



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària, Departament de Ciència Animal i dels Aliments.

Màster Oficial en Qualitat d'Aliments d'Origen Animal

Trabajo de Fin de Máster

EVALUACIÓN DE UNA SONDA MULTIFIBRA PARA LA DETERMINACIÓN ÓPTICA EN LÍNEA DEL MÓDULO ELÁSTICO DEL GEL DURANTE LA ELABORACIÓN DE QUESO

Zulma Yizeth Villaquiran Samboni

Directores: Manuel Castillo Zambudio

Oscar Arango Bedoya

Anna Zamora Viladomiu

Noviembre de 2020

Agradecimientos

A Dios, por guiarme siempre.

A mi familia, mi madre, mi padre y mi hermano por su apoyo incondicional, por su amor y por llenarme de ánimos a diario, son mi más bonito tesoro.

Al Dr. Oscar Arango por su invaluable apoyo desde el inicio de toda esta vivencia, por todo el tiempo dedicado, sus consejos, enseñanzas, amabilidad, disposición de ayuda continua y por su confianza.

Al Dr. Manuel Castillo por su constante ayuda, su paciencia, dedicación y por compartir su valioso conocimiento que ha sido bastante enriquecedor, ha sido un verdadero honor tener su asesoría.

A la Dra. Anna Zamora por su brindarme su ayuda durante la ejecución de esta tesis, por atender siempre mis consultas y por su constante apoyo en laboratorio, aprendí mucho gracias a su dirección.

A Ceiba por brindarme la oportunidad de vivir esta experiencia y de adquirir nuevos conocimientos a través del programa de becas “Bécate Nariño”.

A mis compañeros de máster por cada momento compartido, fuera y dentro del ámbito académico y por hacer de esta una experiencia inolvidable.

A todas las personas de laboratorio y de planta piloto que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme.

Sin la ayuda de todos, nada de esto hubiera sido posible.

Declaro ser la autora de este Trabajo Fin de Máster que se presenta para obtener el grado de Maestría en Calidad de Alimentos de Origen Animal en la Universidad Autónoma de Barcelona, España. Este trabajo no ha sido presentado antes para obtener ningún grado o examen en cualquier otra universidad.

Zulma Villaquiran

Bellaterra, 18 de noviembre de 2020

Los Doctores Oscar Arango Bedoya (Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Narino, Pasto, Colombia), Manuel Castillo Zambudio y Anna Zamora Viladomiu (Àrea de Tecnologia dels Aliments del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona),

INFORMAN

Que el trabajo titulado: **“Evaluación de una sonda multifibra para la determinación óptica en línea del módulo elástico del gel durante la elaboración de queso”** ha sido realizado bajo su supervisión y tutela por Zulma Villaquiran durante la realización del Máster en Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, noviembre de 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Oscar Arango Bedoya', with a horizontal line above it.

Manuel Castillo Zambudio

Oscar Arango Bedoya

Anna Zamora Viladomiu

Tabla de contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Diseño experimental	9
3.2. Preparación y análisis de las muestras	9
3.3. Caracterización de las muestras de leche	10
3.3.1. Calcio iónico o libre.....	10
3.3.2. pH.....	11
3.3.3. Tamaño de partícula.....	11
3.4. Monitorización de la coagulación mediante una sonda multifibra	11
3.4.1. Sistema óptico de monitorización de la coagulación mediante sonda multifibra... 11	
3.4.2. Monitorización de la coagulación de la leche.....	13
3.5. Monitorización de la coagulación mediante parámetros reológicos	14
3.6. Análisis estadístico	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. Análisis fisicoquímico de las muestras de leche	17
4.2. Selección de sonda	19
4.3. Respuesta óptica y reológica en función de las concentraciones de CaCl₂ y proteína	22
4.4. Comportamiento de los coeficientes del modelo de predicción	26
4.5. Calibración y validación del modelo de predicción	28
CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS	33
ANEXO	37

RESUMEN

Actualmente es posible monitorizar la coagulación enzimática de la leche utilizando fibras ópticas de dispersión de luz NIR, sin embargo, la configuración de estas resulta relativamente costosa, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar una sonda multifibra de bajo coste para la determinación óptica del módulo elástico del gel (G') durante la elaboración de queso, utilizando el modelo de predicción propuesto por Arango y Castillo (2018). Se realizaron pruebas preliminares para seleccionar el diámetro de fibra y la longitud de onda más adecuadas usando dos niveles de grasa (0,5 y 3,6 %) y proteína (3,0 y 4,0 %). Para desarrollar los ensayos de coagulación se empleó un diseño factorial completamente aleatorizado con tres réplicas, variando la concentración de proteína (3,2, 3,6 y 4,0 %) y calcio añadido (150, 200 y 250 mg L⁻¹). La sonda de 600 μ m de diámetro a 780 nm mostró mayor sensibilidad a las variaciones de proteína y grasa. Esta sonda arrojó un perfil de dispersión de luz similar al obtenido con la sonda convencional y por tanto permitió determinar los parámetros ópticos derivados, que contienen información relacionada con las fases de coagulación de la leche. El incremento lineal del voltaje inicial con la proteína indica que se podría estimar este último valor sin comprometer la calidad de la estimación de G' . Finalmente, la sonda multifibra permitió predecir la dureza de la cuajada empleando el modelo propuesto ($SEP < 7$ Pa), constituyendo una buena alternativa a la sonda convencional.

Palabras clave: coagulación enzimática, dispersión de luz NIR, módulo elástico, sonda multifibra, monitorización.

ABSTRACT

It is currently possible monitoring the enzymatic coagulation of milk using NIR light dispersion optical fibers. However, the configuration of the fiber used so far is relatively expensive. Therefore, the objective of this work was to evaluate a low-cost multifiber probe for optical determination of the elastic modulus of the gel (G') during cheese making, using the prediction model proposed by Arango and Castillo (2018). Preliminary tests were carried out to select the most appropriate fiber diameter and wavelength using two levels of fat (0.5 and 3.6%) and protein (3.0 and 4.0%). To develop the coagulation trials a fully randomized factorial design with two factors, i.e., concentration of protein (3.2, 3.6 and 4.0%) and added calcium (150, 200 and 250 mg L⁻¹), and three replicates was used. The 600 μ m diameter probe at 780 nm showed increased sensitivity to protein and fat variations. This probe showed a light dispersion profile similar to the one obtained with the conventional probe, and therefore it allowed to determine the derived optical parameters containing information related to the milk coagulation phases. The linear increase of the initial voltage with the protein content indicates that the later could be estimated without compromising the quality of G' estimation. Finally, the multifiber probe allowed predicting the curd hardness using the proposed model (SEP < 7 Pa), being a good alternative to the conventional probe.

Keywords: enzymatic coagulation, NIR light scattering, elastic modulus, multifiber probe, monitoring.

