0F}). Como se aprecia en la gráfica **(*b*)** los datos comprendidos entre T_{max} y T_{2min} (T_{lastA} en la figura) se ajustan al modelo de agregación de segundo orden.

V.7.5. Modelo matemático de endurecimiento

Asumiendo una cinética de primer orden para la desaparición de los puntos de enlace, debido a la incorporación de micelas y racimos de micelas de caseína en la red tridimensional proteica que produce el aumento de la dureza del gel, y considerando que dicho proceso es el principal responsable de la respuesta óptica observada a partir del tiempo T_{2min} (curvas tipo *A*) ó T_{2min2} (curvas tipo *B*), podemos deducir la ecuación que describe los cambios de reflectancia debidos al endurecimiento de la cuajada (modelo *III*), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$-\frac{dF}{dt}_{F} = k_1 F \qquad \text{(V.7.5.}1\text{)}$$

donde F es la concentración de sitios de enlace para endurecimiento de la cuajada a tiempo t_F (tiempo tras T_{2min} o T_{2min2}) y k_1 es la constante experimental de velocidad de primer orden. El desarrollo del modelo *III*, que corresponde a:

$$R_F = R_{\infty F} - \left\{ \left(R_{\infty F} - R_{0F} \right) e^{-k_1 (t' - T_{0F})} \right\} \qquad \text{(V.7.5.}2\text{)}$$

se presenta en el **Artículo 4**. En dicho modelo, R_F representa el ratio de reflectancia a tiempo (t'-T_{0F}), t' es el tiempo tras la adición de enzima, T_{0F} es el tiempo tras el cual se observa un grado significativo de endurecimiento (T_{2min} para las curvas tipo *A* y T_{2min2} para las tipo *B*) y R_{0F} es el ratio de reflectancia a tiempo T_{0F}. Dicho modelo presenta dos parámetros: $R_{\infty F}$, valor asintótico del ratio de reflectancia debido al endurecimiento, a

tiempo infinito, y k_1. Como se menciona en el apartado **V.7.3**, se considera que los datos posteriores a $T_{2\min}$ en las curvas tipo *A* (T_{0F} en la gráfica ***c*** de la **Figura V.7.4.*1***) o posteriores a $T_{2\min 2}$ (en curvas tipo *B*) reflejan mayoritariamente la cinética de endurecimiento y por lo tanto se ajustan al modelo *III*.

V.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos correspondientes a cada experimento de bloques aleatorio, se realiza mediante el empleo del Modelo Lineal General (*GLM*) del paquete estadístico Statistical Analysis System (*SAS*, versión 6.11, 1995 y versión 8.00, 1999, *SAS* Institute Inc., Cary, *NC*, *EEUU*; http://www.sas.com) o del Modelo Lineal General Multivariante del paquete estadístico Statistical Packages for the Social Sciences (*SPSS*, versión 9.0.1.,1999, *SPSS* Inc., Chicago, *IL*, *EEUU*; http://www.spss.com). En los modelos estadísticos se introducen los factores del diseño experimental como efectos principales, incluyéndose en el análisis las interacciones más importantes entre los factores estudiados. El efecto aleatorio ejercido sobre los parámetros estudiados por diversas variables no fijas se considera mediante la inclusión de co-variables en el modelo. Tras un análisis preliminar de los datos, se eliminan todas aquellas interacciones y co-variables que no contribuyen significativamente a la variabilidad de los datos.

Para el análisis de la varianza (*ANOVA*), las medias de mínimos cuadrados (*LSM*) y la significación de cada tratamiento se computa mediante suma de cuadrados tipo *IV*. Las diferencias entre las medias de los diversos tratamientos se consideraron significativas cuando $P < 0'05$.

Para la obtención del mejor modelo con 1, 2 o 3 variables para la predicción del tiempo de corte, se emplea el procedimiento de selección de variables del *SPSS*, o el procedimiento de máximo R^2 del *SAS*, incluyendo en el modelo variables independientes, variables dependientes obtenidas mediante reflectancia difusa y

diversas variables derivadas. El análisis de regresión complementario, desarrollado para la obtención y selección de modelos de predicción del tiempo de corte más efectivos y sencillos se realiza mediante los procedimientos *GLM* y *NLIN* (regresión no lineal) del *SAS* o el procedimiento de regresión lineal del *SPSS*.

El ajuste de los datos experimentales de reflectancia difusa, a los modelos cinéticos propuestos mediante el procedimiento *NLIN* del *SAS*, se aborda con el objetivo de seleccionar el modelo que mejor explica el incremento de reflectancia que tiene lugar tras T_{max} y de obtener los parámetros cinéticos de los procesos de agregación de caseína y endurecimiento de la cuajada. Los parámetros cinéticos obtenidos se analizan mediante el procedimiento *GLM* del *SAS* (suma de cuadrados tipo *IV*).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de este apartado se relacionan entre sí los diferentes resultados obtenidos que han sido publicados en los trabajos de investigación que integran la presente Memoria de Tesis. Como consecuencia del carácter individualizado de las diversas experiencias que constituyen cada uno de esos trabajos, las discusiones de los resultados realizadas en cada uno de los artículos resultan inevitablemente inconexas.

VI.1. CLASIFICACIÓN DE VARIABLES DE REFLECTANCIA DIFUSA

Bajo este epígrafe, tras un análisis de las características fundamentales -magnitudes, comportamiento frente a los factores de la coagulación, etc.- de las distintas variables generadas a partir de la curva de reflectancia difusa con respecto al

tiempo, se propone la clasificación en función de sus unidades, con el fin de racionalizar el análisis final de los datos obtenidos **(Tabla VI.1.*1*)**.

Tabla VI.1.*1*. Clasificación de las variables de reflectancia difusa. [1]

Tipo de variable	Variable	Unidades
Variables de tiempo	T_{max}, T_{2max}, T_{2min}, T_{2min2} y S	min
Variables de respuesta	R_{max}, R_{cut} y V_0	Adimensional o V
Variables mixtas	D_{max}, D_{2max} y D_{2min}	min^{-1} o min^{-2}

[1] T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{2max}, tiempo hasta el máximo de la segunda derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada; T_{2min2}, tiempo hasta el segundo mínimo de la segunda derivada; S, T_{2min} menos T_{2max}; R_{max}, ratio de reflectancia a tiempo T_{max}; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte; V_0, voltaje inicial; D_{max}, máximo valor de la primera derivada; D_{2max}, máximo de la segunda derivada; D_{2min}, mínimo de la segunda derivada.

VI.1.1. Variables de tiempo

A este grupo pertenecen T_{max}, T_{2max}, T_{2min}, T_{2min2} y S. Estas variables representan unidades de tiempo (min) y están íntimamente relacionadas con la cinética de las distintas fases del proceso de coagulación, por lo que son especialmente útiles para el estudio de los factores que afectan a la coagulación de la leche. También permiten la comparación de diversas condiciones de elaboración de queso, el análisis de la adaptabilidad tecnológica de enzimas, aditivos y nuevos productos lácteos y la predicción de los tiempos de coagulación y de corte. También, con fines principalmente analíticos las variables T_{cut} y T_{clot}, pese a haber sido obtenidas mediante métodos diferentes a la reflectancia difusa, constituyen variables de tiempo por su comportamiento y unidades, y son consideradas en estas experiencias para valorar su comportamiento comparativo o como referencia.

VI.1.2. Variables de respuesta

Básicamente, las variables que integran este grupo se caracterizan por ser proporcionales a la intensidad de reflectancia difusa procedente de la leche antes y durante la coagulación, por lo que presentan unidades de voltaje (V). Estas variables son sensibles a las características fisico-químicas de la leche, tales como grasa, proteína, temperatura, etc., por lo que con fines comparativos es necesario trabajar con ratios de reflectancia, que permiten la normalización del valor inicial de reflectancia (V_0) a un valor unidad. Puesto que son ratios todas las variables de respuesta (R_{max} y R_{cut}) son adimensionales, excepto el voltaje inicial (V_0) que, lógicamente, conserva sus unidades de diferencia de potencial eléctrico (V).

VI.1.3. Variables mixtas

Las variables mixtas son valores, a un tiempo dado, de la primera o de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo y, por lo tanto, presentan como unidad la inversa del tiempo (min^{-1} ó min^{-2}). A este grupo pertenece, D_{max}, D_{2max} y D_{2min}. Pese a que su valor depende tanto de la intensidad de reflectancia difusa como del tiempo, su comportamiento tiene más aspectos en común con las variables de respuesta que con las de tiempo. En general, estas variables reflejan la velocidad de incremento de la reflectancia difusa (D_{max}) o el cambio de velocidad en dicho incremento (D_{2max} y D_{2min}).

VI.2. FACTORES QUE AFECTAN AL PERFIL DE REFLECTANCIA DIFUSA

VI.2.1. Efecto de la composición de la leche sobre los valores de reflectancia

Payne *et al*. (1993*b*) demuestran que en la leche de vaca la reflectancia difusa depende de la composición química de la leche. Según dichos autores, el efecto

principal se debe a los contenidos en materia grasa y proteína. Como se detalla en el capítulo **IV** de esta Memoria, en cada experimento se realizaron 3 réplicas. En los experimentos *I* y *II*, resulta necesario el uso de diferentes lotes de leche de cabra para completar los ensayos correspondientes a cada réplica, lo cual aumenta la variabilidad de los parámetros de reflectancia dentro de cada réplica, como consecuencia de las diferencias existentes en la composición química de los lotes.

Por este motivo, en los análisis estadísticos correspondientes a dichos experimentos, se incluye la réplica como efecto principal y el lote como co-variable. Por el elevado número de lotes diferentes utilizados en los experimentos *I* y *II*, la inclusión del lote cómo factor consumiría un número elevado de grados de libertad (n-1) que limitaría el estudio de posibles interacciones.

Sin embargo, la inclusión del lote como co-variable reduce considerablemente la variabilidad dentro de cada réplica, consumiendo un solo grado de libertad. En el análisis estadístico preliminar de los experimentos *I* y *II*, se observa que la réplica no contribuye significativamente a explicar la variabilidad de las variables dependientes, por lo que es eliminada del modelo.

En el experimento *III* se emplea un único lote de leche para cada réplica, por lo que ambos factores contienen la misma información: la variabilidad debida a la réplica y la causada por el lote. Por tal motivo, la réplica se incluye en el modelo como factor principal, pues se conserva la totalidad de la información con el consumo de tan sólo dos grados de libertad, mientras que si se hubiese incluido como co-variable, se hubiera perdido un tercio de la información ahorrándose sólo un grado de libertad.

VI.2.2. Efecto de los factores de la coagulación en los parámetros de tiempo y mixtos

Todos los parámetros de tiempo estudiados en los distintos experimentos varían

en función de la velocidad del proceso de coagulación. El aumento de la velocidad de coagulación producido por cualquier factor, se traduce tanto en un aumento estadísticamente significativo del parámetro D_{max}, que representa la velocidad de incremento en reflectancia difusa producido por la coagulación, como en un descenso significativo de todos los parámetros de tiempo. Lógicamente cualquier factor que disminuya la velocidad de coagulación, conducirá al efecto contrario sobre los parámetros mixtos y de tiempo.

VI.2.2.1. *Efecto del tipo de enzima*

Para comparar el efecto sobre los parámetros de reflectancia de las dos enzimas ensayadas en el experimento *II* (enzima coagulante microbiano procedente de *M. miehei* y cuajo líquido de cabrito) es necesario ajustar las concentraciones de ambas enzimas a un mismo tiempo de coagulación de Berridge. Tras la selección de las concentraciones a emplear, se utiliza el análisis de varianza para verificar que, efectivamente, el tiempo de coagulación de Berridge es el mismo para las dos enzimas, como se recoge en el epígrafe **V.4** de esta Memoria.

Posteriormente, se procede a la realización de los ensayos de reflectancia. El análisis de varianza de los parámetros de tiempo estudiados en dicho experimento, $T_{\max}$ y $T_{\text{cut,}}$ revela que la influencia del tipo de enzima sobre dichas variables es altamente significativa ($P < 0'003$).

Como se observa en la **Tabla VI.2.2.1.*1***, las *LSM* de ambos parámetros son significativamente menores para el cuajo de cabrito que para el coagulante microbiano. *El valor de T_{max} en la leche de cabra coagulada con el extracto enzimático procedente del abomaso de cabrito, resulta ser un 89% del tiempo obtenido con M. miehei, mientras que el valor de T_{cut} producido con cuajo de cabrito, representa un 92% del correspondiente a la enzima microbiana*.

Tabla VI. 2.2.1.*1*. Efecto del tipo de enzima sobre los parámetros de tiempo durante la coagulación de leche de cabra. [1]

Tipo de enzima	T_{max} (min)	T_{cut} (min)
Cuajo de cabrito líquido	7'4 [a]	14'8 [a]
Enzima coagulante de *M. miehei*	8'3 [b]	16'2 [b]

[1] T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{cut}, tiempo de corte visual.
[a-b] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'003). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

Dicho resultado coincide con el publicado por Ustunol *et al*. (1991) y por López (1993). Ustunol *et al*. (1991) emplean reflectancia difusa (950 nm) para la comparación de la adaptabilidad tecnológica de diferentes enzimas coagulantes comerciales. Tras ajustar la concentración de ocho enzimas para conseguir tiempos de coagulación de 5'30 ± 0'2 min, dichos autores observan que tanto T_{max} como $T_{cut,}$ son significativamente menores en cuajos con elevado porcentaje de quimosina (cuajo de ternera y quimosina *B*) que en enzima microbiana procedente de *M. miehei*. En 1993 López compara la adaptabilidad tecnológica de nueve enzimas coagulantes diferentes, mediante empleo de reflectancia difusa medida a 900 nm tras ajustar sus concentraciones a tiempos de coagulación de Berridge de 6 min. El valor de T_{max} observado en el cuajo de cabrito en pasta es 6'3 min, mientras que en la enzima microbiana procedente de *M. miehei* es 7'3 min.

Resulta curioso, que tras ajustar la concentración de las enzimas a un mismo tiempo de coagulación de Berridge, los valores de T_{max} sean significativamente diferentes. Este comportamiento podría explicarse asumiendo diferentes velocidades de hidrólisis en función de la enzima, que determinarían un diferente grado de agregación micelar tanto a tiempo T_{max} como en el momento de la coagulación visible. Existen algunas evidencias que soportan dicha hipótesis. En primer lugar, según López (1993) la actividad proteolítica inespecífica, determinada como relación de nitrógeno no

proteico con respecto al nitrógeno total, es mayor en la enzima microbiana que en el cuajo de cabrito en pasta con un 35% de quimosina, lo cual podría determinar menores proporciones de caseína hidrolizada, a tiempos iguales, en la coagulación producida por la enzima de *M. miehei*. Ortiz de Apocada *et al*. (1994) observan una mayor actividad proteolítica de *M. miehei* en comparación con cuajo de ternera y quimosina obtenida por fermentación. En segundo lugar, López *et al*. (1997*a*) estudian la hidrólisis de la κ-caseína en leche de cabra y comparan las constantes de hidrólisis propias de diferentes proteasas, ajustadas a un tiempo de coagulación de 6 minutos. Dichos autores concluyen que la constante de hidrólisis es un 42'72% menor en la enzima de *M. miehei*, que en el cuajo de cabrito, de donde se deduciría que el grado de hidrólisis necesario para el inicio de la agregación micelar (60-80% según Carlson *et al*., 1987*a*, *b*) se alcanza antes empleando cuajo de cabrito. De hecho, de los datos recogidos por López *et al*. (1997*a*) se desprende que el grado de hidrólisis en el momento de la coagulación es un 56'58% menor en el caso de la enzima microbiana que en el del cuajo de cabrito.

El aumento de reflectancia difusa durante la floculación ha sido atribuido a los cambios que acaecen en la distribución de tamaño de las partículas (especialmente caseína) y a la unión de las micelas entre sí (Crofcheck *et al*., 1999). Si el grado de hidrólisis alcanzado con cuajo de cabrito en el tiempo de coagulación de Berridge es mayor que el obtenido con *M. miehei*, se espera que la agregación se inicie antes con el primer cuajo, dando lugar a un valor más pequeño de T_{max}, que coincide con lo observado. Las mencionadas características de hidrólisis del cuajo de cabrito y una mayor velocidad de agregación y endurecimiento justificarían también el menor valor de T_{cut} observado en comparación con la enzima de origen microbiano. Diversos autores han constatado el efecto del tipo de cuajo tanto en la velocidad de agregación (Lawrence y Creamer, 1969) como en la de endurecimiento (Fox, 1988). Por último, la mayor velocidad de agregación y endurecimiento del cuajo de cabrito parecen llevar asociadas un incremento de la dureza máxima como se desprendería del valor significativamente mayor de R_{cut} encontrado con este tipo de cuajo ($P < 0'003$), que aparece recogido más adelante en el apartado **VI.2.3.1**. De lo anterior podemos extraer dos consecuencias:

1. *La reflectancia de NIR es muy útil para el estudio de la adaptabilidad tecnológica de cuajos y preparados enzimáticos comerciales*, no sólo a nivel de laboratorio sino también a pie de fábrica. Cuando se trata de elaborar quesos curados, los queseros prefieren el uso de cuajos que coagulen la leche rápidamente, esto es, con tiempos de coagulación cortos, que eviten el exceso de humedad en la cuajada y la excesiva aparición de sabores amargos. En este sentido, el sensor de reflectancia instalado en línea, podría facilitar la selección del destino de las cubas en función de sus valores objetivos de T_{max}.

2. *El cuajo "natural" de cabrito podría constituir un sustituto idóneo del cuajo de ternera, al presentar una menor actividad proteolítica inespecífica y una mayor velocidad de hidrólisis, agregación y endurecimiento, proporcionando valores superiores de dureza máxima en menor tiempo*, lo que podría resultar idóneo para la elaboración de quesos curados, e incluso podría contribuir a la obtención de mejores rendimientos queseros. Por este motivo, sería aconsejable realizar un estudio comparativo de los rendimientos propios de ambas enzimas y de la capacidad de sinéresis de las cuajadas obtenidas.

VI.2.2.2. *Efecto de la concentración de enzima*

El efecto de la concentración de enzima (quimosina *B* -EC 3.4.23.4-) se examina en el experimento *I* y, según revela el análisis de varianza, la influencia de este factor sobre la variabilidad de los parámetros de tiempo y mixtos ensayados es muy significativa (P < 0'0001). El análisis de las *LSM* de las distintas variables correspondientes a cada concentración de enzima: 0'020, 0'035 y 0'050 mL kg^{-1} de leche, se muestra en la **Tabla VI.2.2.2.*1***, donde se aprecia que a mayor concentración de enzima, existe un aumento significativo de D_{max} y una disminución también significativa de los parámetros de tiempo, T_{max}, T_{clot} y T_{cut}.

Tabla VI.2.2.2.*1*. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de tiempo y mixtos durante la coagulación de leche de cabra. [1]

*E*o (mL kg^{-1})	T_{max} (min)	T_{clot} (min)	T_{cut} (min)	D_{max}
0'020	22'2 [a]	25'8 [a]	29'1 [a]	0'022 [a]
0'035	12'9 [b]	14'3 [b]	17'1 [b]	0'035 [b]
0'050	8'9 [c]	9'7 [c]	12'2 [c]	0'045 [c]

[1] E_0, concentración de enzima; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{cut}, tiempo de corte visual; D_{max}, máximo valor de la primera derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo.
[a-c] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'0001). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

En la **Figura VI.2.2.2.*1*** se representa gráficamente el comportamiento de las diferentes variables con respecto a la concentración de enzima.

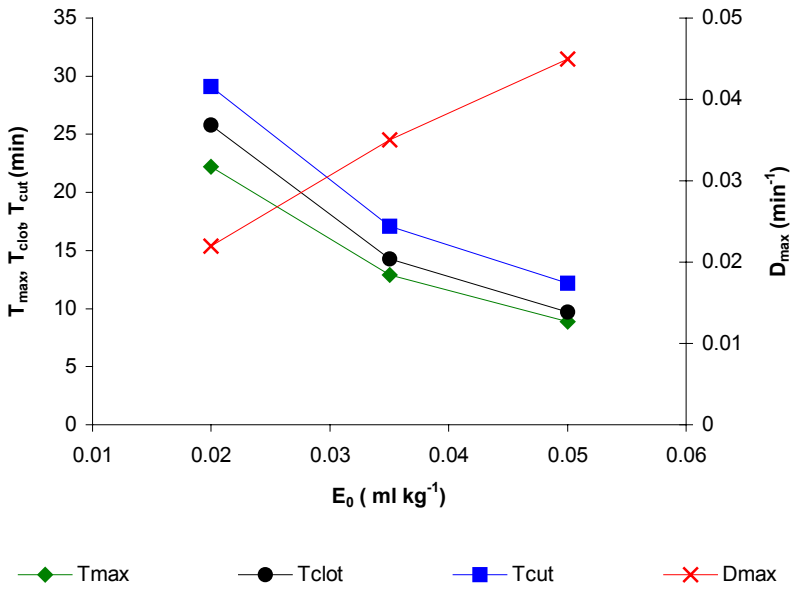

Figura VI.2.2.2.*1*. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de tiempo y mixtos. E_0, concentración de enzima; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{cut}, tiempo de corte visual; D_{max}, máximo valor de la primera derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo.

Conforme aumenta la concentración de enzima, el incremento de la reflectancia es más rápido (aumento de D_{max}), reflejando un aumento de la velocidad de hidrólisis de la κ-caseína y de la agregación, que se traduce en un descenso de todos los parámetros de tiempo. Estos resultados coinciden con los publicados por Ustunol *et al*. (1993) que, determinando reflectancia difusa a 950 nm, comprueban la existencia de una correlación negativa entre la concentración de enzima (cuajo de ternera: 0'197, 0'229 y 0'274 mL/900g leche) y los parámetros de tiempo (T_{max}, T_{clot} y T_{cut}), y de una correlación positiva entre dicho factor y el parámetro mixto D_{max}. También en leche de vaca, y mediante reflectancia difusa a 940 nm, Payne *et al*. (1993*b*) confirman el descenso de T_{max} y K_{20} al aumentar E_0 (cuajo de ternera: 0'11, 0'14 y 0'17 mL kg^{-1} de leche; quimosina *B*: 0'038, 0'050 y 0'62 mL kg^{-1} de leche).

Nuestros resultados también concuerdan con *Passos et al*. (1999) que siguiendo la evolución de la coagulación con un sensor de conductividad térmica, demuestran que tanto la fase enzimática como el tiempo de corte decrecen si se aumenta la concentración de enzima (2'0, 2'5 y 3'0 g/100 L de leche). Carlson *et al*. (1987*d*) constatan mediante el empleo de un formógrafo que tanto *RCT* como K_{20} se correlacionan inversamente con E_0. Otros autores confirman el descenso de *RCT* y/o T_{cut} con el aumento de E_0 (Kopelman y Cogan, 1976; Walstra y Jenness, 1984; Okimgo *et al*., 1985; Van Hooydonk y van den Berg, 1988; Sanjuan y Fernández-Salguero, 1994).

Hace más de 100 años que Storch y Segelcke (1874) observaron que el tiempo de coagulación visual es inversamente proporcional a la concentración de enzima, relación que se describe mediante la ecuación:

$$T_c E = K \qquad \text{(VI.2.2.2.1)}$$

donde

T_c = tiempo de coagulación,

E = actividad enzimática, y

K = constante.

Esta relación sólo resulta válida dentro de un estrecho margen de pH, temperatura y concentración de enzima, por lo que Holter (1932) propuso una expresión que fue posteriormente modificada por Foltmann (1959):

$$T_c = \frac{a}{[E]} + b \qquad \text{(VI.2.2.2.2)}$$

donde

T_c = tiempo de coagulación,

$[E]$ = concentración de enzima,

a = constante, y

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

De acuerdo con la ecuación anterior, la representación del tiempo de coagulación con respecto a la inversa de la concentración de enzima debe ser lineal. Por otro lado, las constantes a y b no sólo dependen del método de determinación del tiempo de coagulación sino también del pH, la temperatura y las concentraciones de calcio y proteína (van Hooydonk y van den Berg, 1988).

McMahon y Brown (1982, 1983, 1990), realizan el seguimiento de la coagulación enzimática de leche desnatada mediante un formógrafo y confirman la ecuación de Foltmann, al observar que el tiempo de coagulación presenta una correlación lineal con la inversa de la concentración de enzima. De Cindio *et al*. (1986) determinan T_{clot} y *RCT* con dos métodos lactodinamométricos (tromboelastógrafo y formógrafo) y mediante una sonda térmica (hot-wire) y constatan la ley de Foltmann en los tres casos. Otros investigadores han ido reconfirmado sucesivamente dicha ley (Garnot y Olson, 1982; Kopelman y Cogan, 1976; Brown y Collinge, 1986; Carlson *et al*, 1987*c*; Dalgleish, 1988*b*; Sharma *et al*, 1989; López, 1993; Picón *et al*., 1993; Irigoyen *et al*., 1998).

Van Hooydonk y van den Berg (1988) aplican con éxito la ecuación de Foltmann a diferentes tiempos característicos del proceso de coagulación como el inicio de la agregación, *RCT*, el inicio de la gelificación y T_{cut}. Si se analiza mediante el empleo de la ecuación de Foltmann la tendencia seguida por las *LSM* de T_{max}, en función de la concentración de enzima, se obtiene como se esperaba, una relación lineal (R^2 = 0'9998) entre dicha variable y la inversa de la concentración de enzima:

$$T_{max} = \frac{0'444}{[E]} + 0'0659 \qquad \text{(VI.2.2.2.}3\text{)}$$

McMahon y Brown (1983) hallan el tiempo de coagulación mediante empleo del formógrafo y obtienen una pendiente de 0'0754, mientras que López (1993) encuentra valores de pendiente de 0'222 y de 0'173, determinando el tiempo de coagulación respectivamente por el método de Berridge y por viscosimetría. Lamentablemente, la comparación de las pendientes obtenidas por los diferentes autores, requiere que los tiempos de coagulación hayan sido obtenidos con el mismo método, en idénticas condiciones y expresando la concentración de enzima en las mismas unidades, motivo por el cual dicha comparación no ha sido establecida.

Por otra parte, Brown y Collinge (1986) ajustan los tiempos de coagulación determinados por turbidimetría (en adelante, turbidimétricos) a la ecuación de Foltmann y determinan un valor muy pequeño, 0'03, para la ordenada en el origen. Dicho valor implica que cuando la concentración de enzima tiende a infinito, el tiempo de coagulación turbidimétrico tiende a cero, de donde se deduce que dicho tiempo de coagulación es equivalente al T_c de la ecuación VI.2.2.2.*1*, siendo más parecido al "tiempo de coagulación real" que el tiempo de coagulación visual, que precisa de la ordenada en el origen. En consonancia, Brown y Collinge (1986) afirman que la existencia de una ordenada en el origen diferente de cero es un artefacto de la técnica empleada para determinar *RCT*. Desde otra perspectiva, nuestros resultados también concuerdan con las conclusiones de McMahon *et al*. (1984*c*) y McMahon y Brown

(1990), que determinan el tiempo de coagulación mediante turbidimetría, el cual corresponde al máximo de la primera derivada del incremento en absorbancia aparente con respecto al tiempo.

Se determina una interacción estadísticamente significativa (P < 0'0001) entre la concentración de enzima y los factores pH y temperatura, para las variables T_{max}, T_{clot} *y* T_{cut}, por lo que el descenso de pH y/o el incremento de temperatura intensifican el efecto producido por el aumento en la concentración de enzima.

En definitiva, el estudio mediante la ecuación de Foltmann del comportamiento de la variable $T_{\max}$, en función de la concentración de enzima, revela que este parámetro de reflectancia disminuye inversamente con el aumento de la concentración de enzima, al igual que el tiempo de coagulación determinado de forma visual (tiempo de coagulación de Berridge) o mediante empleo de métodos tromboelastográficos y viscosimétricos, lo que demuestra una gran similitud de comportamiento entre $T_{\max}$ y el tiempo de coagulación. *En otras palabras, podemos afirmar que el comportamiento de* T_{max} *frente a la concentración de enzima, es equivalente al observado en el tiempo de coagulación de Berridge, que actualmente sigue siendo el parámetro de referencia para el cálculo de la actividad enzimática de los cuajos y enzimas coagulantes comerciales*.

VI.2.2.3. *Efecto del pH*

El efecto ejercido por el pH sobre la variabilidad de todos los parámetros de tiempo y mixtos ensayados (experimento *I*) fue altamente significativo (P < 0'0001) dentro del rango de pH en estudio (5'5-6'5). Como se recoge en la **Tabla VI.2.2.3.*1***, las medias de mínimos cuadrados de los parámetros de tiempo estudiados ($T_{\max}$, T_{clot} y T_{cut}) disminuyen significativamente cuando lo hace el pH (P < 0'0012), mientras que $D_{\max}$ aumenta.

Tabla VI.2.2.3.*1*. Efecto del pH sobre los parámetros de tiempo y mixtos durante la coagulación de leche de cabra. [1]

pH	T_{max} (min)	T_{clot} (min)	T_{cut} (min)	D_{max}
5'5	10'5 [a]	11'8 [a]	15'1 [a]	0'037 [a]
6'0	12'1 [b]	13'4 [b]	16'1 [b]	0'038 [b]
6'5	21'4 [c]	24'5 [c]	27'2 [c]	0'027 [c]

[1] T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{cut}, tiempo de corte visual; D_{max}, máximo valor de la primera derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo.
[a-c] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

Nuestros resultados coinciden con las referencias de Ustunol *et al*. (1993), que mediante la monitorización de la coagulación de leche de vaca con un sensor de fibra óptica a 950 nm, confirman una disminución de los parámetros de tiempo (T_{max}, T_{clot} y T_{cut}) y un aumento de D_{max} por descenso del pH (6'3-6'7). En el mismo año, Payne *et al*. (1993*b*) confirman, en leche de vaca mediante reflectancia difusa a 940 nm, el descenso de T_{max} y K_{20} por acidificación (6'3-6'7).

También Korolczuk (1988) aprecia el descenso del *RCT* refractométrico (determinado mediante refractómetro) por acidificación desde pH 6'5 a 5'7. Similares conclusiones han sido publicadas por Pasos *et al*. (1999) que investigan la disminución de la conductividad térmica durante la coagulación de leche estandarizada. Dichos autores señalan un descenso de la duración de la fase enzimática y del tiempo de corte por acidificación. Erdem (1997) también coincide en indicar un descenso de T_{clot} y de T_{cut} por disminución del pH en el rango 6'51-5'40, mientras que Carlson *et al*. (1987*d*) observan el descenso de los parámetros de tiempo mediante el formógrafo tanto en *RCT* como en K_{20}. Estas tendencias generales de los parámetros de tiempos han sido contrastadas por diversos investigadores (Walstra y Jenness, 1984; Battistotti *et al*., 1986; Van Hooydonk y van den Berg, 1988; Lucey *et al*., 1993*b*; Sanjuan y Fernández-Salguero, 1994).

El descenso acontecido en los tres parámetros de tiempo medidos en nuestra experiencia, es menor entre los valores de pH 5'5 y 6'0 que entre los de 6'0 y 6'5 **(Figura VI.2.2.3.*1*)**.

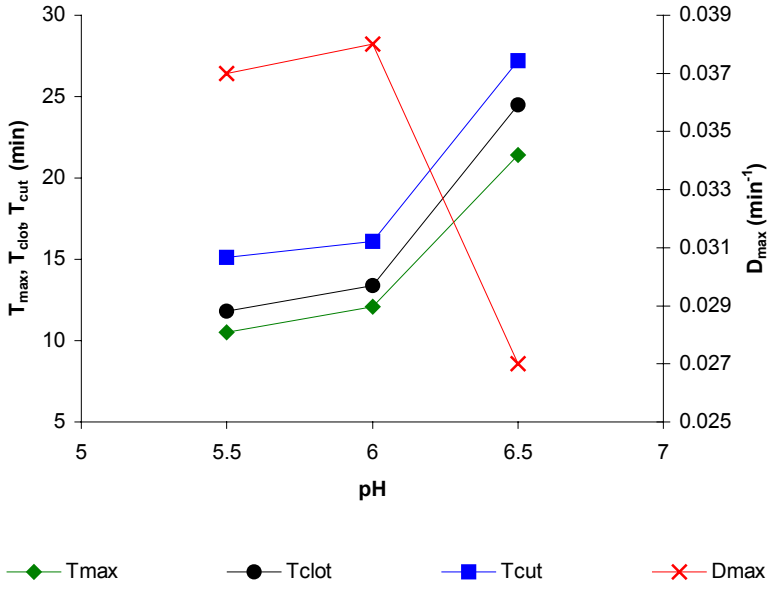

Figura VI.2.2.3.*1*. Efecto del pH sobre los parámetros de tiempo y mixtos.
T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{cut}, tiempo de corte visual; D_{max}, máximo valor de la primera derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo.

En consonancia con nuestros resultados, Imafidon y Farkye (1993) refieren que cuando el pH disminuye desde 6'6 a 6'0, se produce mayor descenso del tiempo de coagulación (determinado mediante formógrafo) que cuando desciende de 6'0 a 5'4. Muchos otros autores han observado que el tiempo de coagulación disminuye más intensamente al principio de la acidificación que posteriormente (Tsugo y Yamauchi, 1959; Ernstrom, 1961; Fox, 1969; Green, 1972; O'Leary y Fox, 1973; Shalabi y Fox, 1982; van Hooydonk y van den Berg, 1988; Brule y Lenoir, 1989; Spreer, 1991).

Nuestras observaciones pueden ser correctamente interpretadas considerando los conocimientos existentes. Van Hooydonk *et al*. (1986*a*), Hyldig, (1993), López *et al*. (1998), y Carlson *et al*. (1987*a*) determinan un aumento de la velocidad de hidrólisis causado por descenso del pH. Estos autores también observan que la máxima velocidad de hidrólisis tiene lugar aproximadamente a pH 6'0 y que el efecto del pH sobre dicha velocidad es menor en el rango de pH comprendido entre 5'6 y 6'4 que entre 6'4 y 7'0. Como puede observarse en la figura anterior **(VI.2.2.3.*1*)**, el máximo valor del parámetro D_{max} se observa a pH 6. Por otra parte, el cambio de pH no sólo afecta a la hidrólisis sino que también influye sobre la agregación (Walstra y van Vliet, 1986; van Hooydonk *et al*., 1986*a*; van Hooydonk *et al*., 1987; van Hooydonk y van den Berg, 1988), aunque la influencia ejercida sobre la fase enzimática es menor que sobre la agregación (Cheryan *et al*., 1974; Mehaia y Cheryan, 1983; McMahon y Brown, 1984*b*; Fox, 1988). Ambos efectos se reflejan conjuntamente en el descenso de *RCT* al disminuir el pH (Okimbo *et al*., 1985; Peri *et al*., 1990; Olson y Bottazzi, 1977; McMahon *et al*, 1984*b*; Sharma *et al*., 1993; Remeuf *et al*., 1995; Erdem, 1997).

La influencia de la acidificación en la fase primaria de la coagulación de la leche, se debe principalmente a un efecto directo sobre la actividad enzimática (Brule y Lenoir, 1989). El pH óptimo para la acción de la quimosina se encuentra aproximadamente a pH 6'0 tanto a 4ºC como a 30ºC (van Hooydonk *et al*., 1986*a*).

Por otra parte, la acidificación con HCl produce el aumento de la concentración de iones H^+ que contribuyen a la disminución de la carga superficial negativa de las micelas, reduciendo la repulsión electrostática existente entre las mismas. El aumento de la concentración de H^+ también facilita el desplazamiento del calcio presente en el fosfato cálcico coloidal, aumentando la actividad del calcio en la fase líquida. Todos estos factores contribuyen sinérgicamente, aumentando la velocidad de formación de enlaces y, por lo tanto, incrementando tanto la velocidad de agregación entre las micelas de para-κ-caseina (Zoon *et al*., 1988*c*, 1989; Visser, 1981) como la velocidad de endurecimiento (Brule y Lenoir, 1989; López *et al*., 1998; Remeuf *et al*., 1995); si bien

con respecto a la dureza del gel, el aumento de la velocidad de coagulación producido por la acidificación, sólo se acompaña de aumento de la dureza máxima si el pH no desciende por debajo de aproximadamente 6'0 (Jen y Ashworth, 1970; Brule y Lenoir, 1989; Marshall *et al*., 1982) a partir del cual se empiezan a acusar efectos tanto de desmineralización como de desagregación micelar.

Por último, se observa la existencia de interacción estadísticamente significativa (P < 0'0001) entre el pH y la concentración de enzima para las variables T_{max}, T_{clot} *y* T_{cut}, por lo que el aumento de la concentración de enzima, magnifica el efecto ejercido por el descenso de pH.

VI.2.2.4. *Efecto de la concentración de cloruro cálcico*

El efecto ejercido por la concentración de Cl_2Ca (1'38, 3'22 y 5'06 mM) sobre la variabilidad de los parámetros de tiempo (T_{max} y T_{cut}) estudiados en el experimento *II* es muy significativo (P < 0'007). Como se esperaba, las *LSM* de T_{max} y T_{cut} decrecen significativamente con el incremento de la concentración de calcio **(Tabla VI.2.2.4.*1*)** confirmando los resultados obtenidos por Payne *et al*. (1993*b*). Estos autores detectan mediante reflectancia difusa a 940 nm un descenso de T_{max} y de K_{20} tras la adición de Cl_2Ca en leche de vaca (0, 0'030 y 0'060 milimoles de calcio g^{-1} de proteína). Nuestros resultados también coinciden con Passos *et al*. (1999), que añaden calcio (disolución de Cl_2Ca al 50%) en leche estándar a concentraciones de 0'28, 0'40 y 0'52 mL L^{-1} de leche y, mediante análisis de la conductividad térmica, aprecian una disminución tanto de la duración de la hidrólisis como del tiempo de corte al aumentar el calcio.

El descenso de T_{max} y T_{cut} entre los dos valores extremos de concentración de calcio, 1'38 y 5'06 mM, es altamente significativo (P < 0'002), pero cuando se comparan las *LSM* obtenidas para concentraciones de calcio menos distantes, éstas sólo son significativamente diferentes entre 1'38 y 3'22 mM. La **Figura VI.2.2.4.*1*** corresponde a la representación gráfica de las medias recogidas en la **Tabla VI.2.2.4.*1***.

Tabla VI.2.2.4.*1*. Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre los parámetros de tiempo durante la coagulación de leche de cabra. [1]

$[Cl_2Ca]$ (mM)	T_{max} (min)	T_{cut} (min)
1'38	8'3 [a]	16'4 [a]
3'22	7'8 [b]	15'4 [b]
5'06	7'5 [b]	14'8 [b]

[1] T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{cut}, tiempo de corte visual.
[a-b] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

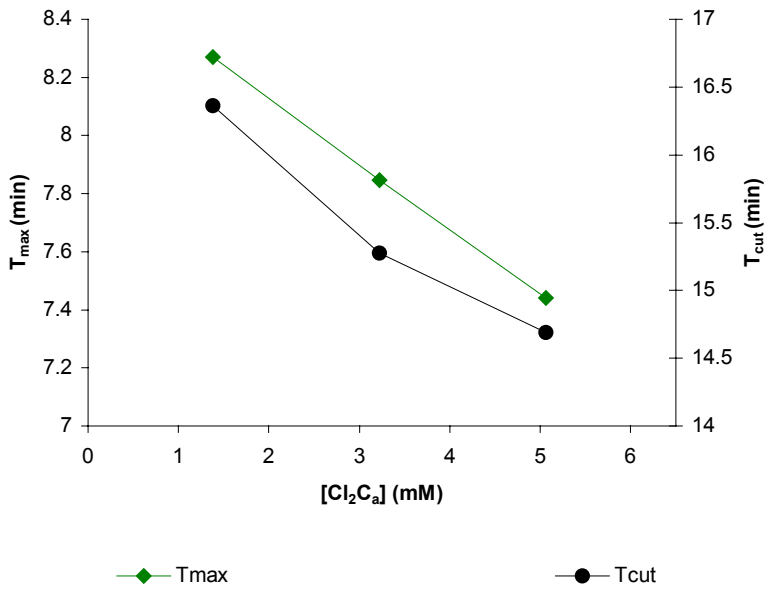

Figura VI.2.2.4.*1*. Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre los parámetros de tiempo.
T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{cut}, tiempo de corte visual.

La ausencia de diferencias significativas entre concentraciones de calcio de 3'22 y 5'06 mM, se atribuye a las pequeñas variaciones de tiempo existentes entre los niveles de calcio considerados, debido probablemente a que el ajuste de pH, realizado con posterioridad a la adición de calcio a diferentes niveles, elimina el efecto indirecto de dicha adición por descenso del pH. En nuestras condiciones experimentales y a la vista de los resultados, consideramos que un aumento en el número de réplicas podría haberse traducido en una mayor significación. En el análisis de los datos obtenidos no se ha observado interacción significativa entre el calcio y el tipo de enzima.

Nuestros resultados confirman los conocimientos generalmente aceptados. Muchos autores han estudiado el efecto de la concentración de cloruro cálcico en la coagulación de la leche. Lucey y Fox (1993) han realizado una amplia revisión bibliográfica al respecto. La gelificación de las micelas de caseína hidrolizada no se inicia si la leche no alcanza una determinada concentración límite de calcio. La adición de calcio por encima de ese nivel y hasta concentraciones de aproximadamente 50 mM provoca una reducción del tiempo de coagulación, pero la adición a concentraciones más altas (> 0'4 M), produce el efecto contrario (McMahon y Brown, 1984*b*; McMahon *et al*., 1984*b*). Recientemente, Famelart *et al*. (1999) confirman un descenso del *RCT* determinado mediante el formógrafo (en adelante formográfico) al aumentar la fuerza iónica por adición de Cl_2Ca hasta una concentración aproximada de 40 mM, concentración a partir de la cual el efecto se invierte. Estas tendencias generales en el comportamiento del tiempo de coagulación, por influencia de la adición de calcio, han sido ampliamente confirmadas (Hardy y Fanni, 1981; Mehaia y Cheryan, 1983; Korolczuk y Maubois, 1988; Zoon *et al*, 1988*c*; McMahon y Brown, 1990; López, 1993; Sanjuan y Fernández-Salguero, 1994).

Algunos de los autores mencionados obtienen sus conclusiones mediante el empleo de métodos ópticos. Hardy y Fanni (1981), analizan la cinética de coagulación mediante la monitorización de la reflexión de la luz con un colorímetro, observando un descenso del tiempo de coagulación por aumento de la concentración de cloruro cálcico

desde 0'002 hasta 0'02 M. Korolczuk (1988) conecta un refractómetro industrial a un ordenador, para analizar la cinética de gelificación enzimática, y observa que el punto de inflexión de la curva de incremento de la señal refractométrica con respecto al tiempo, se correlaciona inversamente con la concentración de calcio en el rango comprendido entre 0 y 8 mM. McMahon *et al*. (1984*b*), durante el estudio de la coagulación de leche mediante turbidimetría, aprecian un desdoblamiento de la curva turbidez/tiempo, que atribuyen a la existencia de un efecto doble del calcio sobre la coagulación, a concentraciones comprendidas entre 0'5 y 100 mM. Según dichos autores, el calcio podría por una parte favorecer la agregación y por otra inhibir la reacción de gelificación. En nuestros resultados no se aprecia la aparición de la referida irregularidad en la curva de reflectancia /tiempo. Recientemente, de Kruif (1999) estudia la influencia de la concentración de Cl_2Ca en los valores de *RCT* derivados de medidas tanto viscosimétricas (*RCT* viscosimétrico) como de reflectancia difusa dinámica. Los valores de *RCT* observados con ambos métodos disminuyen cuando la concentración de Cl_2Ca varía entre 0 y 25 mM.

Por otra parte, no existen muchas citas bibliográficas referentes a la variación del tiempo de corte en función de la concentración de calcio. Lagoueyte *et al*. (1995) en consonancia con nuestras observaciones, apuntan un descenso del tiempo de coagulación por aumento de la concentración de calcio, mientras que al contrario que nosotros, no refieren la existencia de diferencias en el tiempo de corte, debidas a dicho factor. Sin embargo, en 1997, Erdem afirma que en el intervalo de concentración de calcio comprendido entre 0'5 y 100 mM tanto el tiempo de coagulación como el de corte disminuyen al aumentar la concentración de dicho elemento, especialmente entre 1 y 10 mM. Estas tendencias generales han sido contrastadas por Van Hooydonk y van den Berg (1988).

El tratamiento térmico de la leche por encima de 65-70ºC provoca la precipitación parcial del fosfato cálcico (van Hooydonk *et al*., 1987; Veisseyre, 1988) por lo que, la adición de Cl_2Ca se ha constituido en una práctica común durante la elaboración de

queso con el objetivo de compensar la disminución de la actividad de calcio producida durante la pasterización. Su uso reduce el tiempo de coagulación y aumenta la dureza del coágulo en aquellas leches que han sufrido un tratamiento térmico. Parte del calcio añadido contribuye a incrementar la actividad del calcio, pero la mayor parte se une directamente a los grupos funcionales de las caseínas con carga negativa (principalmente a residuos de fosfoserina y grupos carboxílicos) o al fosfato cálcico coloidal (*CCP*). De hecho, la concentración de fosfato soluble decrece tras la adición de calcio (van Hooydonk y van den Berg, 1988).

Según Bringe y Kinsella (1986) la adición de Cl_2Ca aumenta la velocidad de hidrólisis, mientras que por el contrario, Famelart *et al*. (1999) observan un descenso lineal de la constante de velocidad de hidrólisis con el aumento de la concentración de Cl_2Ca. No obstante, mayoritariamente se cree que la adición de Cl_2Ca a la leche no afecta directamente a la fase enzimática de la coagulación (Scott-Blair y Oosthuizen, 1961; Mehaia y Cheryan, 1983; Walstra y Jenness, 1984; van Hooydonk *et al*., 1986*b*; van Hooydonk y van den Berg, 1988; de Kruif, 1999; Mellema *et al*., 1999) sino que afecta indirectamente a la velocidad de hidrólisis, por descenso del pH. La ionización del Cl_2Ca, conlleva un aumento del Ca^{2+} soluble, que es capaz de desplazar un cierto número de protones por transformación de los iones HPO_4^{2-} en fosfato tricálcico, con aumento del calcio micelar y solubilización de iones H^+, que disminuye el pH de la leche.

Por otra parte, se ha afirmado claramente que la adición de calcio desarrolla su principal efecto favorecedor de la coagulación potenciando directamente la agregación de las micelas hidrolizadas de caseína, lo que se aprecia más nítidamente si se mantiene constante el pH de la leche (Mehaia y Cheryan, 1983; van Hooydonk y Walstra, 1987; van Hooydonk y van den Berg, 1988; Zoon *et al*., 1988*c*; Lucey y Fox, 1993). Este efecto sobre la agregación se atribuye a un descenso adicional del potencial zeta (ζ) de las micelas de caseína que ya han sido hidrolizadas (Lucey *et al*. 1993*a*). Este hecho podría guardar relación con la densidad relativa de la capa pilosa de *CMP*. En este

sentido, de Kruif (1999) sugiere que a altas concentraciones de Cl_2Ca el descenso de densidad de la capa pilosa, necesario para inducir la agregación, es menor.

Por lo tanto, en este estudio, para acceder a un análisis aislado del efecto del calcio sobre la coagulación, se contrarresta el descenso asociado del pH, mediante ajuste del mismo a un valor de 6'5, con posterioridad a la adición de los diferentes niveles de cloruro cálcico seleccionados (apartados **V.2.2** y **V.2.4**). De esta forma, las variaciones existentes en los parámetros de tiempo, sólo se atribuyen al efecto del calcio sobre la cinética de coagulación, independientemente del descenso concomitante de pH.

Finalmente, el calcio también produce un incremento de la dureza de la cuajada, alcanzándose un máximo a una concentración de 10 mM, para disminuir posteriormente (Dill y Roberts, 1959; Keogh, 1966; Jen y Ashworth, 1970; Marshall *et al*., 1982).

VI.2.2.5. *Efecto de la temperatura*

En los dos experimentos en los que se considerara diferentes temperaturas de coagulación (experimentos *I* y *III*) el efecto de dicho factor sobre la variabilidad de los parámetros de tiempo y mixtos resulta muy significativo (P < 0'0001) dentro del rango de temperaturas ensayado (20-40ºC).

Como se recoge en la **Tabla VI.2.2.5.*1***, las *LSM* de los parámetros de tiempo ensayados en el experimento *I* (T_{max}, T_{clot} y T_{cut}) disminuyen con el incremento de la temperatura (P < 0'0001) mientras que el parámetro mixto (D_{max}) sufre un aumento significativo (P < 0'0001). Estos resultados coinciden con los observados en los parámetros, T_{max}, T_{clot}, T_{cut} y D_{max}, por Ustunol *et al*. (1993) en leche de vaca mediante la determinación de la reflectancia difusa, a 950 nm y a temperaturas de 29'4, 32'2 y 35ºC. Y también con los publicados por Payne *et al*. (1993*b*) mediante determinación de T_{max} a 940 nm y de K_{20} (27, 31 y 35ºC). En el mismo sentido apuntan Korolckzuk y Maubois (1988) que mediante refractomería (25, 30, 35, 40 y 45ºC) aprecian un

descenso del tiempo al que aparece el punto de inflexión de la curva señal/tiempo al aumentar la temperatura. Passos *et al*. (1999) afirman que con el aumento de la temperatura (29, 32 y 35ºC), descienden tanto la duración de la hidrólisis como el tiempo de corte determinados mediante un sensor térmico. Carlson *et al*. (1987*d*) comprueban mediante el formógrafo que *RCT* y K_{20} descienden al aumentar la temperatura. Estas tendencias han sido amplia y sucesivamente confirmadas (Walstra y Jenness, 1984; Van Hooydonk y van den Berg, 1988).

En el experimento *II* se confirman los resultados del experimento *I*, puesto que las *LSM* reflejan un aumento de D_{max} con la temperatura, a la vez que los cuatro parámetros de tiempo medidos (T_{max}, T_{2max}, T_{2min} y T_{cut}) disminuyen.

Tabla VI.2.2.5.*1*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y mixtos durante la coagulación de leche de cabra. [1]

Experimento	Temperatura (ºC)	T_{max} (min)	T_{clot} (min)	T_{2max} (min)	T_{2min} (min)	T_{cut} (min)	D_{max} (min^{-1})
	28	17’6 [a]	19’4 [a]	--	--	22’6 [a]	0’028 [a]
I	**32**	14’0 [b]	15’9 [b]	--	--	18’6 [b]	0’034 [b]
	36	12’3 [c]	14’4 [c]	--	--	17’2 [c]	0’040 [c]
	20	39’4 [a]	--	32’4 [a]	45’1 [a]	61’7 [a]	0’016 [a]
	25	26’8 [b]	--	22’8 [b]	30’2 [b]	40’5 [b]	0’027 [a]
III	**30**	19’5 [c]	--	16’4 [c]	22’1 [c]	29’5 [c]	0’041 [b]
	35	16’3 [cd]	--	13’0 [d]	18’8 [cd]	25’7 [c]	0’059 [c]
	40	14’1 [d]	--	10’8 [d]	17’3 [d]	24’5 [c]	0’093 [d]

[1] T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{2max}, tiempo hasta el máximo de la segunda derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada; T_{cut}, tiempo de corte visual; D_{max}, máximo valor de la primera derivada.
[a-d] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferente (P < 0’05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna y del mismo experimento.

Sin embargo, el descenso de los tiempos al aumentar la temperatura es más acusado en los tramos 20-25ºC y 25-30ºC (P < 0'0004), tornándose este efecto mucho menos significativo o incluso no significativo en los tramos 30-35ºC y 35-40ºC. Según van Hooydonk y van den Berg (1988) y Payne *et al*. (1993*b*), a temperaturas inferiores a 30ºC las reacciones de agregación y gelificación son las etapas limitantes de la velocidad, motivo por el cual se produce un acusado incremento de los tiempos de coagulación y corte por debajo de dicha temperatura. La disminución de las distancias relativas entre las *LSM* al aumentar la temperatura podrían facilitar la desaparición de las diferencias significativas a altas temperaturas, lo cual, como se comenta posteriormente en este mismo apartado, también puede guardar relación con cierto grado de inactivación enzimática (Zoon *et al*., 1988*b*) y/o con la disminución de los valores de Q_{10} con el aumento de la temperatura (Mehaia y Cheryan, 1983). Con respecto a la significación de la comparación entre medias en el parámetro D_{max} se observa un fenómeno similar.

El descenso de los parámetros de tiempo y el aumento de D_{max}, ha sido atribuido al efecto conjunto de la temperatura sobre las fases de hidrólisis y de agregación. Las fuentes bibliográficas consultadas presentan un alto grado de consenso en ralación con la interpretación del efecto de la temperatura sobre las distintas fases de la coagulación. La temperatura favorece tanto la fase de hidrólisis de la κ-caseína como la fase de agregación de las micelas de caseína hidrolizadas (McMahon y Brown, 1984*b*; Walstra y van Vliet, 1986; van Hooydonk y Walstra, 1987; Fox, 1988; Sharma *et al*., 1989), lo que conduce a un descenso de *RCT* (Hardy y Fanni, 1981; Mehaia y Cheryan, 1983; Lagoueyte *et al*., 1994, 1995; Sharma *et al*., 1989, 1993; Niki *et al*., 1994*b*; Sanjuan y Fernández-Salguero, 1994).

La temperatura ejerce un efecto mucho más marcado en la fase de agregación que en la hidrólisis. El valor Q_{10} para la reacción de hidrólisis varia entre 1'3 y 2 según la mayoría de autores (Cheryan *et al*., 1974: 2'0; Visser, 1981: 2'0; Mehaia y Cheryan, 1983: 5'3-5'7 entre 20-40ºC; McMahon y Brown, 1984*b*: 1'8-2'0 entre 1-30ºC; van

Hooydonk *et al*., 1984: 1'3-1'5 a 30ºC; Walstra y Jenness, 1984: 3'0; van Hooydonk y Walstra, 1987: 1'4; Fox, 1988: 1'8; van Hooydonk y van den Berg, 1988: 1'3-2'0; Veisseyre, 1988: 3'0; Fox y Mulvihill, 1990: 2'0), mientras que el Q_{10} de la agregación es superior a 11'0 para la mayoría de los autores (Cheryan *et al*., 1974: 11'0-12'0 entre 20-50ºC; Visser, 1981, 12'0; Mehaia y Cheryan, 1983: 11'4-12'0 entre 20-40ºC; McMahon y Brown, 1984*b*: 11'0-12'0; Walstra y Jenness, 1984: 30'0; van Hooydonk y Walstra, 1987: 30'0 a 30ºC; Fox, 1988: 16'0; Veisseyre, 1988: 15; Fox y Mulvihill, 1990: 16'0).

El aumento de la temperatura produce un incremento de la velocidad de hidrólisis (Carlson *et al*., 1987*a*). Una mayor temperatura incrementa los movimientos brownianos produciendo un aumento de la probabilidad de colisión entre enzima y sustrato. Por otra parte, el aumento de la temperatura incrementa el porcentaje de colisiones efectivas ya que existen más partículas con energía cinética superior a la energía de activación necesaria para la reacción de hidrólisis (Jiménez y Macarulla, 1984). Pero como se ha comentado, el aumento de la temperatura también favorece la agregación ya que el aumento del porcentaje de colisiones efectivas entre las micelas de caseína hidrolizadas favorece la reacción de agregación. Además, las uniones que se establecen entre las micelas de para-κ-caseína y que conducen a la gelificación de la leche, son esencialmente hidrofóbicas, aunque también los puentes de hidrógeno y los enlaces de naturaleza iónica son importantes. Los enlaces hidrofóbicos aparecen más rápidamente y son más fuertes cuando aumenta la temperatura, conduciendo a la rápida formación de cadenas y racimos de micelas y a una más rápida fusión de las mismas (Lagoueyte *et al*., 1994), que como consecuencia favorece la agregación, motivo por el que el gel se forma más rápido alcanzando una mayor dureza máxima.

En la **Figura VI.2.2.5.*1***, obtenida a partir de los datos de la **Tabla VI.2.2.5.*1*** pertenecientes al experimento *III*, se observa gráficamente y de forma conjunta el efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y el parámetro mixto D_{max}.

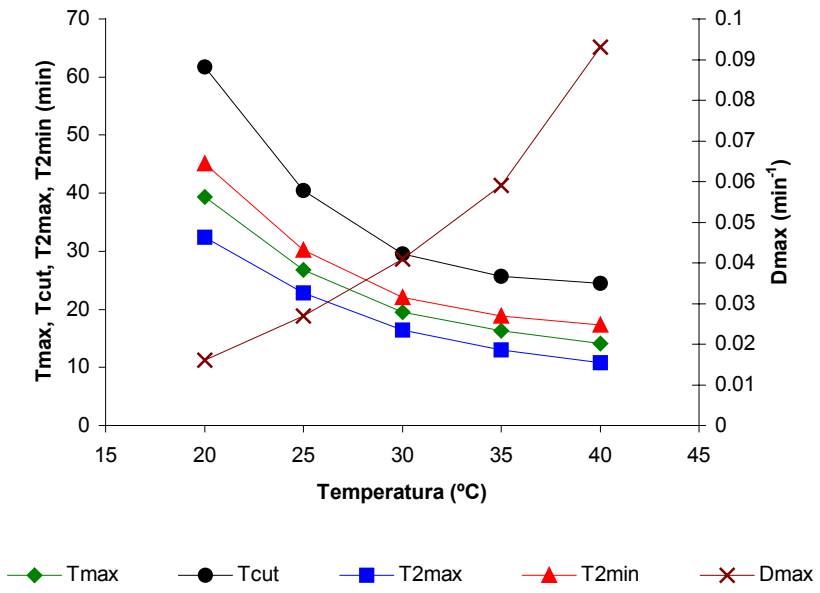

Figura VI.2.2.5.*1*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y mixtos.
Experimento *III*. T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{2max}, tiempo hasta el máximo de la segunda derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada; D_{max}, máximo valor de la primera derivada.

Como puede apreciarse, *el efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo no es lineal*, lo cual ha sido observado por numerosos investigadores (Foltmann, 1959; Scott-Blair y Burnett, 1959; Fox, 1969; Ramet y Weber, 1980; Hardy *et al*., 1985; Korolczuk y Maubois, 1988; Zoon *et al*., 1988*b*; Sharma *et al*., 1989, 1993; Lagoueyte *et al.,* 1994, 1995; Niki *et al*., 1994*b*) como se representa en la **Figura VI.2.2.5.*2***. Para comparar los resultados de tres autores diferentes, en dicha figura se expresan los datos como valores relativos con respecto al tiempo observado a 40ºC. Van Hooydonk y van den Berg (1988) mencionan un ascenso drástico de los tiempos de coagulación y de corte conforme la leche se enfría por debajo de 30ºC -de forma análoga a lo observado en la **Figura VI.2.2.5.*2***- y lo atribuyen al efecto limitante de la agregación y la gelificación sobre la velocidad de coagulación a temperaturas inferiores a 30ºC.

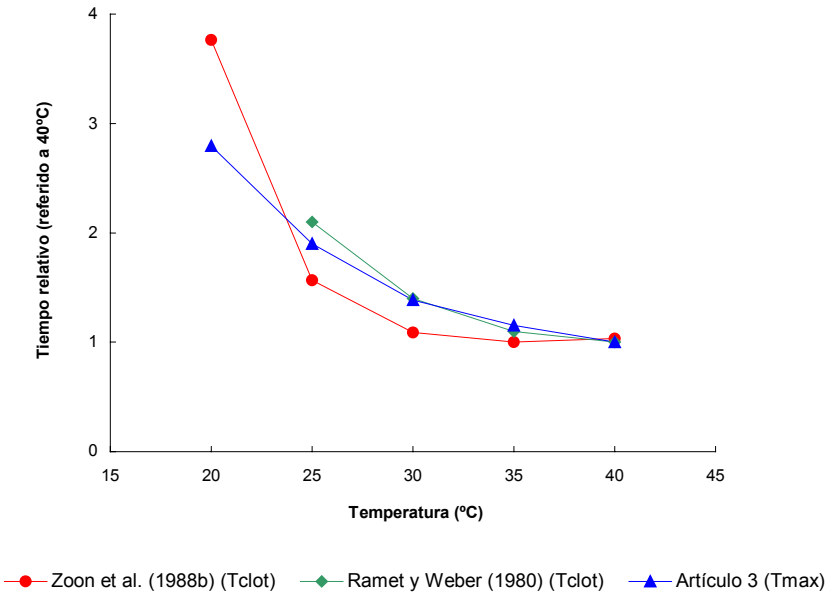

Figura VI.2.2.5.*2*. Efecto no lineal de la temperatura sobre los parámetros de tiempo.
T_{clot}, tiempo de coagulación; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia. Corresponde a Fig. 3 del artículo 3.

Por su parte, Zoon *et al*. (1988*b*) afirman que a temperaturas más altas, y en forma más acusada entre 20ºC y 30ºC, la reacción de coagulación es más rápida, lo que se refleja en un incremento más pronunciado de los módulos elástico y viscoso. Mehaia y Cheryan (1983) calculan el Q_{10} del proceso de coagulación (hidrólisis + agregación) entre 20ºC y 30ºC y entre 30ºC y 40ºC y observan un Q_{10} mayor entre 20ºC y 30ºC que entre 30ºC y 40ºC, lo que está relacionado con el efecto no lineal de la temperatura sobre el tiempo de coagulación. No obstante, este comportamiento también podría deberse a una inactivación térmica de la quimosina. La **Figura VI.2.2.5.*3*** es análoga a la **VI.2.2.5.*1***, pero realizada conforme a los parámetros de tiempo obtenidos en el experimento *I*. En dicha figura no se observa, tan claramente, el efecto cuadrático de la temperatura debido al reducido rango de temperaturas utilizado (28-36ºC). Si en la **Figura VI.2.2.5.*1*** sólo consideramos el rango de temperatura comprendido entre 28 y 36ºC, tampoco apreciamos dicho efecto nítidamente.

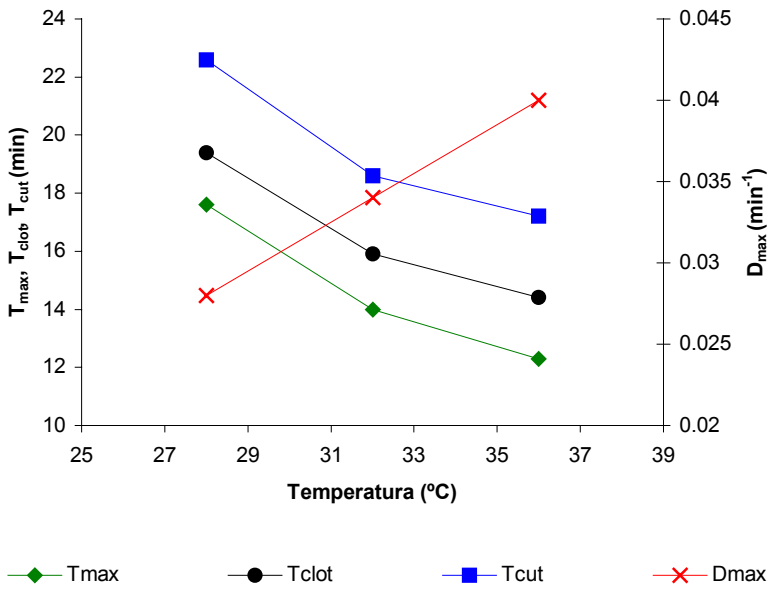

Figura VI.2.2.5.*3*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y mixtos.
Experimento *I*. T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{cut}, tiempo de corte visual; D_{max}, máximo valor de la primera derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo.

Con relación a las interacciones de otros factores con la temperatura, se observa la existencia de interacción entre la temperatura y la concentración de enzima para las variables de tiempo, T_{max}, T_{clot} y T_{cut} (P < 0'0001). Por lo tanto, el aumento de la concentración de enzima favorece el efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo.

Por otra parte, Saputra en 1992 afirma que la reflectancia difusa, medida respectivamente a longitudes de onda de 820, 940, 1250 y 1650 nm, es útil para monitorizar la hidrólisis enzimática de la leche. Recientemente, López *et al*. (1998) encuentran que la máxima velocidad de cambio del módulo elástico (G') con respecto al tiempo, se correlaciona linealmente con la constante de hidrólisis de la κ-caseína a valores de pH de 6'74, 6'5 y 6'25. Por otra parte, el parámetro de reflectancia difusa, D_{max}, corresponde a la pendiente máxima del incremento en reflectancia que se alcanza

a tiempo T_{max}, por lo que siempre es ligeramente anterior al tiempo de coagulación de Berridge (Castillo *et al*., 2000*b*). Asumiendo que D_{max} está correlacionada con la velocidad de hidrólisis de la κ-caseína, se puede establecer la siguiente ecuación tipo Arrhenius, para estudiar el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis:

$$\ln D_{max} = \ln A - \left(\frac{E_a}{RT}\right) \qquad \text{(VI.2.2.5.1)}$$

donde

A = estimación del factor de frecuencia de Arrhenius,

R = constante universal de los gases, 8'314 J mol^{-1} K^{-1}, y

E_a = estimación de la energía de activación para la hidrólisis de la κ-caseína.

T = temperatura absoluta.

Como se esperaba, existe una relación lineal entre el ln D_{max} y $1/T$ a cada una de las concentraciones de proteína (para cada concentración, el valor de D_{max} a cada temperatura corresponde a la media de tres réplicas). Los valores de R^2 encontrados son respectivamente 0'999 **(Figura VI.2.2.5.*4*)**, 0'996 y 0'995 para 3, 5 y 7% de proteína.

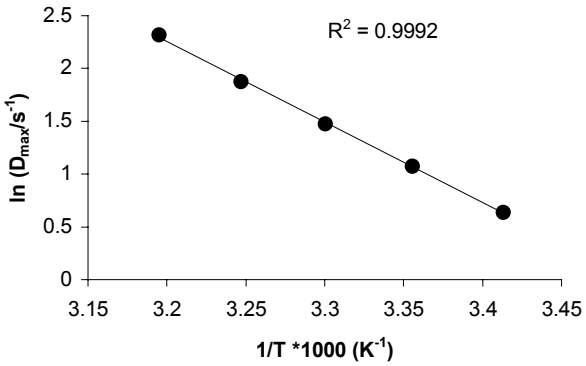

Figura VI.2.2.5.*4*. Relación tipo Arrhenius entre D_{max} y la inversa de la temperatura absoluta.
D_{max}, máximo valor de la primera derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo.

Los valores de E_a calculados son 63'5, 68'1 y 71'7 kJ mol^{-1} para 3, 5 y 7% de proteína respectivamente. Como se refleja en la **Figura VI.2.2.5.5**, los valores de E_a aumentan proporcionalmente a la concentración de proteína, aunque dicho efecto no tiene significación estadística.

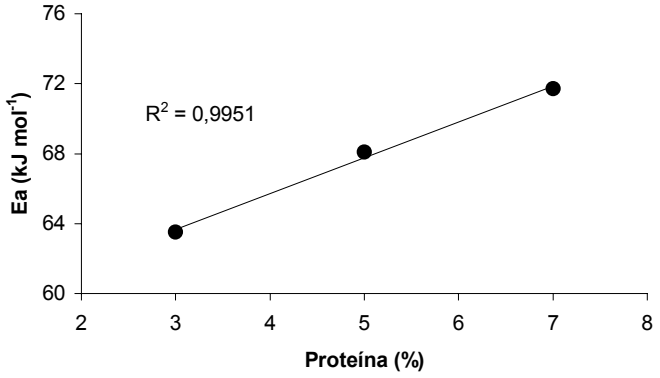

Figura VI.2.2.5.5. Efecto de la concentración de sustrato sobre la energía de activación de la hidrólisis de la κ-caseína.

Estos resultados coinciden con lo citado por diferentes investigadores (Saputra 1992, van Hooydonk *et al*., 1984; Hyldig, 1993; Lomholt, 1996) que concluyen que la constante de velocidad del proceso de hidrólisis enzimática evoluciona de forma inversamente proporcional a la concentración de sustrato.

VI.2.2.6. *Efecto de la concentración de sustrato*

En el experimento *III* se estudia la influencia de la concentración de sustrato (κ-caseína) mediante el ajuste de la concentración de proteína en la leche (3, 5 y 7%). El efecto de la modificación del nivel proteico en la variabilidad de los parámetros de

tiempo (T_{max}, T_{cut}, T_{2max} y T_{2min}), es muy significativo (P < 0'0001), siendo D_{max}, independiente de dicho factor. La interacción proteína × temperatura es significativa para T_{max}, T_{2max} y T_{2min} (P < 0'0001).

Como se desprende del análisis de las *LSM* recogidas en la **Tabla VI.2.2.6.*1***, todos los parámetros de tiempo aumentan con el incremento de la concentración proteica (P < 0'0001) mientras que la distancia relativa entre T_{max} y T_{cut}, medida como $(T_{cut} - T_{max})/T_{max}$, se acorta ($P$ < 0'0001).

Tabla VI.2.2.6.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros de tiempo y mixtos durante la coagulación de leche de cabra. [1]

Proteína (%)	T_{max} (min)	T_{cut} (min)	T_{2max} (min)	T_{2min} (min)	D_{max} (min^{-1})	$(T_{cut}-T_{max})/T_{max}$
3	13'3 [a]	30'7 [a]	10'7 [a]	16'0 [a]	0'050 [a]	1'2 [a]
5	22'0 [b]	33'8 [a]	18'2 [b]	25'2 [b]	0'050 [a]	0'5 [b]
7	34'5 [c]	44'7 [b]	28'4 [c]	38'9 [c]	0'042 [a]	0'3 [c]

[1] *T*max, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{2max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la segunda derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo; T_{2min}, tiempo desde la adición de enzima hasta el mínimo de la segunda derivada; D_{max}, máximo valor de la primera derivada.
[a-c] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

La interpretación de los resultados expuestos no resulta sencilla, si consideramos las profundas contradicciones encontradas en la literatura relativas al efecto de la concentración de sustrato sobre el tiempo de coagulación y la constante de velocidad de la etapa de hidrólisis. Algunos autores aseguran que tiene lugar un descenso de *RCT* cuando se aumenta la concentración de proteína mediante ultrafiltración (Reuter *et al*., 1981; Lucisano *et al*., 1985; Mehaia y El-Khadragy, 1988; Sharma *et al*., 1992; O'Callaghan *et al*., 1999*b*). El descenso de *RCT* es también observado por Sharma *et*

al. (1993) cuando no se realiza ajuste del pH de la leche, pero curiosamente, si éste se ajusta (6'0, 6'4 y 6'8) la concentración de proteína no ejerce efecto alguno. Discrepando con Sharma *et al*. (1993), Waungana *et al*. (1998) comprueban dicha disminución de *RCT* cuando ajustan el pH a 6'5, no observándola al pH natural de la leche. Mehaia (1994) determina una reducción de *RCT* con el aumento de proteína que tiende a desaparecer al aumentar la concentración de enzima, la acidez o la concentración de Cl_2Ca. Sin embargo, los resultados de este estudio coinciden con Dalgleish (1980), que afirma que un incremento en la concentración de caseína mediante ultrafiltración o adición de ultrafiltrado de leche provoca un ascenso de la dureza final, mientras que el tiempo de coagulación no se ve afectado o sufre un ligero aumento. Por su parte, otros autores como Culioli y Sherman (1978), Schmutz y Puhan (1978), Garnot y Corre (1980), Garnot *et al*. (1982); Ambrosoli *et al*. (1988) y Clark y Sherbon (2000) afirman que *RTC* claramente aumenta al elevar la concentración de proteína.

Puesto que la primera fase de la coagulación es de naturaleza enzimática, para interpretar los resultados obtenidos en esta experiencia es preciso considerar las condiciones experimentales en las que ha sido realizada, en relación con las concentraciones de enzima y sustrato. Varios autores han demostrado que la hidrólisis de la κ-caseína se ajusta a una cinética de Michaelis –Menten (Garnier, 1963; Carlson, 1982; Dalgleish, 1993):

$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{Km + [S]} \qquad \text{(VI.2.2.6.1)}$$

donde

V_{max} = máxima velocidad de hidrólisis (por saturación de los centros del enzima con el sustrato),

K_m = constante de Michaelis-Menten y

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

Cuando se cumple $[S] >> K_m$, entonces $-d[S]/dt = V_{max}$, esto es, la reacción de hidrólisis se aproxima a una cinética de orden cero, y la velocidad es independiente de la concentración de sustrato, mientras que si $K_m >> [S]$ la reacción es de orden uno, por lo que la velocidad de hidrólisis es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Van Hooydonk y Walstra (1987) revisan los parámetros cinéticos de la hidrólisis realizada por la quimosina en diferentes sustratos. Para la hidrólisis enzimática desarrollada por la quimosina sobre la κ-caseína presente en la leche, se sugieren valores de K_m entre 0'001 y 0'05 mM. Si asumimos que un 73'8% de la proteína total en la leche de cabra es caseína y que el 11'5% de la caseína es κ-caseína (Quiles y Hevia, 1994), se puede estimar que las muestras con un contenido proteico de 3, 5 y 7% deben contener respectivamente 0'13, 0'22 y 0'31 milimoles de κ-caseína por litro.

Puesto que la $[S]$ debe ser al menos 10 veces mayor que el K_m para que la enzima se considere saturada por el sustrato (Christensen y Palmer, 1980), para que se cumpliese simultáneamente la condición de saturación para un 3, 5 y 7% de proteína, la K_m debería ser menor de 0'013 mM. Ya que el valor de K_m para la hidrólisis de la caseína en la leche se cree comprendido entre 0'001 y 0'05 mM, la probabilidad de que se cumpla la condición de saturación sería de un 25%.

Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales parece más probable que se cumpla la condición $K_m >> [S]$ que la condición contraria, lo que supondría que la cinética de hidrólisis se reduce a una cinética de orden uno. Muchos autores afirman que, habitualmente, una reacción de primer orden describe de forma correcta la reacción de hidrólisis enzimática (van Hooydonk *et al*., 1984, 1986*a*; van Hooydonk y Walstra, 1987; Lomholt, 1996; López *et al*., 1997*a*; Mellema *et al*., 1999).

Por todo lo expuesto, en nuestras condiciones experimentales, se espera que el incremento en la concentración de proteína produzca un aumento de la velocidad de hidrólisis y como consecuencia un descenso de los parámetros de tiempo. Sin embargo,

los datos de la tabla anterior **(VI.2.2.6.*1*)** representados en la **Figura VI.2.2.6.*1*** sugieren, todo lo contrario.

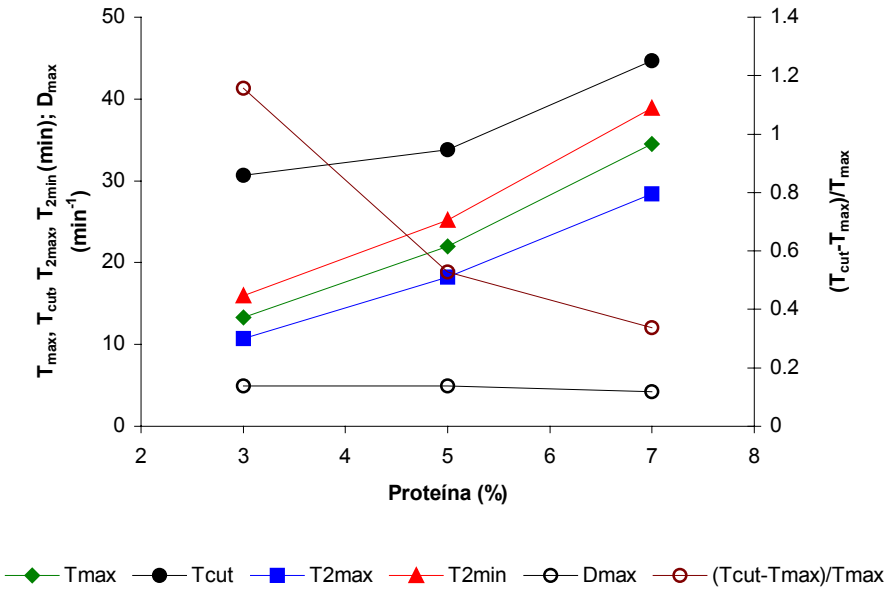

Figura VI.2.2.6.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros de tiempo y mixtos. T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{2max}, tiempo hasta el máximo de la segunda derivada del ratio de reflectancia con respecto al tiempo; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada; D_{max}, máximo valor de la primera derivada multiplicado por 100; $(T_{cut}-T_{max})/T_{max}$, tiempo relativo entre T_{max} y T_{cut}.

La reacción enzimática podría en determinadas condiciones reducirse a una reacción de orden cero o de orden uno, en función de la relación entre K_m y $[S]$ que depende a su vez de muchos factores. Téngase en cuenta que las referencias bibliográficas encontradas sobre el valor de K_m son muy heterogéneas y que según Lehninger (1987) y Stryer (1988), el valor de K_m para un enzima determinado no es fijo sino que depende de cada sustrato particular y de su estructura, así como del pH, la temperatura y la fuerza iónica. Entonces, si se analiza la variedad de efectos observados en relación con la influencia de la proteína sobre *RCT* y la diversidad de condiciones

experimentales en las que los trabajos de investigación han sido realizados -ajuste/no ajuste del pH, proporción constante o no de la relación enzima/proteína, método de ajuste proteico, etc.-, obviamente, no podemos saber con certeza el orden de la reacción enzimática bajo el que ha sido realizada la hidrólisis en cada caso.

Van Hooydonk *et al*. (1984), Saputra (1992), Hyldig (1993) y Lomholt (1996) observan que la constante de velocidad de hidrólisis no sólo no aumenta con la concentración de proteína, como predice una cinética de orden uno, ni se mantienen constante, en concordancia con un proceso de orden cero, sino que más bien disminuye. Este inesperado, descenso en la constante de hidrólisis debe resultar de la disminución de la velocidad efectiva de difusión de la enzima debido al aumento de la concentración proteica, y podría explicar porque T_{max}, T_{2max}, T_{2min} y T_{cut} aumentan significativamente con la proteína. Esta hipótesis concuerda con lo encontrado por Muhr y Blanshard (1982), que afirman que la velocidad de difusión de un soluto en una disolución de polímeros depende de la concentración de dichos polímeros, y con lo publicado por Vélez-Ruiz y Barbosa-Cánovas (1998) y Reddy y Datta (1994), que indican un aumento del coeficiente de consistencia de la leche concentrada y/o reconstituida en función de su contenido en sólidos.

Por todo ello, van Hoooydonk *et al*. (1984) propuso un modelo de difusión para describir la hidrólisis enzimática de la κ-caseína en leche, en el que la velocidad de difusión de la enzima hacia la superficie de las micelas de caseína controla la velocidad de la reacción. Por su parte, Payens (1984), basándose en el incremento de viscosidad provocado por la concentración proteica y en su efecto ralentizador sobre la difusión, realiza un análisis que reconcilia una cinética de hidrólisis de orden uno, con un incremento de *RCT* por aumentar la concentración de proteína. Saputra (1992) analiza la hidrólisis de la leche mediante reflectancia difusa, asumiendo que esta reacción sigue una cinética de primer orden descrita mediante un modelo de difusión. Dicho investigador conjuga, al igual que Payens (1984), el descenso de la constante de hidrólisis, debido al descenso de la difusión por aumento de la proteína, con valores

ascendentes de T_{max}, a todas las longitudes de onda, temperaturas y concentraciones de enzima estudiadas.

Pero podemos realizar el análisis desde otra perspectiva. Sabemos que la agregación no se inicia hasta que la κ-caseína ha sido hidrolizada en un 60-80% (Carlson *et al*., 1987*a*, *b*). Por lo tanto, si la enzima estuviera saturada con el sustrato, un incremento en la concentración de caseína, a concentración constante de enzima, podría traducirse en un aumento de la duración de la fase de latencia necesaria para que se alcance el porcentaje de hidrólisis requerido para el inicio de la fase de agregación. En nuestras condiciones experimentales, si bien no parece lo más probable, la enzima podría estar saturada con el sustrato (orden cero) siempre que el "valor real" de K_m para la reacción de hidrólisis sea menor de 0'013 mM.

La hipótesis de saturación con el sustrato concuerda con el comportamiento observado en el parámetro D_{max}. En sus ensayos, Saputra (1992) observa que la reflectancia difusa permite medir la hidrólisis enzimática de la leche. Por otra parte D_{max}, que corresponde a la pendiente máxima del incremento en reflectancia difusa, parece ser el parámetro de reflectancia más relacionado con la velocidad de hidrólisis. Si la enzima estuviese saturada con el sustrato, al aumentar la concentración de caseína la velocidad de hidrólisis debería ser constante, lo que se reflejaría en un valor fijo de D_{max}.

En dichas condiciones, la misma cantidad de enzima tendría que hidrolizar a velocidad constante más sustrato, produciendo un aumento de los parámetros de tiempo. Esta hipótesis de saturación enzimática es consistente con lo observado en el presente estudio, esto es: aumento de los parámetros de tiempo y valor constante de D_{max} (véanse las anteriores **Tabla VI.2.2.6.*1*** y **Figura VI.2.2.6.*1***), y coincide con lo publicado por Culioli y Sherman (1978) que comprueban que *RCT* aumenta con la concentración proteica a todas las E_0 ensayadas.

Con respecto al comportamiento de T_{cut}, varios autores afirman, como se ha comentado, que la velocidad de endurecimiento del gel aumenta cuando se incrementa la concentración de proteína (van Hooydonk y van den Berg, 1988; Guinee *et al.*, 1997), probablemente debido a un aumento del número de colisiones efectivas entre las micelas de caseína hidrolizadas, por lo que cabría esperar un descenso de T_{cut}. Incluso aunque se produjese un aumento de las velocidades de agregación y endurecimiento del gel como consecuencia de una mayor concentración de sustrato, el retraso producido en el inicio de la agregación, debido al retardo de la fase de hidrólisis, podría conducir a un incremento de T_{cut}. Esto podría explicar porque se observa un incremento de T_{cut} al aumentar la proteína, y a la vez se produce un descenso significativo de la distancia de tiempo relativa entre T_{max} y T_{cut} según se representa en la figura previa **(Figura VI.2.2.6.*1*)**.

VI.2.3. Efecto de los factores de la coagulación en los parámetros de respuesta

VI.2.3.1. *Efecto del tipo de enzima*

El análisis de varianza revela que parte de la variabilidad de los parámetros de respuesta estudiados en el experimento *II* (R_{max} y R_{cut}, $P < 0'02$ y $P < 0'003$) se debe respectivamente) al tipo de enzima empleado (cuajo de cabrito líquido o enzima microbiano de *M. miehei*), mientras que la variabilidad del parámetro V_0 no depende del tipo de enzima, como era de esperar.