1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son la fracción de la leche más relevante en la producción de queso. Se pueden dividir en dos categorías dependiendo de su solubilidad a pH 4,6 a 20°C: las proteínas séricas (solubles) y las caseínas (insolubles). En bovinos, las caseínas comprenden cuatro tipos de proteínas: α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseína (κ -CN) que constituyen respectivamente el 38, 10, 34 y 15 % de la caseína total (Fox et al., 2017). Todas las caseínas están fosforiladas, es decir contienen grupos fosfato (PO_4), los cuales enlazan cationes polivalentes como el calcio libre (Ca^{2+}) que es el principal catión enlazado en la leche. Debido a lo anterior, las cargas se neutralizan y se genera la precipitación de las α_{s1} -, α_{s2} - y β -caseínas (Horne y Lucey, 2017). Como la κ -CN contiene muy poco fosfato ($1 \text{ mol PO}_4 \text{ mol}^{-1}$) es insensible al calcio y por tanto puede estabilizar hasta 10 veces su peso de caseínas por medio de la formación de una estructura cuaternaria conocida como micela de caseína (Fox et al., 2017). Es por esta razón que los modelos más aceptados actualmente sobre la estructura de la micela coinciden en que la κ -CN se ubica en la superficie de la misma, con su extremo hidrofóbico N-terminal hacia las caseínas sensibles al calcio y su extremo hidrofílico C-terminal hacia el exterior de la micela, dándole una apariencia pilosa como se muestra en la Figura 1.

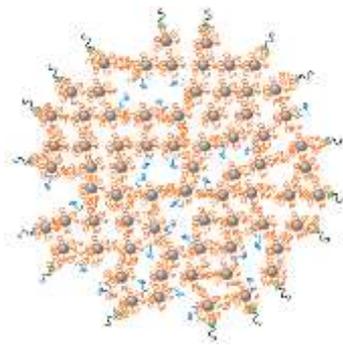


Figura 1. Estructura de la micela de caseína (Dalgleish & Corredig, 2012)

Durante la coagulación enzimática ocurre la hidrólisis de la κ -CN y por lo tanto la superficie de la micela se desestabiliza (Fox et al., 2017). Las micelas de caseína tienen un peso molecular medio de $\sim 10^8$ Da y un diámetro medio de ~ 100 nm, en un rango entre 50 y 600 nm (Horne y Lucey, 2017).

El papel estabilizador e integrador del fosfato de calcio dentro de la micela también ha sido reconfirmado por los modelos micelares más recientes. Dalgleish y Corredig (2012) explican que la micela de caseína se forma a partir de la unión de nanoagregados de fosfato de calcio/caseína por medio de enlaces no covalentes entre ellos y con otras caseínas. Lo

importante sobre el modelo de nanoagregados es que la formación de las micelas se da a través de la interacción entre los grupos fosfato serina de las caseínas y el fosfato de calcio.

En la leche, las sales se encuentran en equilibrio dinámico y cualquier cambio en las condiciones externas de la leche puede alterar este equilibrio. Algunas sales como el fosfato de calcio exceden su límite de solubilidad y por tanto se encuentran en solución y en la fase coloidal, asociadas a las micelas de caseína, por ello este último conjunto de sales se conoce como fosfato de calcio coloidal (CCP) aunque incluya otros elementos/iones. El CCP juega un papel importante en la integridad micelar y en la coagulación enzimática (Fox et al., 2017). El fosfato coloidal puede variar tanto en cantidad como en composición debido al intercambio iónico, por tanto los cambios en la composición iónica por alteración de la temperatura, el pH, etc. afectarán de manera diferente la solución de sales de la leche, donde puede ocurrir un intercambio con las sales micelares (Walstra et al., 2006).

Por otra parte, alrededor del 30 % del calcio total de la leche bovina es soluble y solo un 30 % de esta fracción existe como Ca^{2+} . Aunque se encuentra a bajas concentraciones, el Ca^{2+} es de gran importancia en varios aspectos de la coagulación enzimática. El calcio insoluble por su parte se encuentra asociado principalmente a las micelas de caseína, como CCP o como calcio micelar (Fox et al., 2017).

Relevancia de la coagulación enzimática de la leche en la elaboración de queso

La elaboración del queso puede considerarse como un proceso de concentración y la sinéresis es el método por el cual la mayor parte de la humedad es retirada de la cuajada. Una vez alcanzado el punto de gelificación, la dureza de la cuajada evoluciona aumentando con el tiempo, por tanto, se requiere seleccionar el momento de dureza óptimo para el corte, que induce el proceso de desuerado. Para evitar la formación de finos, el corte debe hacerse cuando la cuajada está suficientemente cohesionada, pero aún no ha alcanzado un grado excesivo de endurecimiento (Weber, 1989).

Desde el punto de vista físico-químico, la coagulación enzimática de la leche consiste en la transformación de la leche líquida en un coágulo viscoelástico por acción de enzimas específicas (proteinasas) conocidas como “cuajos”, las cuales actúan sobre las κ -CN de la leche fragmentándolas parcialmente y liberando el segmento hidrofílico C-terminal de la κ -CN conocido como glicomacropéptido. Esto ocasiona en las micelas una reducción del potencial zeta hasta un nivel crítico de unos 5-7 mV (~50 %) y una disminución de la repulsión electrostática por neutralización de las cargas negativas, gracias a la presencia de iones de Ca^{2+}

(Walstra et al., 2006; Fox et al., 2017). La coagulación enzimática comprende dos fases superpuestas: la fase de hidrólisis enzimática o de desestabilización y la no enzimática o de formación del gel, que comprende a su vez las subetapas de agregación micelar que forma la estructura básica del gel y la de endurecimiento que la dota de resistencia mecánica. La fase de hidrólisis o desestabilización micelar involucra la liberación del glicomacropéptido y la formación de micelas de *para-κ*-caseína, las cuales agregan en presencia de Ca^{2+} a temperaturas superiores a 20 °C durante la fase de agregación y gelificación, con el desarrollo de un gel particulado. El Ca^{2+} puede actuar por medio del entrecruzamiento de las micelas desestabilizadas, a través de los residuos de fosfato serina o, simplemente, por neutralización de las cargas superficiales (Fox et al., 2017). Inicialmente se forman pequeñas cadenas lineales de micelas que continúan agregándose para formar aglomerados y eventualmente una red de apariencia fractal. Durante el endurecimiento del gel ocurre la adición de nuevas micelas a la red de caseínas y el incremento en la fuerza y el número de enlaces. Los geles resultantes de la coagulación enzimática son viscoelásticos y sus propiedades reológicas pueden ser caracterizadas usando reología oscilatoria de baja amplitud que permite determinar parámetros como el módulo elástico del gel (G'), que mide la energía almacenada por ciclo de oscilación o la $\text{tg } \delta$, relacionado con la relajación de los enlaces del gel durante la deformación. Luego de la gelificación, G' tiende a incrementarse reflejando la fusión en curso de las micelas que resulta en un incremento en el área de contacto entre partículas agregadas y la posible incorporación de partículas adicionales dentro de la red. Por tanto, para la formación de la cuajada el incremento de G' dependerá de la tasa de incorporación de partículas dentro de la red y de la tasa de incremento en la fuerza de los enlaces con el tiempo (Horne y Lucey, 2017).