Tal como se recoge en la **Tabla VI.2.3.1.*1***, las *LSM* de R_{max} y R_{cut} resultan significativamente mayores con el cuajo de cabrito líquido que empleando la enzima coagulante derivada de *M. miehei*. Pese a producir el cuajo de cabrito los menores tiempos (T_{max} y T_{cut}) en comparación con la enzima de origen microbiano (apartado **VI.2.2.1**), los ratios de reflectancia correspondientes a esos tiempos son mayores en el cuajo de cabrito, lo cual indica de forma clara que dicha enzima coagula la leche de cabra más rápidamente que la enzima microbiana.

Tabla VI.2.3.1.*1*. Efecto del tipo de enzima sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra. [1]

Tipo de enzima	R_{max}	R_{cut}	V_0
Cuajo de cabrito líquido	1'053 [a]	1'104 [a]	1'998 [a]
Enzima coagulante de *M. miehei*	1'049 [b]	1'094 [b]	2'000 [a]

[1] *R*max, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual; V_0, voltaje inicial.
[a-b] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

La constante de velocidad de hidrólisis es mayor con cuajo de cabrito (López *et al*., 1997*a*) y también la hidrólisis es más específica (López, 1993), lo que genera menores tiempos y condiciona un inicio anticipado de la agregación y del endurecimiento, que a su vez produce mayores ratios de reflectancia, si comparamos a un tiempo dado.

Por otra parte, no se observan diferencias significativas entre las enzimas estudiadas, con respecto al parámetro V_0, ni existen interacciones entre el tipo de cuajo y la concentración de cloruro de calcio para ninguna de las variables de respuesta analizadas.

VI.2.3.2. *Efecto de la concentración de enzima*

El efecto de la concentración de enzima (0'02-0'05 mL kg^{-1}) sobre las variables, R_{max} y R_{cut}, se ha estudiado en el experimento *I,* y pese a que su variabilidad depende significativamente de la concentración de enzima (P < 0'0012 y P < 0'0148 respectivamente), el análisis de las *LSM* no permite concluir tendencia alguna en su comportamiento **(Tabla VI.2.3.2.*1*)**.

Tabla VI.2.3.2.*1*. Efecto de la concentración de enzima sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra. [1]

E_0 (mL kg^{-1})	R_{max}	R_{cut}
0'020	1'088 [a]	1'191 [a]
0'035	1'077 [b]	1'170 [b]
0'050	1'078 [b]	1'175 [b]

[1] E_0, concentración de enzima; R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual.
[a-b] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

La obtención de significación en el análisis de varianza sin la observación de una evolución consistente podría deberse a que el número de ensayos realizados no permite apreciar posibles diferencias, pero tras un análisis detallado consideramos que R_{max} y R_{cut} no varían en función de E_o **(Figuras VI.2.3.2.*1* y VI.2.3.2.*2*)**.

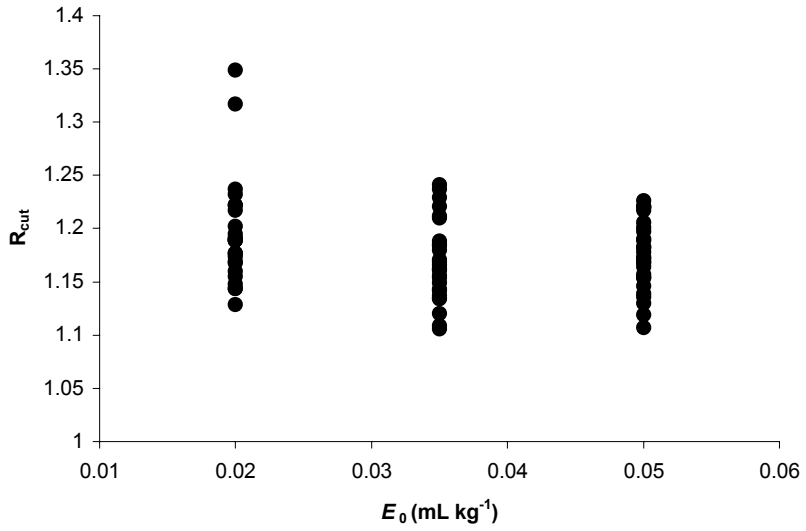

Figura VI.2.3.2.*1*. Evolución de R_{cut} en función de la concentración de enzima.
E_0, concentración de enzima; R_{cut}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia. Valores de R_{cut} medidos dentro de los rangos ensayados de pH (5'5-6'5) y temperatura (28-36ºC). N = 81.

En esa dirección apuntan Garnot y Olson (1982) que demuestran una independencia del valor final del módulo de rigidez, determinado mediante el aparato de Vanderheiden (1976), con respecto a la concentración de enzima, lo que indica que la matriz final de cuajada depende de las interacciones existentes entre las micelas de caseína y de las características de la leche, más que de la velocidad de hidrólisis.

En la **Figura VI.2.3.2.*2*** se analiza el efecto de la concentración de enzima en el perfil de reflectancia difusa y su primera derivada. Se aprecia cláramente que cuando la concentración de enzima aumenta desde 0'02 a 0'05 mL kg^{-1} los parámetros de tiempo T_{max} y T_{cut} disminuyen, mientras que los ratios de reflectancia correspondientes a esos tiempos se mantienen aproximadamente constantes, produciendose un desplazamiento horizontal de las curvas.

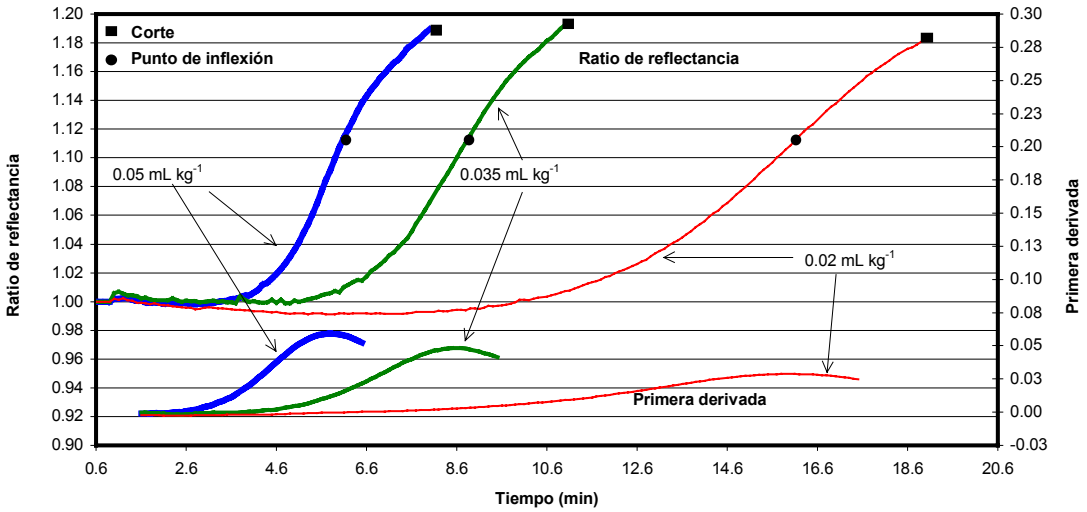

Figura VI.2.3.2.*2*. Efecto de la concentración de enzima en los parámetros de tiempo y respuesta.

● Punto de inflexión, observese: T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia. ■ Corte, observese: T_{cut}, tiempo de corte visual; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual. Cada curva es la media de tres réplicas. Corresponde a la Fig. 3 del artículo 1.

Lógicamente, el descenso de los parámetros de tiempo, se acompaña de un incremento en el valor del máximo de la primera derivada, que se aprecia claramente en una mayor altura de la función derivada. Aunque Ustunol *et al*. (1993) no proporcionaron en su estudio valores numéricos de R_{max} y R_{cut}, la tendencia general observada en la evolución de los perfiles de reflectancia en función de la concentración de enzima coincide con nuestras observaciones.

VI.2.3.3. *Efecto del pH*

La influencia del pH en el rango 5'5-6'5 sobre las variables de respuesta se analiza en el experimento *I*. El análisis estadístico muestra que la variabilidad de R_{max} y R_{cut}, depende significativamente de la concentración de enzima (P < 0'0081 y P < 0'0068 respectivamente) pero, como anteriormente, el análisis de las *LSM* no refleja tendencias con respecto a la variación del pH (**Tabla VI.2.3.3.*1***).

Tabla VI.2.3.3.*1*. Efecto del pH sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra. [1]

pH	R_{max}	R_{cut}
5'5	1'080 [a]	1'178 [ab]
6'0	1'077 [a]	1'167 [b]
6'5	1'086 [b]	1'191 [a]

[1] R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual.
[a-b] Medias con el misma superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

La significación obtenida en el análisis de varianza, sin observación de una tendencia definida, podría deberse a un número insuficiente de réplicas, pero tras el

análisis cuidadoso de las mismas consideramos que R_{max} y R_{cut} no varían en función del pH **(Figuras VI.2.3.3.*1* y VI.2.3.3.*2*)**.

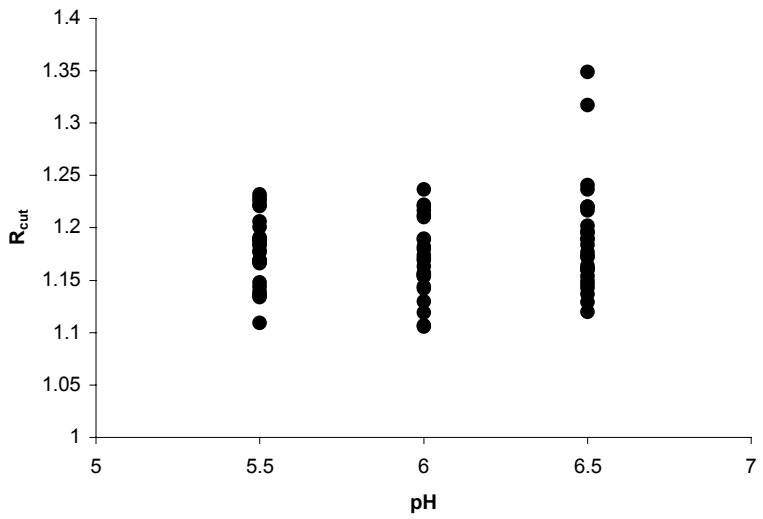

Figura VI.2.3.3.*1*. Evolución de R_{cut} en función del pH.
R_{cut}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia. Valores de R_{cut} medidos dentro de los rangos ensayados de concentración de enzima (0'02-0'05 mL kg^{-1}) y temperatura (28-36ºC). N = 81.

En la **Figura VI.2.3.3.*2*** se refleja la influencia del pH en el perfil de reflectancia difusa y su primera derivada. Se observa que un descenso del pH de 6'5 a 5'5 produce una disminución de los parámetros de tiempo, T_{max} y T_{cut}, mientras que los ratios de reflectancia correspondientes a dichos tiempos (R_{max} y R_{cut}) no varían, lo cual produce un desplazamiento horizontal de las curvas, como en el caso anterior.

El descenso de los parámetros de tiempo, se acompaña de un incremento del máximo de la primera derivada, que se aprecia en una mayor altura de la función derivada excepto para un valor de pH de 5'5 (ver significación estadística de las diferencias en **Tabla VI.2.3.3.*1***). Lógicamente esto implica una menor reducción de los

parámetros de tiempo entre valores de pH 6'0 y 5'5. Nuestros resultados coinciden con la tendencia general observada por Ustunol *et al*. (1993), si bien, su estudio se realizó en un rango más estrecho de pH comprendido entre 6'7 y 6'3, motivo por el que estos autores no encuentran descenso alguno en el parámetro D_{max}.

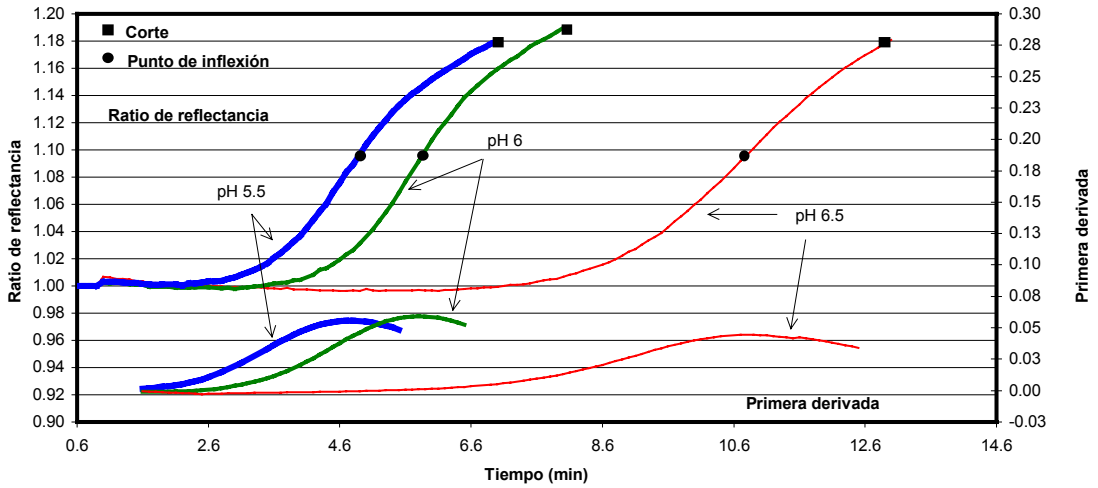

Figura VI.2.3.3.*2*. Efecto del pH sobre los parámetros de tiempo y de respuesta.

● Punto de inflexión, observese: T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia. ■ Corte, observese: T_{cut}, tiempo de corte visual; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual. Cada curva es la media de tres réplicas. Corresponde a la Fig. 2 del artículo 1.

Los resultados expuestos coinciden con Elaya *et al*. (1995) que afirma que tanto a 15ºC como a 20ºC, la acidificación de leche de cabra, oveja y vaca desde su pH inicial hasta pH 5'9 produce un aumento de la turbidez mientras que, por el contrario, el descenso de pH de 5'9 hasta 5'2 produce un descenso de la misma.

En consonancia, Jen y Ashworth (1970), Brule y Lenoir (1989) y Marshall *et al*. (1982) señalan que el aumento de la velocidad de coagulación producido por la acidificación sólo se acompaña de aumento de la dureza máxima si el pH no desciende

por debajo de 6'0, valor a partir del cual la desmineralización y desagregación micelar revierten el proceso (apartado **VI.2.2.3**).

VI.2.3.4. *Efecto de la concentración de cloruro cálcico*

La influencia ejercida por la concentración de Cl_2Ca (1'38-5'06 mM) sobre la variabilidad de los parámetros de respuesta, R_{max}, R_{cut} y V_0, no es significativa (experimento *II*), por lo que no existen diferencias entre las *LSM* **(Tabla VI.2.3.4.*1*)**.

Tabla VI.2.3.4.*1*. Efecto de la concentración de cloruro cálcico sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra. [1]

[Cl_2Ca] (mM)	R_{max}	R_{cut}	V_0 (V)
1'38	1'051 [a]	1'102 [a]	1'989 [a]
3'22	1'050 [a]	1'099 [a]	2'004 [a]
5'06	1'051 [a]	1'097 [a]	2'005 [a]

[1] *R*max, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual; V_0, voltaje inicial.
[a] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna.

En consonancia con nuestras observaciones Mellema *et al*. (1999) estudian la coagulación de micelas de caseína en leche desnatada mediante reología y reflectancia difusa y comprueban que, la adición de disoluciones de Cl_2Ca a la leche no modifican ni la densidad ni el índice de refracción en el rango 0-0'5 M.

Lochte-Watson *et al*. (1998) estudia el efecto del pH y de la concentración de grasa, proteína y calcio sobre la reflectancia difusa en leche y el análisis de varianza no revela efecto significativo de la concentración de calcio sobre la reflectancia difusa, si

bien la interacción entre el calcio y proteína es significativa.

Por el contrario, McMahon y Brown (1990) que monitorizan la coagulación de leche reconstituida mediante reflectancia difusa y el formógrafo, tras constatar que los valores de turbidez se correlaciona con los de G, calculan G_∞ mediante ajuste de los datos experimentales a una forma modificada de la ecuación de Scott-Blair y Burnett (1963*b*), comprobando que la adición de calcio (1-20 mM) aumenta G_∞.

Recientemente, Famelart *et al*. (1999) emplean un reómetro para determinar el módulo de rigidez de dispersiones de micelas de caseína en disoluciones de diferente concentración de Cl_2Ca. Dichos investigadores ajustan los datos experimentales (G) a la ecuación de Scott-Blair y Burnett (1963*b*) a fin de obtener una estimación de G_∞, cuyo valor, al contrario que en el caso de McMahon y Brown (1990), no mostró variación significativa en función de la concentración de Cl_2Ca.

Las conclusiones de Famelart *et al*. (1999) concuerdan con nuestros resultados, si tenemos en cuenta que tanto R_{max} como R_{cut} son proporcionales -en forma similar al módulo de rigidez- al grado de agregación y el endurecimiento (apartados **VI.5.8.2** y **VI.5.10**).

VI.2.3.5. *Efecto de la temperatura*

Sendos análisis de varianza realizados en los experimentos *I* y *III* demuestran que parte de la variabilidad de los parámetros (R_{max}, R_{cut} y V_0) se debe a la temperatura ($P <$ 0'0001) entre 20ºC y 40ºC. Como se aprecia en la **Tabla VI.2.3.5.*1***, las *LSM* de R_{max}, R_{cut} y V_0 aumentan significativamente con la temperatura.

Referente al experimento *I*, las *LSM* de los parámetros ensayados (R_{max} y R_{cut}) ascienden con el incremento de la temperatura ($P <$ 0'0032). En el experimento *III*, se confirman los resultados del experimento *I*, puesto que en dichas variables las *LSM*

reflejan la misma tendencia en función de la temperatura. Sin embargo, la elevación de sus valores es más acusada en los tramos 30-35ºC y 35-40ºC (P < 0'0001), que en los tramos 20-25ºC y 25-30ºC, donde el efecto térmico es menos significativo. Este fenómeno podría guardar relación con la disminución de las distancias relativas entre las *LSM* al disminuir la temperatura.

Tabla VI.2.3.5.*1*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra en los experimentos *I* y *III* . [1]

Experimento	Temperatura (ºC)	R_{max}	R_{cut}	V_0 (V)
	28	1'065 [a]	1'149 [a]	--
I	**32**	1'077 [b]	1'171 [b]	--
	36	1'102 [c]	1'216 [c]	--
	20	1'172 [a]	1'345 [a]	1'242 [a]
	25	1'173 [a]	1'371 [a]	1'283 [b]
III	**30**	1'196 [b]	1'443 [b]	1'325 [c]
	35	1'255 [c]	1'601 [c]	1'359 [d]
	40	1'339 [d]	1'800 [d]	1'395 [e]

[1] *R*max, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual; V_0, voltaje inicial.
[a-e] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferente (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna y del mismo experimento.

Por su parte *V*o (experimento *III*) también aumenta significativamente con la temperatura (P < 0'0016), pero mientras que la variación de V_0 es lineal **(Figura VI.2.3.5.*1*)**, el efecto de dicho factor sobre R_{max} y R_{cut}, se ajusta a una ecuación cuadrática **(Figura VI.2.3.5.*2*)**. La variación no lineal de R_{max} y R_{cut} con la temperatura justifica la disminución de las diferencias entre medias a bajas temperaturas.

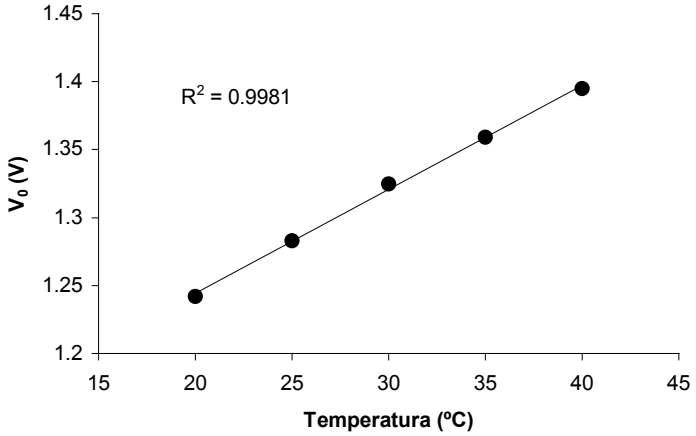

Figura VI.2.3.5.*1*. Efecto lineal de la temperatura sobre el voltaje inicial (V_0).

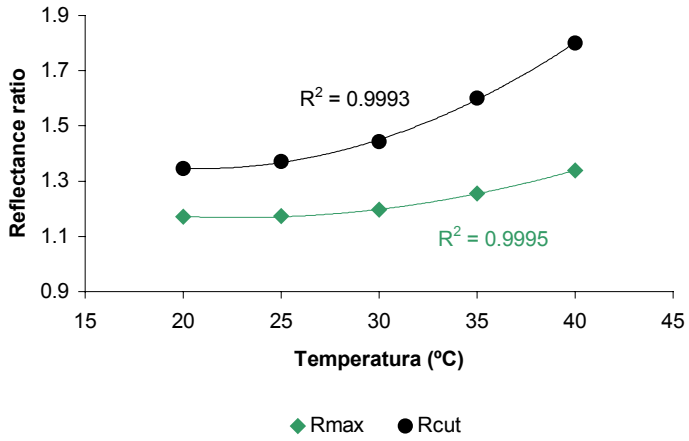

Figura VI.2.3.5.*2*. Efecto no lineal de la temperatura sobre los parámetros de respuesta.
R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual.

En la **Figura VI.2.3.5.*3*** se presenta la evolución de la curva de reflectancia difusa y de su primera derivada con la temperatura. Se observa que una elevación de la temperatura de 28 a 36ºC disminuye los parámetros de tiempo, T_{max} y T_{cut}, mientras que los ratios de reflectancia correspondientes a dichos tiempos aumentan significativamente, produciendose un desplazamiento horizontal y diagonal de las curvas. Como cabe esperar, el descenso de los parámetros de tiempo se acompaña de un incremento del máximo de la primera derivada.

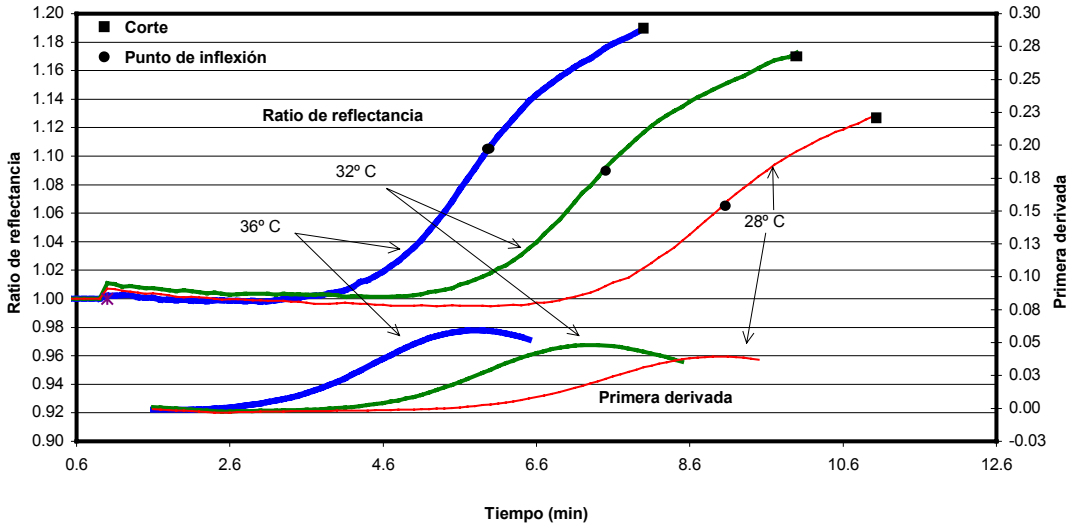

Figura VI.2.3.5.*3*. Efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo y de respuesta.

● Punto de inflexión, observese: T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia. ■ Corte, observese: T_{cut}, tiempo de corte visual; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual. Cada curva es la media de tres réplicas. Corresponde a la Fig. 4 del artículo 1.

Si comparamos el efecto de la temperatura sobre R_{max} y R_{cut} con la evolución de dichos parámetros en función de la concentración de enzima (apartado **VI.2.3.2**), el pH (apartado **VI.2.3.3**) y la concentración de Cl_2Ca (apartado **VI.2.3.4**), podemos señalar que R_{max} y R_{cut} sólo parecen depender de la temperatura, permaneciendo constantes con las modificaciones del resto de factores. McMahon *et al*. (1984*a*) monitorizan la

absorbancia de leche sin diluir durante la coagulación y sugirieren que si la absorbancia final correspondiese al grado de unión entre las cadenas proteicas, entonces la variación de la actividad coagulante, y por lo tanto del tiempo de coagulación, no debería afectar a la absorbancia final sino a la velocidad a la que ésta se alcanza. En este sentido, Scher y Hardy (1993) observan que la turbidez a los 45 minutos de la adición de enzima tiende a estabilizarse, por lo que consideran que debe existir un valor constante de turbidez al final de la agregación. Un concepto similar es propuesto por Eleya *et al*. (1995) que considera que la formación de una red tridimensional continua de caseína podría estar relacionada con la estabilización de los valores de turbidez a un valor máximo.

Como se ha ido discutiendo en los correspondientes apartados del epígrafe **VI.2.2**, todos los parámetros de tiempo y mixtos cambian con los diferentes factores de la coagulación, mientras que los parámetros R_{max} y R_{cut} sólo parecen variar con la temperatura. Es decir, los parámetros de tiempo y mixtos dependen de la velocidad de coagulación, mientras que, contrariamente, los parámetros de respuesta, R_{max} y R_{cut}, parecen independientes de ésta. Puesto que la velocidad de coagulación depende de factores como pH, concentración de enzima o de Cl_2Ca, la modificación de éstos, produciría variaciones de los parámetros de tiempo y mixtos, sin afectar a R_{max} y R_{cut}. Esta hipótesis podría explicar porque los cambios en pH, concentración de enzima o Cl_2Ca, no afectan a R_{max} y R_{cut}, pero no explica el efecto de la temperatura sobre dichas variables.

Una posible razón podría ser que los cambios en los factores de la coagulación, en general, producen cambios en la cinética de este proceso, reflejándose en modificaciones de los parámetros de reflectancia tanto mixtos como de tiempo; pero los cambios de temperatura, además de este efecto indirecto sobre la reflectancia, produce un efecto directo. En este sentido, varios autores comprueban que la reflectancia difusa en la leche depende del número y tamaño de las micelas de caseína y los glóbulos grasos, de la longitud de onda de la radiación incidente y de la diferencia de índice de refracción entre las diferentes partículas y solventes (Payne *et al*., 1993*a*; Lochte-

Watson *et al*., 1998). Por otra parte, Jou *et al*. (1994) afirman que el índice de refracción (*n*) depende tanto de la densidad como de la temperatura del medio, mientras que Matissek *et al*. (1998) y Walstra y Jenness (1987) encuentran que *n* depende fuertemente de la composición del medio, de la longitud de onda y de la temperatura.

Como consecuencia, los cambios en R_{max} y R_{cut} con la temperatura podrían ser debidos, en parte a la aceleración de la coagulación y en parte a un efecto directo sobre la reflectancia de la leche. Esto explicaría la diferente magnitud de los perfiles de reflectancia a diferentes temperaturas y sugiere que una corrección de la señal en función de la temperatura podría mejorar la estimación de los parámetros de respuesta.

VI.2.3.6. *Efecto de la concentración de sustrato*

El efecto de la concentración de sustrato se examina en el experimento *III* y parte de la variabilidad de los parámetros R_{max} y V_0 se atribuye a dicho factor (P < 0'0001), mientras que no existe relación entre los valores de R_{cut} y la concentración de proteína. La **Tabla VI.2.3.6.*1*** muestra las *LSM* de dichas variables.

Tabla VI.2.3.6.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre los parámetros de respuesta durante la coagulación de leche de cabra . [1]

Proteína (%)	R_{max}	R_{cut}	V_0 (V)
3	1'173 [a]	1'504 [a]	1'104 [a]
5	1'233 [b]	1'513 [a]	1'373 [b]
7	1'275 [c]	1'519 [a]	1'486 [c]

[1] *R*max, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual; V_0, voltaje inicial.
[a-c] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferente (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna y del mismo experimento.

En la tabla se observa un aumento de R_{max} y V_0 con el incremento del nivel proteico (P < 0'0001). El comportamiento de V_0 coincide con el observado por otros autores. Payne *et al*. (1993*b*) demuestra que el voltaje medido por el sensor de reflectancia difusa aumenta con el contenido proteico, mientras que Lochte-Watson *et al*. (1998) concluye que la reflectancia difusa de la leche aumenta linealmente con el aumento en la concentración de proteína.

Por otra parte, el ratio de reflectancia en el momento del corte, R_{cut}, es independiente de la concentración de proteína, lo que sugiere que para la leche desnatada la concentración de proteína no modifica el ratio final de reflectancia en el momento del corte, afectando sólo a la velocidad a la que se alcanza dicho valor de reflectancia. Este razonamiento es coherente con el descenso observado en la distancia de tiempo relativa entre T_{max} y T_{cut} cuando aumenta la concentración proteica, coincidiendo cualitativamente con las conclusiones de Garnot *et al*. (1982) que cuando aumenta la concentración proteica aprecian un descenso en el período comprendido entre los tiempos de coagulación y de corte, típicos de la elaboración de queso Cheddar.

VI.3. PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN DE BERRIDGE

El tiempo de coagulación de la leche tradicionalmente viene siendo determinado de diversas formas, con el fin de establecer el punto de gelificación durante la coagulación enzimática. El primer método propuesto y más común de todos se basa en la observación visual de los flóculos iniciales de caseína sobre la pared de vidrio de una botella (Sommer y Matsen, 1935) o de un tubo de ensayo (Berridge, 1952*a*, *b*). Por su sencillez y exactitud, el *RCT* propuesto por Berridge se ha utilizado habitualmente como método de elección para la determinación de la fuerza de los cuajos y enzimas coagulantes y hace ya más de una década que se modificó, constituyéndose en método de referencia con la publicación de la norma *IDF*/*FIL* 110*A*: 1987; apéndice *A*. Posteriormente, esta norma ha servido de base para la elaboración de otras más

específicas, pero que siguen empleando el tiempo de coagulación de Berridge para estimar el punto de gelificación, como el estándar *IDF*/*FIL* 157*A*: 1997, especialmente diseñado para la determinación de la actividad coagulante de cuajos de origen bovino y el estándar *IDF*/*FIL* 176: 1996, aplicable a coagulantes microbianos.

Merin *et al*. (1989) definen T_{clot} como el tiempo de latencia entre la adición de la enzima y la aparición de flóculos visibles de caseína. Según McMahon *et al*. (1984*a*), T_{clot} corresponde al tiempo mínimo para que la enzima produzca una cantidad suficiente de caseína hidrolizada, susceptible de participar en la reacción de agregación, y al tiempo necesario para que dicha reacción avance lo suficiente como para ser captada por el ojo humano.

En definitiva, T_{clot} es una estimación del tiempo necesario para alcanzar el "punto de gelificación teórico", definido por McMahon *et al*. (1984*a, b*) como el momento en el que se constituye la red tridimensional primaria e infinita de caseína y la leche deja de comportarse como un líquido; y por Ross-Murphy (1995) como la transición del estado sol, donde el peso molecular medio (M_w) es finito, al estado gel cuando M_w es infinito; transición que se detecta cuando el ángulo de fase (δ) es menor de 45º.

Por otra parte, para estimar el punto de gelificación teórico podemos utilizar parámetros no visuales, más objetivos que T_{clot}, tales como cambios de la dispersión de la luz (Claesson y Nitschmann, 1957), de viscosidad (Scott-Blair y Oosthuizen, 1961), de velocidad de ultrasonidos (Everson y Winder, 1968), de opacidad (Lawrence y Creamer, 1969), de conductividad eléctrica (Tsouli *et al*., 1975). Algunos de los equipos utilizados son: un medidor automático del tiempo de coagulación sanguínea (de Man y Batra, 1964), un formógrafo (McMahon y Brown, 1982) o un reómetro (Bohlin *et al*., 1984).

Las medidas de *RCT*, procedentes de diferentes instrumentos, representan pesos moleculares y/o grados de coagulación particulares en función del método de

determinación empleado (McMahon y Brown, 1984*b*), por lo que el tiempo de latencia observado y la exactitud de la estimación del punto de gelificación dependerán de los parámetros físicos elegidos, así como, de la resolución del equipo.

En primer lugar, nuestro interés se ha centrado en la predicción de T_{clot} mediante el empleo de parámetros de reflectancia difusa. Para la selección de un modelo matemático de predicción de T_{clot} se ha empleado cada variable independiente utilizada como factor fijo en el experimento *I* y las variables dependientes, obtenidas mediante reflectancia difusa. Tras el análisis de regresión de los diferentes modelos planteados, sólo T_{max} demuestra ser eficaz para tal predicción. El modelo de regresión de T_{clot} en función de $T_{max,}$ que se muestra en la **Tabla VI.3.*1***, proporciona un buen ajuste de los datos demostrando la existencia de una fuerte relación lineal entre T_{max} y T_{clot}, representada gráficamente en la **Figura VI.3.*1***.

Tabla VI.3.*1*. Modelo de regresión lineal para la predicción de $T_{clot.}$[1]

ANOVA de regresión lineal				
Fuente	***GL***	***SC***	**Estadístico *F***	**Significación**
Modelo ($T_{clot} = \beta_0 + \beta_1 T_{max}$)	1	7206’250	9003’035	0’0001
Error	79	63’234		
Total	80	7269’484		

Regresión lineal						
Variable predictora	**Coeficiente**	***SEE***	**Significación**	R^2	***CV* (%)**	***SEP* (min)**
Ordenada en el origen	β_0 = -0’628	0’207	0’0032	0’991	5’40	0’895
T_{max}	β_1 = 1’17	0’0124	0’0001			

[1] T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; *GL*, grados de libertad; *SC*, suma de cuadrados; *SEE*, error estándar de estimación del parámetro; R^2, coeficiente de determinación; *CV*, coeficiente de variación; *SEP*, error estándar de predicción. $N = 81$.

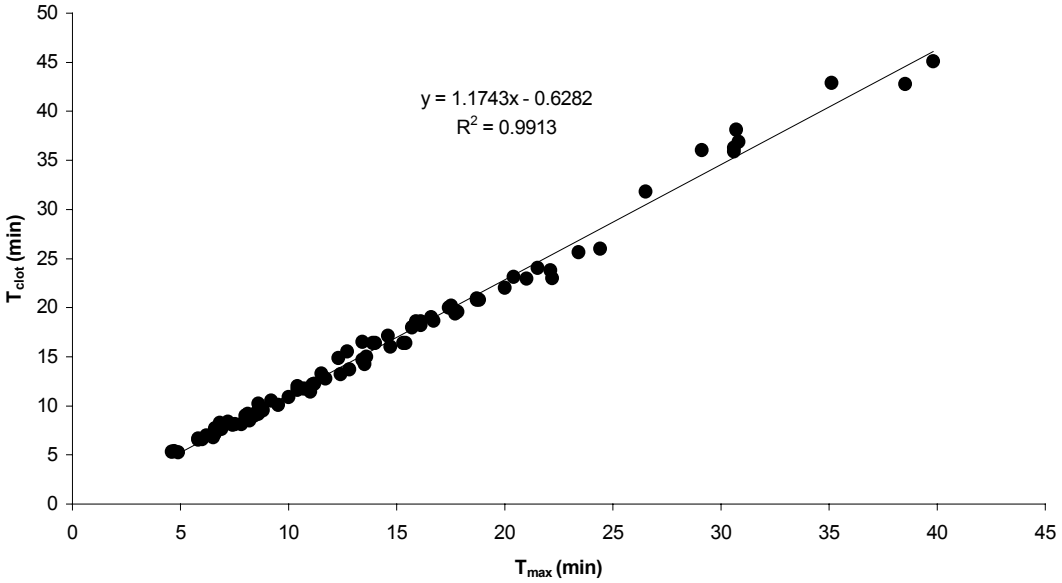

Figura VI.3.*1*. Recta de regresión de T_{clot} frente a T_{max}.
T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia. $N = 81$.

La regresión explica significativamente ($P < 0'0001$) una proporción del 99'13% del total de la variación en $T_{clot,}$ lo que permite predecir dicha variable a partir de los valores de T_{max}, con un error estándar (*SEP*) de 53'70 s. Remeuf *et al*. (1993) estudianel proceso de coagulación, en leche entera y desnatada, empleando un sensor de transmisión *NIR* y un formógrafo y obtienen una buena correlación entre T_{max} (sensor) y *RCT* obtenido mediante el formógrafo.

O'Callaghan *et al*. (1999*a*) realizan una experiencia en la que seis técnicas de monitorización de la coagulación y determinación de T_{cut} en línea (sensor "CoAguLite" de reflectancia difusa de *NIR*, sensores "Gelograph" y "TxPro" de transmisión de *NIR*, sensor térmico "hot- wire" y sensores vibracionales "Viscolite" y "Sofraser") se comparan entre sí y con medidas reológicas de endurecimiento del gel (G' y G''), a diferentes velocidades de coagulación. La existencia de correlación entre los *RCT* determinados mediante cada uno de los sensores y los parámetros reológicos, permite a

dichos autores predecir, mediante regresión lineal, el tiempo de coagulación reométrico (determinado mediante parámetros reológicos) con un *SEP* de 45 a 70 s, dependiendo del sensor empleado en la predicción. En lo referente al sensor CoAguLite, el único estudiado tanto por O'Callaghan *et al*. (1999*a*) como por nosotros, podemos emplear valores arbitrarios de T_{max} (8-12 min) para comparar la predicción de valores de *RCT* reométricos y de T_{clot}, mediante el uso de las ecuaciones de regresión correspondientes (O'Callaghan *et al*., 1999*a* y modelo de la **Tabla VI.3.*1***). Asi, encontramos que las predicciones obtenidas para T_{clot} son, por término medio, 3'81 min menores que las de los valores de *RCT* reométricos. Famelart *et al*. (1999) afirman que no existen diferencias entre el *RCT* formográfico y el *RCT* reométrico, mientras que, en consonancia con nuestros resultados, Giangiacomo *et al*. (1998) comprueban que T_{clot} es 3-4 min menor que el *RCT* determinado con el formógrafo.

La relación existente entre T_{clot} y T_{max} confirma desde un punto de vista cualitativo, las publicaciones de numerosos investigadores, quienes encuentran una alta correlación entre los *RCT* estimados por diversos métodos. Carini *et al*. (1982) e Irigoyen *et al*. (1998) observan una alta correlación entre T_{clot} y los *RCT* obtenidos respectivamente con el formógrafo y el tromboelastógrafo (R^2 = 0'985 y R^2 = 0'999). Korolczuk *et al*. (1986) comparan las señales procedentes de un refractómetro y de un viscosímetro rotacional coaxial y correlacionan los valores de *RCT* refractométricos con los puntos de gelificación teóricos, calculados mediante ajuste de la ecuación de Scott-Blair y Burnett (1963*b*) a los datos de la curvas viscosimétrica y refractométrica (R^2 = 0'999 en ambos casos). Dichos autores también encuentran relación lineal entre los puntos de gelificación teóricos procedentes de las curvas refractométrica y viscosimétrica entre sí (R^2 = 0'999).

Por otra parte, Korolczuk (1988) correlaciona el *RCT* refractométrico con los puntos de gelificación teóricos, calculados a partir de la curva refractométrica mediante el empleo de diferentes ecuaciones (Scott-Blair y Burnett, 1963*b*; Tuszynski, 1971; Douillard, 1973), obteniendo valores de R^2 respectivos de 0'908, 0'965 y 0'981.

Dejmek (1989) determina un regresión lineal entre el *RCT* reométrico y el medido por conductividad eléctrica (R^2 = 0'997). Gunasekakaran y Ay (1994) estudian la atenuación de los ultrasonidos durante la coagulación y observan una alta correlación entre el punto de cambio (transición de atenuación rápida a lenta) y T_{clot}. López y Laencina (1994) correlacionan T_{clot} y *RCT* viscosimetrico en leche reconstituida de vaca (R^2 = 0'991), obteniendo resultados similares en leche de cabra. Raynal y Remeuf (2000) empleando el formógrafo, y un sensor térmico/óptico, mencionan la existencia de correlación entre los *RCT* térmico y formográfico (R^2 = 0'96), entre el *RCT* térmico y el segundo tiempo característico de la curva absorbancia/tiempo (R^2 = 0'93) y entre este último y el *RCT* formográfico (R^2 = 0'92).

Del análisis complementario de datos, se deduce que los valores experimentales de T_{max} siempre son algo menores que los de T_{clot}, como se muestra gráficamente en la **Figura VI.3.*2***, en la que se representa el valor de la diferencia, T_{clot} - T_{max} para cada una de las 81 observaciones realizadas en el experimento *I*.

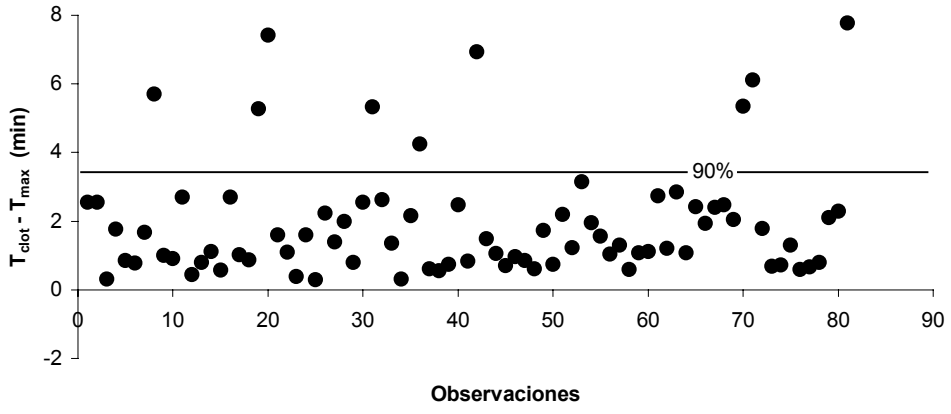

Figura VI.3.*2*. Representación gráfica de la diferencia T_{clot} - T_{max}.
T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia. N = 81. Por debajo de la línea se localizan el 90% de las observaciones.

El valor T_{clot} - T_{max} siempre es positivo y en el 90% de las observaciones menor de 3'20 min. A partir de las medias de ambos parámetros, se estima que T_{max} representa un 89% de T_{clot}. Dado que en nuestros trabajos previos (López *et al*., 1997*b*) no se han detectado diferencias significativas entre T_{clot} y T_{max} y puesto que el lapso de tiempo entre dichas variables es pequeño, se decidió abordar la comparación de las medias de dichas variables.

Ya que las muestras de ambas variables son apareadas, se planteó la realización de un test "*t* de Student". La hipótesis nula analizada fue que la media de las diferencias entre cada dos parejas de datos es cero ($H_0 \equiv \mu_1 = \mu_2$). El pequeño valor de *P* obtenido ($P < 0'0001$) sugiere que la media de las diferencias no es cero, por lo que T_{max} y T_{clot} son variables diferentes. Estos resultados discrepan con los obtenidos por López *et al*. (1997*b*) quienes no detectaron diferencias significativas entre T_{max} y T_{clot}, lo cual se atribuye al uso de diferente longitud de onda, o más probablemente, al empleo de un sensor mejorado, más sensible y preciso en el presente estudio.

Por el contrario, y desde otro punto de vista, coincidimos con numerosos autores que refieren la existencia de diferencias entre diversos métodos de determinación de *RCT*. McMahon y Brown (1982) comparan el formógrafo y el método de Sommer y Matsen (1935) y observan diferencias ($P < 0'0001$) en el *RCT* determinado por ambos métodos. McMahon *et al*. (1984*b*) comparan diversos métodos de determinación de *RCT*, siendo el orden decreciente de sensibilidad: turbidez, aparición de flóculos visibles, viscosímetro y formógrafo. De Cindio *et al*. (1986) comprueba que los *RCT* tromboelastográfico (determinado mediante el tromboelastógrafo) y formográfico son de 1 a 10 min mayores (más frecuentemente 2-3 min) que el determinado mediante conductividad térmica (hot-wire). Por su parte, Carlson *et al*. (1987*c*) aboga por el siguiente orden de detección de *RCT*: viscosimétrico (detectado con el viscosímetro), visual y formográfico, mientras que Dejmek (1989) publica que un método de conductividad eléctrica es capaz de detectar la agregación en el mismo tiempo que el viscosímetro, pero minutos antes que el reómetro. Sharma *et al*. (1992) comparan un

método viscosimétrico (viscosímetro Nametre), el sistema de hilo caliente, el formógrafo y un texturómetro Instron adaptado para medición del módulo de rigidez y encuentran diferencias significativas ($P < 0'05$) entre el *RCT* determinado mediante los diferente instrumentos excepto entre hot-wire y viscosímetro. La sensibilidad para la detección del punto de gelificación fue de mayor a menor: hot-wire = viscosímetro Nametre, detector de módulo de rigidez y formógrafo. En 1994, López y Laencina publican diferencias significativas ($P < 0'05$) entre T_{clot} y el *RCT* viscosimétrico, en leche reconstituida de vaca y en leche de cabra, correspondiendo respectivamente el *RCT* viscosimétrico a un 87'93 y un 81'92% del T_{clot}.

Profundizando en la existencia de diferencias entre los diferentes métodos de determinación de *RCT*, estas se deben corresponder con diferentes grados de hidrólisis de la κ-caseína y de agregación de las micelas. Puesto que T_{max} representa por término medio un 89% de T_{clot} (Castillo *et al*. 2000*b*), esta variable detectaría un grado de agregación menor que T_{clot}, lo que demuestra una mayor sensibilidad de la reflectancia difusa como método de estimación del punto de gelificación, comparado con el método de Berridge.

Coincidiendo con esta opinión McMahon *et al*. (1984*b*) asegura que los métodos basados en la determinación de turbidez detectan antes la coagulación que los basados en la observación visual (Sommer y Matsen, 1935; Berridge, 1952*a*, *b*). En este sentido, Sharma *et al*. (1989), usando un viscosímetro (Nametre) en leche desnatada reconstituida, comprueba que dicho instrumento también detecta una fase de coagulación más temprana que la correspondiente al *RCT* determinado visualmente (glass slide test).

También en consonancia con nuestros resultados, O'Callaghan *et al*. (1999*a*) indican que el punto de gelificación se detecta antes con sensores ópticos que empleando otros equipos como los sensores hot-wire y vibracionales, que presentan valores similares entre sí. A una conclusión similar llegan Hardy y Fanni (1981) que

determinan T_{clot} y la variación de luminosidad (ΔL) durante la coagulación de leche desnatada reconstituida, observando siempre en primer lugar el punto de inflexión de la curva luminosidad/tiempo. De forma similar, Giangiacomo *et al*. (1998) miden ΔL en el tiempo y contrastan la señal óptica con la determinación visual y formográfica de *RCT*, observando primero el punto de inflexión, seguido de *RCT* visual y posteriormente el *RCT* formográfico.

Por otra parte, podemos realizar una estimación del grado de hidrólisis a tiempo T_{max}, en base a los resultados obtenidos por Saputra (1992). Este autor cuantifica la hidrólisis enzimática de la leche mediante determinación de la concentración del caseinomacropéptido (*NPN*) y, simultáneamente, monitoriza la coagulación mediante reflectancia difusa medida a varias longitudes de onda. Como resultado, establece una ecuación que, basada en una cinética de primer orden, predice la concentración de caseinomacropéptido normalizada (*NNPN*).

$$NNPN = 1 - e^{-[t/\tau]} \qquad \text{(VI.3.1)}$$

donde

τ = inversa de la constante de velocidad de hidrólisis de primer orden, k_f, y

t = tiempo desde la adición de enzima.

De la revisión de los datos de Saputra (1992) correspondientes a los valores de τ y T_{max}, medidos a 820 nm, se obtiene una regresión lineal entre dichos parámetros según la siguiente ecuación:

$$\tau = 0.6661 T_{max} \qquad \text{(VI.3.2)}$$

con un valor de R^2 de 0'93. Sustituyendo la ecuación VI.3.*2* en VI.3.*1* se puede calcular el valor de *NNPN* cuando $t = T_{max}$, que se corresponde con el grado de hidrólisis (α) a

tiempo T_{max} (α = 0'78). De forma similar se puede estimar que, cuando $t = t_{IP}$, α = 0'61 (t_{IP} = período de inducción, definido por Saputra en 1992), como se refleja en la **Figura VI.3.*3***.

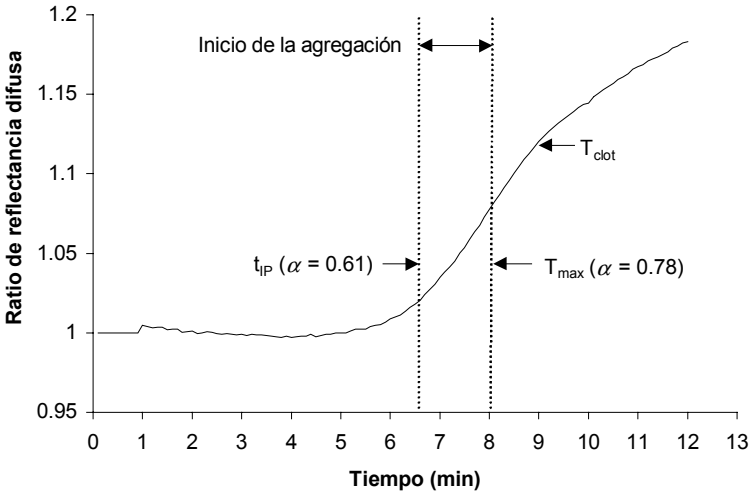

Figura VI.3.*3*. Inicio de la agregación, determinado mediante reflectancia difusa.
t_{IP}, período de inducción según Saputra (1992); T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{clot}, tiempo de coagulación de Berridge; α, grado de conversión o hidrólisis. Corresponde a la Fig. 5 del artículo 4.

La agregación no se inicia de forma apreciable hasta que aproximadamente un 60-80% de la κ-caseína ha sido hidrolizada (Carlson *et al.*,*1987a*, *b*; Dalgleish, 1993) por lo que, de acuerdo con dicho autor y considerando que el grado de hidrólisis estimado respectivamente a los tiempos t_{IP} y T_{max} es 0'61 y 0'78, se podría considerar que el inicio de la agregación se localiza entre t_{IP} y T_{max}.

Efectivamente, se espera que el comienzo de la agregación tenga lugar un poco antes de $T_{max,}$ puesto que se considera comprendido entre t_{IP} y T_{max}. Dado que T_{max}

representa un 89% de T_{clot} (Castillo *et al*. 2000*b*) y teniendo en cuenta que, Green *et al*. (1978) afirman que la agregación se observa a un tiempo situado entre un 70 y un 90% de T_{clot}, podríamos considerar dicho parámetro como el momento en el que se produce el "inicio significativo" de los procesos de agregación y gelificación que conducen a la formación del gel. Máxime cuando dicho parámetro corresponde al punto de inflexión del incremento de reflectancia difusa durante la coagulación.

En realidad, T_{max} (α = 0'78) quizás no corresponda exactamente al inicio de la agregación, sino más bien a un grado incipiente de agregación, suficientemente significativo como para que el sensor de *NIR* sea capaz de detectarlo, como un punto de inflexión en la curva de reflectancia difusa.

Coincidiendo con esta hipótesis, Carlson *et al*. (1987*b*) interpreta el dramático aumento de turbidez que observan al 80% de hidrólisis de la κ-caseína, como el nivel de hidrólisis requerido para que acontezca un "inicio sustancial del proceso de floculación". Para aclarar esta interpretación, los autores se apoyan en una figura en la que se representa el incremento de turbidez con respecto al grado de hidrólisis, figura en la que se observa que una hidrólisis de 0'6 corresponde a un incremento de turbidez incipiente, como en la **Figura VI.3.*3***, mientras que una hidrólisis de 0'8 coincide, a simple vista, con el punto de inflexión de la curva de turbidez.

En resumen, T_{max} constituye un 89% de T_{clot}, y es significativamente diferente de éste parámetro, demostrando una mayor sensibilidad a la agregación. Existe una alta correlación lineal entre ambas variables, que permite la predicción de T_{clot} en función de T_{max}, con un SEP de 53'70 s. A tiempo T_{max}, aproximadamente el 80% de la hidrólisis ha concluido, iniciándose, en ese momento o instantes antes, la agregación de las micelas de caseína que conduce a la gelificación, determinando la aparición de un punto de inflexión en la curva de reflectancia. Por todo lo dicho, podríamos considerar T_{max} como el punto de inicio significativo de los procesos de agregación y endurecimiento.

VI.4. PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE CORTE

VI.4.1. Algoritmos de predicción del tiempo de corte a concentración constante de proteína

En la industria quesera son numerosos los casos en los que se trabaja con niveles aproximadamente constantes de proteína, bien sea por la elevada homogeneidad en el contenido proteico de la leche del rebaño suministrador, por la mezcla eficaz de leche procedente de diferentes rebaños o por la estandarización de la leche previa a su transformación. Por este motivo, en los experimentos *I* y *II* se plantea el estudio de la predicción de T_{cut} en condiciones de reducida variación del contenido proteico (apartado **V.1.1**).

En el experimento *I* se probaron diferentes modelos de regresión lineal múltiple, mediante el procedimiento *GLM* de *SAS* (1995), incluyendo como variables predictoras, T_{max}, pH, temperatura y concentración de enzima. En la predicción de T_{cut}, sólo T_{max}, pH y temperatura parecen ser parámetros de interés. El algoritmo que presenta el menor *SEP* se detalla en la **Tabla VI.4.1.*1*** (Modelo *I*)**.**

Tabla VI.4.1.*1*. Modelo *I* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo		$T_{cut} = \beta_0 + \beta_1 T_{max} + \beta_2$ Temp $+ \beta_3$ pH ($P < 0'0001$)				
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	5'53	1'44	0'0002	0'995	0'700	81
β_1	1'25	0'0125	0'0001			
β_2	0'166	0'0255	0'0001			
β_3	-1'62	0'236	0'0001			

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; Temp, temperatura; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones.

El modelo *I* presenta un *SEP* pequeño (0'70 min) y es capaz de explicar un 99'50% de la variabilidad en T_{cut}. Sin embargo, con este algoritmo la predicción se realiza en base a tres variables (T_{max}, temperatura y pH), por lo que su aplicación en la industria se vería comprometida al requerir la determinación de cuatro coeficientes de regresión (β_0, β_1, β_2 y β_3) y el empleo de los valores de temperatura y pH a los que tiene lugar la coagulación. A fin de simplificar el modelo *I* se introduce el modelo *II* **(Tabla VI.4.1.*2*)** que sólo contiene, como variable explicativa, el parámetro de reflectancia difusa T_{max}.

Tabla VI.4.1.*2*. Modelo *II* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0 + \beta_1 T_{max}$ ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	2'10	0'227	0'0001	0'990	0'980	81
β_1	1'18	0'0136	0'0001			

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones.

La ventaja del modelo *II* es que sólo utiliza parámetros de reflectancia difusa para la predicción, aunque presenta un *SEP* más elevado (0'98 min) y un R^2 menor (0'989) que el modelo *I*. Pero este modelo contiene una ordenada en el origen que dificulta su adaptación industrial si lo comparamos con el modelo *III* **(Tabla VI.4.1.*3*)**, que se representa gráficamente en la **Figura VI.4.1.*1*** junto al modelo *II*. El modelo *III* se obtiene mediante la eliminación de la ordenada en el origen del modelo *II*, que aun conllevando un aumento de *SEP* y un descenso de R^2, facilita considerablemente la implementación del sensor en planta, para reproducir fielmente la determinación de T_{cut} realizada por el maestro quesero. Ahora el coeficiente de regresión, β_0, en adelante β, se

puede estimar mediante división del valor de T_{cut}, determinado por el quesero, por T_{max}, obtenido a tiempo real mediante monitorización de la coagulación.

Tabla VI.4.1.*3*. Modelo *III* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0 T_{max}$ ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	1'29	0'0094	0'0001	0'979	1'410	81

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones.

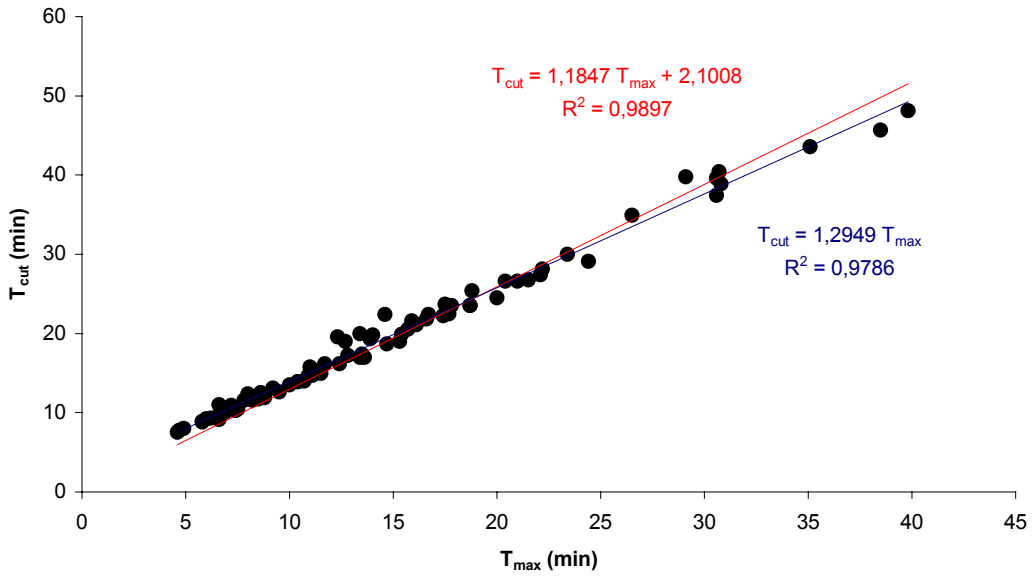

Figura VI.4.1.*1*. Rectas de regresión de T_{cut} frente a T_{max}.
Rojo, modelo *II*; azul, modelo *III*; T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia.

Van Hooydonk y van den Berg (1988) consideran que la precisión exigible para un instrumento objetivo de predicción de T_{cut} debe ser aproximadamente un minuto. Como se menciona en el apartado **VI.3**, O'Callaghan *et al*. (1999*a*) comparan la capacidad de seis sensores para la predicción del tiempo de corte reométrico (definido como *G*' = 20 Pa) en línea. Los resultados muestran que dichos sensores predicen el tiempo de corte reométrico con un *SEP* comprendido entre 1'75 y 2'17 min, concluyéndose la no existencia de diferencias significativas entre las predicciones obtenidas a partir de los distintos instrumentos.

Aunque el modelo *III*, en comparación con los modelos *I* y *II*, presenta el *SEP* más elevado (1'41 min) y el menos preciso R^2 (0'979), ha sido considerado como el mejor de los tres porque aúna sencillez y eficacia de forma óptima, siendo aún capaz de describir la mayor parte de la variabilidad de T_{cut} en un amplio rango de pH (5'5-6'5), temperatura (28-36ºC) y concentración de enzima (0'02-0'05 mL kg^{-1}). Además, en condiciones industriales, normalmente la variabilidad de factores como pH, temperatura o concentración de enzima es mucho menor que en el presente estudio, lo que repercute en una disminución del error de predicción.

Por otro lado, nuestros resultados coinciden con los publicados por Payne (1995) quien, a raíz de sus trabajos en leche de vaca, describe una alta correlación entre T_{cut} y T_{max}. Dicho autor probó con éxito un sensor de reflectancia difusa de *NIR* (820 nm) para la predicción de T_{cut} durante un año. El algoritmo utilizado, equivalente a los modelos *III* y *VII* de esta memoria, permite predecir correctamente T_{cut} siempre que la concentración de proteína sea relativamente constante.

Recientemente, Passos *et al*. (1999), basándose en el descenso de la conductividad térmica de la leche durante la coagulación, predice T_{cut} mediante el empleo de un sensor térmico. Estos autores estudian el sensor en planta, en condiciones variables de acidez (0'16, 0'17 y 0'18% de ácido láctico), obteniendo un *SEP* (1'9 min) superior al obtenido por nosotros. Además, si representamos los valores de T_{cut} frente a los del tiempo en el que la tangente de la curva voltaje/tiempo es máxima (parámetro

predictor), no observamos una buena relación lineal entre las variables **(Figura VI.4.1.*2*).**

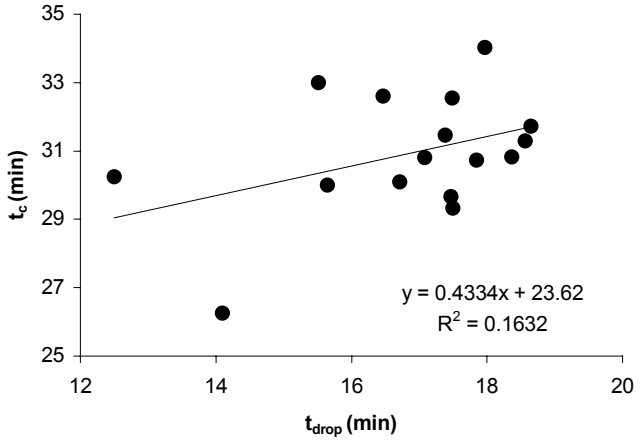

Figura VI.4.1.*2*. Recta de regresión de t_c frente a t_{drop}.
t_c, tiempo de corte visual; t_{drop}, tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la tangente de la curva voltaje/tiempo.

Laporte *et al*. (1998) comparan la capacidad de un sensor de reflectancia *NIR* (1100-2500 nm) para el estudio de la coagulación enzimática de la leche con la de un sensor térmico y determinan la existencia de una alta correlación entre las dos técnicas, pero sugieren la necesidad de desarrollar un método de referencia para la comparación objetiva entre diferentes instrumentos.

Por su parte, en el experimento *II*, se pretende la obtención de una ecuación de regresión eficaz para la predicción de T_{cut} en condiciones cambiantes de concentración de Cl_2Ca y empleando dos enzimas diferentes. Se probaron, mediante el procedimiento de selección de variables de *SPSS* (1999), diversos modelos de regresión lineal múltiple que incluyeron concentración de Cl_2Ca, temperatura, R_{max} y T_{max} como variables

predictoras para la selección de los mejores modelos de uno, dos y tres parámetros. La variable que presenta la menor correlación parcial con T_{cut}, es la primera de las que se estudia su eliminación del modelo, lo cual ocurre si se cumple el criterio de exclusión (basado en la significación de la variable). Tras la primera eliminación, el mencionado método de selección y prueba continúa de la manera descrita, hasta que ninguna otra variable cumpla el criterio de exclusión. Los resultados de la selección de variables se resumen en la **Tabla VI.4.1.*4***, observándose que el orden de eliminación de variables establecido es: R_{max}, temperatura, Cl_2Ca y ordenada en el origen.

Tabla VI.4.1.*4*. Modelos *IV* al *VII* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Identificación	Modelo	Coeficiente	*SEP* (min)
IV	$T_{cut} = \beta_0 + \beta_1 T_{max}^{a} + \beta_2$ Temp $+ \beta_3$ [Cl_2Ca]	β_0 = -20’2 β_1 = 1’57 β_2 = 0’737 β_3 = -0’0857	0’548
V	$T_{cut} = \beta_0 + \beta_1 T_{max}^{a} + \beta_2$ [Cl_2Ca]	β_0 = 3’75 β_1 = 1’54 β_2 = -0’105	0’531
VI	$T_{cut} = \beta_0 + \beta_1 T_{max}^{a}$	β_0 = 2’23 β_1 = 1’69	0’533
VII	$T_{cut} = \beta_0 T_{max}^{a}$	β_0 = 1’97	0’545

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; Temp, temperatura; *SEP*, error estándar de predicción. Los modelos *IV* al *VII* corresponden respectivamente a los modelos *I* al *IV* del artículo 2 (Tabla 7). $N = 18$.
[a] Probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico F exceda su valor observado, $P < 0’0001$.

Todos los modelos recogidos en esta tabla son altamente significativos ($P <$ 0'0001), si bien en cada modelo la única variable que resulta significativa es T_{max}. El modelo *VII* es el más sencillo, conservando una alta capacidad de predicción de T_{cut} (*SEP* = 0'55 min) independientemente del tipo de enzima empleado para la coagulación (cuajo de cabrito líquido o enzima coagulante procedente de *M. miehei*) y de la concentración de Cl_2Ca de la leche (1'38-5'06 mM). Además presenta un único coeficiente de regresión, lo que simplifica al máximo la calibración industrial.

Dado que el modelo VII es equivalente al III, los resultados del experimento II corroboran las conclusiones desprendidas del experimento I, haciéndolas extensibles a nivel de planta piloto.

Por la utilidad práctica de los modelos *III* y *VII*, nos pareció interesante el estudio de la variabilidad del coeficiente β (T_{cut}/T_{max}) en función de los factores de la coagulación (pH, temperatura, tipo de enzima, concentraciones de enzima, calcio y proteína), ya que dicho coeficiente controla directamente la predicción de T_{cut}. El análisis de varianza de β, en función de los mencionados factores, se recogen en la **Tabla VI.4.1.*5***.

Como se desprende del análisis de esta tabla y se observa fácilmente en la **Figura VI.4.1.*3***, el parámetro β aumenta significativamente con el ascenso de la temperatura y de la concentración de enzima, así como con la disminución del pH y la concentración de proteína. La concentración de Cl_2Ca y el tipo de enzima, que son los únicos factores entre los estudiados que desarrollan su acción directa, exclusivamente sobre una de las fases de la coagulación, también son los únicos en no producir diferencias significativas en β, hechos que podrían estar relacionados entre sí. *En cualquier caso, las variaciones de este parámetro, se atribuyen a que cualquiera de los factores mencionados ejercen un efecto proporcionalmente menor sobre T_{cut} que sobre T_{max}, por lo que, cuando los parámetros de tiempo aumentan, β disminuye y viceversa, implicando la necesidad de calibrar el sistema, a pie de planta, con anterioridad a su uso industrial.*

Tabla VI.4.1.5. Efecto de los factores de la coagulación sobre el parámetro β.[1]

Experimento	Factor	Nivel	β
		28	1'307[a]
I	**Temperatura (ºC)**	32	1'364[a]
		36	1'441[b]
		5'5	1'480[c]
I	**pH**	6'0	1'355[d]
		6'5	1'278[e]
		0'020	1'333[f]
I	***E*o (mL kg^{-1})**	0'035	1'367[fg]
		0'050	1'413[g]
		1'38	1'986[h]
II	**[Cl_2Ca] (mM)**	3'22	1'969[h]
		5'06	1'971[h]
II	**Tipo de enzima**	Cuajo de cabrito	1'999[i]
		Enzima de *M. miehei*	1'951[i]
		3	2'157[j]
III	**Proteína (%)**	5	1'528[k]
		7	1'337[l]

[1] β, T_{cut}/T_{max}; E_0, concentración de enzima.
[a-l] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05).

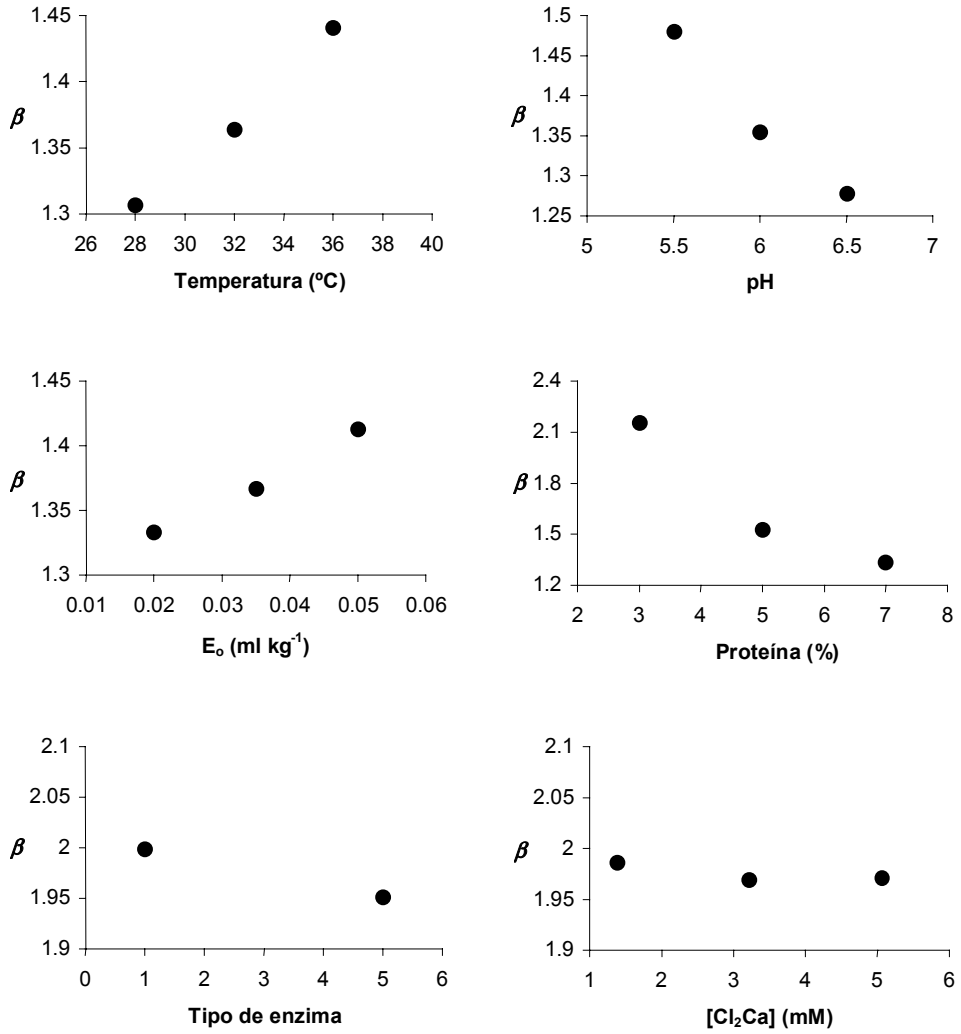

Figura VI.4.1.*3*. Efecto de los factores de la coagulación sobre el parámetro *β*.
β, T_{cut}/T_{max}; E_0, concentración de enzima.

La influencia de la concentración de proteína es mucho más importante que la ejercida por el resto de factores. *El efecto relativo producido por la concentración de enzima, la temperatura y el pH sobre el parámetro β, es respectivamente 10, 29 y 32% del ejercido por la concentración de proteína.* Esto sugiere claramente la necesidad de una corrección de *β* en función de la proteína, corrección que, por otra parte, parece no

ser necesaria en el caso del pH, la temperatura o la concentración de enzima.

Como se aprecia al comparar las **Tablas VI.4.1.*1*** y **VI.4.1.*3***, *la inclusión en el algoritmo de predicción de parámetros como, pH y temperatura, cuando la concentración de proteína es relativamente estable, disminuye el SEP y aumenta* R^2*, si bien este beneficio no compensa el perjuicio que supone el aumento del número de coeficientes de regresión a determinar para la implementación del sistema. Como consecuencia, podemos utilizar un solo valor de* β*, siempre que la concentración de proteína en la leche sea aproximadamente constante (modelos III y VII).*

En conclusión, el parámetro β*, que controla la predicción del tiempo óptimo de corte, varía significativamente con la temperatura, el pH, y las concentraciones de enzima y proteína. En condiciones estables de concentración proteica, los modelos III y VII, que incluyen exclusivamente el parámetro* T_{max} *de reflectancia difusa de NIR, predicen eficazmente el tiempo de corte en leche de cabra con un SEP de 1'41 y 0'55 min respectivamente. Sin embargo, la preponderancia del efecto ejercido por la concentración de proteína sobre el parámetro* β*, obliga a la inclusión de un factor proteico en el algoritmo de predicción de* T_{cut}*, cuando existan variaciones de la concentración proteica (variación entre lotes de leche, adición de caseína en polvo o ultrafiltración de leche).*

VI.4.2. Algoritmos de predicción del tiempo de corte en función de la concentración de proteína

Cualquier tecnología propuesta para la predicción del tiempo de corte, debe ser capaz de operar dentro de un amplio rango de concentraciones proteicas para ser comercialmente viable. La composición química de la leche en los rumiantes varía de acuerdo con diversos factores (Storry *et al*., 1983; Aleandri *et al*., 1990, Clark, 1993; Tornadijo *et al*., 1998; López *et al*., 1999), lo que en conjunto contribuye a la

fluctuación natural del contenido en proteína, que obedece a una distribución de frecuencias logarítmica normal (Walstra y Jeness, 1984).

Así, el contenido proteico en leche de vaca está comprendido entre 3'1 y 3'5% (Veisseyre, 1988), mientras que en leche de cabra oscila entre 2'9 y 5'6% (Riel, 1991). Además, en la industria quesera, el porcentaje de caseína de la leche se incrementa frecuentemente mediante ultrafiltración, o por la adición de caseína o leche desnatada en polvo.

La funcionalidad de la caseína durante la coagulación es indiscutible, puesto que ésta constituye tanto el principal sustrato de hidrólisis como de agregación, lo que explica su gran influencia sobre las características de coagulación de la leche. Algunos autores han estudiado el efecto de la concentración de proteína en el *RCT*, dejando constancia de importantes contradicciones (apartado **VI.2.2.6**) mientras que, por el contrario, parece bien establecido que el aumento de concentración proteica favorece el endurecimiento.

La velocidad de endurecimiento aumenta proporcionalmente con la proteína (van Hooydonk y van den Berg, 1988; Guinee *et al*., 1997) mientras que la dureza máxima, medida como módulo de rigidez o como módulo complejo de viscosidad, exhibe una dependencia potencial con respecto a la proteína (Culioli y Sherman, 1978; Garnot *et al*., 1982; van Dijk, 1982; Tokita *et al*., 1985; Dejmek, 1989; Zoon *et al*., 1988*a*; Sharma *et al*., 1993; Niki *et al*., 1994*b*; Guinee *et al*., 1997), donde el exponente (> 1) suele estar comprendido entre 1'8 y 4'0.

Van Hooydonk y van den Berg (1988) consideran la necesidad de ajustar el método de selección de T_{cut} si se utiliza leche preconcentrada para la elaboración de queso mediante el método tradicional, debido al efecto de la concentración proteica sobre la velocidad de endurecimiento.

Payne *et al*. (1993*b*) analizan la evolución de la reflectancia difusa en leche de vaca con diferentes concentraciones de proteína (3'3, 4'3 y 5'3%) y determinan el tiempo de corte de forma objetiva mediante un formógrafo (K_{20}). Estos autores opinan que cuando la concentración de proteína no es suficientemente estable, es necesario introducir un término relativo a la concentración proteica para la predicción del tiempo de corte formográfico, según la siguiente ecuación:

$$K_{20} = \beta_0 + \beta_1 (T_{max}) + \beta_2 (\% \text{ proteína}) \qquad \text{(VI.4.2.1)}$$

expresión que necesita la obtención de tres parámetros, siendo por tanto, poco práctica a nivel industrial. Según O'Callaghan *et al*. (1999*b*) el tiempo de corte reométrico es cuatro o cinco veces más sensible a los cambios de nivel proteico que a la variación de la concentración de enzima, por lo que, para describir matemáticamente la evolución del ratio entre el tiempo de corte y el tiempo de coagulación, se precisa incluir un término relativo a la concentración proteica, siempre que los niveles de proteína varíen significativamente.

Como consecuencia de lo anteriormente mencionado, así como de lo discutido sobre el efecto de la proteína en β (apartado **VI.4.1**), la aplicación de sensores ópticos en las plantas elaboradoras de queso, donde el contenido proteico de la leche varíe, requiere un algoritmo que tenga en cuenta el efecto de la proteína. Por ende, sería deseable que dicho algoritmo contuviese sólo un coeficiente calibrable, para facilitar la implementación industrial del sistema.

A tal fin, se emplean las variables independientes establecidas como parámetros fijos en el experimento *III* y las variables dependientes obtenidas mediante reflectancia difusa y dos variables dependientes calculadas (proteína * T_{max}), y (S * T_{max}), para el desarrollo y la evaluación de diferentes modelos de regresión, empleando los procedimientos: *NLIN*, *GLM* y Maximum R^2 de *SAS* (1999), para la predicción de T_{cut}.

El procedimiento Maximum R^2 ha sido empleado para seleccionar los mejores modelos de una, dos o tres variables. Los parámetros T_{2min}, (proteína * T_{max}) y concentración proteína son los mejores predictores de T_{cut} de entre todos los estudiados. El modelo *VIII* **(Tabla VI.4.2.*1*)** que contiene T_{2min} es el mejor modelo de un sólo parámetro.

Tabla VI.4.2.*1*. Modelo *VIII* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo		$T_{cut} = \beta_0 + \beta_1 T_{2min}$ ($P < 0'0001$)				
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	6'76	1'85	0'0007	0'888	6'19	45
β_1	1'11	0'0600	0'0001			

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{2min}, tiempo desde la adición de enzima hasta el mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *VIII* corresponde al modelo *I* del artículo 3.

El modelo *VIII* tiene un bajo coeficiente de determinación (0'888), que da lugar a un elevado *SEP* (6'19 min), excesivo para una predicción adecuada del tiempo de corte. Por su parte, el modelo *IX* **(Tabla VI.4.2.*2*)** es el mejor de los modelos de dos variables predictoras y contiene además de T_{2min}, el término (proteína * T_{max}), mientras que el modelo *X* **(Tabla VI.4.2.*3*)**, que es el mejor de los de tres variables, incorpora a las dos variables anteriores, la variable proteína. Pese a que los modelos *IX* y *X* tienen un *SEP* considerablemente menor que el modelo *VIII,* éstos tampoco resultan prácticos, porque para su aplicación industrial, requieren la determinación previa de tres o de cuatro coeficientes de regresión.

Tabla VI.4.2.*2*. Modelo *IX* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0 + \beta_1 T_{2min} + \beta_2$ [Proteína] * T_{max} ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	-0'845	0'886	0'3459	0'983	2'45	45
β_1	2'21	0'0759	0'0001			
β_2	-0'166	0'0109	0'0001			

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *IX* corresponde al modelo *II* del artículo 3.

Tabla VI.4.2.*3*. Modelo *X* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0 + \beta_1 T_{2min} + \beta_2$ [proteína] * T_{max} + β_3 [proteína] ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	4'94	2'56	0'0603	0'985	2'32	45
β_1	2'01	0'111	0'0001			
β_2	-0'127	0'193	0'0001			
β_3	-1'07	0'448	0'0213			

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *X* corresponde al modelo *III* del artículo 3.

Para simplificar el proceso de calibración industrial, se planteó el desarrollo de modelos sencillos sin ordenada en el origen. Así, se obtienen el modelo *XI* **(Tabla VI.4.2.*4*),** para establecer una comparación con el modelo *III* del apartado **VI.4.1** ($T_{cut} = \beta_0 * T_{max}$) y el modelo *XII* **(Tabla VI.4.2.5)**, desarrollado a partir del modelo *VIII* y conteniendo sólo T_{2min}.

Tabla VI.4.2.*4*. Modelo *XI* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0 T_{max}$ ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	1'48	0'0424	0'0001	0'823	7'71	45

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *XI* corresponde al modelo *IV* del artículo 3.

Tabla VI.4.2.*5*. Modelo *XII* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0 T_{2min}$ ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	1'30	0'0339	0'0001	0'854	7'01	45

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{2min}, tiempo desde la adición de enzima hasta el mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *XII* corresponde al modelo *V* del artículo 3.

Como se observa, el modelo *XII,* que contiene T_{2min} en vez de T_{max}, presenta un mayor coeficiente de determinación y un menor *SEP* que el modelo *XI*, si bien el *SEP* de ambos modelos es muy grande, excediendo los 7 min. Se demuestra, por tanto, la incapacidad de los modelos sencillos para la predicción del tiempo de corte en condiciones de elaboración, en que el contenido de proteína varíe. Por este motivo, a los modelos *XI* y *XII* se les añade el término (proteína * T_{max}), en un esfuerzo por mejorar la capacidad descriptora de dichos algoritmos con respecto al efecto de la proteína sobre T_{cut}, obteniéndose los modelos *XIII* **(Tabla VI.4.2.*6*)** y *XIV* **(Tabla VI.4.2.*7*)** respectivamente.

Tabla VI.4.2.6. Modelo *XIII* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0\ T_{max} + \beta_1$ [proteína] T_{max} ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	2'61	0'0708	0'0001	0'976	2'89	45
β_1	-0'187	0'0113	0'0061			

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *XIII* corresponde al modelo *VI* del artículo 3.

Tabla VI.4.2.7. Modelo *XIV* de regresión lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0\ T_{2min} + \beta_1$ [proteína] T_{max} ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	2'15	0'0494	0'0001	0'982	2'45	45
β_1	-0'160	0'0090	0'0001			

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; T_{2min}, tiempo hasta el mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *XIV* corresponde al modelo *VII* del artículo 3.

La introducción del término proteico en los modelos XI y XII reduce el SEP de T_{cut} en un 64%, pero desafortunadamente los modelos *XIII* y *XIV* son modelos de dos coeficientes, que aún requieren considerables esfuerzos de calibración.

Considerando la fuerte relación lineal existente entre T_{2min} y T_{max} ($R^2 = 0'997$) y buscando la facilidad de calibración industrial, finalmente se desarrolla el modelo *XV*, que contiene los términos T_{2min} y proteína, un coeficiente (β_0) que requiere calibración

en planta y una constante (γ) que corrige la pendiente β_0 en función del contenido de proteína **(Tabla VI.4.2.*8*)**.

Tabla VI.4.2.*8*. Modelo *XV* de regresión no lineal para la predicción de T_{cut}.[1]

Modelo			$T_{cut} = \beta_0\ T_{2min}\ (1 + \gamma\ [\text{proteína}])$ ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP* (min)**	***N***
β_0	2'19	0'0508	0'0001	0'983	2'42	45
γ	-0'0674	0'0022	0'0001			

[1] T_{cut}, tiempo de corte visual; T_{2min}, tiempo desde la adición de enzima hasta el mínimo de la segunda derivada de la curva de reflectancia con respecto al tiempo; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *XV* corresponde al modelo *VIII* del artículo 3.

El modelo *XV* **(Figura VI.4.2.*1*)** presenta el valor más alto de R^2 (0'983) y el *SEP* más pequeño (2'42 min) de todos los modelos comparados, excepción hecha del modelo *X*, que tiene un R^2 de 0'985 y un *SEP* de 2'32 min. *El modelo XV, que contiene un término proteico y la variable de reflectancia difusa T_{2min}, predice adecuadamente T_{cut} en un amplio rango de concentraciones de proteína (3-7%) y reúne la ventaja de tener un sólo parámetro que requiera calibración en la industria, β_0, asumiendo que γ es una constante que representa el efecto de la proteína sobre la pendiente de regresión (β_0).*

Por último, tras la comparación de los modelos *XI* y *XIII* respectivamente con los modelos *XII* y *XIV*, podemos concluir que *los modelos que incluyen T_{2min}, en vez de T_{max}, son más eficaces para la predicción de T_{cut}, presentando menor SEP (7'71 y 2'89 min frente a 7'01 y 2'45 min), al menos cuando el contenido proteico de la leche varía significativamente.* Debe también tenerse en cuenta, que estas dos variables están fuertemente correlacionadas y exhiben básicamente el mismo comportamiento.