Entre los factores más importantes que influyen en las diferentes fases de la coagulación se encuentran la temperatura, el pH, la concentración de la enzima, la fuerza iónica, la adición de CaCl_2 , la proteína y la grasa.

Determinación del tiempo de corte en la elaboración de queso

El momento óptimo para el corte de la cuajada durante la elaboración de cualquier tipo de queso es una etapa crítica, dado su efecto sobre el rendimiento quesero, el contenido de humedad, la maduración y la homogeneidad del producto. A nivel industrial el tiempo de corte se determina de forma subjetiva (Castillo, 2006), debido a que a pesar de múltiples investigaciones, no se ha encontrado un método práctico y económico que permita un control objetivo y en línea de dicha

etapa, lo que viene impidiendo por décadas lograr una completa automatización en la elaboración industrial de quesos.

Un corte prematuro de la cuajada, cuando aún 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. Prolongar el tiempo de corte puede representar un aumento en el rendimiento, pero el mayor contenido de humedad puede acelerar las reacciones de deterioro del producto, afectar a la maduración y reducir la vida útil del queso (Passos et al., 1999; Castillo, 2006; Fagan et al., 2007). 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, ambos subjetivos: 1) a un tiempo prefijado desde la adición de la enzima (cuajo) o 2) según el juicio de un operario muy entrenado, basado en una evaluación subjetiva de la cuajada (determinación manual y visual). El corte a un tiempo prefijado es cuestionable porque aquellos factores que afectan a la cinética de coagulación, tales como la composición de la leche, pueden variar el tiempo de corte óptimo; mientras que, en el segundo método, la decisión depende de la experiencia del quesero, que no es objetiva (Castillo, 2006). Cualquier desviación respecto al momento óptimo de corte incide de forma negativa en el rendimiento y textura del queso, dificultando así, la obtención de un producto normalizado, de rendimiento y calidad máximos.

Numerosos instrumentos han sido empleados para evaluar la coagulación de la leche y determinar el momento óptimo para el corte de la cuajada, entre ellos se encuentran el Formagraph (Foss Electric A/S, Hillerød, Dinamarca) basado en la técnica de fuerza de arrastre (McMahon y Brown, 1982; Kübarsepp et al., 2005), la reología oscilatoria de baja amplitud (O'Callaghan, 2011), dispositivos ultrasónicos (Cosgrove, 2000; Taifi et al., 2006) y la sonda de alambre caliente (Hori, 1985; Passos et al., 1999; O'Callaghan et al., 2001). Sin embargo, la mayoría de estos métodos son intrusivos, no trabajan en línea o no resultan prácticos para su uso a nivel de plantas industriales por cuestiones de limpieza, mantenimiento o recalibración por cambios en la composición de la leche.

Aplicación de sensores ópticos en la determinación del tiempo de corte

Los cambios en las propiedades ópticas de la leche durante la coagulación han permitido, especialmente a partir del uso de fibras ópticas, el desarrollo de una serie de instrumentos basados en determinaciones de reflexión, absorbancia, dispersión y refracción de luz. Estos son métodos continuos y no destructivos. De entre las propiedades mencionadas, la dispersión de la luz es una de las que mejores resultados arroja para el estudio de la formación del gel. En un medio no absorbente, es posible medir directamente la porción de luz incidente que se dispersa en un cierto ángulo o medir indirectamente la porción de luz que no ha interactuado con el medio, es decir, la luz transmitida (Payne y Castillo, 2007). En la leche, especialmente en el rango de luz visible e infrarrojo cercano, la dispersión de la luz predomina sobre la absorción y se relaciona directamente con la velocidad de agregación micelar y de endurecimiento del gel de caseína, por lo que dicha tecnología de sensores ópticos ha sido probada como herramienta útil para controlar la coagulación de la leche. En particular, el sensor de fibra óptica de dispersión de infrarrojo cercano (NIR), CoAguLite™, es un sensor *inline* que ha sido bien documentado para monitorizar la coagulación de la leche y predecir tiempos de gelificación y de corte (Castillo, 2006) y en la actualidad se encuentra comercialmente disponible para el control en línea en la elaboración de queso, principalmente en Estados Unidos.

Varios estudios previos han demostrado que dicho sensor es un instrumento prometedor para la monitorización en línea de las propiedades ópticas durante la coagulación de la leche, que aporta información indirecta sobre parámetros tecnológicos de relevancia en la elaboración de queso. Arango et al. (2018a) obtuvieron y validaron modelos de predicción del tiempo de corte de la cuajada usando parámetros ópticos de tiempo determinados mediante cálculo de derivadas a partir del perfil de la ratio de dispersión en función del tiempo. De manera similar, Salvador et al. (2019) encontraron que el sensor óptico de dispersión de luz predice bien el tiempo en el cual el gel alcanza valores de $G' = 30$ Pa.

Por otra parte, Arango y Castillo (2018) desarrollaron y patentaron un método para la monitorización en tiempo real de la firmeza del gel (EP3036527 B1, 2018), que consiste en un modelo matemático que relaciona la señal de dispersión NIR, obtenida mediante el sensor de fibra óptica, con el módulo elástico del gel. Este método no involucra parámetros de tiempo y por tanto permite introducir los datos de la ratio de dispersión de luz recolectados directamente en el modelo para calcular el valor de G' en tiempo real. Con dicho método se han obtenido buenas predicciones del tiempo de corte reológico, es decir, cuando el gel alcanza una firmeza

específica, por ej., 30, 35 o 40 Pa, según el tipo de queso a elaborar. Sin embargo, la configuración de fibra óptica del sensor resulta relativamente costosa para su inclusión en las cubas de plantas de procesamiento de quesos, por lo que se pretende evaluar su sustitución por una sonda multifibra de reducido coste que facilite la implementación de esta tecnología a nivel industrial. Para ello se hace necesario comprobar si la respuesta que arroja esta sonda se ajusta al modelo propuesto previamente, teniendo en cuenta las variaciones que se presentan normalmente en condiciones de producción, tales, como la variación en la concentración de proteína de la leche o en el cloruro de calcio adicionado.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la presente propuesta de investigación pretende dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación:

¿Es posible ajustar el modelo de predicción de la firmeza de la cuajada (Arango y Castillo, 2018) usando sondas multifibra de bajo costo, en base a la ratio de dispersión de luz NIR en un rango de concentraciones de proteína en leche y de CaCl_2 añadido?

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la dispersión de luz NIR mediante una sonda multifibra de bajo costo para la determinación óptica del módulo elástico, G' , del gel durante la elaboración de queso, en función de la concentración de proteína y de CaCl_2 añadido.

Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta de dispersión NIR de dos sondas multifibra durante la coagulación enzimática de la leche, en función de la concentración de grasa y proteína, y seleccionar una de las dos sondas en función de la respuesta óptica obtenida.
2. Estudiar la respuesta de dispersión NIR durante la coagulación enzimática de la leche usando la sonda multifibra seleccionada en el objetivo uno, en función de la concentración de proteína y de CaCl_2 añadido.
3. En caso de obtener, en la ejecución del objetivo dos, una respuesta sigmoideal durante la coagulación de la leche, que responde, según lo esperado, a las variaciones de la concentración de proteína y CaCl_2 añadido, calibrar y validar el modelo de predicción del módulo elástico del gel propuesto por Arango & Castillo (2018) en los rangos estudiados de proteína y calcio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

Para seleccionar la sonda más adecuada en la determinación de los parámetros ópticos se realizaron algunas pruebas preliminares usando dos sondas VIS-NIR con diámetro de ferrula de ¼” y diferente diámetro de fibra: de 400 µm (QR400-7-VIS-BX, Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL, EE. UU.) y de 600 µm (OCF-107982, Ocean Optics, Inc.). Para ello se realizaron algunos ensayos de coagulación enzimática con las dos sondas descritas, dos niveles de grasa (0,5 y 3,6 %) y dos de proteína (3,0 y 4,0 %) teniendo en cuenta que estos son factores que afectan a la ratio de dispersión de luz, de forma muy bien conocida. Se analizaron los perfiles de la ratio de dispersión obtenidos a 580, 680, 780 y 880 nm para visualizar el efecto de la longitud de onda, el diámetro de fibra y las concentraciones de grasa y proteína sobre la respuesta óptica de las sondas.

Una vez seleccionada la sonda con mejor comportamiento, para estudiar la predicción de G' usando la sonda multifibra NIR seleccionada, se empleó un diseño factorial completamente aleatorizado con dos factores experimentales y tres niveles cada uno: concentración de proteína (3,2, 3,6 y 4,0 %) y CaCl_2 anhidro añadido (150, 200 y 250 mg L⁻¹). Cada combinación (es decir, tratamiento) se repitió tres veces ($n = 3$) para un total de $N = abn = 3^2 \cdot 3 = 27$ ensayos independientes.

Por otra parte, para determinar los efectos de las concentraciones de proteína y calcio añadido sobre algunos parámetros fisicoquímicos: pH, calcio iónico - Ca^{2+} - y tamaño de partícula, se planteó un diseño factorial completamente aleatorizado, con los tres niveles de proteína y calcio antes mencionados y tres réplicas ($N = 27$).

3.2. Preparación y análisis de las muestras

La reconstitución de las muestras de leche, se realizó con leche descremada en polvo de baja temperatura (Chr. Hansen SL, Jernholmen, Denmark) con un WPNI de mín. 6,0 mg g⁻¹, 32,5 % de proteína y 1,25 % de grasa. Los niveles de proteína se ajustaron variando la cantidad de leche en polvo empleada, en base a balances de materia. Una vez pesada la leche, se mezcló con agua destilada a 45 °C y se agitó durante 20 min en un agitador magnético a ~500 rpm. Simultáneamente se adicionó la cantidad de CaCl_2 requerida añadiendo 286, 381 y 476 µL L⁻¹ de una solución de 515 g L⁻¹ CaCl_2 (Laboratorios Arroyo S.A., Santander, España), con el fin de que la mezcla se equilibrara. Posteriormente, la leche reconstituida se dejó en reposo durante 20 minutos más a ~20 °C y en la oscuridad con el objetivo de que las micelas de caseína se

rehidrataran completamente hasta el momento de la coagulación, es decir, alrededor de 15 minutos adicionales.

Para llevar a cabo los ensayos de selección de la sonda se empleó nata, obtenida a través de centrifugación de leche proveniente de vacas del Servei de Granges i Camps Experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, España). Se caracterizó su contenido tanto en proteína como en grasa mediante los métodos de Kjeldahl y Gerber (AOAC, 2005), respectivamente. La nata se pasteurizó a 60° C durante 30 minutos y se almacenó en refrigeración a 4° C hasta su utilización. La reconstitución se llevó a cabo pesando la cantidad de leche y nata requeridas de acuerdo con balances de materia correspondientes. La nata se atemperó hasta 40° C en un baño termostático agitando suavemente y se adicionó a la leche previamente disuelta a 45° C. Posteriormente se agitó durante 20 minutos y se añadieron 286 $\mu\text{L L}^{-1}$ de la solución de CaCl_2 . Finalmente se dejó en reposo durante 20 minutos más hasta el momento de coagulación.

3.3. Caracterización de las muestras de leche

Tanto Ca^{2+} como pH se analizaron sobre las muestras recién preparadas mientras que el tamaño de partícula se analizó en muestras refrigeradas a ~ 4 °C que contenían Timerosal (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) como conservante.

3.3.1. Calcio iónico o libre

La concentración de Ca^{2+} se determinó usando un electrodo selectivo de calcio iónico Hach (ISE Ca^{2+} LZW9660C, Hach Company, Düsseldorf, Alemania) conectado a un multímetro Sension+ (MM340, Hach Company). Se prepararon cuatro soluciones patrón de 100, 150, 200 y 250 mg L^{-1} Ca^{2+} (2,49, 3,74, 4,99 y 6,23 mM), a partir de una solución madre de 1 g L^{-1} Ca^{2+} , las cuales fueron almacenadas a ~ 16 °C y empleadas a lo largo del experimento para construir las curvas de calibración diarias. El análisis se llevó a cabo a esta temperatura, teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante: añadiendo 10 mL L^{-1} de KCl 3M como ajustador de fuerza iónica, realizando las mediciones en orden creciente de concentración en el caso de los patrones y con agitación constante. El multímetro arrojó valores de voltaje (mV) que fueron graficados vs. el $-\log(\text{Ca}^{2+})$ de los patrones, dada la relación lineal existente entre la salida eléctrica del electrodo y el logaritmo de la actividad medida (Lewis, 2011). Las curvas patrones obtenidas permitieron determinar la concentración de Ca^{2+} en las muestras analizadas.

3.3.2. pH

El pH se determinó por triplicado mediante el método potenciométrico empleando un pH-metro portátil Sension+ LPV2550T y un electrodo de pH HACH LZW5051T, ambos de Hach Company, con una resolución de 0,01 pH, en muestras a 17 °C. Antes de cada medida los electrodos se calibraron con dos soluciones tamponadas de pH = 4,0 y pH = 7,0 a la misma temperatura que la de las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.3. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó mediante dispersión de luz dinámica empleando el analizador de tamaño de partículas Zetasizer Nano ZS y la versión 7.11 de su software (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) para la recolección de datos. Para el análisis, cada muestra de leche refrigerada a ~4 °C hasta su análisis, se atemperó a 20 °C, se agitó y se transfirió una alícuota de 1 mL en una cubeta de poliestireno desechable DTS0012 de 3,5 mL que se introdujo posteriormente en la celda de medida. Las estimaciones fueron hechas a un ángulo de dispersión de 173° usando el modo de análisis de proteína con tres medidas por muestra a 25 °C. Los resultados de diámetro promedio fueron exportados a Microsoft Excel para el posterior análisis estadístico.

3.4. Monitorización de la coagulación mediante una sonda multifibra

3.4.1. Sistema óptico de monitorización de la coagulación mediante sonda multifibra

El montaje del sistema óptico empleado se muestra en la Figura 2 y consta de una fuente de luz halógena de tungsteno (LS-1, Ocean Optics, Inc.), un espectrofotómetro de alta resolución (HR4000, Ocean Optics, Inc.) con un rango de detección de 200 a 1100 nm, acoplado a un ordenador de escritorio y una celda de medida no comercial de acero inoxidable AISI 316L; todos interconectados a través de la sonda multifibra en estudio. La celda de medida donde se introduce la muestra de leche posee un diámetro de 2,54 cm y una capacidad de 20 mL, con doble camisa para permitir la circulación de agua caliente por la parte inferior y lateral de la celda. También consta de una entrada de agua y tres salidas que mejoran la eficiencia de la transferencia de calor hacia el interior de la muestra con ayuda de un baño termostático (Ovantherm TC00, Suministros Grupo Esper, S.L., Barcelona, España) fijado a 33,0° C ± 0,1° C. El interior de la celda ha sido sometido a un tratamiento de oxidación conocido como Nerinox, el cual otorga un color negro mate intenso para evitar cualquier error de medida como resultado de la reflexión de la luz.

La adquisición de datos se realizó estableciendo en el software un tiempo de integración de 200 ms y 30 escaneos, lo que significa que el equipo escanea cada 200 ms y guarda el valor promediado de 30 escaneos, por lo tanto, almacena un dato cada 6 s (un total de ~600 registros a lo largo de un ensayo de coagulación de duración media de 60 min, para cada una de las 3684 longitudes captadas por el espectrofotómetro). Los perfiles espectrales fueron generados usando el software OceanView 1.6.5 (Ocean Optics, Inc.).

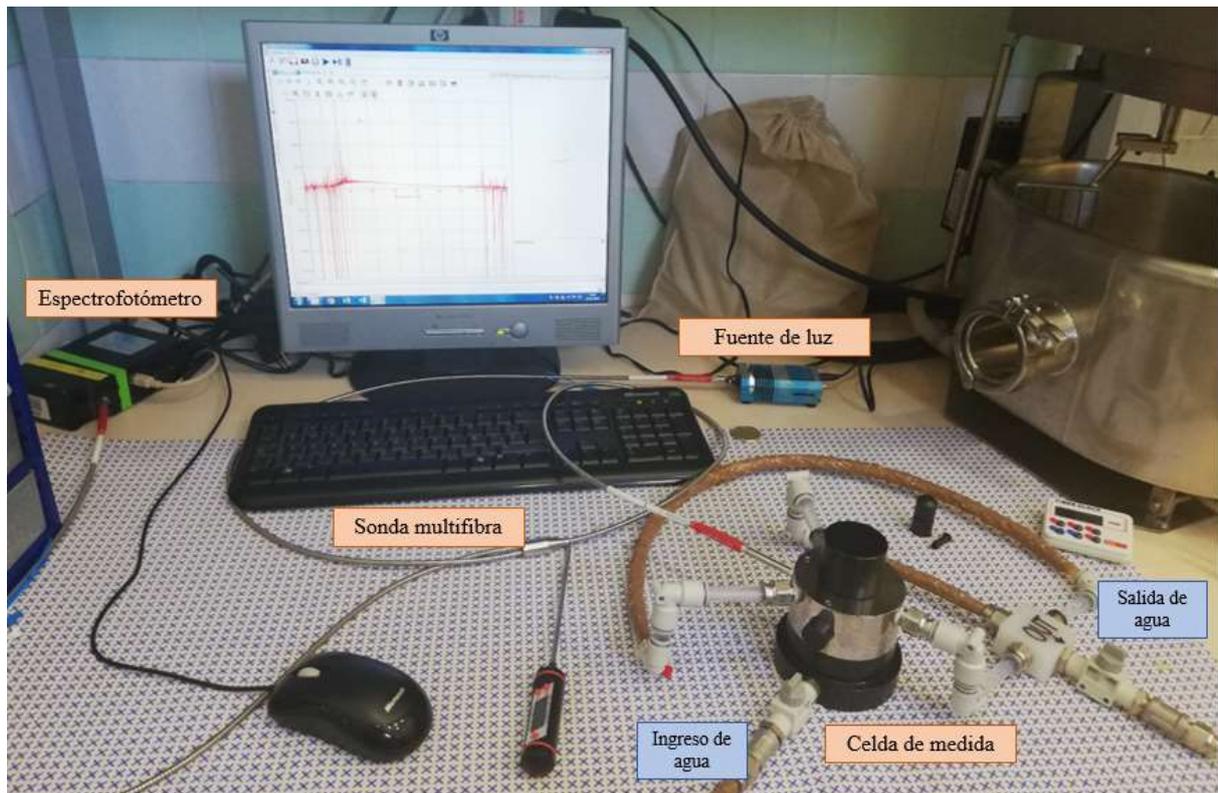


Figura 2. Montaje del sistema óptico empleado en la monitorización de la coagulación enzimática de la leche usando una sonda multifibra.

En la Figura 3 se muestra un esquema de la sonda multifibra empleada que consta de tres extremos: un primer extremo acoplado a una fuente de luz, a través del cual se transmite luz hacia la muestra de leche por seis fibras periféricas. Un segundo extremo que se encuentra en contacto con la muestra, presenta las seis fibras de excitación y una fibra central o de detección que capta la luz dispersada por la muestra a 180° . El tercer extremo, acoplado a un espectrofotómetro, convierte la señal de respuesta en un valor de intensidad de luz, dentro de un rango de longitudes de onda que va desde 200 a 1100 nm.



Figura 3. Esquema de la sonda multifibra empleada (<https://www.oceaninsight.com>).