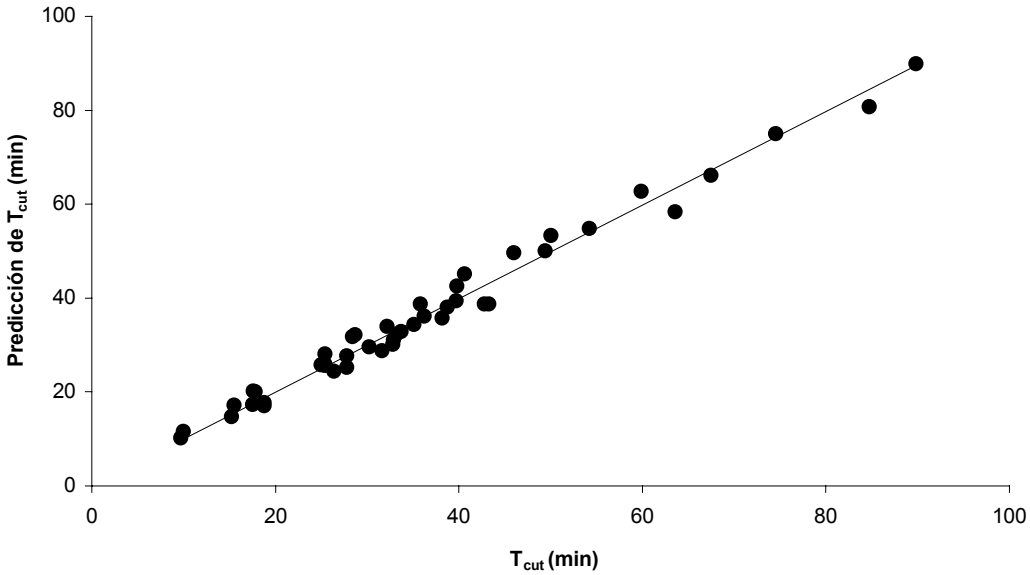

Figura VI.4.2.*1*. Recta de regresión entre la predicción de T_{cut}, (modelo *XV*) y T_{cut}.
T_{cut}, tiempo visual de corte.

VI.4.3. Comparación entre algoritmos de predicción basados en parámetros de tiempo y de respuesta

El incremento de reflectancia difusa está relacionado con la agregación y la formación del entramado proteico (Crofcheck *et al*., 1999), por lo que sería de esperar que no sólo los parámetros de tiempo permitiesen la predicción del tiempo de corte, pudiéndose también establecer los algoritmos en función de R_{max}. Sin embargo, la sensibilidad de los parámetros de respuesta a factores como la temperatura y la concentración proteica dificultan considerablemente la obtención de una buena relación lineal entre R_{max} y R_{cut} que permita la predicción de T_{cut}. En el experimento *I* se estudia la relación existente entre R_{max} y R_{cut}, estableciéndose la regresión lineal que se detalla en la **Tabla VI.4.3.*1*** y se representa en la **Figura VI.4.3.*1***.

Tabla VI.4.3.*1*. Modelo *XVI* de regresión lineal para la predicción de R_{cut}.[1]

Modelo			$R_{cut} = \beta_0 + \beta_1 R_{max}$ ($P < 0'0001$)			
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP***	***N***
β_0	-0'630	0'154	0'0001	0'6411	0'0251	81
β_1	1'67	0'143	0'0001			

[1] R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual; R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones.

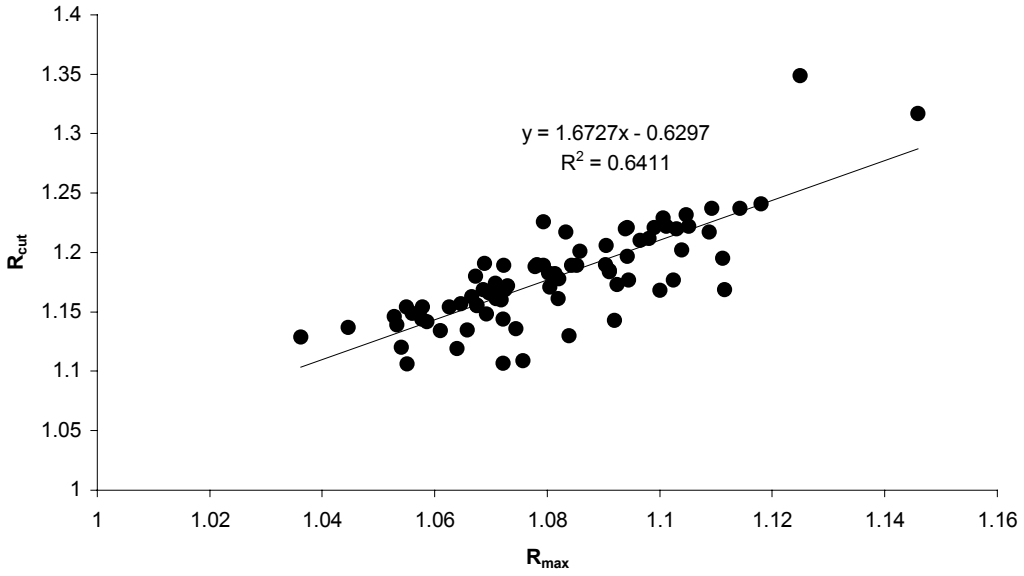

Figura VI.4.3.*1*. Recta de regresión de R_{cut} frente a R_{max} (modelo *XVI*).

Posteriormente, en el experimento *III*, se consideraron todas las variables independientes establecidas como parámetros fijos, así como las variables dependientes obtenidas mediante reflectancia y la variable dependiente calculada (proteína * R_{max})

para la obtención, mediante los procedimientos *GLM* y Maximum R^2 de *SAS* (1999), de diferentes modelos de regresión para la predicción de R_{cut}. Para obtener un coeficiente de determinación similar al conseguido en el modelo *XV* es necesario introducir en el modelo de regresión (modelo *XVII*) los parámetros predictivos: R_{max}, (proteína * R_{max}) y temperatura **(Tabla VI.4.3.*2*)**.

Tabla VI.4.3.*2*. Modelo *XVII* de regresión lineal para predicción de R_{cut}.[1]

Modelo		$R_{cut} = \beta_0 + \beta_1 R_{max} + \beta_2$ proteína * $R_{max} + \beta_3$ temp ($P < 0'0001$)				
Coeficiente	**Estimación**	***SEE***	***P***	R^2	***SEP***	***N***
β_0	-1'30	0'123	0'0001	0'970	0'0341	45
β_1	2'39	0'135	0'0001			
β_2	-0'0412	0'0032	0'0001			
β_3	-0'0047	0'0013	0'0006			

[1] R_{cut}, ratio de reflectancia en el tiempo de corte visual; R_{max}, ratio de reflectancia en el punto de inflexión de la curva de reflectancia; temp, temperatura; *SEE*, error estándar de estimación del coeficiente de regresión; *P*, probabilidad, cuando H_0 es verdadera, de que el estadístico *F* exceda su valor observado; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *N*, número de observaciones. El modelo *XVII* corresponde al modelo *IX* del artículo 3.

Pero el *SEP* del modelo *XVII* no es comparable con el del modelo *XV*, ya que el primero corresponde al error de predicción de R_{cut} y no al de T_{cut}. Para establecer dicha comparación es necesario transformar cada predicción de R_{cut} en la correspondiente predicción en unidades de tiempo, tras lo cual estaremos en condiciones de comparar la eficacia de predicción de T_{cut} mediante el empleo de un modelo basado en parámetros de tiempo (*XV*) o de otro basado en parámetros de respuesta (*XVII*).

Con esta finalidad, en la **Figura VI.4.3.*2*** se representan simultáneamente las regresiones lineales, sin ordenada en el origen, entre las predicciones de los tiempos de

corte calculados respectivamente mediante los modelos *XV* y *XVII* y los valores de T_{cut} observados experimentalmente.

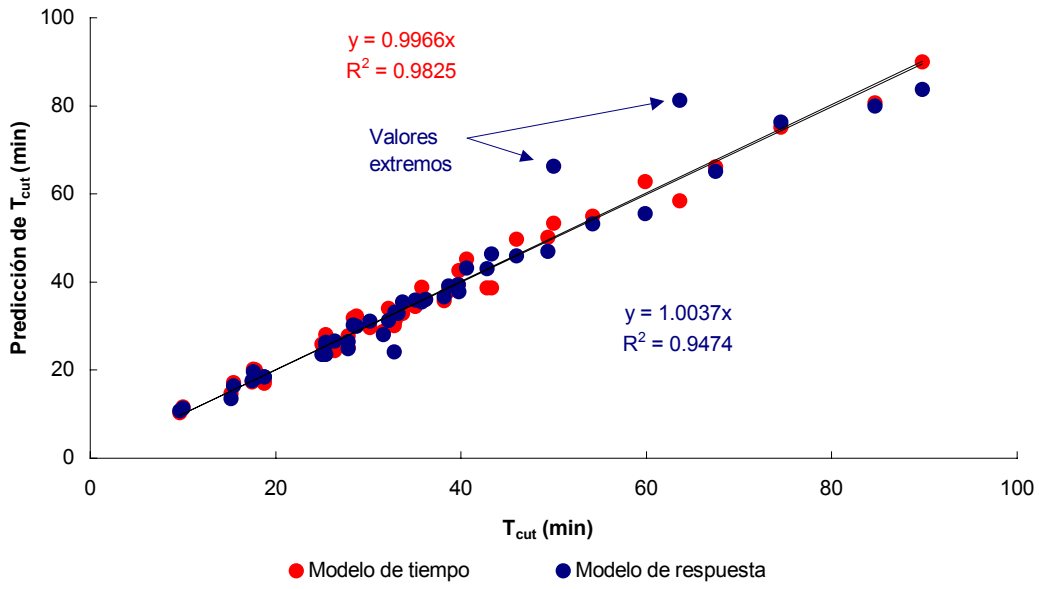

Figura VI.4.3.*2*. Predicción del tiempo de corte en base a modelos de tiempo y de respuesta.
T_{cut}, tiempo de corte visual. Modelo de tiempo (*XV*). Modelo de respuesta (*XVII*). $N = 45$. Corresponde a la Fig. 4 del artículo 3.

En el modelo *XV*, de base tiempo, R^2 es 0'983 y el *SEP* 2'38 min, mientras que en el modelo *XVII*, de base respuesta, R^2 es inferior (0'947) y casi se duplica el valor de *SEP* (4'32). Sin embargo, si consideramos los dos puntos marcados en la figura como datos extremos y los eliminamos de ambas regresiones, los valores de *SEP* y R^2 pasan a ser 2'19 min y 0'984 para el modelo *XV* y 2'25 min y 0'984 para el modelo *XVII*.

Estos resultados demuestran que para leche desnatada de cabra los parámetros de respuesta son eficaces para la predicción de T_{cut}, cuando el algoritmo se ajusta en función de la concentración de proteína y de la temperatura, proporcionando una

precisión similar a la obtenida con los parámetros de tiempo. Por lo tanto, los parámetros de tiempo resultan ser mejores parámetros predictores de T_{cut}, porque no requieren ajuste con respecto a la temperatura de coagulación para obtener igual exactitud en la predicción.

En la **Figura VI.4.3.*3*** se analiza el efecto del contenido proteico sobre la predicción de T_{cut}, comparando su influencia, tanto en los modelos de predicción que emplean variables de tiempo, como en los que usan variables de respuesta. La columna de la izquierda muestra, a través de las gráficas **(*a*)**, **(*c*)** y **(*e*)** y de forma secuencial, el efecto de la corrección proteica sobre los modelos de tiempo. En **(*a*)** se observa la reducida capacidad del modelo *XI* para la predicción de T_{cut}, ya que no contempla corrección alguna en función de la proteína. En **(*c*)** se representa la relación lineal entre la variable predictora, T_{max}, y T_{cut}, así como su marcada dependencia de la concentración de proteína. Por último, en la gráfica **(*e*)** se recoge la eficacia del modelo *XIII*, en el que se ajusta la predicción en función del nivel proteico, en comparación con el modelo *XI* de la gráfica **(*a*)**. En la columna derecha se ofrece un razonamiento similar al descrito para la columna izquierda pero referido al efecto de la corrección proteica sobre los modelos basados en parámetros de respuesta.

De la observación de las gráficas **(*a*)** y **(*b*)**, se deduce que tanto los algoritmos de predicción de tiempo como de respuesta que utilizan una sola variable explicativa, T_{max} o R_{max} respectivamente, son inadecuados para la predicción del tiempo de corte en leche de cabra desnatada, cuando la concentración de proteína varía significativamente.

En las gráficas **(*c*)** y **(*d*)**, la primera de ellas muestra que existe una buena relación lineal entre T_{max} y T_{cut}, cuando el nivel de proteína es constante. En ese caso, y con respecto a los parámetros de tiempo, se puede emplear un modelo con una sola variable explicativa y sin ordenada en el origen para la predicción de T_{cut}.

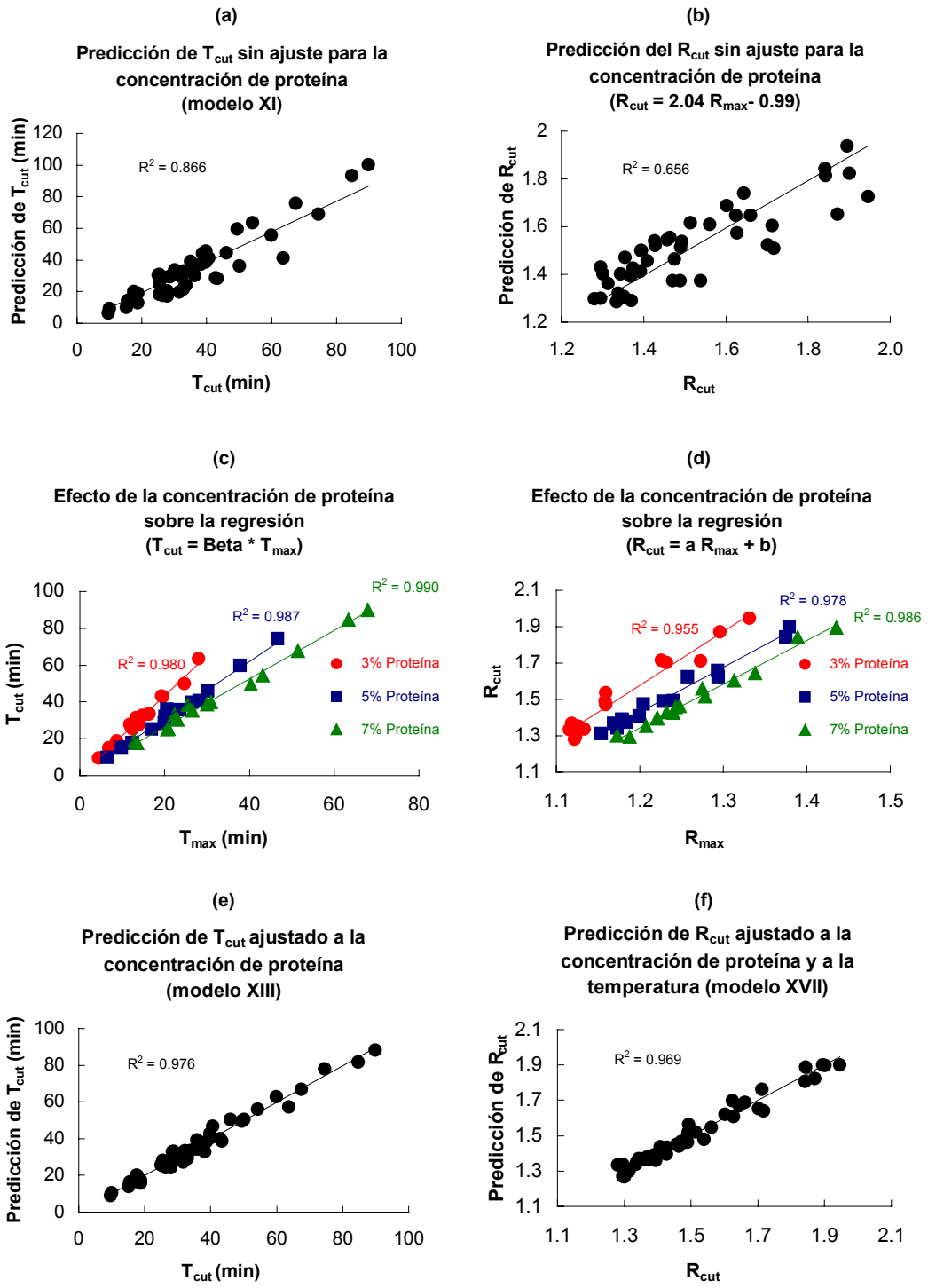

Figura VI.4.3.*3*. Efecto de la concentración proteica sobre la predicción del tiempo de corte.
Izquierda, modelos de tiempo; derecha, modelos de respuesta; T_{cut}, tiempo de corte visual; R_{cut}, ratio de reflectancia a tiempo T_{cut}; T_{max}, tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión; R_{max}, ratio de reflectancia a tiempo T_{max}. Corresponde a la Fig. 5 del artículo 3.

De forma paralela **(*d*)**, es posible la predicción de R_{cut} (y por ende T_{cut}) empleando un modelo de respuesta de un sólo parámetro predictor y con ordenada en el origen, siempre que la concentración de proteína permanezca constante.

Finalmente, las gráficas **(*e*)** y **(*f*)** comparan los modelos de predicción de tiempo (*XIII*) y respuesta (*XVII*) que compensan la concentración proteica. Se observa que ambos modelos son capaces de predecir, en leche de cabra descremada, el tiempo de corte con exactitud similar, si bien los modelos de respuesta necesitan la contribución de un término para la temperatura y de una ordenada en el origen.

Estos datos demuestran la ventaja de los parámetros de tiempo sobre los de respuesta en la predicción del tiempo de corte y confirman que cuando la concentración de proteína varía es necesaria la inclusión de un término para la proteína en los algoritmos de predicción para compensar el efecto de dicho factor, tanto en los modelos de tiempo como en los de respuesta. Estos resultados confirman con los trabajos de Payne *et al*. (1993*b*) y O'Callaghan *et al*. (1999*b*).

VI.5. CINÉTICA DE AGREGACIÓN Y DE ENDURECIMIENTO

VI.5.1. Extensión de la agregación en el punto de inflexión de la curva de reflectancia difusa

Chaplin y Green (1980) afirman que la hidrólisis de la κ-caseína se encuentra esencialmente completa al 80% de $T_{clot.}$ Según Castillo *et al*. (2000*b*) T_{max} constituye un 89% de T_{clot} y, por otra parte, nuestro análisis realizado a partir de los datos de Saputra (1992) confirman que a T_{max} el grado de hidrólisis es aproximadamente un 80%. Se podría por tanto concluir que a tiempo T_{max} la hidrólisis de la κ-caseína está cerca de finalizar, lo que nos permite asumir que la mayor parte de los sitios potenciales de unión

entre las micelas de caseína ya se encuentran disponibles en ese momento, hipótesis que se asume en el desarrollo de los modelos cinéticos.

VI.5.2. Desdoblamiento de las fases de agregación y de endurecimiento

En el experimento *III* se estudia la coagulación de la leche de cabra a diferentes velocidades de reacción y concentraciones de sustrato, establecidas mediante la variación de la temperatura y de la concentración de proteína. En estas condiciones experimentales se obtienen las curvas de reflectancia difusa/tiempo, cuyo perfil se ve afectado tanto por la temperatura como por la concentración de proteína, como se observa en la **Figura VI.5.2.*1***.

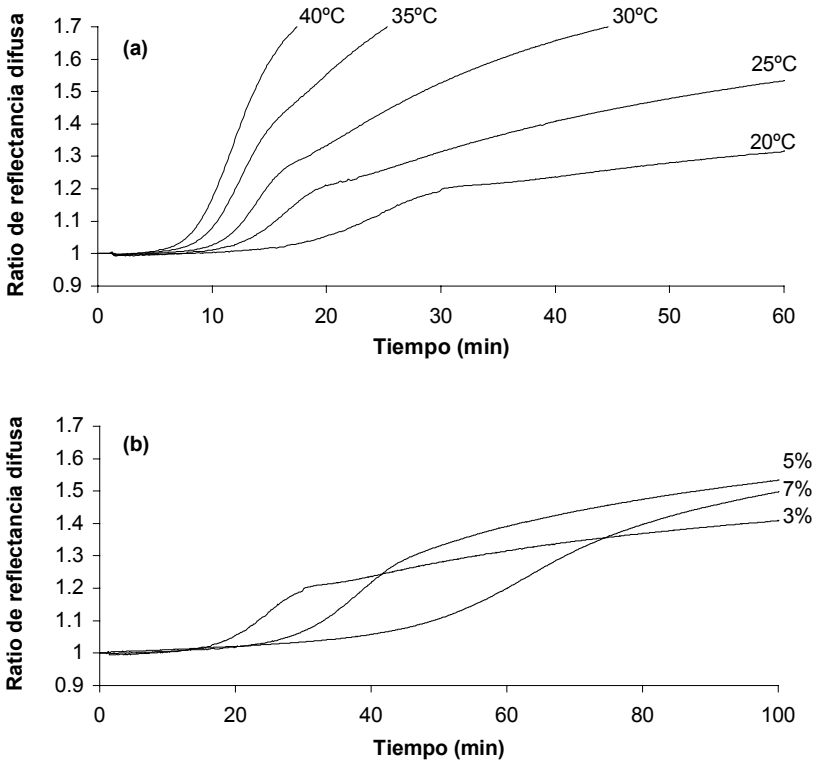

Figura VI.5.2.*1*. Efecto de la temperatura y de la proteína: "hombro" en el perfil de reflectancia.
(*a*), Datos correspondientes a leche desnatada con 3% de proteína, coagulada a 20, 25, 30, 35 y 40ºC, empleando una concentración constante de Cl_2Ca y de enzima; (*b*), datos correspondientes a leche desnatada con 3, 5 y 7% de proteína coagulada a 20ºC y a una concentración constante de Cl_2Ca y de enzima. Corresponde a Fig. 6 del artículo 4.

La **Figura VI.5.2.*1* (*a*)** muestra el efecto de la temperatura en una curva de reflectancia/tiempo perteneciente a una muestra con el 3% de proteína. A 20ºC se observa nítidamente una irregularidad en el perfil de reflectancia (hombro) que parece dividir la curva en dos partes, pero conforme aumenta la temperatura dicho hombro tiende a desaparecer dando lugar a una curva más uniforme.

Paralelamente, la **Figura VI.5.2.*1* (*b*)** refleja la influencia ejercida por la concentración de proteína en leche coagulada a 20ºC sobre el perfil de reflectancia difusa de *NIR*. Como anteriormente para el caso de 3% de proteína se aprecia claramente la existencia de dicho hombro, que gradualmente desaparece cuando aumenta la concentración de proteína dando lugar a una curva sigmoidal.

La aparición de este hombro sugiere que la formación del gel consta de dos reacciones o fases diferentes pero que se solapan en el tiempo y sirve de base para la proposición del modelo cinético *I* (apartado **V.7.2**). La primera fase, justo tras el punto de inflexión de la curva T_{max}, se ha considerado debida a la reacción de agregación de las micelas de caseína hidrolizadas mientras que la segunda fase resultaría de la reacción de endurecimiento del gel. La aparición del hombro en la curva de reflectancia ejerce un efecto directo sobre la primera y la segunda derivadas con respecto al tiempo dando lugar a la existencia de un segundo máximo en la primera derivada, como se observa en los perfiles tipo *B* (apartado **V.7.3** y **Figura V.7.3.*1***).

Diversos autores han observado anteriormente la existencia de irregularidades en las curvas de monitorización de la coagulación y el solapamiento de las fases de agregación y endurecimiento del gel. Steinsholt (1973), usando un instrumento de medida universal, Instron, para monitorizar el aumento de dureza de la cuajada, destaca algunas evidencias de la existencia de dos fases durante la gelificación, pero lo atribuye a un artefacto de medida debido a deformación del coágulo. Hardy y Fanni (1981), al principio de la segunda fase de la coagulación, detectan un hombro en la curva de

incremento de la luminosidad (ΔL) con respecto al tiempo, que se desplaza en función de la concentración de calcio.

Storry y Ford (1982*a*) realizan el seguimiento de la evolución del endurecimiento de la cuajada durante el tiempo con un texturómetro Instron y la describen como una curva sigmoidal asimétrica con una irregularidad tras T_{clot}. La irregularidad se observaba claramente por la aparición de un hombro en la representación gráfica de la velocidad de endurecimiento con respecto al tiempo, por lo que sugieren que el hombro no es más que la consecuencia de dos curvas coexistentes, la primera de las cuales refleja el proceso de agregación mientras que la segunda corresponde a la unión de micelas de caseína a la red tridimensional proteica preexistente.

McMahon *et al*. (1984*a*, *b* y *c*) y Hardy *et al*. (1985) también observan anomalías similares. Estos primeros autors opinan que el fenómeno observado es indicativo de "algún cambio del proceso de agregación T_{clot}", por lo que sugieren que una vez la red tridimensional de proteína alcanza un tamaño crítico el sistema cambia y la leche deja de comportarse como un líquido verdadero. En ese preciso momento (punto de gelificación) cualquier movimiento adicional de partículas conducirá a una colisión que irá seguida de un rápido crecimiento del tamaño de las mismas. En otras palabras, en el punto crítico de gelificación las partículas independientes, que se movían y colisionaban de forma aleatoria, repentinamente cesan de moverse en libertad porque la organización de la red tridimensional proteica primaria impide los movimientos y colisiones aleatorios.

A tiempo T_{clot} sólo el 89% (Dalgleish, 1981) o 90% (Fox y Mulvihill, 1990) de las micelas se han incorporado a la estructura tridimensional y, como consecuencia, tras T_{clot} las micelas libres pueden tanto reaccionar con la matriz proteica como con otra partícula libre.

Knoop (1977) demuestra mediante microscopía la existencia de agregación continua de micelas de caseína durante 24 horas y Gunasekaran y Ay (1994) aseguran que la agregación continúa tras la formación del coágulo. Green *et al*. (1978) observan, empleando microscopía electrónica y viscosimetría, que cuando se alcanza *RCT*, las micelas agregadas en la matriz proteica primaria, que inicialmente mantenía su estructura exclusivamente mediante puentes de unión, progresivamente van constituyendo cadenas cada vez más homogéneas por la contracción paulatina de los puentes de unión que conduce a un proceso de acercamiento de las micelas entre sí, hasta que éstas contactan e inician un proceso de fusión.

VI.5.3. Modelización simultánea de agregación y endurecimiento (Modelo *I*)

El modelo cinético *I*, presentado en el epígrafe **V.7.2**, describe el cambio de reflectancia difusa de *NIR* en función del tiempo a partir de tras T_{max}, combinando un modelo de segundo orden para la agregación micelar y otro de primer orden para el endurecimiento del gel. El modelo *I* se ajusta con éxito mediante técnicas de regresión no lineal a cada perfil de reflectancia. Los *SEP* y R^2 medios de los 45 ensayos realizados en el experimento *III* son respectivamente 0'0035 ± 0'0022 y 0'9996 ± 0'0004.

Por lo tanto, este modelo es capaz de predecir el aumento de reflectancia difusa tras T_{max} con excelente exactitud pero, sin embargo, los parámetros cinéticos obtenidos no son consistentes. Los valores teóricos de R_∞ son mucho mayores que los valores experimentales y frecuentemente los tiempos de vida media obtenidos para la agregación son mayores que los correspondientes a la reacción de endurecimiento.

Además los cambios observados en los parámetros cinéticos, producidos por las variaciones de temperatura y/o concentración de proteína, no son lógicos. En otras palabras, el método de regresión no es capaz de estimar simultáneamente los cuatro parámetros presentes en el modelo *I* (R_∞, β_1, k_1 y k_2) proporcionando valores razonables de los mismos, motivo por el que se considera necesaria la obtención de información

restrictiva sobre el rango real de los parámetros del modelo. A tal fin, se divide cada uno de los perfiles de reflectancia en dos partes, lo que permite la estimación, por separado, de las constantes de velocidad de los procesos de agregación y endurecimiento (apartado **V.7.3**).

VI.5.4. Cinética de agregación (Modelo *II*)

El modelo cinético *II* (apartado **V.7.4**) se ajusta, en cada curva de reflectancia difusa, a los datos experimentales comprendidos entre T_{max} y T_{2min}. Sin embargo y por diferentes razones, no es posible obtener resultados consistentes de forma directa. En primer lugar, porque aunque el modelo *II* sólo contiene dos parámetros ($R_{\infty A}$ y k_2), la regresión aún no proporciona una única solución, ya que los términos ($R_{\infty A} - R_{0A}$) y k_2, que aparecen en el denominador, están fuertemente correlacionados entre sí. En segundo lugar porque los sitios potenciales de unión entre las micelas de caseína, pese a haber sido mayoritariamente generados a tiempo T_{max}, continúan siendo creadas en ese momento e incluso un poco después, a menor velocidad. En tercer lugar, porque aun cuando entre T_{max} y T_{2min} el proceso dominante sea el de agregación, en este fragmento debe existir una pequeña, pero cada vez mayor, influencia del proceso de endurecimiento sobre el incremento de reflectancia difusa.

Pese a estas limitaciones, la sección de la curva entre T_{max} y T_{2min} se consideró como la más apropiada para ser ajustada al modelo de agregación de segundo orden. Se observa que el modelo *II* se puede ajustar fácilmente a la porción comprendida entre T_{max} y T_{2min} de las curvas obtenidas a 20ºC, lo cual es lógico si se considera que a esa temperatura tiene lugar el menor grado de solapamiento entre las fases de agregación y endurecimiento bajo nuestras condiciones experimentales, tal y como se observa en la gráfica (***a***) de la última figura (**VI.5.2.*1***). Por este motivo, las constantes de agregación obtenidas mediante ajuste al modelo *II* de las curvas a 20ºC, se consideran las menos afectadas por las interferencias del proceso de endurecimiento. Posteriormente se asume un valor Q_{10} de 12 para la agregación (Mehaia y Cheryan, 1983; McMahon y Brown,

1984*b*) que, por ende, se asume como constante en el rango de 20 a 40ºC (Mehaia y Cheryan, 1983). La constante de agregación a 20ºC, k_2, correspondiente a cada concentración de proteína y calculada mediante el modelo *II*, se usa junto al valor de Q_{10} para la obtención de las constantes cinéticas de agregación a 25, 30, 35 y 40ºC. Las constantes de velocidad del proceso de agregación calculadas, se sustituyen entonces en el modelo *II* para calcular $R_{\infty A}$. Los parámetros cinéticos de agregación obtenidos en este procedimiento se recogen en la **Tabla VI.5.4.*1***.

Tabla VI.5.4.*1*. Parámetros cinéticos de agregación obtenidos mediante ajuste del modelo *II* a los datos experimentales de reflectancia difusa entre T_{max} y T_{2min}.[1]

Temperatura (ºC)	Proteína (%)	$R_{\infty A}$	k_2 (s^{-1})	R^2	*SEP*
	3	1’42 ± 0’0764	0’0047 ± 0’0014	0’997 ± 0’0025	0’0013 ± 0’0008
20	**5**	1’60 ± 0’112	0’0018 ± 0’0006	0’999 ± 0’0005	0’0009 ± 0’0002
	7	1’69 ± 0’146	0’0011 ± 0’0005	0’999 ± 0’0007	0’0010 ± 0’0007
	3	1’33 ± 0’0436	0’0150 ± 0’0050	0’998 ± 0’0006	0’0015 ± 0’0002
25	**5**	1’50 ± 0’0831	0’0063 ± 0’0032	0’997 ± 0’0032	0’0016 ± 0’0013
	7	1’58 ± 0’0758	0’0038 ± 0’0016	0’998 ± 0’0016	0’0018 ± 0’0009
	3	1’30 ± 0’0198	0’0560 ± 0’0172	0’982 ± 0’0114	0’0048 ± 0’0018
30	**5**	1’43 ± 0’0636	0’0214 ± 0’0077	0’990 ± 0’0084	0’0042 ± 0’0018
	7	1’50 ± 0’0952	0’0137 ± 0’0062	0’991 ± 0’0030	0’0039 ± 0’0006
	3	1’35 ± 0’0251	0’180 ± 0’0599	0’891 ± 0’0614	0’0174 ± 0’0053
35	**5**	1’45 ± 0’0494	0’0758 ± 0’0385	0’930 ± 0’0582	0’0148 ± 0’0065
	7	1’50 ± 0’0899	0’0459 ± 0’0192	0’959 ± 0’0183	0’0112 ± 0’0025
	3	1’49 ± 0’0223	0’673 ± 0’206	0’601 ± 0’198	0’0600 ± 0’0288
40	**5**	1’58 ± 0’0674	0’257 ± 0’0927	0’730 ± 0’170	0’0549± 0’0281
	7	1’59 ± 0’134	0’164 ± 0’0749	0’738 ± 0’118	0’0558 ± 0’0287

[1] $R_{\infty A}$, valor asintótico del ratio de reflectancia debido a la agregación, a tiempo infinito; k_2, constante de velocidad de agregación; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción. Valores medios ± desviación estándar. $N = 3$. Corresponde a la Tabla 1 del artículo 4.

Los valores de $R_{\infty A}$, que aumentan significativamente cuando lo hace la concentración de proteína, son siempre menores que los correspondientes valores experimentales de R_{∞}, indicando que sólo una fracción del incremento total del ratio de reflectancia difusa, el relativo a la reacción de agregación, es explicado por el modelo *II*.

Los valores de k_2 disminuyen con el aumento de la concentración proteica y con el descenso de la temperatura, por lo que los tiempos de vida media (τ_2) aumentan en dichas condiciones, respondiendo consistentemente y como se esperaba a las variaciones de temperatura y de concentración proteica. Posteriormente el parámetro cinético k_2 se emplea en el modelo *I*, como se discutirá en breve.

VI.5.5. Cinética de endurecimiento (Modelo *III*)

Los parámetros cinéticos correspondientes a la reacción de endurecimiento del gel se estiman, para cada curva, mediante ajuste por regresión no lineal del modelo *III* (apartado **V.7.5**) a los valores experimentales del ratio de reflectancia difusa, tras T_{2min} (curvas tipo *A*) o tras T_{2min2} (curvas tipo *B*).

La valores estimados de la constante de velocidad de endurecimiento del gel (k_1) y del ratio asintótico de reflectancia debido al proceso de endurecimiento a tiempo infinito ($R_{\infty F}$) son detallados en la **Tabla VI.5.5.*1***.

Como se recoge en la tabla, en general, $R_{\infty F}$ aumenta, k_1 disminuye y τ_1 aumenta cuando crece el contenido proteico, mientras que un incremento de la temperatura produce un aumento consistente de $R_{\infty F}$ y k_1 y el consiguiente descenso de τ_1. En definitiva, los tiempos de vida media (τ_1) estimados mediante el modelo *II* responden adecuadamente a los cambios de concentración proteica y de temperatura, por lo que el parámetro k_1 se emplea en el modelo *I* como se discute a continuación.

Tabla VI.5.5.*1*. Parámetros cinéticos de endurecimiento obtenidos mediante ajuste del modelo *III* a los datos experimentales de reflectancia difusa tras T_{2min} (curvas tipo *A*) o tras T_{2min2} (curvas tipo *B*).[1]

Temperatura (ºC)	Proteína (%)	$R_{\infty F}$	K_1 (s^{-1})	R^2	*SEP*
	3	1'53 ± 0'0710	0'00027 ± 0'00005	0'999 ± 0'0003	0'0011 ± 0'0008
20	**5**	1'69 ± 0'0854	0'00024 ± 0'00006	0'999 ± 0'0007	0'0019 ± 0'0019
	7	1'74 ± 0'165	0'00028 ± 0'0001	0'998 ± 0'0007	0'0049 ± 0'0003
	3	1'76 ± 0'108	0'00033 ± 0'00006	0'998 ± 0'0020	0'0058 ± 0'0043
25	**5**	1'95 ± 0'119	0'00029 ± 0'00008	0'997 ± 0'0027	0'0099 ± 0'0060
	7	1'90 ± 0'0888	0'00035 ± 0'0002	0'997 ± 0'0011	0'0089 ± 0'0018
	3	1'90 ± 0'0343	0'00059 ± 0'00003	0'999 ± 0'0007	0'0032 ± 0'0015
30	**5**	2'17 ± 0'122	0'00042 ± 0'00002	0'996 ± 0'0036	0'0100 ± 0'0064
	7	2'18 ± 0'188	0'00040 ± 0'00007	0'998 ± 0'0016	0'0088 ± 0'0047
	3	1'97 ± 0'0539	0'0012 ± 0'0002	0'999 ± 0'0001	0'0013 ± 0'0006
35	**5**	2'20 ± 0'0816	0'00076 ± 0'00009	0'999 ± 0'0008	0'0037 ± 0'0010
	7	2'24 ± 0'213	0'00069 ± 0'0002	0'998 ± 0'0015	0'0057 ± 0'0030
	3	2'01 ± 0'0487	0'0023 ± 0'0010	0'999 ± 0'0005	0'0010 ± 0'0006
40	**5**	2'17 ± 0'909	0'0018 ± 0'0007	0'999 ± 0'0004	0'0029 ± 0'0004
	7	2'21 ± 0'224	0'0010 ± 0'0003	0'999 ± 0'0002	0'0045 ± 0'0002

[1] $R_{\infty F}$, valor asintótico del ratio de reflectancia debido al endurecimiento, a tiempo infinito; k_1, constante de velocidad de endurecimiento; R^2, coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción. Valores medios ± desviación estándar. $N = 3$. Corresponde a la Tabla 2 del artículo 4.

VI.5.6. Validación del Modelo *I*

Las constantes de velocidad de agregación (k_2) y de endurecimiento (k_1) previamente estimadas mediante ajuste de los modelos cinéticos *II* (apartados **V.7.4** y **VI.5.4**) y *III* (apartados **V.7.5** y **VI.5.5**) a cada una de las curvas de reflectancia difusa mediante regresión no lineal, se sustituyen en el modelo *I*, asumiéndose por tanto, que dichas constantes son correctas.

Dado que el modelo *I* posee cuatro parámetros (R_∞, β_1, k_1 y k_2), la sustitución de k_1 y k_2 en el modelo y su posterior ajuste a los datos de reflectancia de cada curva tras T_{max}, mediante regresión no lineal, permite la estimación de R_∞ y de β_1. El modelo *I* es capaz de predecir consistentemente el valor de R_∞, a la vez que permite distribuir el incremento de reflectancia difusa durante la coagulación, entre las reacciones de agregación y de endurecimiento del gel, gracias a la contribución del parámetro β_1.

El valor medio del coeficiente de determinación (R^2) correspondiente a la regresión entre los datos teóricos y experimentales de las 45 curvas ensayadas, se localiza en el rango 0'9975 ± 0'0027, mientras que la media del *SEP* es 0'0081 ± 0'0037. En la **Figura VI.5.6.*1*** se ofrece la representación gráfica del ajuste al modelo *I* de una muestra de leche con un contenido proteico de 5%.

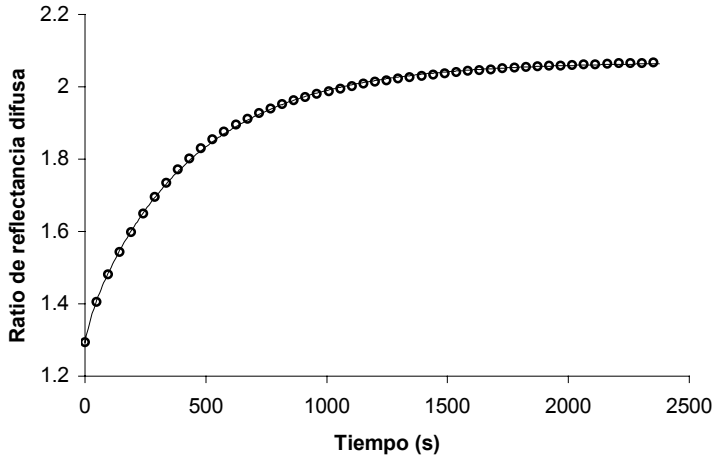

Figura VI.5.6.*1*. Ajuste de los datos experimentales al modelo *I*.
Muestra de leche con un 5% de proteína, coagulada a 40ºC. Sólo se representa 1 de cada 8 puntos experimentales para que se aprecie la curva teórica. Los parámetros estimados son: k_1, 0'0022 (s^{-1}); k_2, 0'265 (s^{-1}); R_∞, 2'07; β_1, 0'0867 (11'2%). R^2, 0'9996; *SEP,* 0'0035. Corresponde a la Fig.7 del artículo 4.

El ajuste con éxito de los datos experimentales al modelo *I*, a todos los niveles ensayados de temperatura y concentración proteica, confirman su validez. Los valores de β_1 estimados mediante el modelo *I* se organizan de forma coherente con respecto a las variaciones de temperatura y contenido proteico, y proporcionan interesante información referente al solapamiento de los procesos de agregación y endurecimiento durante la formación del gel, como se discute posteriormente.

VI.5.7. Análisis de la varianza de los parámetros cinéticos de agregación y endurecimiento

Tras la obtención de los parámetros cinéticos de agregación y endurecimiento, éstos se someten a un análisis de varianza **(Tabla VI.5.7.*1*)** con el objeto de estudiar sus principales fuentes de variación y de comparar la existencia de diferencias significativas entre las medias.

Tabla VI.5.7.*1*. Análisis de la varianza de los parámetros cinéticos de agregación y endurecimiento estimados mediante reflectancia difusa en leche de cabra (grasa como co-variable).[1]

Fuente	*DF*	Estadístico *F*					
		R_∞	β_1 (%)	k_1 (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	τ_1(s)	τ_2(s)
Grasa	1	25’1***	0’305^{ns}	0’406^{ns}	5’18*	2’01^{ns}	7’95**
Réplica	2	21’3***	3’71*	1’75^{ns}	6’58**	2’75^{ns}	5’68**
Proteína	2	76’8***	16’4***	3’01^{ns}	27’2***	3’19^{ns}	29’9***
Temperatura	4	96’7***	205***	33’8***	67’1***	28’3***	132***
Prot. * Temp.	8	0’950^{ns}	1’60^{ns}	2’35*	12’2***	0’209^{ns}	7’21***

[1] *DF*, grados de libertad; *significativo al 95%; **significativo al 99%; ***significativo al 99’9%; ^{ns}no significativo al nivel 0’05.
R_∞, valor asintótico del ratio de reflectancia, a tiempo infinito; β_1, incremento de reflectancia difusa, tras el punto de inflexión de la curva de reflectancia, exclusivamente debido al proceso de agregación; k_1, constante de velocidad de endurecimiento; k_2, constante de velocidad de agregación; τ_1, tiempo de vida media de endurecimiento; τ_2, tiempo de vida media de agregación; Prot., proteína; Temp., temperatura. Corresponde a la Tabla 3 del artículo 4.

Como se observa en la tabla, el efecto de la temperatura es muy significativo para todos los parámetros ($P < 0'0001$), mientras que la proteína lo es para es para R_∞, β_1, k_2 y τ_2 ($P < 0'0001$). Se detecta la existencia de interacción entre la temperatura y la concentración de proteína para los parámetros k_1, k_2 y τ_2.

Si bien es cierto que se han propuesto numerosos modelos matemáticos para la descripción cuantitativa de la agregación de las micelas de caseína o del endurecimiento del gel, la mayoría de los autores no diferencian entre agregación y endurecimiento desde un punto de vista cinético, centrándose exclusivamente en uno de los dos procesos, excepto Carlson *et al*. (1987*b*, *d*) que analizan separadamente ambas reacciones. Aunque varios autores han estudiado el efecto de diferentes factores como la temperatura, el pH, la concentración de enzima o de sustrato en estos procesos, normalmente no analizan específicamente y mediante análisis de la varianza la capacidad de respuesta de los parámetros cinéticos obtenidos, en condiciones de coagulación cambiantes.

Por otra parte, la comparación de resultados entre los diferentes autores, se ve dificultada por el empleo de instrumentos de diferente naturaleza, así como por la vaguedad de la terminología utilizada (coagulación, gelificación, floculación, aglomeración, agregación, polimerización, endurecimiento, índice de dureza,...).

No obstante, Sharma *et al*. (1993) estudian la cinética de agregación de leche ultrafiltrada a diferentes valores de pH, temperatura y concentración de leche con el uso de un viscosímetro, ajustando los datos experimentales del complejo de viscosidad a la ecuación propuesta por Scott-Blair y Burnett (1963*a*). Mediante regresión no lineal estiman los parámetros del modelo, esto es, complejo de viscosidad máximo (μ^*_∞) y λ (tiempo en el cual $\mu^* = \mu^*_\infty$ /e). En relación con los tres factores estudiados, el análisis de varianza realizado por dichos autores sólo muestra significación para el efecto de la concentración de leche sobre el parámetro μ^*_∞. No se ha encontrado en la literatura

disponible, otras referencias relativas al análisis de varianza de parámetros cinéticos de los procesos de agregación y/o endurecimiento de la coagulación de la leche.

VI.5.8. Efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de agregación y endurecimiento

VI.5.8.1. *Efecto sobre k_1 y k_2*

Las medias de mínimos cuadrados de k_1, k_2, τ_1 y τ_2 se recogen en la **Tabla VI.5.8.1.*1*** para los cinco niveles de temperatura ensayados (20, 25, 30, 35 y 40ºC) en el experimento *III*. Como se esperaba, las constantes de velocidad de ambos procesos aumentan con el ascenso de la temperatura (P < 0'05), por lo que, lógicamente, los tiempos de vida media descienden en proporción, coincidiendo con el conocimiento general. Muchos autores han referido que la velocidad de formación del entramado proteico durante la gelificación, depende considerablemente de la temperatura, viéndose favorecida por ésta.

Tabla VI.5.8.1.*1*. Efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad y los tiempos de vida media de agregación y endurecimiento estimados mediante reflectancia difusa en leche de cabra. [1]

Temperatura (ºC)	k_1 (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	τ_1(s)	τ_2(s)
20	0'000263[a]	0'00237[a]	2942[a]	1905[a]
25	0'000324[a]	0'00810[a]	2306[b]	885[b]
30	0'000469[a]	0'0310[a]	1531[c]	379[c]
35	0'000888[b]	0'100[b]	857[d]	166[d]
40	0'00172[c]	0'365[c]	492[d]	77[d]

[1] k_1, constante de velocidad de endurecimiento; k_2, constante de velocidad de agregación; τ_1, tiempo de vida media de endurecimiento; τ_2, tiempo de vida media de agregación.
[a-d] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna. N = 3 en todos los tratamientos.

Kowalchyk y Olson (1977) analizan mediante viscosimetría la velocidad de incremento de la dureza de geles enzimáticos, observando que la velocidad de incremento de dureza de la cuajada aumenta con la temperatura dentro del rango de en estudio (31-40ºC). Por su parte, y también trabajando con un viscosímetro, Sharma *et al*. (1989, 1993) demuestran que la velocidad de agregación y el índice de dureza (consistencia a los 60 min) aumentan al hacerlo la temperatura. Niki *et al*. (1994*b*) miden los módulos elástico y viscoso de rigidez (*G*' y *G*'') durante la gelificación enzimática de micelas de caseína de diferentes tamaños y aprecian que la constante de velocidad de gelificación es mayor cuando la temperatura también lo es. Numerosos investigadores también apuntan un efecto similar de la temperatura sobre la velocidad de los procesos de agregación y/o endurecimiento (Hossain, 1976; Tokita *et al*., 1982*a*; Dalgleish, 1983; Walstra y van Vliet, 1986; van Hooydonk y van den Berg, 1988; Zoon *et al*., 1988*b*).

VI.5.8.2. *Efecto sobre* R_∞

La **Tabla VI.5.8.2.*1*** refleja la evolución de las *LSM* de R_∞ en función de la temperatura.

Tabla VI.5.8.2.*1*. Efecto de la temperatura sobre el ratio final de reflectancia en leche de cabra.[1]

Temperatura (ºC)	R_∞
20	1'67[a]
25	1'87[b]
30	2'08[c]
35	2'14[c]
40	2'13[c]

[1] R_∞, valor asintótico del ratio de reflectancia, a tiempo infinito.
[a-c] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). N = 3 en todos los tratamientos.

Como se observa, R_∞ aumenta proporcional y significativamente ($P < 0'0001$) con la temperatura hasta 30ºC donde se estabiliza alcanzando una meseta o valor máximo. Mientras el grado de consenso entre los diferentes autores es alto, en lo referente al efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad de agregación y de endurecimiento, existen importantes divergencias con respecto a la dependencia de la dureza máxima en función de la temperatura.

Sharma *et al*. (1993) valoran la rigidez mediante la determinación del complejo de viscosidad (μ^*) empleando un viscosímetro de esfera vibratoria (Nametre) y, posteriormente, estiman el valor teórico máximo de dicha variable (μ^*_∞) ajustando, por regresión no lineal, los datos experimentales a la ecuación propuesta por Scott-Blair y Burnett (1963*a*). De esta forma, concluyen que la temperatura (28-37ºC) no ejerce efecto significativo alguno sobre el valor final de μ^*_∞.

Sin embargo, y en desacuerdo con lo anterior, otros investigadores opinan que la rigidez final disminuye cuando aumenta la temperatura. En este sentido, Zoon *et al*. (1988*b*) estudian la influencia de la temperatura en los módulos de almacenamiento y rotura (*G*' y *G*'') dentro del rango comprendido entre 20 y 40ºC y observan que el valor máximo de ambos módulos disminuye cuando la temperatura aumenta.

Contrariamente, otros autores afirman que la rigidez final del gel es mayor a temperaturas superiores. De esta opinión son Tokita *et al*. (1982*a*), que trabajando con leche descremada encuentran que la rigidez final de geles de coagulación enzimática aumenta casi linealmente con la temperatura. Otros autores como Bohlin *et al*. (1984) y Carlson *et al*. (1987*d*) obtienen similares resultados. Van Vliet y Walstra (1985) aseguran que, en trabajos previos, encontraron un incremento del módulo de rigidez (*G*) con el aumento de la temperatura de formación, tanto en geles de coagulación ácida como enzimática, pero en cambio, observaron un claro descenso de *G* cuando aumentaba la temperatura de medida. Por este motivo, van Vliet y Walstra (1985) critican los resultados de Tokita *et al*. (1982*a*) por considerar que los resultados de éstos

últimos constituyen más un reflejo del efecto de la temperatura de formación del gel que de la temperatura de medida.

Algunos autores también han observado simultáneamente aumento y descenso de la rigidez final al aumentar la temperatura, dependiendo del rango de temperaturas estudiadas y del tiempo seleccionado para estudiar la rigidez final. Así, Lagoueyte *et al*. (1995) empleando un reómetro, determinan un descenso de la firmeza máxima por ascenso de la temperatura, pero contrariamente, a tiempos menores de 4 horas observan un ascenso, mostrando claramente que el tiempo ejerce también un efecto en la dependencia de la firmeza final respecto de la temperatura. Roefs *et al*. (1990) analizan mediante técnicas reológicas, la influencia de la temperatura de medida en geles de coagulación mixta. *G*' disminuye casi linealmente con la temperatura a cualquier valor de pH comprendido entre 4'4 y 4'8 y a temperaturas comprendidas entre 20 y 40ºC. Pero a valores de pH superiores a 4'8, se observa la aparición de un máximo en el valor final de *G*', que se localiza entre 15 y 20ºC.

Por último, otros investigadores encuentran un incremento de la rigidez final hasta un valor máximo, momento en el cual se mantiene o incluso comienza a disminuir, coincidiendo con lo observado por Roefs *et al*. (1990) a pH mayor de 4'8. Dejmek (1987) miden *G*' y *G*'' a las 16 horas empleando un reómetro y aprecian la existencia de un máximo a 25ºC en las curvas de ambos módulos frente a la temperatura, que aparece más nítidamente a frecuencias altas. Tras analizar el efecto que ejercen diferentes tamaños de micela de caseína sobre la coagulación enzimática, Niki *et al*. (1994*b*) concluyen que los valores finales de *G*' y *G*'', a todos los tamaños micelares estudiados, crecen conforme aumenta la temperatura entre 25ºC y 28-30ºC, para comenzar a descender a partir de esa temperatura.

Mediante el uso de técnicas tanto reológicas como ópticas, Tobitani *et al*. (1995) examinan la gelificación de leche desnatada, concentrada, previamente hidrolizada e inducida por calor. Una vez alcanzada la temperatura de gelificación, el aumento de

temperatura produce un incremento de *G*' hasta un máximo para posteriormente decrecer debido a la separación de fases (sinéresis). Recientemente, Horne (1998) afirma que el valor de *G* medido a dos veces el tiempo de gelificación (t_g) imita el desarrollo de la dureza del gel a tiempo infinito. Según dicho autor, existe un fuerte incremento lineal de la dureza final del gel si aumentamos la temperatura, hasta que se alcanza un máximo localizado a 35-40ºC, tras el que la temperatura produce un descenso de *G*.

Por otra parte, Korolczuk *et al*. (1986) constatan una importante relación entre las curvas de viscosidad (viscosímetro rotacional de cilindros coaxiales Rhéomat 30) y las refractométricas y concluyen que los dos métodos miden cambios en el estado físico de la leche durante la coagulación y en la dureza del gel. La reflectancia difusa aumenta durante la agregación y formación de la red proteica que conforma el gel (Peri *et al*., 1990; López, 1993), al igual que lo hacen el módulo complejo de rigidez o elasticidad y sus componentes: los módulos viscoso y elástico, ya que el incremento de reflectancia difusa parece ser directamente proporcional al establecimiento de enlaces entre las micelas de caseína (Chofcheck *et al*., 1999), y los módulos son proporcionales al número de uniones (Carlson, *et al*., 1987*d*; Zoon *et al*., 1988*a*).

Por lo tanto, R_∞ es proporcional a la dureza del gel como lo son los valores finales de los módulos. Teniendo en cuenta la gran importancia de las uniones hidrofóbicas en la formación del entramado proteico tridimensional y en el desarrollo de la dureza del gel (Payens, 1977; McMahon *et al*.,1984*c*; Roefs *et al*., 1990; Niki *et al*., 1994*a*, *b*; Lagoueyte *et al*., 1994, 1995; Horne, 1998; Mellema *et al*. 1999) y su fuerte dependencia de la temperatura (Schmidt y Morris, 1984; Zoon *et al*., 1988*b*; Kim *et al*., 1992; Roefs *et al*., 1990) debemos esperar un aumento de dichos parámetros al aumentar la temperatura.

Las interacciones hidrofóbicas se ven favorecidas por un efecto de entropía (Lien y Kennon, 1987). Antes de la formación de una de estas uniones, las moléculas de agua

se sitúan ordenadamente alrededor de los grupos no polares expuestos, pero cuando tiene lugar la interacción hidrofóbica, ese orden es interrumpido produciendo un cambio de entropía favorable, lo suficientemente grande como para superar la entalpia debida a la interacción de los grupos no polares, por lo que la energía libre de Gibbs es negativa y el proceso es espontáneo. Dado que la contribución del término entrópico es dominante sobre el entálpico en las interacciones hidrofóbicas, el valor absoluto de la energía libre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) aumenta con la temperatura (Niki *et al*., 1994*b*), lo cual explica el incremento de R_∞.

Pero, como se ha comentado anteriormente, el aumento de R_∞ con la temperatura sólo tiene lugar hasta 30ºC, momento en el cual se estabiliza. Este fenómeno podría presentar diferentes causas. En primer lugar podría deberse a la existencia de otras fuerzas de unión entre las micelas de caseína, menos dependientes de la temperatura, además de las hidrofóbicas. Según Chen y Dickinson (1999), las fuerzas intermoleculares capaces de mantener la estructura tridimensional de los geles proteicos son: enlaces covalentes, enlaces electrostáticos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Pese a que la naturaleza de las fuerzas atractivas, que participan en la coagulación enzimática de las micelas de caseína, no ha sido aún totalmente dilucidada (Horne, 1998; Risso *et al*., 2000), se cree que el gel enzimático se estabiliza principalmente gracias a la actuación de enlaces débiles de tipo no-covalente (van Vliet *et al*., 1991; Ross-Murphy, 1995; Schorsch, *et al*., 2000) tales como interacciones hidrofóbicas, enlaces electrostáticos y/o puentes de hidrógeno (Culioli y Sherman, 1978; Walstra *et al*., 1985; Roefs *et al*., 1990; Niki *et al*., 1994*b*; Lefebvre-Cases *et al*., 1998), aunque se cree que también juegan un papel importante los enlaces de Ca^{2+} (Payens, 1977; Lefebvre-Cases *et al*., 1998; Mellema *et al*., 1999) y quizás los S-S (Culioli y Sherman, 1978).

En segundo lugar, la razón de la estabilización de R_∞ podría guardar relación con un aumento de la sinéresis causado por la temperatura. La temperatura, al ascender, conduce a un rápido incremento de la dureza del gel, pero simultáneamente, el

incremento de dureza es pronto enmascarado por el aumento de sinéresis, porque el rápido aumento de la fuerza de las uniones también facilita la contracción del gel (Lagoueyte *et al*., 1995).

Existen una serie de evidencias que soportan dicha hipótesis. Se acepta ampliamente que tanto el coeficiente de permeabilidad (B), como la velocidad de aumento de la permeabilidad de la cuajada con el tiempo (dB/dt) y la presión máxima de sinéresis endógena, aumentan al hacerlo la temperatura (van Dijk y Walstra, 1986; van den Bijgaart, 1988), lo cual ha sido relacionado con el descenso de los módulos finales de rigidez (Lagoueyte *et al*., 1995; Zoon *et al*., 1988*b*).

Por otro lado, Lagoueyte *et al*. (1994) encuentran evidencias microscópicas del incremento en el coeficiente de permeabilidad de la cuajada. Con el aumento de la temperatura, los espacios vacíos del interior del entramado proteico, repletos de suero, se ensanchan provocando soluciones de continuidad en las paredes. McMahon *et al*. (1984*c*) confirman el descenso de la intensidad de la absorbancia aparente causado por el proceso de microsinéresis, observando que dicho descenso, tras el máximo de absorbancia, es más pronunciado a temperaturas mayores.

La tercera posible razón, que explicaría el comportamiento de R_∞, sería el descenso de solubilidad del fosfato cálcico con la temperatura (Horne, 1998) que induciría a la salida parcial de calcio procedente del *CCP*, con el correspondiente ascenso de la carga negativa de las caseínas, que conduciría a un debilitamiento de las uniones y de la firmeza del gel.

VI.5.8.3. *Efecto sobre* β_1

El parámetro β_1, obtenido mediante regresión no lineal a partir del modelo I, se define como la proporción de reflectancia difusa causada por la agregación. Corresponde a (A_∞ -A_0), tal como se recoge en el apartado **V.7.2**. A fin de facilitar el

análisis, se ha expresado como porcentaje del incremento total de reflectancia (R_∞ – R_{max}). En la **Tabla VI.5.8.3.*1*** observamos que el aumento de la temperatura produce un descenso significativo del parámetro β_1.

Tabla VI.5.8.3.*1*. Efecto de la temperatura sobre β_1 en leche de cabra.[1]

Temperatura (ºC)	β_1
20	58'6[a]
25	27'6[b]
30	14'4[c]
35	9'93[d]
40	6'82[d]

[1] β_1, incremento de reflectancia difusa, tras el punto de inflexión de la curva de reflectancia, exclusivamente debido al proceso de agregación.
[a-d] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). N = 3 en todos los tratamientos.

Puesto que una pequeña parte de la agregación ocurre antes de T_{max}, el modelo no recoge la totalidad del cambio de reflectancia, por lo que, β_1 quizás no contenga otro significado físico distinto al de representar la fracción del incremento de reflectancia utilizada por la regresión para describir el proceso de agregación.

Sin embargo, la tendencia de β_1 podría ser explicada mediante el análisis del efecto de la temperatura sobre las constantes k_1 y k_2. Si representamos k_1 y k_2 versus temperatura, se halla un efecto mayor sobre k_2 que sobre k_1, por lo que k_2 sería más sensible a la temperatura que k_1. Así, cuando la temperatura aumenta, la velocidad de agregación se incrementa proporcionalmente más que la velocidad de endurecimiento y, en consecuencia, la contribución de la agregación al incremento de reflectancia

disminuye. Como se comentará en el apartado **VI.5.9.3**, se puede realizar un razonamiento similar en lo relativo al efecto de la proteína sobre β_1.

VI.5.9. Efecto de la concentración de proteína en las constantes cinéticas de agregación y endurecimiento

VI.5.9.1. *Efecto sobre k_1 y k_2*

Las *LSM* de k_1, k_2, τ_1 y τ_2 correspondientes a los tres niveles de concentración proteica seleccionados en el experimento *III* (3, 5 y 7%) se detallan en la **Tabla VI.5.9.1.*1***. Existe un ascenso consistente de las medias de τ_1 y τ_2, paralelo al aumento de la concentración de proteína, producido por el descenso de k_1 y k_2. Varios autores publican el incremento de la velocidad de agregación y/o de endurecimiento por aumento de la concentración de proteína (Walstra y van Vliet, 1986; van Hooydonk y van den Berg, 1988; Sharma *et al*., 1993; Guinee *et al*., 1997) aunque, por el contrario, nosotros observamos un descenso.

Tabla VI.5.9.1.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre las constantes de velocidad y los tiempos de vida media de agregación y endurecimiento estimados mediante reflectancia difusa en leche de cabra. [1]

Proteína (%)	k_1 (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	τ_1(s)	τ_2(s)
3	0’000913[a]	0’201[a]	1277[a]	378[a]
5	0’000706[ab]	0’073[b]	1718[ab]	630[b]
7	0’000580[b]	0’030[b]	1881[b]	1040[c]

[1] k_1, constante de velocidad de endurecimiento; k_2, constante de velocidad de agregación; τ_1, tiempo de vida media de endurecimiento; τ_2, tiempo de vida media de agregación.
[a-c] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0’05). Las comparaciones sólo se establecen dentro de la misma columna. N = 3 en todos los tratamientos.

Este comportamiento es lógico ya que la enzima se considera saturada con el sustrato y la concentración de enzima utilizada es constante. Este hecho concuerda con lo descrito en el apartado **VI.2.2.6**, donde se constata que, si se mantiene constante la concentración de enzima y el nivel de caseína aumenta, los parámetros de tiempo también lo hacen. Por lo tanto, si la enzima hidroliza la κ-caseína en condiciones de saturación con el sustrato, el aumento de la concentración de micelas no varía la velocidad de la reacción, requiriendo la enzima un intervalo de tiempo mayor para completar el proceso.

Esta hipótesis es coherente con lo publicado por Culioli y Sherman (1978), que demuestran que *RCT* aumenta con la concentración de proteína, aunque el efecto de la proteína sobre *RCT* se ve mitigado con el aumento de la concentración de enzima, hasta prácticamente ser anulado. Y también coincide con Fox (1984) que afirma que la concentración de leche mediante ultrafiltración aumenta *RCT* a concentración constante de enzima.

Como consecuencia, k_1 y k_2 deben sufrir un descenso debido a la presencia de una mayor proporción de micelas sin hidrolizar, que son incapaces de participar en la formación del gel, lo que está en consonancia con lo publicado por Garnot *et al*. (1982). Mediante la inducción de la coagulación a concentración constante de enzima, estos autores demuestran que *RCT* aumenta con la proteína, a la vez que el grado de hidrólisis en *RCT* disminuye. Un menor grado de hidrólisis en *RCT*, al aumentar la concentración de proteína, también ha sido señalado por Garnot y Corre (1980), por Dalgleish (1980) y por Lomholt y Qvist (1997).

Otro factor a considerar es que el aumento de la concentración proteica incrementa la viscosidad, que a su vez reduce la difusión de las micelas. El incremento de viscosidad podría, de esta forma, retrasar la agregación aumentando *RCT* (Culioli y Sherman, 1978) y los parámetros de tiempo derivados de la reflectancia difusa (apartado **VI.2.2.6**).

VI.5.9.2. *Efecto sobre R_∞*

Las *LSM* de R_∞, a diferentes concentraciones de proteína, se detallan en la **Tabla VI.5.9.2.*1***.

Tabla VI.5.9.2.*1*. Efecto de la concentración de proteína sobre el ratio final de reflectancia en leche de cabra.[1]

Proteína (%)	R_∞
3	1'79[a]
5	2'04[b]
7	2'11[c]

[1] R_∞, valor asintótico del ratio de reflectancia, a tiempo infinito.
[a-c] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes ($P < 0'05$). $N = 3$ en todos los tratamientos.

La literatura relativa a la relación entre la dureza del gel y el contenido de caseína de la leche es abundante y unánime (Amram *et al*., 1982; Storry y Ford, 1982*b*; Banks y Muir, 1984). Referente a la leche de cabra, Remeuf *et al*. (1989) detectan una correlación significativa (r = 0'76) entre la dureza del gel y el contenido en proteína, mientras que Remeuf *et al*. (1995) citan un aumento de la firmeza máxima conforme se incrementa la concentración de la leche de cabra ultrafiltrada.

En el presente estudio los valores de R_∞, como se esperaba, ascienden significativamente si aumenta la concentración de proteína. Como ya se ha mencionado, durante la agregación y el endurecimiento del gel acontece un incremento de la reflectancia difusa. Una mayor concentración de proteína debería determinar un grado superior de unión entre las micelas de caseína, con más enlaces por unidad de volumen,

que conduciría a un ascenso de R_∞. Según (Waungana *et al*., 1997, 1998), el número y la fuerza de los enlaces establecidos, entre las micelas de caseína hidrolizadas, son mayores en los geles obtenidos a partir de leche concentrada por ultrafiltración, que en aquellos procedentes de leche no concentrada. El descenso de k_1 y k_2 debido al aumento de la concentración proteica es coherente con el aumento paralelo de R_∞, porque las constantes de velocidad sólo guardan relación con el tiempo necesario para completar la reacción.

Diferentes autores han citado que la proteína aumenta la firmeza máxima de la cuajada que, medida normalmente como módulo de rigidez o como complejo de viscosidad, exhibe una dependencia potencial con respecto a la concentración proteica:

$$G_\infty = d\left(C_p\right)^b \qquad \text{(VI.5.9.2.}\mathit{1}\text{)}$$

$$\mu_\infty^{\ *} = d\left(C_p\right)^b \qquad \text{(VI.5.9.2.}\mathit{2}\text{)}$$

donde

G_∞ = módulo final de rigidez a tiempo infinito,

μ^*_∞ = complejo final de viscosidad a tiempo infinito,

C_p = concentración de proteína,

d = constante y

b = constante.

El exponente b se encuentra típicamente comprendido entre 1’8 y 4’0, según la literatura (Culioli y Sherman, 1978: 2’6; Garnot *et al*., 1982: 2’6; van Dijk, 1982: 2’7; Tokita *et al*., 1982*a*, *b*, 1984, 1985,: 2’0-4’0 según el rango de concentración proteica; Dejmek, 1989: 2’5; Zoon *et al*., 1988*a*: 2’4; Sharma *et al*., 1993: 2’3-3’1 en función de la temperatura y el pH; Niki *et al*., 1994*b*: 2’1 para micelas pequeñas y 1’8 para grandes; Guinee *et al*., 1997: >1).

Con el objeto de comparar la evolución seguida por R_∞ con las tendencias características de G_∞ y μ^*_∞, se estima el exponente *b* mediante regresión de mínimos cuadrados entre *ln* (R_∞) y *ln* (C_p). El resultado de las regresiones arroja un valor *b* igual a 0'20 con un R^2 de 0'96, no apreciándose un efecto significativo de la temperatura sobre el valor de *b* (20-40ºC). Las diferencias existentes entre autores con respecto al valor del coeficiente *b* podrían ser debidas, en opinión de Zoon *et al*. (1988*a*), a los diversos métodos seguidos para el ajuste de los niveles de concentración proteica, a la cantidad de enzima añadida o al tiempo transcurrido desde la adición del enzima hasta que se realiza la medida de rigidez. Para estos autores, el uso de una relación constante enzima/proteína proporciona una estimación excesivamente alta de *b*. Por lo tanto, para el estudio de la relación entre la rigidez y la concentración de proteína, aconsejan variar sólo la concentración de proteína y coagular la leche por adición de una cantidad constante de enzima, midiendo el módulo tras un largo período de tiempo.

En el presente trabajo, de acuerdo con Zoon *et al*. (1988*a*), no se ha mantenido constante la proporción entre la concentración de enzima y la de proteína. Sin embargo, el ajuste de los niveles proteicos se ha realizado mediante reconstitución de leche desnatada condensada, que podría implicar ciertas diferencias con respecto a los autores que han empleado ultrafiltración.

Desde otra perspectiva, Sharma *et al*. (1993) atribuyen las diferencias en el exponente a la forma de la curva. El efecto de la proteína sobre la forma de las curvas de reflectancia difusa es diferente al ejercido sobre las curvas de G *y* μ, por lo que parece inapropiado establecer una comparación entre el efecto de la proteína sobre el parámetro de reflectancia difusa (R_∞) y los parámetros reológicos, G_∞ y μ^*_∞.

VI.5.9.3. *Efecto sobre* β_1

En la **Tabla VI.5.9.3.*1*** se analiza el efecto de la concentración de proteína sobre las *LSM* del parámetro β_1, que aumenta con la concentración proteica.

Tabla VI.5.9.3.*1*. Efecto de la temperatura sobre β_1 en leche de cabra.[1]

Proteína (%)	β_1
3	17'3[a]
5	25'7[b]
7	27'4[b]

[1] β_1, incremento de reflectancia difusa, tras el punto de inflexión de la curva de reflectancia, exclusivamente debido al proceso de agregación.
[a-b] Medias con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P < 0'05). N = 3 en todos los tratamientos.

Paralelamente al razonamiento mencionado en el apartado **VI.5.8.3**, en relación con el efecto de la temperatura sobre β_1, la representación gráfica de k_1 y k_2 frente a la concentración de proteína, revela un efecto mayor de este factor sobre k_2, en comparación con k_1, lo que implicaría por lo tanto, un descenso de β_1. Cuando la concentración proteica disminuye k_2 aumenta proporcionalmente más que k_1 y lógicamente la contribución de la agregación al cambio total de reflectancia se ve disminuida.

VI.5.10. Fases de formación de la cuajada

Aunque se puede considerar, como se recoge en el apartado **II.2.6**, que los conocimientos en relación con las etapas del proceso de coagulación de la leche están bien establecidos, muchos de sus aspectos son aún poco conocidos. En general, se acepta que la coagulación consta básicamente de dos procesos cinéticos: hidrólisis de la κ-caseína y agregación de las micelas desestabilizadas (Olson y Bottazzi, 1977; Dalgleish, 1979; Garnot y Olson, 1982; Walstra *et al*., 1985; van Hooydonk y Walstra, 1987; Guthy *et al*., 1989; Hyslop, 1989; Winwood, 1989; Horne y Davidson, 1990; de Kruif *et al*., 1992; van Hekken y Strange, 1994; Pires *et al*., 1997). Pero la

aparentemente bien establecida división de la coagulación en dos fases, no es universalmente aceptada.

Algunos autores la dividen formalmente en esas dos etapas, pero al mismo tiempo diferencian ambiguamente entre conceptos como agregación y formación del gel, cuando profundizan en el análisis de la segunda fase de la coagulación. De esta forma, Green (1984) considera la formación del gel como una fase tardía de la agregación, pero aun así, la analiza separadamente de ésta. Similares divisiones aparecen en Fox (1988) y en Fox y Mulvihill (1990).

También son numerosos los investigadores que dividen la coagulación en tres fases diferentes pero que se solapan: primaria o hidrólisis enzimática, secundaria o agregación y endurecimiento del gel formado (Storry y Ford, 1982*a*; McMahon y Brown, 1984*b*; Carlson, *et al*., 1987*a*; Pires *et al*., 1999). Incluso hay autores que prefieren dividir la coagulación en más de tres etapas, proporcionando una descripción continua del proceso. Así, Johnston (1984) separa la coagulación en cuatro fases: hidrólisis, aglomeración para constituir "unidades poliméricas", formación del gel mediante enlace de las unidades poliméricas y endurecimiento de la cuajada por la continuación de la formación de enlaces. McMahon y Brown (1990) describen la coagulación enzimática según las siguientes etapas: hidrólisis, agregación de las micelas de caseína vía mecanismo de von Smoluchowski (1917), formación de una red de partículas de caseína en el punto de gelificación del proceso de coagulación, continuación de la incorporación de micelas a la red tridimensional, reestructuración de las cadenas de caseína y fusión de micelas, formando gruesas cadenas, con expulsión de suero.

En nuestra opinión, la primera fase de la coagulación, la hidrólisis enzimática, es ampliamente comprendida y está claramente definida, resultando fácil separarla conceptualmente del resto de etapas del proceso. Pero por el contrario, muchos autores no diferencian claramente entre agregación y endurecimiento, quizás porque la

agregación y especialmente el endurecimiento, no son suficientemente comprendidos, existiendo una gran carencia de conocimientos referentes a la secuencia molecular y la naturaleza del proceso de formación del gel y de su endurecimiento.

Por otra parte, la mayoría de los estudios cinéticos de agregación y endurecimiento que han sido realizados, se abordan mediante monitorización de propiedades físicas como viscosidad, módulos de rigidez y características ópticas durante la coagulación. Lógicamente, la sensibilidad de cada una de esas propiedades a los procesos de agregación y endurecimiento es diferente. Por lo tanto, se produce una respuesta distinta a los fenómenos de la coagulación, en función de la técnica utilizada y de la propiedad medida, respuesta, que por otro lado, aporta información relacionada de diferente forma y en distinto grado, con las fases de la coagulación.

De hecho, la viscosidad sólo aumenta exponencialmente entre el inicio de la agregación y el tiempo de coagulación visual (Fox y Mulvihill, 1990), momento tras el cual, la viscosidad ya no puede ser medida por más tiempo (Mellema *et al*., 1999); mientras que la mayoría de los equipos de uso habitual, para el seguimiento del aumento de la dureza del gel, aún no son capaces de medir el módulo en el punto de gelificación, por ser demasiado pequeño (Carlson *et al*., 1987*d*; McMahon y Brown, 1990).

A la luz de los resultados del presente estudio, se considera que la reflectancia difusa de NIR (880 nm) es sensible tanto a la agregación de las micelas de caseína como al proceso de endurecimiento del gel, mientras que otros métodos en general se limitan más a la detección de uno solo de estos procesos.

El análisis de los modelos cinéticos propuestos y ensayados y de los datos cinéticos obtenidos, nos conduce a sugerir que la coagulación de la leche se puede dividir formalmente en dos etapas, integradas en su conjunto por tres procesos diferentes que se solapan entre sí y que requieren tratamiento cinético específico:

1. Fase primaria o enzimática, de hidrólisis de la κ-caseína.

2. Fase secundaria, no enzimática o de formación del gel, constituida a su vez por la agregación de las micelas y por la reacción de endurecimiento.

VII. CONCLUSIONES

PRIMERA.- La coagulación de la leche de cabra puede ser monitorizada mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo a la longitud de onda de 880 nm con un sensor de fibra óptica en línea. La influencia de la composición de la leche sobre la intensidad de reflectancia requiere trabajar con ratios en vez de con valores absolutos de señales eléctricas. La clasificación de los parámetros generados a partir de la curva de reflectancia en función de sus unidades racionaliza el análisis, dada la relación existente entre la naturaleza de las variables y su comportamiento.

SEGUNDA.- Los parámetros de tiempo y mixtos varían en función de la velocidad de coagulación. Por consiguiente, el aumento de la misma producido por cualquier factor de la coagulación se traduce en aumento de la velocidad de incremento del ratio de reflectancia y en descenso de los parámetros de tiempo o viceversa. Sin embargo, los parámetros de respuesta parecen depender más de factores no cinéticos tales como:

índice de refracción y número de enlaces intermicelares, lo que explica la sensibilidad de dichas variables a la temperatura.

TERCERA.- El efecto de la temperatura sobre los parámetros de tiempo, mixtos y de respuesta (excepto el voltaje inicial) es cuadrático. En los parámetros de tiempo este hecho se atribuye principalmente al efecto limitante de los procesos de gelificación sobre los de hidrólisis a temperaturas inferiores a 30ºC. La evolución de la velocidad máxima de incremento del ratio de reflectancia, en función de la temperatura, cumple la ecuación de Arrhenius, permitiendo estimar la energía aparente de activación del proceso de coagulación en 63-72 kJ mol^{-1}. Se observa un aumento de dicha energía con la concentración proteica.

CUARTA.- El aumento de la velocidad de coagulación por adición de cloruro cálcico a la leche es independiente del descenso asociado de pH causado por disolución de la sal, que induce a la liberación parcial de los protones de las micelas de caseína.

QUINTA.- Existen diversas interacciones entre las variables estudiadas: las interacciones de la concentración de enzima con la temperatura y de la concentración de enzima con el pH que afectan a T_{max}, T_{clot}, T_{cut} y D_{max}; la de la temperatura con el pH que influye en D_{max} y R_{max} y la de la proteína con la temperatura que afecta sobre T_{max}, T_{2max} y T_{2min}.

SEXTA.-El parámetro de reflectancia difusa (T_{max}) es diferente del tiempo de coagulación de Berridge (T_{clot}) y representa un 89% del mismo. Dicho parámetro -que corresponde a un grado de conversión de caseína del 78%-, estima el punto de gelificación antes que el método de Berridge, siendo más sensible a la agregación que la mayoría de los parámetros de estimación habitualmente utilizados. Predice con eficacia T_{clot} (R^2 = 0'991 y SEP = 54 s) y disminuye, como este último, de forma inversamente proporcional a la concentración de enzima, cumpliendo por tanto la ecuación de Foltmann (R^2 = 0'999). Su correlación con T_{clot}, su sensibilidad a la agregación y su consistente respuesta a los factores de la coagulación, aconsejan su uso para el estudio

comparado de la adaptabilidad tecnológica de coagulantes comerciales, cultivos microbianos y aditivos, y para la selección de las condiciones ideales de elaboración.

SÉPTIMA.- La variable T_{max} constituye un excelente parámetro predictor del tiempo de corte. Siempre que la concentración de proteína sea estable, la ecuación $T_{cut} = \beta\ T_{max}$ permite la predicción objetiva y en línea de dicho tiempo con un error estándar comprendido entre 33 y 85 s, según las condiciones experimentales. El parámetro de reflectancia difusa T_{2min} proporciona errores estándar de predicción menores que T_{max}, al menos en condiciones variables del contenido proteico de la leche.

OCTAVA.- El parámetro β, que controla la predicción del tiempo óptimo de corte, depende de la temperatura, el pH y las concentraciones de enzima y proteína. El efecto de dichos factores sobre T_{cut} es proporcionalmente menor que sobre T_{max}, por lo que, cuando los parámetros de tiempo aumentan β disminuye y viceversa. Ello contribuye, junto a la diferencia de criterio en la selección del tiempo de corte por parte del maestro quesero, a la necesidad de calibrar dicho parámetro a pie de planta y con anterioridad a su uso industrial. En este sentido es preciso considerar que:

- El efecto relativo producido por la concentración de enzima, la temperatura y el pH sobre el parámetro β, se estima que constituye respectivamente el 10%, el 29% y el 32% del ejercido por la concentración de proteína.

- Como consecuencia, la inclusión en el algoritmo de predicción de parámetros como pH, temperatura y concentración de enzima, disminuye el error estándar de predicción, si bien, el beneficio no compensa el perjuicio que ello supone para la implementación del sistema.

- El efecto dominante de la concentración de proteína sobre el parámetro β aconseja la inclusión de un término proteico en el algoritmo de predicción del tiempo de corte, siempre que existan variaciones significativas del contenido en proteína, lo que permite reducir el error estándar de predicción en un 64%.

En este caso, la ecuación de predicción adopta la forma $T_{cut} = \beta_0\ T_{2min}\ (1 + \gamma$ proteína), donde la constante γ representa el efecto de la proteína sobre la pendiente (β_0). Este algoritmo aún conserva la simplicidad ya que sólo requiere la determinación en planta del coeficiente β_0.

NOVENA.- El parámetro de respuesta R_{max} permite la predicción del tiempo de corte con precisión similar a la obtenida mediante parámetros de tiempo, siempre que se incluya en la ecuación de predicción un término de compensación de la temperatura y un valor de ordenada en el origen. El parámetro de respuesta R_{cut} sólo varía en función de la temperatura y del tipo de enzima, lo que sugiere la posibilidad de determinar el tiempo de corte en base a un valor constante de ratio de reflectancia difusa, que sería válido a una temperatura de coagulación constante y característico de cada tipo de enzima.

DÉCIMA.- La agregación de las micelas de caseína se inicia en un punto localizado entre el período de inducción (α = 0'61) y el punto de inflexión del perfil de reflectancia (α = 0'78).

UNDÉCIMA.- En la curva de reflectancia difusa se observa la aparición de una irregularidad al disminuir la temperatura o la concentración de proteína, que sugiere la coexistencia de dos procesos diferentes durante la formación del gel. Por este motivo, el modelo *I* propuesto para la descripción del incremento de reflectancia difusa tras T_{max} combina una expresión de segundo orden para la agregación y otra de primer orden para el endurecimiento de la cuajada. El modelo se ajusta con éxito a los datos experimentales confirmando que el aumento de reflectancia difusa observado durante la coagulación se debe a la evolución solapada de los procesos mencionados. Actualmente, se acepta de forma mayoritaria que la coagulación de la leche se divide en dos etapas fundamentales: hidrólisis y agregación, si bien nuestros resultados sugieren que la coagulación se produce en dos fases: la hidrólisis enzimática y la fase no enzimática, constituida a su vez por la agregación y la reacción de endurecimiento del gel.

DUODÉCIMA.- Con el ascenso de la temperatura o el descenso de la concentración proteica aumentan las constantes de velocidad de agregación y endurecimiento y disminuye la influencia relativa de la agregación sobre el incremento total del ratio de reflectancia difusa. El valor asintótico del ratio de reflectancia aumenta con la temperatura y la proteína, reflejando un incremento de la firmeza del gel. El ascenso de dicho parámetro hasta 30ºC confirma que las uniones hidrofóbicas desempeñan el papel principal en la gelificación de la leche. Su estabilización posterior a temperaturas mayores indicaría la contribución de otras fuerzas menos dependientes de la temperatura en el mantenimiento de la estructura del gel, el aumento de la sinéresis a esas temperaturas o el incremento de la carga superficial negativa de las micelas, por depleción de calcio.