3.4.2. Monitorización de la coagulación de la leche

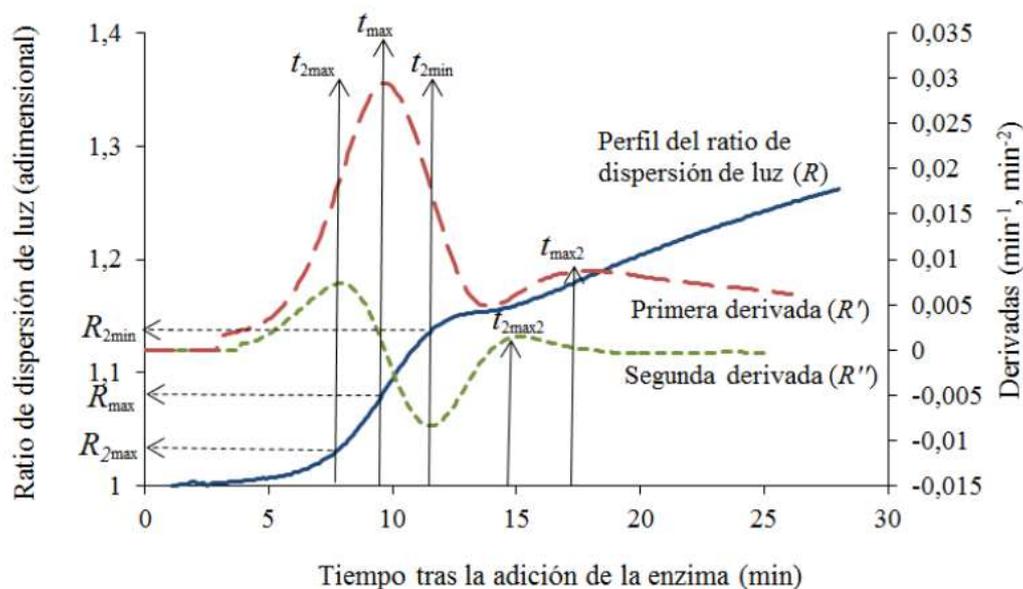
Se tomó una alícuota de 20 mL de leche, la cual se atemperó hasta 32 °C en la celda de medida (Figura 2). Una vez alcanzado el equilibrio térmico, se adicionaron a la muestra de leche 22 μL de quimosina (CHY-MAX extra, 600 IMCU mL^{-1} , Chr. Hansen A/S, Hoersholms, Dinamarca) previamente diluida en agua destilada (10 % v/v) para alcanzar una concentración de enzima de 110 $\mu\text{L L}^{-1}$ de leche, con el objetivo de facilitar su distribución sobre la muestra, e inmediatamente se mezcló durante 30 s. Simultáneamente a la adición de la enzima se puso en marcha el guardado de datos, de manera que no hubo desfase de tiempo para los datos de óptica.

El procedimiento de tratamiento de datos y generación de parámetros habitualmente empleado con la sonda de dispersión de luz previa se ha aplicado directamente a los datos de la sonda multifibra para poder utilizar las curvas de coagulación habituales, y el comportamiento de dichas curvas y sus parámetros asociados, a la respuesta a la coagulación de la sonda en evaluación.

Una vez sustraído el espectro de intensidad sin iluminar la muestra (dark), los valores de intensidad de luz fueron procesados usando el software de procesamiento de datos desarrollado a tal fin por Ctrl4Enviro S.L. (Barcelona, España) con el cual fue posible calcular de manera inmediata los ratios de dispersión de luz en función del tiempo a numerosas longitudes de onda, combinando el total de espectros obtenidos a lo largo de cada ensayo de coagulación. Como primer paso, se estableció un valor de frecuencia en el software de 5 nm y posteriormente el programa agrupó los datos en intervalos equivalentes al doble de la frecuencia establecida, es decir cada 10 nm para obtener un total de 94 bandas de longitud de onda, a cada una de las cuales se asigna el valor medio de intensidad cada 6 s. De entre todas las bandas de longitud de onda generadas en función del tiempo, se trabajó en particular, con los valores medios de intensidad a 580, 680, 780 y 880 nm. Finalmente, para obtener el perfil de dispersión de luz para cada longitud de onda y ensayo, el programa calcula la ratio de dispersión (R) de acuerdo

al procedimiento descrito por Castillo et al. (2000) y Fagan et al. (2007), que consiste en dividir la intensidad medida, para cada una de las longitudes de onda consideradas ($V_{(w)}$) a cada instante por el promedio de los 10 primeros valores ($V_{0(w)}$), que corresponden al primer minuto de coagulación.

Los parámetros ópticos se calcularon a partir de la primera (R') y segunda derivada (R'') de R con respecto al tiempo (Figura 4). R' se determinó calculando la pendiente de los valores de R con respecto al tiempo durante 4 min (31 datos). El cálculo se repitió cada 6 s asignando el resultado de la pendiente como punto central de cada conjunto de datos. R'' se determinó de forma análoga con los valores de R' con respecto al tiempo, usando también 31 datos. Los parámetros ópticos de tiempo (min) calculados corresponden a los máximos y mínimos de las derivadas (Castillo, 2001) tal y como lo muestra la Figura 4.



Parámetro	Descripción
t_{\max}	Tiempo desde la adición de la enzima hasta el primer máximo de R'
$t_{\max 2}$	Tiempo desde la adición de la enzima hasta el segundo máximo de R'
$t_{2\max}$	Tiempo desde la adición de la enzima hasta el primer máximo de R''
$t_{2\min}$	Tiempo desde la adición de la enzima hasta el primer mínimo de R''
$t_{2\max 2}$	Tiempo desde la adición de la enzima hasta el segundo máximo de R''
$t_{2\min 2}$	Tiempo desde la adición de la enzima hasta el segundo mínimo de R''

Figura 4. Perfil típico de la ratio de dispersión de luz con sus respectivas derivadas y parámetros ópticos (Arango, 2015)

3.5. Monitorización de la coagulación mediante parámetros reológicos

Se tomó una alícuota de 40 mL de leche reconstituida y se depositó en la celda del reómetro ThermoHaakeRS1 previamente atemperada hasta $32,00 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,01$ con un baño termostático

Thermo-Haake (Thermo-Haake GmbH, Karlsruhe, Alemania). En ese momento se adicionaron 44 μL de enzima quimosina (CHY-MAX extra, 600 IMCU mL^{-1} , Chr. Hansen A/S) diluida (10 % v/v), con lo que se alcanzó una concentración de enzima de 110 $\mu\text{L L}^{-1}$ de leche y se agitó la mezcla durante 30 s.

Los parámetros reológicos estudiados fueron el módulo elástico del gel (G') y el módulo viscoso (G'') los cuales fueron determinados mediante ensayos en cizalla oscilatoria de baja amplitud, según lo descrito por Arango y Castillo (2018). Para ello se usó el sensor de cilindros concéntricos Z34DIN ajustado a una frecuencia de 1 Hz. La muestra atemperada de leche con la enzima añadida se depositó en el cilindro e inmediatamente se adicionó aceite vegetal para formar una capa en la superficie y evitar pérdidas por evaporación. La recolección de datos se inició después de añadir la muestra en la celda y cuando el software indicaba que el almacenamiento de datos había empezado. Por tanto, el decalaje de ~ 50 s se adicionó posteriormente en los datos de G' exportados a Excel. Con los datos obtenidos se determinó el tiempo de gelificación ($t_{G'1}$) y el tiempo de corte reológico ($t_{G'30}$) que corresponden al tiempo en el que el gel alcanzó valores para G' de 1 y 30 Pa, respectivamente (Arango y Castillo, 2018). También se determinó $tg \delta$ ($tg \delta = G''/G'$) medido al cabo de 30 minutos desde la adición de la enzima ($tg \delta_{30min}$). Otros parámetros estimados fueron el tiempo de agregación (t_{ag}) definido como la diferencia entre $t_{G'1}$ y t_{max} y el tiempo de endurecimiento (t_{F30}) que corresponde al tiempo transcurrido entre $t_{G'1}$ y $t_{G'30}$. Usando el software Rheowin Job Manager (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemania), se obtuvieron datos aproximadamente cada 1,3 s hasta $G' = 35$ Pa. Para poder emparejar estos valores de tiempo con los arrojados por el sistema óptico, es decir cada 6s, fue necesario realizar un ajuste lineal de los datos a partir de $G' = 5$ Pa, con el fin de obtener la ecuación de la recta ajustada. Los ajustes arrojaron un R^2 medio de $0,9983 \pm 0,0012$.