DECIMOTERCERA.- El cuajo de cabrito líquido, a igual tiempo de coagulación, muestra mayor adaptabilidad tecnológica para la coagulación de leche de cabra que la enzima de *Mucor miehei*. Presenta valores de T_{max} y de tiempo de corte más pequeños y valores mayores de R_{cut}. Se espera por tanto, un mejor rendimiento del cuajo de cabrito en comparación con la enzima de *Mucor miehei*, lo que supondría una alternativa natural a la sustitución del cuajo de ternera por proteasa *de M. miehei*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ABDOU, H. M. (1987). Métodos de análisis de tipo instrumental. En *Farmacia*. Remington, vol. 1, pp. 846-891, Ed. Médica Panamericana, S. A., Buenos Aires.

AGARWAL, K. P. y BHATTACHARYA, N. K. (1980). Note on the composition of calostrum and its transition to normal milk in Indian dwarf goats. *Indian Journal of Animal Sciences* **50** 782-784.

AGUADO, J. (1999). *Ingeniería de la Industria Alimentaria*, vol 1, Ed. Síntesis, S. A., Madrid.

AKINSOYINU, A. O., MBA, A. U. y OLUBAJO, F. O. (1977). Studies on milk yield and composition of the West African dwarf goat in Nigeria. *Journal of Dairy Research* **44** 57-62.

ALEANDRI, R., BUTTAZZONI, L. G., SCHNEIDER, J. C., CAROLI, A. y DAVOLI, R. (1990). The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *Journal of Dairy Science* **73** 241-255.

ALMDAL, K., DYRE, J., HVDIST, S. y KRAMER, O. (1993). Towards a phenomenological definition of the term "Gel". *Polymer Gels and Networks* **1** 5-18.

AMBROSOLI, R., DI STASIO, L. y MAZZOCCO, P. (1988). Content of α_{s1}-casein and coagulation properties in goat milk. *Journal of Dairy Science* **71** 24-28.

AMRAM, Y., DELESPAUL, G., VANDEWEGHE, J., SCHNEID, N. y LENOIR, J. (1982). Le refroidissement du lait et son comportement en fromagerie. II Efficacité de divers traitements de correcction. *Revue Laitière Française* **404** 53-57.

ANIFANTAKIS, E. M. y KANDARAKIS, J. G. (1980). Contribution to the study of the composition of goat's milk. *Milchwissenschaft* **35** 617-619.

ANUARIO ESTADÍSTICO DE ESPAÑA. (2000). Encuesta sobre la Estructura de las explotaciones Agrícolas. Año 1997. Instituto Nacional de Estadística, Madrid.

ANUARIO ESTADÍSTICO DE LA REGIÓN DE MURCIA. (2000). Tomo I: Datos Regionales. Consejería de Economía y Hacienda. Dirección General de Economía y Estadística. Centro Regional de Estadística de Murcia, Murcia.

ARBIZA, S. I. (1986). *Producción de Caprinos*, Ed. AGT Editor, S. A., México, D.F.

ATTAIE, R. y RICHTER, R. L. (2000). Size distribution of fat globules in goat milk. *Journal of Dairy Science* **83** (5) 940-944.

BACHMAN, S., KLIMCZAK, B. y GASYNA, Z. (1978*a*). *Acta Alimentaria Polonica* **4** (XXVIII) (1) 55-62. Citado por NOËL *et al*. (1989).

BACHMAN, S., KLIMCZAK, B. y GASYNA, Z. (1978*b*). *Acta Alimentaria Polonica* **4** (XXVIII) (3) 239-246. Citado por NOËL *et al*. (1989).

BACHMAN, S., KLIMCZAK, B. y GASYNA, Z. (1980). *Acta Alimentaria Polonica* **6** (XXX) (3) 135-143. Citado por NOËL *et al*. (1989).

BANKS, J. M. y MUIR, D. (1984). Coagulum strength and cheese yield. *Dairy Industries International* **49** 17-36.

BANON, S. y HARDY, J. (1991). Study of acid milk coagulation by an optical method using light reflection. *Journal of Dairy Research* **58** 75-84.

BATTISTOTTI, B., BOTTAZZI, V. y CHIUSA, P. (1986). Valutazione del coagulo presamico con apparecchiatura "gelograph". *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* **37** (6) 473-480.

BAUER, R., HANSEN, M., HANSEN, S., OGENDAL, L., LOMHOLT, S., QVIST, K. y 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. *Journal of Chemical Physics* **103** 2725-2737.

BELLON, J. L., QUIBLIER, J. P., DURIER, C. y NOEL, Y. (1988). Un noveau capteur industrial de mesure du temps de coagulation du lait. Le Coagulomètre. *Technique Laitiere* **1031** 29-32.

BEN-GERA, I. y NORRIS, K. H. (1968). Influence of fat concentration on the absorption spectrum of milk in the near-infrared region. *Israel Journal of Agricultural Research* **18** (3) 117-124.

BENGUIGUI, L., EMERY, J., DURAND, D. y BUSNEL, J. P. (1994). Ultrasonic study of milk clotting. *Le Lait* **74** (3) 197-206.

BERRIDGE, N. J. (1952*a*). Some observations on the determination of the activity of rennet. *Analyst* **77** 57-62.

BERRIDGE, N. J. (1952*b*). An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *Journal of Dairy Research* **19** 328-329.

BIRTH, G. S. (1976). How light interacts with foods. *Quality Detection in Foods*, ASAE publication 1-76, St. Joseph, Michigan, pp. 6-11.

BIRTH, G. S. y HECHT, H. G. (1987). The physics of near infrared reflectance. En *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, Ed. Williams, P. y Norris, K., American Association of Cereal Chemist, Inc., St. Paul, Minnesota.

BLOOMFIELD, V. A. y MEAD, R. J. (1975). *Journal of Dairy Science* **58** 592-602. Citado por RUETTIMANN y LADISCH (1987).

BLOOMFIELD, V. A. y MORR, C. V. (1973). *Netherlands Milk and Dairy Journal* **27** 103-120. Citado por RUETTIMANN y LADISCH (1987).

B.O. E. *Boletín Oficial del Estado*. (25 de Octubre de 2001). Orden de 10 de octubre de 2001, por la que se ratifica el reglamento de las denominaciones de origen "Queso de Murcia" y "Queso de Murcia al Vino" y de su Consejo Regulador.

BOHLIN, L., HEGG, P. O. y LJUSBERG-WAHREN, H. (1984). Viscoelastic properties of coagulating milk. *Journal of Dairy Science* **67** (4) 729-734.

B.O.R.M. *Boletín Oficial de la Región de Murcia*. (18 de Junio de 1990). Orden de 11 de junio de 1990, de la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca por la que se aprueba la reglamentación específica de los quesos de cabra acogidos a la denominación "Producto de Calidad de Murcia" y su marca.

B.O.R.M. *Boletín Oficial de la Región de Murcia*. (25 de Junio de 1997). Orden de 20 de junio de 1997, por la que se reconocen con carácter provisional las denominaciones de origen "Queso de Murcia" y "Queso de Murcia al Vino"

B.O.R.M. *Boletín Oficial de la Región de Murcia*. (21 de Julio de 2001). Orden de 11 de julio de 2001, por la que se aprueba el reglamento de las denominaciones de origen "Queso de Murcia" y "Queso de Murcia al Vino" y se constituye su Consejo Regulador.

BRIGNON, G., MAHÉ, M. F., GROSCLAUDE, F. y Ribadeau-Dumas, B. (1989). Sequence of caprine α_{S1}-casein and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level, α_{S1}-CN A, B and C. *Protein Sequence and Data Analysis* **2** 181-188.

BRINGE, N. A. y KINSELLA, J. E. (1986). Influence of calcium chloride on the chymosin-initiated coagulation of casein micelles. *Journal of Dairy Research* **53** 371-379.

BRINGE, N. A. y KINSELLA, J. E. (1990). Acidic coagulation of casein micelles: mechanisms inferred from spectrophotometric studies. *Journal of Dairy Research* **57** 365-375.

BROWN, R. J. y COLLINGE, S. K. (1986). Actual milk coagulation time and inverse of chymosin activity. *Journal of Dairy Science* **69** (4) 956-958.

BRULE, G. y LENOIR, J. (1989). La coagulación de la leche. En *El Queso*. Eck, A., pp. 3-20, Ed. Omega, S. A., Barcelona.

BUCHHEIM, W. y WELSCH, U. (1973). Evidence for the submicellar composition of casein micelles on the basis of electron microscopical studies. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **27** 163-180.

BUNGENBERG DE JONG, H. G. (1949). A survey of the study objects in this volume. En *Colloid Science II*, pp. 1-18, Kruyt, H. R., Ed. Elsevier, Amsterdam.

BURGESS, K. J. (1978). Measurement of the firmness of milk coagulum. *Irish Journal of Food Science and Technology* **2** 129-134.

BYNUM, D. G. y OLSON, N. F. (1982). Influence of curd firmness at cutting on cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. *Journal of Dairy Science* **65** 2281-2290.

CARINI, S., RAMPILLI, M. y MUCCHETTI, G. (1982). Proposta di automazione per la determinazione del titolo. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* **32** 214-225.

CARLSON, A. (1982). *The enzymatic coagulation of milk*. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin–Madison, Wisconsin.

CARLSON, A., HILL, C. G. y OLSON, N. F. (1987*a*). Kinetics of milk coagulation: I. The Kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotechnology and Bioengineering* **29** 582-589.

CARLSON, A., HILL, C. G. y OLSON, N. F. (1987*b*). Kinetics of milk coagulation: II. Kinetics of the secondary phase: Micelle flocculation. *Biotechnology and Bioengineering* **29** 590-600.

CARLSON, A., HILL, C. G. y OLSON, N. F. (1987*c*). Kinetics of milk coagulation: III. Mathematical modeling of the kinetics of curd formation following enzymatic hydrolysis of κ-casein parameter estimation *Biotechnology and Bioengineering* **29** 601-611.

CARLSON, A., HILL, C. G. y OLSON, N. F. (1987*d*). The Kinetics of milk coagulation: IV. The kinetics of the gel-firming process. *Biotechnology and Bioengineering* **29** 612-624.

CARROLL, R. J., BASCH, J. J., PHILLIPS, J. G. y FARRELL, H. M. J. (1985). Ultrastructural and biochemical investigations of mature human milk. *Food Microstructure* **4** 323-331.

CASAL, H. L., KOHLER, U. y MANTSCH, H. H. (1988). Structural and conformational changes of β-lactoglobulin B: An infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta* **957** 11-20.

CASTILLO, M., JORDÁN, M. J., ABELLÁN, A., LAENCINA, J. y LÓPEZ, M. B. (1996). Tecnología de aprovechamiento del lactosuero. *Revista Española de Lechería* **74** 24-30.

CASTILLO, M., JORDAN, M. J., BAÑÓN, S., GARRIDO, M. D., LAENCINA, J. y LÓPEZ, M. B. (1998). Effect of different coagulant enzymes in Murciano-Granadina fresh goat cheese. Influence on cheese yield. En *Basis of the Quality of Typical Mediterranean Animal Products*, pp. 244-248, Ed. Flamant, J. C., Gabiña, D. y Espejo Díaz, E., Wageningen Pers.Wageningen.

CASTILLO, M., JORDÁN, M. J., GODOY, A., LAENCINA, J. y LÓPEZ, M. B. (2000*a*). Kinetics of syneresis in fresh goat cheese. *Milchwissenschaft* **55** (10) 566-569.

CASTILLO, M., PAYNE, F. A., HICKS, C. L. y LÓPEZ, M. B. (2000*b*). Predicting cutting and

clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal* **10** 551-562.

CHAPLIN, B. y GREEN, M. L. (1980). Determination of the proportion of κ-casein hydrolysed by rennet on coagulation of skim-milk. *Journal of Dairy Research* **47** 351-358.

CHEN, J. y DICKINSON, E. (1999). Interfacial ageing effect on the rheology of a heat-set protein emulsion gel. *Food Hydrocolloids* **13** 363-369.

CHERYAN, M., VAN WYK, P. J., OLSON, N. F. y RICHARDSON, T. (1974). Secondary phase and mechanism of enzymic milk coagulation. *Journal of Dairy Science* **58** (4) 477-481.

CHIANESE, L., GARRO, G., NICOLAI, M. A., MAURIELLO, R., FERRANTI, P., PIZZANO, R., CAPPUCCIO, U., LAEZZA, P., ADDEO, F., RAMUNNO, L., RANDO, A. y RUBINO, R. (1993). The nature of casein heterogeneity in caprine milk. *Le Lait* **73** 533-547.

CHRISTENSEN, H. N. y PALMER, G. A. (1980). Aproximaciones para altas y bajas concentraciones de sustrato. En *Cinética Enzimática*, pp. 29-32, Ed. Reverté, S. A., Barcelona.

CLAESSON, O. y NITSCHMANN, H. (1957). Optical investigation of the rennet clotting of milk. *Acta Agriculturae Scandinavica* **7** 341-345.

CLARK, S. (1993). Associations between breed, age, lactation number, days in milk, season, month and percent protein in goat milk. Master Science Thesis, Cornell University, Ithaca, NY.

CLARK, S. y SHERBON, J. W. (2000). $Alpha_{s1}$-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research* **38** 123-134.

CLARK, P. S. y SRINIVASAN, D. (1989). Effects of salts on coagulation and the structure of curd made from ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science* **72** Suppl. 1, Abstr. 374G.

CÓDIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL. (1985). Decreto 2484/1967 de 21 de Septiembre. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid.

CREAMER, L. K. (1991). Some aspects of casein micelle structure. En *Interactions in Food Proteins*, pp 148-163, Parris, N. y Barford, R., Ed. ACS Symp. Ser. 454., American Chemical Society, Washington, DC.

CREAMER, L. K., PLOWMAN, J. E., LIDDELL, M. J., SMITH, M. H. y HILL, J. P. (1998). Micelle stability: κ-casein structure and function. *Journal of Dairy Science* **81** (11) 3004-3012.

CROFCHECK, C. L., PAYNE, F. A., HICKS, C. L., MENGÜÇ, M. P. y NOKES, S. E. (2000). Fiber optic sensor response to low levels of fat in skim milk. *Journal of Food Process Engineering* **23** 163-175.

CROFCHECK, C. L., PAYNE, F. A. y NOKES, S. E. (1999). Predicting the cutting time of cottage cheese using light backscatter measurements. *Transaction of the ASAE* **42** (4) 1039-1045.

CSAPO, J., CSAPO, J. y HORVATH, A. M. (1984). I. Protein content of goat's milk and the distribution of its protein fractions. *Tejipar* **33** (3) 61-65.

CULIOLI, J. y SHERMAN, P. (1978). Rheological aspects of the renneting of milk concentrated by ultrafiltration. *Journal of Texture Studies* **9** 257-281.

DALGLEISH, D. G. (1979). Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immovilized or soluble chymosin. *Journal of Dairy Research* **46** 653-661.

DALGLEISH, D. G. (1980). Effect of milk concentration on the rennet coagulation time. *Journal of Dairy Research* **47** 231-235.

DALGLEISH, D. G. (1981). Effect of milk concentration on the nature of curd formed during renneting – a theoretical discussion. *Journal of Dairy Research* **48** 65-69.

DALGLEISH, D. G. (1983). Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research* **50** 331-340.

DALGLEISH, D. G. (1984). Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using laser Doppler electrophoresis. *Journal of Dairy Research* **51** 425-438.

DALGLEISH, D. G. (1988*a*). The coagulation of milk during renneting-further comments. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **42** 341-343.

DALGLEISH, D. G. (1988*b*). A new calculation of the kinetics of the renneting reaction. *Journal of Dairy Research* **55** 521-528.

DALGLEISH, D. G. (1990). Aspects of stability in milk and milk products. En *Food Colloids*, Bee, R. D., Richmond, P. y Mingins, J., pp. 295-305, Ed. R. Soc. Chem., Cambridge, United Kingdom.

DALGLEISH, D. G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1, pp. 69-100, Ed. Fox, P. F., London: Chapman & Hall.

DALGLEISH, D. G. (1998). Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities. *Journal of Dairy Science* **81** (11) 3013-3018.

DANIEL, W. W. (1995). *Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud*, Ed. Limusa, S. A. de C. V., Grupo Noriega Editores, México, D. F.

DARLING, D. F. y DICKSON, J. (1979*a*). The determination of the zeta potential of casein micelles. *Journal of Dairy Research* **46** 329-332.

DARLING, D. F. y DICKSON, J. (1979*b*). Electrophoretic mobility of casein micelles. *Journal of Dairy Research* **46** 441-451.

DAVIES, D. T. y LAW, A. J. R. (1983).Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *Journal of Dairy Research* **50** 67-75.

DE CINDIO, B., GRASSO, G., SPAGNA MUSSO, S., DI MATTEO, M. y MINCIONE, B. (1986). Confronto fra parametri lattodinamometrici e termoconduttivi: il tempo di coagulazione. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* **37** (6) 457-472.

DEJMEK, P. (1987). Dynamic rheology of rennet curd. *Journal of Dairy Science* **70** (7) 1325-1330.

DEJMEK, P. (1989). Precision conductometry in milk renneting. *Journal of Dairy Research* **56** 69-78.

DE KRUIF, C. G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal* **9** 183-188.

De Kruif, C. G., Jeurnink, T. J. M. y Zoon, P. (1992). The viscosity of milk during the initial stages of renneting. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **46** 123-137.

De Kruif, C. G. y Roefs, S. P. F. M. (1997). Skim milk acidification at low temperature. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **50** 113-120.

De Man, J. M. y Batra, S. C. (1964). Measurement of the rennet clotting time of milk with an automatic clot-timer. *Dairy Industries* **29** (1) 32-33.

Devendra, C. (1972). The composition of milk of British Alpine and Anglo-Nubian goats imported into Trinidad. *Journal of Dairy Research* **39** 381-385.

Diaz-Carrillo, E., Muñoz-Serrano, A., Alonso-Moraga, A., Serradilla-Manrique, J. M. (1993). Near infrared calibration for goats milk components: protein, total casein, α-casein, β-casein, κ-casein, fat and lactose. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **1** 141-146.

Dickinson, E. (1992). *An Introduction to Food Colloids*, Ed. Oxford University Press, Oxford.

Dickinson, E. y Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*, Ed. Applied Science Publishers, London.

Dill, C. W. y Roberts, W. M. (1959). Relationships of heat treatment, solids-non-fat, and calcium chloride to the curd tension of skim milk. *Journal of Dairy Science* **42** 1792-1799.

D.O.C.E. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*. (6 de Septiembre de 2001). Publicación de una solicitud de registro con arreglo al apartado 2 del artículo 6 del Reglamento (CEE) nº 2081/92 del Consejo relativo a la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen.

Donelly, W. J., McNeil, G. P., Buchheim, W. y McGann, T. C. A. (1984). A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta* **789** 136-143.

Douillard, R. (1973). Rheological analysis of curd formation. *Journal of Texture Studies* **4** 158-165.

Dumais, R., Blais, J. A. y Conrad, F. (1991). Queso. En *Ciencia y Tecnología de la Leche*, Amiot, J., pp. 249-296, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza.

DYBOWSKA, B. E. y FUJIO, Y. (1996*a*). A new method for measuring acid-induced milk gelation. *Milchwissenschaft* **51** (3) 130-134.

DYBOWSKA, B. E. y FUJIO, Y. (1996*b*). Effect of temperature and glucono-δ-lactone (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. *Milchwissenschaft* **51** (10) 557-560.

EIGEL, W. N., BUTLER, J. E., ERNSTROM, C. A., FARRELL, H. M. J., HARWALKER, V. R., JENNESS, R. y WHITNEY, R. M. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science* **67** 1599-1631.

ELEYA, M. M. O., BANON, S. D., y HARDY, J. (1995). A comparative study of pH and temperature effects on the acidic coagulation of milks from cows, goats, and sheep. *Journal of Dairy Science* **78** (12) 2675-2682.

EL-ZAYAT, A. I., MOHAMED, A. A., GOUDA, A. y ABBAS, F. (1984). Chemical composition and physical properties of goat milk in Suez Canal area and Sinai Peninsula. *Egyptian Journal of Food Science* **12** (1/2) 149-154.

ERDEM, Y. K. (1997). The effect of calcium chloride concentration and pH on the clotting time during the renneting of milk. *Gida* **22** (6) 449-455.

ERNSTROM, C. A. (1961). Milk clotting activity of pepsin and rennin. *Milk Products Journal* **52** (5) 8-9.

ESPIE, W. E. y MULLAN, W. M. (1990). Compositional aspects of goat milk in Northern Ireland. *Milchwissenschaft* **45** (6) 361-362.

EVERSON, T. C. y WINDER, W. C. (1968). Rennet coagulation test with a recorded output. *Journal of Dairy Science* **51** (6) 940.

FALAGÁN, A., LUNA, A. y CARRIZOSA, J. (2000). Evolución del sector productor y transformador de leche de cabra en Murcia: una aventura pionera en España. En *Actualidad y Nuevas Tendencias en el Sector Lácteo*, pp. 91-98, Ed. Servicio de Publicaciones Universidad Miguel Hernández, Alicante.

FAMELART, M. H., LE GRAET, Y. y RAULOT, K. (1999). Casein micelle dispersions into water, NaCl and $CaCl_2$: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. *International Dairy Journal* **9** 293-297.

FAMELART, M. H. y MAUBOIS, J. L. (1988). Comparaison de l'évolution de l'indice de réfraction et de la viscosité au cours de la gélification lactique du lait. *Le Lait* **68** (1) 1-12.

FARRELL, H. M. J., KUMOSINSKI, T. F. y KING, G. (1994). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: energy-minimized submicelle structure compared with small-angle X-ray scattering data. En *ACS Symp. Ser. 576.*, pp. 392-419, Kumosinski, T. F. y Liebman, M. N., Ed., American Chemical Society, Washington, D. C.

FITZGERALD, J. W. y WINDER, W. C. (1961). An ultrasonic method for measurement of solids-not-fat and milk fat in fluid milk. *Journal of Dairy Science* **44** 1165.

FLORY, P. J. (1974). Gels and gelling processes. *Faraday Discussions of the Chemical Society* **57** 7-18.

FOLTMANN, B. (1959). On the enzymatic and the coagulation stages of the renneting process. *15th International Dairy Congress*, London **2** 655-661.

Fox, P. F. (1969). Milk-clotting and proteolytic activities of rennet, and of bovine pepsin and porcine pepsin. *Journal of Dairy Research* **36** 427-433.

Fox, P. F. (1984). *Developments in Food Proteins,* vol. 3, Ed. Hudson, B. J. F. Elsevier Applied Science Publishers, London.

Fox, P. F. (1988). Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **10** 522-535.

FOX, P. F. y MULVIHILL, D. M. (1990). Casein. En *Food Gels*, pp. 121-173, Ed. Harris, P., Elsevier Science Publishers, London.

GARNIER, J. (1963). Kinetic study of a limited proteolysis: action of rennin on κ-casein. *Biochemica et Biophysica Acta* **66** 366-377.

GARNOT, P. y CORRE, C. (1980). Influence of milk protein concentration on the gelling activity of chimosin and bovine pepsin. *Journal of Dairy Research* **47** 103-111.

GARNOT, P. y OLSON, N. F. (1982). Use of oscillatory deformation technique to determine clotting times and rigidities of milk clotted with different concentrations of rennet. *Journal of Food Science* **47** 1912-1915.

GARNOT, P., RANK, T. C. y OLSON, N. F. (1982). Influence of protein and fat contents of ultrafiltered milk on rheological properties of gels formed by chymosin. *Journal of Dairy Science* **65** (12) 2267-2273.

GATTI, C. A. y PIRES, M. S. (1995). Effect of monovalent cations on the kinetics of renneted milk coagulation. *Journal of Dairy Research* **62** 667-672.

GATTI, C. A., PIRES, M. S., ORELLANA, G. A. y PEREYRA, J. (1996). Kinetic evidence for steric destabilization of casein by rennet enzyme activity. *Journal of the Chemical Society*. *Faraday Transactions* **92** (14) 2575-2578.

GATTI, C. A., RISSO, P. H. y PIRES, M. S. (1995). Spectrofluorometric study on surface hydrophobicity of bovine casein micelles in suspension and during enzymic coagulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43** (9) 2339-2344.

GERVAIS, A. (1983). *Appareil de mesure des propriétés rhéologiques des semi-solides par cisaillement harmonique de rotation*. Thèse Docteur-Ingénieur. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Massy.

GHIONNA, C. DE H., CATILO, G., ANGELUCCI, M., ZAMELO, G. y RUBIO, R. (1984). Yield and composition of milk from local goats reared in Lucania. *Annali dell`Istituto Sperimentale per la Zootecnia* **17** (2) 155-166.

GIANGIACOMO, R., LIZZANO, R., BARZAGHI, S., CATTANEO, T. M. P. y BARROS, A.S. (1998). NIR and other luminometric methods to monitor the primary clotting phase of milk. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **6** 205-211.

GNAN, S. O., ERABATI, H. A. y RANA, H. S. (1985). The composition of Libyan goat's milk. *Australian Journal of Dairy Technology* **40** (4) 163-165.

GONÇ, S. (1982). Studies on the quality and Technological properties of goat milk from improved German breed, Maltase and cross breed F_1 and G_1 in the aegean sea

region and the effect of genotypes and other factors on milk properties. *21th International Dairy Congress,* Moscow, vol 1, book 2, 624.

GOULDEN, D. S. (1957). Diffuse reflexion spectra of dairy products in the near-infrared region. *Journal of Dairy Research* **24** 242-251.

GRAF, E. y BAUER, H. (1976). Milk and milk products. En *Food Emulsions*, Ed. Friberg, S., Marcel Dekker, New York.

GRAF, F., OSTERKORN, K., FAUTZ, J., FRAHM, K. y GALL, C. (1970). Calorific value of goats' milk. Arb. Inst. Tierzucht **8** 45. Citado por QUILES y HEVIA (1994).

GRANDPIERRE, C., GHISOLFI, J. y THOUVENOT, J. P. (1988). Étude biochimique du lait de chèvre. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **23** 367-374.

GRAPPIN, R. (1993). Reference and modern techniques for the measurement of protein and protein fractions in milk. *Milk proteins 93,* La Roche-sur-Foron, pp. 7-35.

GRAPPIN, R., JEUNET, R., PILLET, R. y LE TOQUIN, A. (1981). Etude des laits de chèvre. 1. Teneur du lait de chèvre en matière grasse, matière azotée et fractions azotées. *Le Lait* **61** 117-133.

GREEN, M. L. (1972). On the mechanism of milk clotting by rennin. *Journal of Dairy Research* **39** 55-63.

GREEN, M. L. (1973). Studies on the mechanism of clotting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **27** 278-285.

GREEN, M. L. (1984). Milk coagulation and the development of cheese texture. En *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, pp. 1-33, Ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc, New York.

GREEN, M. L. y CRUTCHFIELD, G. (1971). Density-gradient electrophoresis of native and of rennet-treated casein micelles. *Journal of Dairy Research* **38** 151-164.

GREEN, M. L., HOBBS, D. G., MORANT, S. V. y HILL, V.A. (1978). Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk II. Process of gel assembly. *Journal of Dairy Research* **45** 413-422.

GRIFFIN, M. C. A. (1987). Structural studies of casein micelles using photon correlation spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* **115** 499-506.

GROSCLAUDE, F., MAHÉ, M. F., BRIGNON, G., DI STASIO, L. y JEUNET, R. (1987). A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α_{S1}-casein. *Génétique Sélection Evolution* **19** (4) 399-412.

GRUEN, L. C. y TAO, Z. J. (1985). Time-dependent ultraviolet absorption changes in proteins at high pH. *International Journal of Peptide and Protein Research* **26** 381-389.

GUINEE, T. P., GORRY, C. B., O'CALLAGHAN, D. J., O'KENNEDY, B. T., O'BRIEN, N. y 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.

GUNASEKARAN, S. y AY, C. (1994). Evaluating milk coagulation with ultrasonics. *Food Technology* **48** 74-78.

GUNASEKARAN, S. y AY, C. (1996). Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics. *Journal of Food Process Engineering* **19** 63-73.

GUTHY, K., AUERSWALD, D. y BUCHHEIM, W. (1989). Electron microscopic and viscosimetric studies of the primary phase of rennet coagulation of milk. *Milchwissenschaft* **44** (9) 560-563.

GUTHY, K. y NOVAK, G. (1977). Observations on the primary phase of milk coagulation by rennet under standardized conditions. *Journal of Dairy Research* **44** 363-366.

HARDY, J. y FANNI, J. (1981). Application of reflection photometry to the measurement of milk coagulation. *Journal of Food Science* **46** 1956-1957.

HARDY, J., FANNI, J. y SCHER, J. (1985). Une méthode turbidimétrique de mesure de la coagulation du lait. *Revue Laitière Française* **441** 13-18.

HATFIELD, D. S. (1981). A new instrument to measure cheese curd rigidity, and preliminary trials in cheese-making. *Journal of the Society of Dairy Tecnology* **34** (4) 139-142.

HIGUCHI, W. I., SWARBRICK, J., HO, N. F., SIMONELLI, A. P. y MARTIN, A. (1987). Fenómenos de las partículas y dispersiones groseras. En *Farmacia*, Remington, pp. 423-460, Ed. Médica Panamericana, S. A., Buenos Aires.

HOLT, C. (1975). Casein micelle size from elastic and quasi-elastic light scattering measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* **400** 293-301.

HOLT, C. (1985). The milk salts: Their secretion, concentrations and physical chemistry. En *Developments in Dairy Chemistry*, vol 3, pp. 143-181, Fox, P. F., Ed. Elsevier Applied Science Publishers, London.

HOLT, C. (1992). Structure and stability of the bovine casein micelle. En *Advances in Protein Chemistry*, Afinsen, C. B., Sall, J. D. E. D., Richards, F. K. y Eisenberg, D. S., pp. 63-151, Ed. Academic Press, Inc., New York, NY.

HOLT, C. (1995). The biological function of casein micelles?. *HRI Year-book 1994*, pp. 60-69, Hannah Research Institute, Ayr.

HOLT, C. (1998). Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephacryl column chromatography. *Journal of Dairy Science* **81** (11) 2994-3003.

HOLT, C. y DALGLEISH, D. G. (1986). Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. *Journal of Colloid and Interface Science* **114** 513-524.

HOLT, C. y HORNE, D. S. (1996). The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **50** 85-111.

HOLTER, H. (1932). Uber die Labwirkung. *Biochemistre Zeitschrift* **255** 160-188.

HORI, T. (1985). Objective measurements of the process of curd formation during rennet treatment of milks by the Hot Wire method. *Journal of Food Science* **50** (4) 911-917.

HORI, T., MIYAWAKI, O. y YANO, T. (1989). In-line measurement of milk clotting by a hot-wire method. *5th International Conference on Engineering and Food*, Köln, Cologne, pp. 1-9.

HORNE, D. S. (1984). Steric effects in the coagulation of casein micelles by ethanol. *Biopolymers* **23** 989-993.

HORNE, D. S. (1987). Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discussions*. *Royal Society of Chemistry* **83** 259-270.

HORNE, D. S. (1992). Ethanol stability. En *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, Ed. P. F. Fox, Elsevier, London.

HORNE, D. S. (1995). Light scattering studies of colloid stability and gelation. En *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*, pp. 240-267, Ed. Dickinson, E., Blackie Academic & Professional, Glasgow.

HORNE, D. S. (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal* **8** 171-177.

HORNE, D. S. (1999). Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal* **9** 261-268.

HORNE, D. S. (2000). Casein micelles: structure and properties with special reference to goat milk. *7th International Conference on Goats*, Poitiers, pp 1015.

HORNE, D. S. y DAVIDSON, C. M. (1986). The effect of environmental conditions on the steric stabilization of casein micelles. *Colloid and Polymer Science* **264** 727-734.

HORNE, D. S. y DAVIDSON, C. M. (1990). The use of dynamic light-scattering in monitoring rennet curd formation. *Milchwissenschaft* **45** 712-715.

HORNE, D. S. y 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** 61-71.

HOSSAIN, M. A. (1976). *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber*. **28** 43. Citado por ZOON *et al*. (1988*a*).

HUETER, T. F., MORGAN, H. y COHEN, M. S. (1953). Ultrasonic attenuation in biological suspensions. *Journal of Acoustic Society of America* **25** (6) 1200-1201.

HUNTER, E. A., MCNULTY, D. A. y BANKS, J. M. (1997). Statistical design and analysis of experiments in cheese technology. *Lebensmittel -Wissenschaft und- Technologie*. **30** (2) 121-128.

HYLDIG, G. (1993). *Rennet coagulation. Effect of technological parameters on the enzymatic reaction and gel formation in milk and UF concentrates*. Ph.D. Thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

HYSLOP, D. B. (1989). Enzymatically initiated coagulation of casein micelles: a kinetic model. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **43** 163-170.

IMAFIDON, G. I. y FARKYE, N. Y. (1993). Rennet coagulability of high-heat treated milk influenced by time of pH adjustment. *Journal of Food Science* **58** (6) 1300-1302.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). (1987). *Determination of the clotting time of milk to which a milk-clotting enzyme solution has been added*. International IDF Standard 110A: Appendix A. Brussels.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). (1996). *Microbial coagulants: determination of total milk-clotting activity*. International IDF Standard 176: 1996. Brussels.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). (1997). *Bovine rennets: determination of total milk-clotting activity*. International IDF Standard 157ª:1997. Brussels.

IRIGOYEN, A., ARIZCUN, C., ORDÓÑEZ, A. I., IBÁÑEZ, F. C. y TORRE, P. (1998). Empleo del tromboelastografo para medir el tiempo de coagulacion de la leche de queseria: comparación con el metodo oficial. *Alimentaria* **Julio-Agosto** 53-57.

JABLONKA, M. S., MUNRO, P. A. y DUFFY, G. G. (1988). Use of light scattering techniques to study the kinetics of precipitation of mineral acid casein from skim milk. *Journal of Dairy Research* **55** 179-188.

JAUBERT, A. y MARTIN, P. (1992). Reverse-phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of α_{S1} and α_{S2} genetic variants. *Le Lait* **72** 235-247.

JEN, J. J. y ASHWORTH, U. S. (1970). Factors influencing the curd tension of rennet-coagulated milk. Salt balance. *Journal of Dairy Science* **53** 1201-1206.

JENNESS, R., (1980). Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *Journal of Dairy Science* **63** 1605-1630.

JENNESS, R. y KOOP, J. (1962). Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **16** 153-164.

JENNESS, R., SHIPE, W. F. J. y SHERBON, J. W. (1974). Physical Properties of Milk, En *Fundamentals of Dairy Chemistry*, Ed. Webb, B. H., Johnson, A. H. y Alford, J. A., AVI, Westport, Connecticut.

JIMÉNEZ, J. y MACARULLA, J. M. (1984). *Fisico-Química Fisiológica*, pp. 67-90., Ed. Interamericana- Mc Graw-Hill, Madrid.

JOHNSTON, D. E. (1984). Application of polymer cross-linking theory to rennet-induced milk gels. *Journal of Dairy Research* **51** 91-101.

JOU, D., LLEBOT, J. E. y PÉREZ, C. (1994). *Física para las Ciencias de la Vida*, pp. 383-486, Ed. Mc Graw-Hill- Interamericana de España, S. A., Madrid.

JUÁREZ, M., RAMOS, M. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, C. (1991). *Quesos Españoles de Leche de Cabra*, Ed. Fundación de Estudio Lácteos (FESLAC), Madrid.

KALAB, M., PHIBBS-TODD, B. E. y ALLAN-WOJTAS, P. (1982). Milk gel structure XIII. Rotary shadowing of casein micelles for electron microscopy. *Milchwissenschaft* **37** 513-518.

KAMISHIKIRYO-YAMASHITA, H., ORITANI, Y., TAKAMURA, H. y MATOBA, T. (1994). Protein content in milk by near-infrared spectroscopy. *Journal of Food Science* **59** (2) 313-315.

KAYE, W. (1954). Near-infrared spectroscopy. A review. I. Spectral identification and analytical applications. *Spectrochimica Acta* **6** 257-287.

KEOGH, M. K. (1966). Master Science Thesis, University College, Cork, Ireland.

KIM, B. Y., KIM, M. H. y KINSELLA, J. E. (1992). Effect of salts and temperature upon the rate and extent of aggregation of casein during acidification of milk. *Korean Journal of Food Science and Technology* **24** (1) 42-48.

KIRCHMEIER, O. (1973). Arrangement of components, electric charge and interaction energies of casein particles. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **27** 191-198.

KNOOP, A. M. (1977). *Deutsche Milchwirtschaft* **28** 1154. Citado por GREEN (1984).

KOPELMAN, I. J. y COGAN, U. (1976). Determination of clotting power of milk clotting enzymes. *Journal of Dairy Science* **59** (2) 196-199.

KOROLCZUK, J. (1988). Refractometric signal evolution during rennet coagulation of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **42** 313-322.

KOROLCZUK, J. y MAUBOIS, J. L. (1988). Effect of pH, calcium concentration and temperature on the evolution of the refractometric signal produced during rennet coagulation of milk. *Journal of Dairy Research* **55** 81-88.

KOROLCZUK, J., MAUBOIS, J. L. y LOHEAC, J. (1986). Suivi de la coagulation-présure du lait à l'aide d'un nouveau capteur réfractométrique. *Le Lait* **66** (4) 327-339.

KOWALCHYK, A. W., y OLSON, N. F. (1977). Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. *Journal of Dairy Science* **60** (8) 1256-1259.

KOWALCHYK, A. W. y OLSON, N. F. (1978). Firmness of enzimatically-formed milk gels measured by resistance to oscillatory deformation. *Journal of Dairy Science* **61** 1375-1379.

KRIKORIAN, S. E. y MAHPOUR, M. (1973). The identification and origin of N-H overtone and combination bands in the near-infrared spectra of simple primary and secondary amides. *Spectrochimica Acta* **29A** 1233-1246.

KUAYE, A. Y. (1994). An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chemistry* **49** 207-211.

KUMOSINSKI, T. F., PESSEN, H., BROWN, E. M., KAKALIS, L. T. y FARRELL, H. M. J. (1991). Quaternary structural changes of bovine casein by small-angle X-ray scattering. En *Interactions of Food Proteins*, pp 182-194, Parris, N. y Barford, R., Ed. ACS Symp. Ser. 454., American Chemical Society, Washington, DC.

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.

LAGOUEYTE, N., LAGAUDE, A. y TARODO DE LA FUENTE, B. (1995). Rheological properties of renneted reconstituted milk gels by piezoelectric Viscoprocess: effects of temperature and calcium phosphate. *Journal of Food Science* **60** (6) 1344-1363.

LAPORTE, M. F., MARTEL, R. y PAQUIN, P. (1998). The near-infrared optic probe for monitoring rennet coagulation in cow's milk. *International Dairy Journal* **8** (7) 659-666.

LAW, A. J. R., PAPOFF, C. M., DALGLEISH, D. G. y CAMPUS, R. L. (1992). Quantitative fractionation of ovine casein by cation-exchange FPLC. *Milchwissenschaft* **47** 279.

LAW, A. J. R. y TZIBOULA, A. (1992). Quantitative fractionation of caprine casein by cation-exchange FPLC. *Milchwissenschaft* **47** 558-562.

LAWRENCE, R. C. y CREAMER, L. K. (1969). The action of calf rennet and other proteolytic enzymes on κ-casein. *Journal of Dairy Research* **36** 11-20.

LEE, H. O., LUAN, H. y DAUT, D. G. (1992). Use of an ultrasonic technique to evaluate the rheological properties of cheese and dough. *Journal of Food Engineering* **16** (1/2) 127-150.

LEFEBVRE-CASES, E., GASTALDI, E., VIDAL, V., MARCHESSEAU, S., LAGAUDE, A., CUQ, J. L. y TARODO DE LA FUENTE, B. (1998). Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *Journal of Dairy Science* **81** (4) 932-938.

LEHNINGER, A. L. (1987). *Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*, Ed. Omega, S. A., Barcelona.

LE MENS, P. (1985). Propriétés physico-chimiques nutritionnelles et chimiques. En *Laits et Produits Laitiers*. *Vache*. *Brebis*. *Chevre*, vol. 1., pp. 349-368, Luquet, F. M., Ed.Technique et Documentation-Lavoisier, Paris.

LEWIS, M. J. (1993). *Propiedades Físicas de los Alimentos y de los Sistemas de Procesado*, Ed. Abribia, S. A., Zaragoza.

LIBBEY, L. M. y ASHWORTH, U. S. (1960). Spectrophotometric observations on the reaction of rennin with sodium caseinate. *Journal of Dairy Science* **43** 856.

LIEN, E. J. y KENNON, L. (1987). Estructura molecular, propiedades y estados de la materia. En *Farmacia*, pp.236-268, Ed. Médica Panamericana, S.A., Buenos Aires.

LOCHTE-WATSON, K. R., PAYNE, F. A., GATES, R. S. y HICKS, C. L. (1998). Effects of pH, protein, fat, and calcium on diffuse reflectance of milk. *Transactions of the ASAE* **41** (3) 701-707.

LODES, A., KRAUSE, I., BUCHBERGER, J., AUMANN, J. y KLOSTERMEYER, H. (1996). The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 1. Casein micelle size and the content of non-glycosylated κ-casein. *Milchwissenschaft* **51** (1) 368-373.

LOMHOLT, S. B. (1996). *The kinetics of the aggregation of casein micelles by rennet*. Ph.D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

LOMHOLT, S. B. y QVIST, K. B. (1997). Relationship between rheological properties and degree of κ-casein proteolysis during renneting of milk. *Journal of Dairy Research* **64** 541-549.

LOMHOLT, S. B., WORNING, P., OGENDAL, L., QVIST, K. B., HYSLOP, D. B. y BAUER, R. (1998). Kinetics of the renneting reaction followed by measurement of turbidity as a function of wavelength. *Journal of Dairy Research* **65** 545-554.

LÓPEZ, M. B. (1993). *Cuajos y enzimas coagulantes en la elaboración de queso de cabra en la región de Murcia*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.

LÓPEZ, M. B., BOTET, M. J., HELLÍN, P., LUNA, A. y LAENCINA, J. (1995). Effect of thermal treatment on goat milk clotting time. *Milchwissenschaft* **50** (3) 126-129.

LÓPEZ, M. B., JORDÁN, M. J., HELLÍN, P., CASTILLO, M. y LAENCINA, J. (1997*a)*. Kinetics of κ-casein hydrolysis by different rennet and coagulant enzymes in murciano-granadina goat milk. *Milchwissenschaft* **52** (7) 370-373.

LÓPEZ, M. B., JORDÁN, M. J., LUNA, A., BAÑÓN, S., GARRIDO, M. D. y LAENCINA, J. (1997b). Diffuse reflectance profiles of goat's milk during coagulation by various enzymes. *Food Science and Technology International* **3** 299-301.

LÓPEZ, M. B. y LAENCINA, J. (1994). Viscosimetric measurement of milk clotting time. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* **45** (3) 169-182.

LÓPEZ, M. B., LOMHOLT, S. B. y QVIST, K. B. (1998). Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effect of pH and enzyme concentration. *International Dairy Journal* **8** 289-293.

LÓPEZ, M. B., LUNA, A., LAENCINA, J. y FALAGÁN, A. (1999). Cheese-making capacity of goat´s milk during lactation: influence of stage and number of lactations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79** 1105-1111.

LUCEY, J. A. y FOX, P. F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *Journal of Dairy Science* **76** (6) 1714-1724.

LUCEY, J. A., GORRY, C. y FOX, P. F. (1993*a*). Rennet coagulation properties of heated milk. *Agricultural Science in Finland* **2** 361-369.

LUCEY, J. A., GORRY, C. y FOX, P. F. (1993*b*). Methods for improving the rennet coagulation properties of heated milk. *Cheese Yield & Factors Affecting its Control,* IDF Seminar, Cork, 448-456.

LUCISANO, M., PERI, C. y DONATI, E. (1985). Studies on coagulation of milk ultrafiltration retentates. I. Coagulation kinetics. *Milchwissenschaft* **40** 600-604.

LUQUET, F. M. (1985). *Laits et Produits Laitiers. Vache. Brebis. Chevre*, vol. 1, Ed.Technique et Documentation-Lavoisier, Paris.

MAHIEU, H., LE JAOUEN, J. C., LUQUET, F. M. y MOUILLET, L. (1977). Etude comparative de la composition et de la contamination des laits des espèces laitières bovines, ovines et caprines. *Le Lait* **57** 561-571.

MARIANI, P., CORRIANI, F., FOSSA, E. y PECORARI, M. (1987). Composizione chimica, ripartizione delle frazioni azotate e caratteristiche di coagulazione del latte di capra durante un ciclo di produzione. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* **38** 7-30.

MARQUES, F. (1977). Algunos parámetros lecheros de la agrupación murciano-granadina. *Symposium sobre la cabra en los países mediterráneos*, Málaga, Granada, Murcia, 354-361.

MARSHALL, R. J., HATFIELD, D. S. y GREEN, M. L. (1982). Assessment of two instruments for continuous measurement of the curd-firming of renneted milk. *Journal of Dairy Research* **49** 127-135.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, C., JUÁREZ, M., RAMOS, M. y MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J. (1988). Composición de la leche de cabra de razas Murciana y Granadina. *Anales de Bromatología* **40** (2) 237-248.

MATISSEK, R., SCHNEPEL, F. M. y STEINER, G. (1998*). Análisis de los Alimentos: Fundamentos, Métodos, Aplicaciones*, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza.

MAYES, J. J. y SUTHERLAND, B. J. (1984). Coagulum firmness and yield in cheddar cheese manufacture – the role of the curd firmness instrument in determining cutting time. *The Australian Journal of Dairy Technology* **June** 69-73.

MBA, A. U., BOTO, B. S. y OYENUGA, V. A. (1975). Studies on the milk composition of West African dwarf, Red Sokoto and Saanen goats at different stages of lactation. I. Total solids, butterfat, solids-non fat, protein, lactose and energy contents of milk. *Journal of Dairy Research* **42** 217-226.

MCGANN, T. C. A., KEARNEY, R. D. y DONNELLY, W. J. (1979). Developments in column chromatography for the separation and characterization of casein micelles. *Journal of Dairy Research* **46** 307-311.

MCMAHON, D. J. y BROWN, R. J. (1982). Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. *Journal of Dairy Science* **65** (8) 1639-1642.

MCMAHON, D. J. y BROWN, R. J. (1983). Milk coagulation time: linear relationship with inverse of rennet activity. *Journal of Dairy Science* **66** (2) 341-344.

MCMAHON, D. J. y BROWN, R. J. (1984*a*). Composition, structure, and integrity of casein micelles: a review. *Journal of Dairy Science* **67** 499-512.

MCMAHON, D. J. y BROWN, R. J. (1984*b*). Enzymic coagulation of casein micelles: a review. *Journal of Dairy Science* **67** (5) 919-929.

MCMAHON, D. J. y BROWN, R. J. (1990). Development of surface functionality of casein particles as the controlling parameter of enzymic milk coagulation. *Colloids and Surfaces* **44** 263-279.

McMahon, D. J., Brown, R. J. y Ernstrom, C. A. (1984*a*). Enzymic coagulation of milk casein micelles. *Journal of Dairy Science* **67** (4) 745-748.

McMahon, D. J., Brown, R. J., Richardson, G. H. y Ernstrom, C. A. (1984*b*). Effects of calcium, phosphate, and bulk culture media on milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science* **67** (5) 930-938.

McMahon, D. J. y McManus, W. R. (1998). Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *Journal of Dairy Science* **81** (11) 2985-2993.

McMahon, D. J., Richardson, G. H. y Brown, R. J. (1984*c*). Enzymic milk coagulation: role of equations involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *Journal of Dairy Science* **67** (6) 1185-1193.

McQueen, D. H., Wilson, R., Kinnunen, A. y Jensen, E. P. (1995). Comparison of two infrared spectroscopic methods for cheese analysis. *Talanta* **42** 2007-2015.

Mehaia, M. A. (1994). Effect of milk and calcium concentration and pH on rennet coagulation time of UF camel milk. *Egyptian Journal of Dairy Science* **22** 297-306.

Mehaia, M. A. y Cheryan, M. (1983). The secondary phase of milk coagulation. Effect of c, pH and temperature on clotting activity. *Milchwissenschaft* **38** (3) 137-140.

Mehaia, M. A. y El-Khadragy, S. M. (1998). Physicochemical characteristics and rennet coagulation time of ultrafiltered goat milk. *Food Chemistry* **62** (3) 257-263.

Mellema, M., Leermakers, F. A. M. y Kruif, C. G. (1999). Molecular mechanism of the renneting process of casein micelles in skim milk, examined by viscosity and light-scattering experiments and simulated by model SCF calculations. *Langmuir* **15** (19) 6304-6313.

Mendiola, F. J. (2000). *Obtención y caracterización del coagulante de leche normalizado de origen vegetal (Cynara cardunculus) y su aplicación de queso de La Serena*. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, Badajoz.

Mercier, J. C., Grosclaude, F. y Ribadeau-Dumas, B. (1972). *Milchwissenschaft* **27** 402-407. Citado por Brule y Lenoir (1989).

MERIN, U., TALPAZ, H. y FISHMAN, S. (1989). A mathematical model for the description of chymosin action on casein micelles. *Journal of Dairy Research* **56** 79-86.

MIDDLETON, G. y FITZ-GERALD, C. H. (1981). Chemical analysis of goat's milk produced in South East Queensland. *Australian Journal of Dairy Technology* **36** 115-117.

MILES, C. A., SHORE, D. y LANGLEY, K. R. (1990). Attenuation of ultrasound in milks and creams. *Ultrasonics* **28** 394-400.

MORA-GUTIERREZ, A., KUMOSINSKI, T. F. y FARRELL, H. M. J. (1991). Quantification of α_{S1}-casein in goat milk from Frech-Alpine and Anglo-Nubian breeds using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Science* **74** 3303-3307.

MORR, C. V. (1967). Effect of oxalate and urea on the ultra-centrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *Journal of Dairy Science* **50** 1744-1751.

MUHR, A. H. y BLANSHARD, J. M. V. (1982). *Polymer* **23** (Suppl.). Citado por VAN HOOYDONK *et al*. (1984).

MULET, A., BENEDITO, J. y ROSSELLO, C. (1999). Ultrasonic velocity in cheddar cheese as affected by temperature. *Journal of Food Science* **64** (6) 1038-1041.

NIKI, R., KIM, G. Y., KIMURA, T., TAKAHASHI, K., KOHYAMA, K. y NISHINARI, K. (1994*a*). Physical properties and microstructure of rennet gels from casein micelles of different sizes. *Milchwissenschaft* **49** (6) 325-329.

NIKI, R., KOHYAMA, K., SANO, Y. y NISHINARI, K. (1994*b*). Rheological study on the rennet-induced gelation of casein micelles with different sizes. *Polymer Gels and Networks* **2** 105-118.

NOËL, Y., RAMET, J. P., GERVAIS, A., LABLÉE, J. y CERF, O. (1989). Propiedades físicas del coágulo. En *El Queso*, Eck, A., pp.187-197, Ed. Omega, S. A., Barcelona.

O'CALLAGHAN, D. J., O'DONNELL, C. P. y PAYNE, F. A. (1999*a*). A comparison of on-line techniques for determination of curd setting time using cheesemilks under different rates of coagulation. *Journal of Food Engineering* **41** 43-54.

O'CALLAGHAN, D. J., O'DONNELL, C. P. y PAYNE, F. A. (1999*b*). Effect of protein content of milk on the storage and loss moduli in renneting milk gels. *Journal of Food Process Engineering* **22** 249-261.

OKIGBO, L. M., RICHARDSON, G. H., BROWN, R. J. y ERNSTROM, C. A. (1985). Effects of pH, calcium chloride, and chymosin concentration on coagulation properties of abnormal and normal milk. *Journal of Dairy Science* **68** (10) 2527-2533.

O'LEARY, P. A. y FOX, P. F. (1973). Ovine pepsin: suitability as a rennet substitute. *Irish Journal of Agricultural Research* **12** 267-272.

OLSEN, E. D. (1990). *Métodos Ópticos de Análisis*, Ed. Reverté, S. A., Barcelona.

OLSON, N. F. y BOTTAZZI, V. (1977). Rheology of milk gels formed by milk-clotting enzymes. *Journal of Food Science* **42** (3) 669-673.

ONO, T. y CREAMER, L. K. (1986). Structure of goat casein micelles. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **21** 57-64.

ONO, T., KOHNO, H., ODAGIRI, S. y TAKAGI, T. (1989). Subunit components of casein micelles from bovine, ovine, caprine and equine milks. *Journal of Dairy Research* **56** 61-68.

ORTIZ DE APODACA, M. J., AMIGO, L. y RAMOS, M. (1994). Study of the milk-clotting and proteolytic activity of calf rennet, fermentation-produced chymosin, vegetable and microbial coagulants. *Milchwissenschaft* **49** (1) 13-16.

PAQUET, J., LACROIX, C., AUDET, P. y THIBAULT, J. (2000). Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation processes for production of cheese starters. *International Dairy Journal* **10** 391-399.

PARKASH, S. y JENNESS, R. (1968). The composition and characterization of goat´s milk. A review. *Dairy Science Abstracts* **230** 67-87.

PARKER, T. G. y DALGLEISH, D. G. (1977). The use of light-scattering and turbidity measurements to study the kinetics of extensively aggregating proteins: α_s-casein. *Biopolymers* **16** 2533-2547.

PASSOS, E. F., MONTEIRO, P. S., OLIVEIRA, R. C., MARTINS, J. G. O., ALVES, H. G. y BRANDAO, S. C. C. (1999). Predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production using a heated thermistor. *Journal of Food Science* **64** (5) 879-882.

PAYENS, T. A. J. (1966). Association of caseins and their possible relation to structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science* **49** 1317-1324.

PAYENS, T. A. J. (1976). On the enzyme-triggered clotting of casein: a preliminary account. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **30** 55-59.

PAYENS, T. A. J. (1977). On enzymatic clotting processes II. The colloidal instability of chymosin-treated casein micelles. *Biophysical Chemistry* **6** 263-270.

PAYENS, T. A. J. (1979). Casein micelles: the colloid-chemical approach. *Journal of Dairy Research* **46** 291-306.

PAYENS, T. A. J. (1984). The relationship between milk concentration and rennet coagulation time. *Journal of Applied Biochemistry* **6** 232-239.

PAYENS, T. A. J. (1989). The enzyme-triggered coagulation of casein micelles. *Advances in Colloid and Interface Science* **30** 31-65.

PAYENS, T. A. J., WIERSMA, A. K. y BRINKHUIS, J. (1977). On enzymatic clotting processes. I. Kinetics of enzyme-triggered coagulation reactions. *Biophysical Chemistry* **6** 253-262.

PAYNE, F. A. (1995). Automatic control of coagulum cutting in cheese manufacturing. *Applied Engineering in Agriculture* **11** (5) 691-697.

PAYNE, F. A., FREELS, R. C., NOKES, S. E. y GATES, R. S. (1998). Diffuse reflectance changes during the culture of cottage cheese. *Transactions of the ASAE* **41** (3) 709-713.

PAYNE, F. A., GATES, R. S., FANNIN, B. L. (1996). Measurement precision for a fiber optic diffuse reflectance sensor. *Transactions of the ASAE* **39** (6) 2193-2198.

PAYNE, F. A. y HICKS, C. L. (1992). Assignee to University of Kentucky Research Foundation. *Method of predicting cut-time of milk coagulum in cheese-making process*. United States Patent nº US005172193A.

PAYNE, F. A., HICKS, C. L., MADANGOPAL, S. y SHEARER, S. A. (1993*a*). Fiber optic sensor for predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production. *Transactions of the ASAE* **36** (3) 841-847.

PAYNE, F. A., HICKS, C. L. y SHEN, P. S. (1993*b*). Predicting optimal cutting time of coagulating milk using diffuse reflectance. *Journal of Dairy Science* **76** (1) 48-61.

PAYNE, F. A., MADANGOPAL, S., HICKS, C. L. y SHEARER, S. A. (1990). Fiber optic milk coagulation sensor for cut-time detection. *Food Processing Automation Conference*, American Society of Agricultural Engineers, Publication 02-90, St. Joseph. Michigan, pp. 173.

PEARCE, K. N. (1976). Moving boundary electrophoresis of native and rennet-treated casein micelles. *Journal of Dairy Research* **43** 27-36.

PERI, C., LUCISANO, M. y DONATI, E. (1985). Studies on coagulation of milk ultrafiltration retentates II. Kinetics of whey syneresis. *Milchwissenschaft* **40** (11) 650-652.

PERI, C., PAGLIARINI, E., IAMETTI, S. y BONOMI, F. (1990). A study of surface hydrophobicity of milk proteins during enzymic coagulation and curd hardening. *Journal of Dairy Research* **57** 101-108.

PICÓN, A., GAYA, P. y NUÑEZ, M. (1993). Quantitative determination of chymosin activity by thrombelastography. *Food Chemistry* **47** 209-212.

PICQUE, D., CATTENOZ, T., LATRILLE, E., PERRET, B. y CORRIEU, G. (1996). *Dispositif et procédé de contrôle de la fabrication de fromages*. INRA patent nº 96 12022.

PIERRE, A., MICHEL, F., VON LE GRAËT, Y. y ZAHOUTE, L. (1998). Casein micelle size in relation with casein composition and α_{s1}, α_{s2}, β and κ-casein contents in goat milk. *Le Lait* **78** 591-605.

PIERRE, A., MICHEL, F. y ZAHOUTE, L. (1999). Composition of casein micelles in relation to size in goat milks with A and null α_{s1}-casein variants. *International Dairy Journal* **9** 179-182.

PINTO, C. M., VILLENA, P. J. y JOFFRE, B. H. (1984). Study of milk composition in Anglo-Nubian goats. *Agro Sur* **12** (2) 163-173.

PIRES, M. S., GATTI, C. A., ORELLANA, G. A. y PEREYRA, J. (1997). Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: importance of steric stabilization after κ-casein proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** (11) 4446-4451.

PIRES, M. S., ORELLANA, G. A. y GATTI, C. A. (1999). Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: action of Ca^{2+} and pH. *Food Hydrocolloids* **13** 235-238.

PIRISI, A., COLIN, O., LAURENT, F., SCHER, J. y PARMENTIER, M. (1994). Comparison of milk composition, cheesemaking properties and textural characteristics of the cheese from two groups of goats with a high or low rate of α_{S1}-casein synthesis. *International Dairy Journal* **4** 329-345.

PLINT, M. A., BURNETT, J. y SCOTT BLAIR, G. W. (1967). An improved dairy torsiometer. *Dairy Industries* **32** 104-105.

POVEY, M. J. W., GOLDING, M., HIGGS, D. y WANG, Y. (1999). Ultrasonic spectroscopy studies of casein in water. *International Dairy Journal* **9** 299-303.

PURI, *et al*. (1963). Studies in physico-chemical properties of milk. *Indian Journal of Dairy Science* **16** 47-50. Citado por LE MENS (1985).

QUILES, A. y HEVIA, M. L. (1994). *La Leche de Cabra*, Ed. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, Murcia.

QURESHI, H. A., DESHPAUDE, K. S. y BONDE, H. S. (1981). Studies on chemical composition of goat milk. *Indian Veterinary Journal* **58** 212-214.

RAMET, J. P. y WEBER, F. (1980). Contribution a l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le Lait* **60** 1-13.

RANAWANA, S. S. E. y KELLAWAY, R. C. (1977). Responses to postruminal infusions of graded levels of casein in lactating goats. *British Journal of Nutrition* **37** 67-79.

RAYNAL, K. y REMEUF, F. (2000). Effect of storage at 4ºC on the physicochemical and renneting properties of milk: a comparison of caprine, ovine and bovine milks. *Journal of Dairy Research* **67** 199-207.

REDDY, CH. S. y DATTA, A. K. (1994). Thermophysical properties of concentrated reconstituted milk during processing. *Journal of Food Engineering* **21** 31-40.

REMEUF, F., COSSIN, V., DERVIN, C., LENOIR, J. y TOMASSONE, R. (1991). Relations entre les caractères physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Le Lait* **71** 397-421.

REMEUF, F. y LENOIR, J. (1985). Caractéristiques physico-chimiques de laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation para la présure. *Revue Laitière Française* **446** 32-40.

REMEUF, F. y LENOIR, J. (1986). Relationship between the physico-chemical characteristics of goat´s milk and its rennetability. *International Dairy Federation Bulletin* **202** 68-72.

REMEUF, F., LENOIR, J. y DUBY, C. (1989). Etude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Le Lait* **69** 499-518.

REMEUF, F., PICQUE, D. y CORRIEU, G. (1993). The MEX-3 suspended solids meter with RD-20/10 sensor in milk coagulation. *BTG Application Bulletin AP1050.01e*, Zellweger, Nunn Brook Rd, The County Estate, Sutton-in-Ashfield, NG17 2HU, England.

REMEUF, F., VERDALET-GUZMAN, I. y LENOIR, J. (1995). Technological adjustment of goat milk containing low synthesis-rate α_{S1}-casein variants. *International Dairy Journal* **5** 381-392.

REUTER, H., HISSERICH, D. y PROKOPEX, D. (1981). Study on the formal kinetics of rennet coagulation of milk concentrated by ultrafiltration. *Milchwissenschaft* **36** 13-15.

RICHARDSON, B. C. y CREAMER, L. K. (1974). Comparative micelle structure. III. The isolation and chemical characterization of caprine β_1-casein y β_2-casein. *Biochimica et Biophysica Acta* **365** 133-137.

RICHARDSON, G. H., OKIGBO, L. M. y THORPE, J. D. (1985). Instrument for measuring milk coagulation in cheese vats. *Journal of Dairy Science* **68** (1) 32-36.

RIDDELL-LAWRENCE, S. y HICKS, C. L. (1989). Effect of curd firmness on stirred curd cheese yield. *Journal of Dairy Science* **72** (2) 313-321.

RIEL, R. (1991). Composición y estructura físico-química de la leche. En *Ciencia y Tecnología de la Leche*, Amiot, J., pp. 1-53, Ed. Acribia, S.A., Zaragoza.

RISSO, P. H., GATTI, C. A., ZERPA, S. M. y PÉREZ, G. R. (2000). Comparative study of the action of anionic and non-ionic hydrophobic fluorescent markers on the enzymic coagulation of heated bovine casein micelles. *Food Hydrocolloids* **14** 179-185.

RODRIGUEZ-OTERO, J. L., HERMIDA, M. y CENTENO, J. (1997). Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** (8) 2815-2819.

ROEFS, S. P. F. M., VAN VLIET, T., VAN DEN BIJGAART, H. J. C. M., DE GROOT-MOSTERT, A. E. A. y WALSTRA, P. (1990). Structure of casein gels made by combined acidification and rennet action. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **44** 159-188.

ROLLEMA, H. S. (1992). Casein association and micelle formation. En *Advanced Dairy Chemistry*, vol. 1, pp. 111-140, Fox, P. F., Ed. Elsevier Applied Science Publishers, London.

ROSS-MURPHY, S. B. (1995). Rheological characterisation of gels. *Journal of Texture Studies* **26** 391-400.

RUEGG, M., LUSCHER, M. y BLANC, B. (1974). Hydration of native and rennin coagulated caseins as determined by differential scanning calorimetry and gravimetric sorption measurements. *Journal of Dairy Science* **57** 387-393.

RUETTIMANN, K. W. y LADISCH, M. R. (1987). Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation. *Enzyme and Microbial Technology* **9** 578-589.

SACHDEVA, K. K., SENGAR, O. P. S., SINGH, S. N. y LINDAHL, I. L. (1974). Studies on goats. 2. Effect of plane of nutrition on milk production and composition. *Milchwissenschaft* **29** 471-475.

SANJUAN E. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1994). Influencia de algunos factores sobre el tiempo de coagulación por cuajo vegetal (*Cynara sp.*). *Alimentación, Equipos y Tecnología* **Julio-Agosto** 69-73.

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. y SHEARER, S. A. (1992). Selection of near-infrared wavelengths for monitoring milk coagulation using principal component analysis. *Transactions of the ASAE* **35** (5) 1597-1605.

SARAF, B. y SAMAL, K. (1984). Ultrasonic velocity absorption in reconstituted powdered milk, part II. *Acustic* **56** 61-66.

SAS. (1995). *Statistical Analysis System*. Versión 6.11. SAS Institute, Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA.

SAS. (1999). *Statistical Analysis System*.Versión 8.00. SAS Institute, Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA.

SASIC, S. y OZAKI, Y. (2001). Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. 1. Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least-squares regression and band assignment. *Analytical Chemistry* **73** (1) 64-71.

SAWAYA, W. N., KHAN, P. y AL-SHALHAT, F. (1984). Physical and chemical characteristics of ghee and butter from goat's and sheep's milk. *Food Chemistry* **14** 227-232.

SCHAR, W. y FLUCKIGER, E. (1982). Ein neues Gerat zur messung des verfestigungs verlaufes von milchgallerten. *Lebensmittel -Wissenschaft und- Technologie* **15** (5) 16.

SCHER, J. y HARDY, J. (1993). Study of the evolution of casein micelle size distribution after renneting by means of quasielastic light scattering. *The Australian Journal of Dairy Technology* **48** 62-65.

SCHMIDT, D. G. (1980). Colloidal aspects of casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **34** 42-64.

SCHMIDT, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. En *Developments in Dairy Chemistry*, vol. 1, pp. 61-86, Fox, P. F., Ed. Elsevier Applied Science Publishers, London.

SCHMIDT, D. G. y BUCHHEIM, W. (1970). Elektronenmikroskopische untersuchung der feinstuktur von caseinmicellen in kuhmilch. *Milchwissenschaft* **25** 596-600.

SCHMIDT, R. H. y MORRIS, H. A. (1984). Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems. *Food Technology* **38** (5) 85-96.

SCHMIDT, D. G. y PAYENS, T. A. J. (1976). *Surface and Colloids Science*, vol. 9, Ed. Matijevic, E., Wiley, New York.

SCHMUTZ, M. y PUHAN, Z. (1978). Rennet-coagulation of ultrafiltrated milk. *Schweiz. Milchw. Firschung* **7** 69-74. Citado por MEHAIA.y EL-KHADRAGY (1998).

SCHORSCH, C., CARRIE, H., CLARK, A. H. y NORTON, I. T. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. *International Dairy Journal* **10** 519-528.

SCHOTT, H. (1987). Dispersiones coloidales. En *Farmacia*. Remington, pp. 381-422, Ed. Médica Panamericana, S. A., Buenos Aires.

SCOTT-BLAIR, G. W. y BURNETT, J. (1958). Physical changes in milk caused by the action of rennet. 1. Description of apparatus for measuring rigidity moduli and internal viscosities, tests of reliability and some observations on syneresis. *Journal of Dairy Research* **25** 297-303.

SCOTT-BLAIR, G. W. y BURNETT, J. (1959). Physical changes in milk caused by the action of rennet. IV. Effects of varying rennet concentration and temperature. *Journal of Dairy Research* **26** 58-62.

SCOTT-BLAIR, G. W. y BURNETT, J. (1963*a*). A simple method for detecting an early stage in coagulation of renneted milk. *Journal of Dairy Research* **30** 383-390.

SCOTT-BLAIR, G. W. y BURNETT, J. (1963*b*). An equation to describe the rate of setting of blood and milk. *Biorheology* **1** 183-191.

SCOTT-BLAIR, G. W. y OOSTHUIZEN, J. C. (1961). A viscometric study of the breakdown of casein in milk by rennin and rennet. *Journal of Dairy Research* **28** 165-173.

SHALABI, S. I. y FOX, P. F. (1982). Influence of pH on the rennet coagulation of milk. *Journal of Dairy Research* **49** 153-157.

SHARMA, S. K., HILL, A. R., GOFF, H. D. y YADA, R. (1989). Measurement of coagulation time and curd firmness of renneted milk using a Nametre viscometer. *Milchwissenschaft* **44** (11) 682-685.

SHARMA, S. K., HILL, A. R. y MITTAL, G. S. (1992). Evaluation of methods to measure coagulation time of ultrafiltered milk. *Milchwissenschaft* **47** (11) 701-704.

SHARMA, S. K., HILL, A. R. y MITTAL, G. S. (1993). Effect of milk concentration, pH and temperature on aggregation kinetics and coagulation properties of ultrafiltered (UF) milk. *Food Research International* **26** 81-87.

SHAW, D. J. (1970). *Introducción a la Química de Superficies y Coloides*, Ed. Alhambra, S. A., Madrid.

SINGH, N. P., SACHDEVA, K. K. y SENGAR, O. P. (1972). A study on the nitrogen distribution in goats' milk. *Milchwissenschaft* **27** 165-167.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J. y NIEMAN, T. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*, Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U., Madrid.

SKOOG, D. A., WEST, D. M. y HOLLER, F. J. (1995). *Química Analítica*, Ed. McGraw-Hill/Interamericana de México, S. A. de C. V., México.

SLATTERY, C. W. y EVARD, R. (1973). A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochimica et Biophysica Acta* **317** 529-538.

SOMMER, H. H. y MATSEN, H. (1935). The relation of mastitis to rennet coagulability and curd strength of milk. *Journal of Dairy Science* **18** 741-749.

SPREER, E. (1991). *Lactología Industrial*, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza.

SPSS (1999). *Statistical Packages for the Social Sciences*. Version 9.0.1. SPSS Inc., 233 S. Wacker Drive, Chicago, IL, USA.

STEINSHOLT, K. (1973). The use of an Instron Universal Testing Instrument in studying the rigidity of milk during coagulation by rennin. *Milchwissenschaft* **28** 94-97.

STORCH, V. y SEGELCKE. T. (1874). *Milchforsch, Milchprax*. **3** 997. Citado por MCMAHON y BROWN (1983).

STORRY, J. E. y FORD, G. D. (1982*a*). Development of coagulum firmness in renneted milk –a two-phase process. *Journal of Dairy Research* **49** 343-346.

STORRY, J. E. y FORD, G. D. (1982*b*). Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. *Journal of Dairy Research* **49** 469-477.

STORRY, J. E., GRANDISON, A. S., MILLARD, D., OWEN, A. J. y FORD, G. D. (1983). Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research* **50** (2) 215-229.

STOTHART, P. H. y CEBULA, D. J. (1982). Small-angle neutron scattering study of bovine casein micelles and sub-micelles. *Journal of Molecular Biology* **160** 391-395.

STRYER, L. (1988). *Bioquímica*, Ed. Reverté. S. A., Barcelona.

SWAISGOOD, H. E. (1996). Characteristics of milk. En *Food Quemistry*, pp. 841-878, Ed. Fennema, O. R., Marcel Dekker, Inc., New York.

TOBITANI, A., YAMAMOTO, H., SHIOYA, T. y ROSS-MURPHY, S. B. (1995). Rheological and structural studies on heat-induced gelation of concentrated skim milk. *Journal of Dairy Research* **62** 257-267.

TOKITA, M., HIKICHI, K., NIKI, R. y ARIMA, S. (1980). Dynamic viscoelastic study on the formation of casein networks in milk-rennet systems. *Reports on Progress in Polymer Physics in Japan* **23** 729-730.

TOKITA, M., HIKICHI, K., NIKI, R. y ARIMA, S. (1981). Mechanism of milk clotting. *Reports on Progress in Polymer Physics in Japan* **24** 581-584.

TOKITA, M., HIKICHI, K., NIKI, R. y ARIMA, S. (1982*a*). Dymamic viscoelastic studies on the mechanism of milk clotting process. *Biorheology* **19** 209-219.

TOKITA, M., HIKICHI, K., NIKI, R. y ARIMA, S. (1982*b*). Application of the theory of gelation to enzymatic clotting process of casein micelle solution. *Biorheology* **19** 695-705.

TOKITA, M., NIKI, R. y HIKICHI, K. (1984). Percolation theory and elastic modulus of gel. *Journal of the Physical Society of Japan* **53** 480-482.

TOKITA, M., NIKI, R. y HIKICHI, K. (1985). Critical behaviour of modulus of gel. *Journal of Chemical Physics* **83** 2583-2586.

TORNADIJO, M. E., MARRA, A. I., GARCÍA FONTÁN, M. C., PRIETO, B. y CARBALLO, J. (1998). La calidad de la leche destinada a la fabricación de queso: calidad química. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **2** (2) 79-91.

TRUJILLO, A. J. (1996). *Procesos de proteolisis primaria que intervienen en la maduración del queso de cabra*. Tesis Doctoral, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

TRUJILLO, A. J., GUAMIS, B. y CARRETERO, C. (1997). Las proteínas mayoritarias de la leche de cabra. *Alimentaria* **285** 19-28.

TRUJILLO, A. J., JORDANA, J., GUAMIS, B., SERRADILLA, J. M. y AMILLS, M. (1998). Polymorphism of the caprine α_{S1}-casein gene and its effect on the production, composition and technological properties of milk and on cheese making and ripening. *Food Science and Technology International* **4** (4) 217-235.

TSOULI, J., FAVRE BONVIN, G., POLICARD, C. y VILLE, A. (1975). Mesure par la méthode conductimétrique de l'activité enzymatique de trois variétés de présure sur du lait frais de mélange et du lait reconstitué à partir de poudre dégraissée. *Le Lait* **55** 289-294.

TSUGO, T. y YAMAUCHI, K. (1959). Comparison of clotting action of various milk coagulating enzyme. Comparison of factors affecting clotting time of milk. *15th International Dairy Congress*, London **2** 636

TUSZYNSKI, W. B. (1971). A kinetic model of the clotting of casein by rennet. *Journal of Dairy Research* **38** 115-125.

TZIBOULA, A. (1995). Influence of genetic polymorphism of caprine caseins on the physicochemical properties of caprine milk. *Production and Utilization of Ewes and Goats' Milk*, IDF Seminar, Crete.

TZIBOULA, A. y HORNE, D. S. (1995). Influence of casein genotype on the physicochemical properties of caprine milk. *Production and Utilization of Ewe and Goats' Milk*, IDF Seminar, Crete.

TZIBOULA, A. y HORNE, D. S. (1999). The role of α_{S1}-casein in the structure of caprine casein micelles. *International Dairy Journal* **9** 173-178.

USTUNOL, Z. y HICKS, C. L. (1990). Effect of a coagulation monitoring device on experimental cheese yield. *Journal of Dairy Science* **73** (1) 1-7.

USTUNOL, Z., HICKS, C. L. y PAYNE, F. A. (1991). Diffuse reflectance profiles of eight milk-clotting enzyme preparations. *Journal of Food Science* **56** (2) 411-415.

USTUNOL, Z., HICKS, C. L., PAYNE, F. A. y MILTON, K. (1993) Effect of pH, temperature and enzyme concentration on diffuse reflectance profiles of coagulating milk. *Italian Journal of Food Science* **2** 107-114.

UUSI-RAUVA, E., SIRPA, A. Y. y ANTILA, M. (1970). Die Zusammensetzung der Finnischen Ziegenmilch. *Soumen Kemistilehti* **B 43** 178-182.

VAN DEN BIJGAART, H. J. C. M. (1988). *Syneresis of rennet-induced milk gels as influenced by cheesemaking parameters*. Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

VANDERHEIDEN, G. (1976). An apparatus for continuously monitoring the structural rigidity of a gel. *CSIRO Food Research Quarterly* **36** (1) 45-47.

VAN DE VOORT, F. R. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International* **25** 397-403.

VAN DIJK, H. J. M. (1982). *Syneresis of curd*. Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

VAN DIJK, H. J. M. (1992). The properties of casein micelles. 6. Behaviour above pH 9 and implications for the micelle model. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **46** 101-113.

VAN DIJK, H. J. M. y WALSTRA, P. (1986). Syneresis of curd. 2. One-dimensional syneresis of rennet curd in constant conditions. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **40** 3-30.

VAN HEKKEN, D. L. y STRANGE, E. D. (1994). Rheological properties and microstructure of dephosphorylated whole casein rennet gels. *Journal of Dairy Science* **77** (4) 907-916.

VAN HOOYDONK, A. C. M., BOERRIGTER, I. J. y HAGEDOORN, H. G. (1986*a*). pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **40** 297-313.

VAN HOOYDONK, A. C. M., HAGEDOORN, H. G. y BOERRIGTER, I. J. (1986*b*). The effect of various cations on the renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **40** 369-390.

VAN HOOYDONK, A. C. M., KOSTER, P. G. y BOERRIGTER, I. J. (1987). The renneting properties of heated milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **41** 3-18.

VAN HOOYDONK, A. C. M., OLIEMAN, C. y HAGEDOORN, H. G. (1984) Kinetics of the chymosin-catalysed proteolysis of κ-casein in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **37** 207-222.

VAN HOOYDONK, A. C. M. y VAN DEN BERG, G. (1988) *Control and determination of the curd-setting during cheesemaking*. Brussels: International Dairy Federation. (IDF B-DOC 225).

VAN HOOYDONK, A. C. M. y WALSTRA, P. (1987). Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **41** 19-47.

VAN VLIET, T. (1999). Rheological classification of foods and instrumental techniques for their study. En *Food Texture*. *Measurement and Perception*, pp. 65-98, Rosenthal, A. J., Ed. Aspen Publishers, Inc., Maryland.

VAN VLIET, T., VAN DIJK, H. J. M., ZOON, P. y WALSTRA, P. (1991). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid and Polymer Science* **269** 620-627.

VAN VLIET, T. y WALSTRA, P. (1985). Note on the shear modulus of rennet-induced milk gels. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **39** 115-118.

VARNAM, A. H. y SUTHERLAND, J. P. (1995). *Leche y Productos Lácteos. Tecnología, Química y Microbiología*, Ed. Acribia, S. A., Zaragoza.

VEINOGLOU, B., BALTADJIEVA, M., KALATZOPOULOS, G., STAMENOVA, U. y PAPADOPOULOU, E. (1982). La composition du lait de chèvre de la règion de Piovdiv en Bulgaria et de Lonnina en Grèce. *Le Lait* **62** 155-165.

VEISSEYRE, R. (1988). *Latología Técnica,* Ed. Acribia, S. A., Zaragoza.

VÉLEZ-RUIZ, J. F. y BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. (1998). Rheological properties of concentrated milk as a function of concentration, temperature and storage time. *Journal of Food Engineering* **35** 177-190.

VISSER, S. (1981). Proteolytic enzimes and their action on milk proteins: A review. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **35** 65-88.

VON SMOLUCHOWSKI, M. (1917). Research on a mathematical theory of the kinetics of coagulation of colloidal suspensions. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **92** 129-168.

VOUTSINAS, L., PAPPAS, C. y KATSIARI, M. (1990). The composition of Alpline goats' milk during lactation in Greece. *Journal of Dairy Research* **57** 41-51.

WALSTRA, P. (1990). On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Scienc*e **73** 1965-1979.

WALSTRA, P. (1996). Dispersed systems: basic considerations. En *Food Quemistry*, pp. 95-155, Ed. Fennema, O. R., Marcel Dekker, Inc., New York.

WALSTRA, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist?. *International Dairy Journal* **9** 189-192.

WALSTRA, P., BLOOMFIELD, V. A., WEI, G. J. y JENNESS, R. (1981). Effect of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta* **669** 258-259.

WALSTRA, P. y JENNESS, R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*, Ed. John Wiley (Sons, Inc., New York.

WALSTRA, P. y JENNESS, R. (1987). *Química y Física Lactológica, Ed*. Acribia, S. A., Zaragoza.

WALSTRA, P., VAN DIJK, H. J. M. y GEURTS, T. J. (1985). The syneresis of curd. 1. General considerations and literature review. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **39** 209-246.

WALSTRA, P. y VAN VLIET, T. (1986). The physical chemistry of curd making. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **40** 241-259.

WAUNGANA, A., SINGH, H. y BENNETT, R. J. (1997). Influence of denaturation and aggregation of β-lactoglobulin on rennet coagulation properties of skim milk and ultrafiltered milk. *Food Research International* **29** 715-721.

WAUNGANA, A., SINGH, H. y 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.

WEBB, B. H., JOHNSON, A. H. y ALFORD, J. A. (1974). *Fundamentals of Dairy Chemistry*, Ed. AVI, Westport, Connecticut.

WEBER, F. (1989). El desuerado del coágulo. En *El Queso*, Eck, A., pp. 21-33*,* Ed. Omega, S. A., Barcelona.

WETZEL, D. L. (1983). Near-infrared reflectance analysis. Sleeper among spectroscopic techniques. *Analytical Chemistry* **55** (12) 1165A-1176A.

WEYER, L. G. (1985). Near-infrared spectroscopy of organic substances. *Applied Spectroscopy Reviews*, **21** (1&2) 1-43.

WHEELER, O. H. (1959). Near-infrared spectra of organic compounds. *Chemical Reviews* **59** 629-666.

WHETSEL, K. (1968). Near-infrared spectrophotometry. *Applied Spectroscopy Reviews* **2** (1) 1-67.

WILSON, R. H. (1995). Recent developments in infrared spectroscopy and microscopy. En *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*, Dickinson, E., pp. 177-195., Ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

WINTER, H. H. y CHAMBON, F. (1986). Analysis of a crosslinked polymer at the gel point. *Journal of Rheology* **30** 367-382.

WINWOOD, J. (1989). Rennet and rennet substitutes. *Journal of the Society of Dairy Technology* **42** (1) 1-2.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. y MASUR, M. (1979). Relación entre el punto crioscópico, la acidez, el pH y los sólidos totales en la leche de cabra. *Revista Española de Lechería* **11** 27-30.

WONG, N. P., JENNESS, R., KEENEY, M. y MARTH, E. H. (1988). *Fundamentals of Dairy Chemistry*, Ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York.

ZITTLE, C. A. y CUSTER, J. H. (1966). Identification of the *ι*-casein among the components of whole goat casein. *Journal of Dairy Science* **49** 788-791.

ZOON, P., VAN VLIET, T. y WALSTRA, P. (1988*a*). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 1. Introduction. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **42** 249-269.

ZOON, P., VAN VLIET, T. y WALSTRA, P. (1988*b*). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 2. The effect of temperature. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **42** 271- 294.

ZOON, P., VAN VLIET, T. y WALSTRA, P. (1988*c*). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 3. The effect of calcium and phosphate. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **42** 295-312.

ZOON, P., VAN VLIET, T. y WALSTRA, P. (1989). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 4. The effect of pH and NaCl. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **43** 17-34.

IX. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

IX.1. ARTÍCULO 1

Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration

Castillo*, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., López, M.B.
International Dairy Journal **10** (2000) 551-562

IX.2. ARTÍCULO 2

Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goat's milk using a light scattering sensor

Castillo*, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., Laencina, J., López, M.B.
International Dairy Journal (en revisión)

IX.3. ARTÍCULO 3

Effect of protein and temperature on cutting time prediction in goat's milk using an optical reflectance sensor

Castillo*, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., Laencina, J., López, M.B.
Journal of Dairy Research (en revisión)

IX.4. ARTÍCULO 4

Kinetics of casein aggregation and curd firming in goat's milk from backscatter of infrared light

Castillo*, M., Payne, F.A., Hicks, C.L., Laencina, J., López, M.B.
Journal of Dairy Research (en revisión)

(*), E-mail: mcastillo@um.es
Tel: +34-968-364710
Fax: +34-968-364147