3.6. Análisis estadístico

Los parámetros ópticos, reológicos y fisicoquímicos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) usando el modelo lineal general (GML), incluyendo como factores en el modelo las concentraciones de proteína y el calcio, su interacción y la réplica. Las variables con efecto significativo de los factores se sometieron a análisis de comparación de medias empleando el método LSD de Fisher con una confianza del 95 %. También se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre todos los parámetros evaluados. Para el procesamiento y análisis de los parámetros ópticos, reológicos y fisicoquímicos se usó el software estadístico MINITAB 18 (Minitab Inc., State College, Pensilvania, EE. UU).

Para verificar la bondad del modelo propuesto por Arango y Castillo (2018) para predecir los valores de dureza del gel, durante la coagulación de leches con distintas concentraciones de proteína y calcio, a partir de los valores de R obtenidos con la sonda multifibra, se realizaron calibraciones y validaciones con las tres réplicas de cada tratamiento. Para ello, se utilizaron 2 réplicas para calibrar el modelo y obtener los respectivos coeficientes de regresión, que fueron empleados para validar el ajuste del modelo de predicción de G' utilizando la réplica independiente adicional. Este procedimiento se repitió para las tres combinaciones posibles dentro de cada tratamiento y por tanto los resultados se presentaron como promedios y desviaciones estándar de los datos de predicción de G' .

Adicionalmente, como consecuencia del anterior ajuste, se introdujo un método diferente que consistió en obtener los promedios de R de las tres réplicas y calibrar el modelo empleando las dos más alejadas de la media, y usando la más cercana para la validación. En este caso, se presentaron los resultados de predicción correspondientes a una calibración y una validación.

En cada calibración se utilizó la herramienta Solver de Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, EE. UU) para obtener los coeficientes del modelo de predicción que también se analizaron mediante ANOVA. El modelo no se detalla por motivos de confidencialidad, pero tiene 4 parámetros, G'_{inf} , kg , R_{inf} y R_0 , que en lo sucesivo se mostrarán codificados aleatoriamente con las letras a, b, c y d. La bondad de ajuste entre los datos de G' medidos con el reómetro y aquellos obtenidos con el modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), el error estándar de predicción (SEP) y el coeficiente de variación (CV).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis fisicoquímico de las muestras de leche

La concentración de calcio añadido no tuvo efecto significativo sobre ninguno de los parámetros fisicoquímicos evaluados, mientras que los valores de pH y tamaño de partícula variaron significativamente en función de los niveles de proteína (Tabla 1). En estudios previos se ha demostrado que la adición de CaCl_2 a la leche tiene efectos sobre el calcio iónico (Ca^{2+}) y el pH (Lewis, 2011) debido a que este se disocia en gran medida, aumentando el calcio libre que se unirá, en parte a fosfatos incrementando así el CCP de la fase micelar y es precisamente esa entrada de calcio en la micela lo que desplaza protones de esta, acidificando la fase soluble con lo que se disminuye el pH (Fox et al., 2017). Walstra et al. (2006) explican que cuando se añade CaCl_2 a la leche, aproximadamente un 30 % de este incrementa el Ca^{2+} y un 40 % entra en la micela desplazando protones y reduciendo el pH. Sin embargo, esto no se evidenció en el presente estudio, debido probablemente a que hubo una variación no esperada de la temperatura en el laboratorio entre las réplicas, la cual tuvo efecto significativo, lo que pudo introducir un “efecto de confusión estadística” al modificar aleatoriamente la variabilidad de la medición del calcio libre. Con ello se confirma que la medición de calcio iónico es un proceso complejo y sensible que requiere de mucho control pues puede verse fácilmente afectado tal como afirman Lin et al. (2006).

Tabla 1. Análisis de varianza y valores F del efecto de la proteína, el calcio añadido y su interacción sobre los parámetros fisicoquímicos de la leche reconstituida para los ensayos de coagulación enzimática de la leche.

Parámetros	R^2	Fuente de variación			
		Calcio añadido (GL=2)	Proteína (GL=2)	Réplica (GL=2)	Calcio*Proteína (GL=4)
Calcio libre	0,906	0,52 ^{ns}	0,88 ^{ns}	85,19 ^{***}	1,72 ^{ns}
pH	0,824	1,58 ^{ns}	10,25 ^{**}	17,02 ^{***}	0,16 ^{ns}
Tamaño de partícula	0,884	1,64 ^{ns}	98,05 ^{***}	1,75 ^{ns}	3,32 [*]

$N=27$; GL , grados de libertad; R^2 , coeficiente de determinación; * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, ^{ns}no significativo.

La Figura 5 muestra que el pH de las muestras disminuyó significativamente al aumentar la concentración de proteína de 3,2 % a 3,6 %. Lo anterior es lógico teniendo en cuenta que se

parte de leche en polvo que debido al proceso de concentración posee un pH más bajo, pues al reconstituirla al 10 % suele presentar un pH de 6,5 - 6,6 comparado con el 6,7 - 6,8 típico de la leche fresca y, por tanto, al incrementar la cantidad de leche en polvo requerida para alcanzar el nivel de proteína deseado, el pH de la fase acuosa también se reducirá. Lo anterior se explica por qué al concentrar la leche para obtener leche en polvo, se concentra la fase soluble que ya está saturada con calcio y todo el exceso se transfiere a la fase micelar como fosfato cálcico coloidal (CCP). Al entrar calcio en la micela junto con fosfato se produce salida de protones y como consecuencia descenso de pH, como se muestra en la siguiente ecuación que representa el equilibrio entre el fosfato de calcio disociado y el calcio iónico (Lin et al., 2006):



Por otra parte, el tamaño de partícula se vio afectado significativamente por todos los niveles de proteína estudiados (Figura 5). El tamaño de partícula, en las muestras de leche analizadas, mayoritariamente hace referencia al tamaño micelar, que varía habitualmente en el rango de 50 a 500 nm (Fox et al., 2017). Es evidente la relación inversa entre pH y tamaño de partícula (Figura 5) que se explica porque al reconstituir la leche y aumentar la proporción de leche en polvo, se parte de un pH menor y de proteína que además es más rica en CCP. El pH bajo favorece la salida de calcio micelar, hacia la fase acuosa y el equilibrio se desplaza hacia la izquierda en la ecuación anterior. Por tanto, el CCP que mantiene las micelas intactas se disuelve, lo que se traduce en una reducción en la fuerza y el número de enlaces y en consecuencia las micelas se hinchan (Walstra et al., 2006). Del mismo modo, Martin y coladorados (2007) indican que al remover el agua de la leche, el calcio se asocia con las micelas dando como resultado micelas más densas y un aumento en la turbidez.

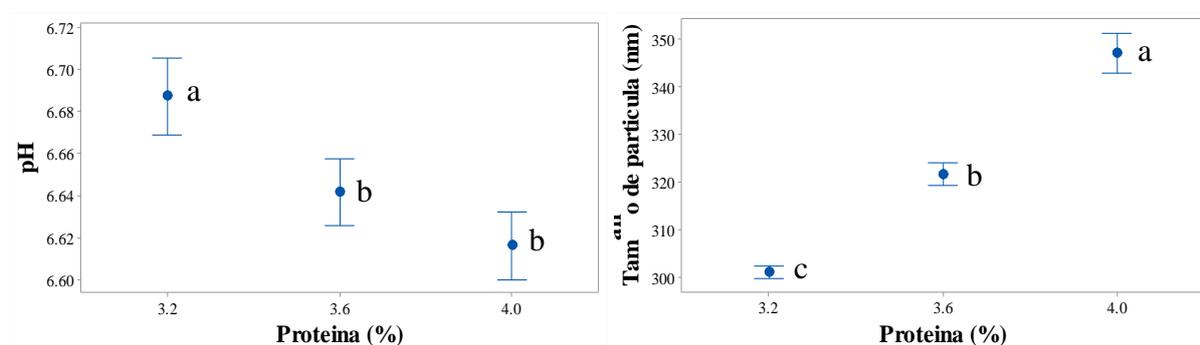


Figura 5. Variación de pH y tamaño de partícula en función de la concentración de proteína en leche en polvo desnatada reconstituida.

4.2. Selección de sonda

Los siguientes resultados corresponden a los ensayos preliminares explicados en la sección 3.1. En las Figuras 6 y 7 se muestra la comparación de los perfiles de dispersión de luz obtenidos con las sondas multifibra de 400 y 600 μm a diferentes longitudes de onda, para las muestras con distintas concentraciones de proteína y grasa, teniendo en cuenta que estos son los dos componentes que generan en mayor medida la dispersión de luz en leche, al estar estructurados ambos como partículas (Payne et al., 1999). Los resultados muestran que la ratio de dispersión de luz aumentó ligeramente con el diámetro de la sonda empleada y con la longitud de onda, lo que concuerda con los resultados encontrados por Payne et al. (1999), quienes utilizando una sonda de 600 μm establecieron que longitudes de onda alrededor de 900 nm, en un rango entre 400 y 900 nm, mostraron una mayor sensibilidad a la dispersión de luz en función de la concentración de grasa láctea.

Por otra parte, valores altos en la pendiente del perfil de dispersión (ΔR) están relacionados con tiempos de coagulación más cortos, como han demostrado estudios previos empleando la sonda convencional (Arango et al., 2018a; Salvador et al., 2019). En este sentido, el perfil de la ratio de dispersión de luz (R) se incrementa a niveles altos de proteína, pero disminuye conforme aumenta la concentración de grasa para las dos sondas evaluadas (Figuras 6 y 7). Esto se debe a que las micelas de caseína dispersan menos luz que los glóbulos grasos, porque son mucho más pequeñas que las segundas (Castillo et al., 2005). Por lo tanto, la grasa genera mayor dispersión de luz y por ende un voltaje inicial (V_0) significativamente más alto, por tanto, dado que R se calcula como el voltaje a tiempo t sobre el voltaje inicial (correspondiente al valor de dispersión de luz durante el primer minuto tras la adición de la enzima), en las muestras con más grasa el aumento relativo de la ratio de dispersión de luz es menor y también lo será el valor de ΔR .

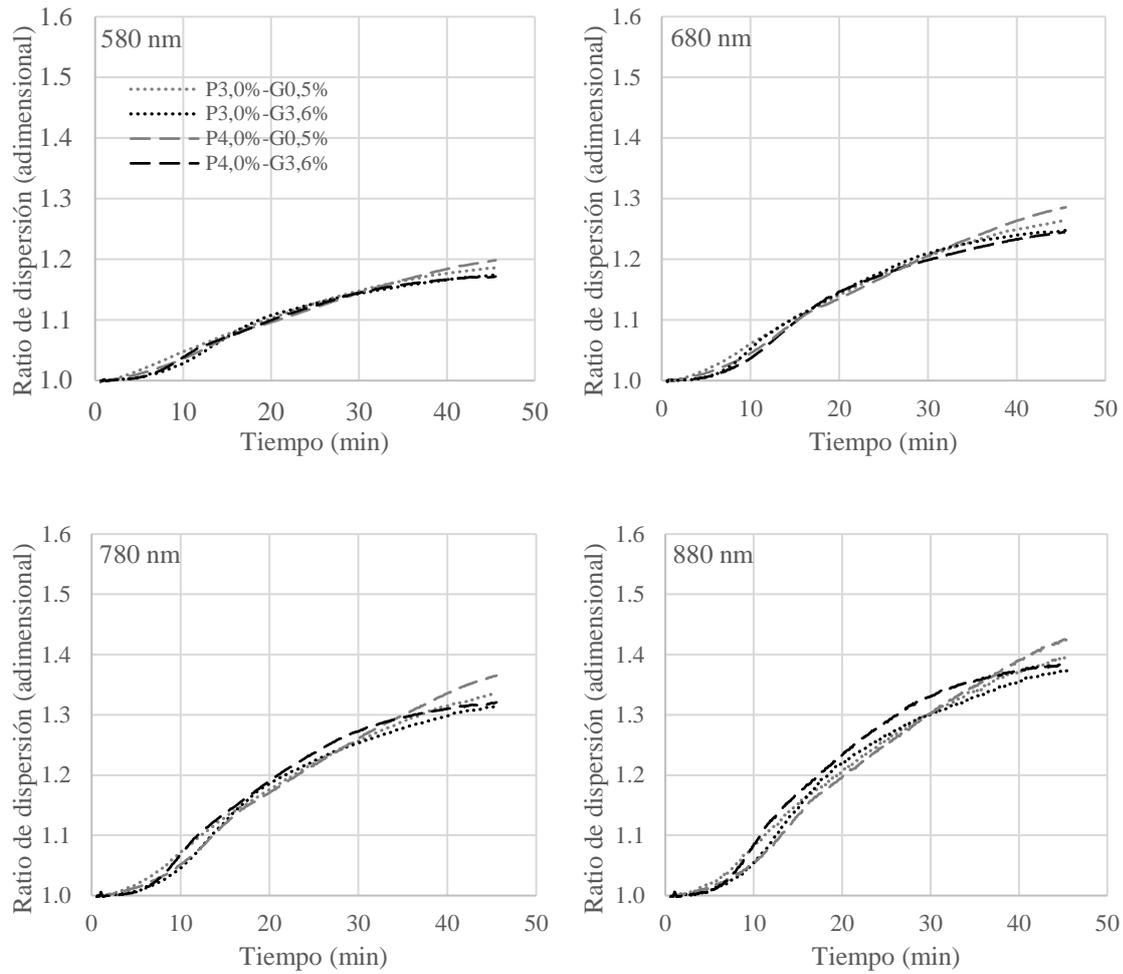


Figura 6. Perfiles de la ratio de dispersión de luz usando una sonda multifibra con diámetro de 400 μm a cuatro longitudes de onda, en función de la concentración de grasa y proteína.

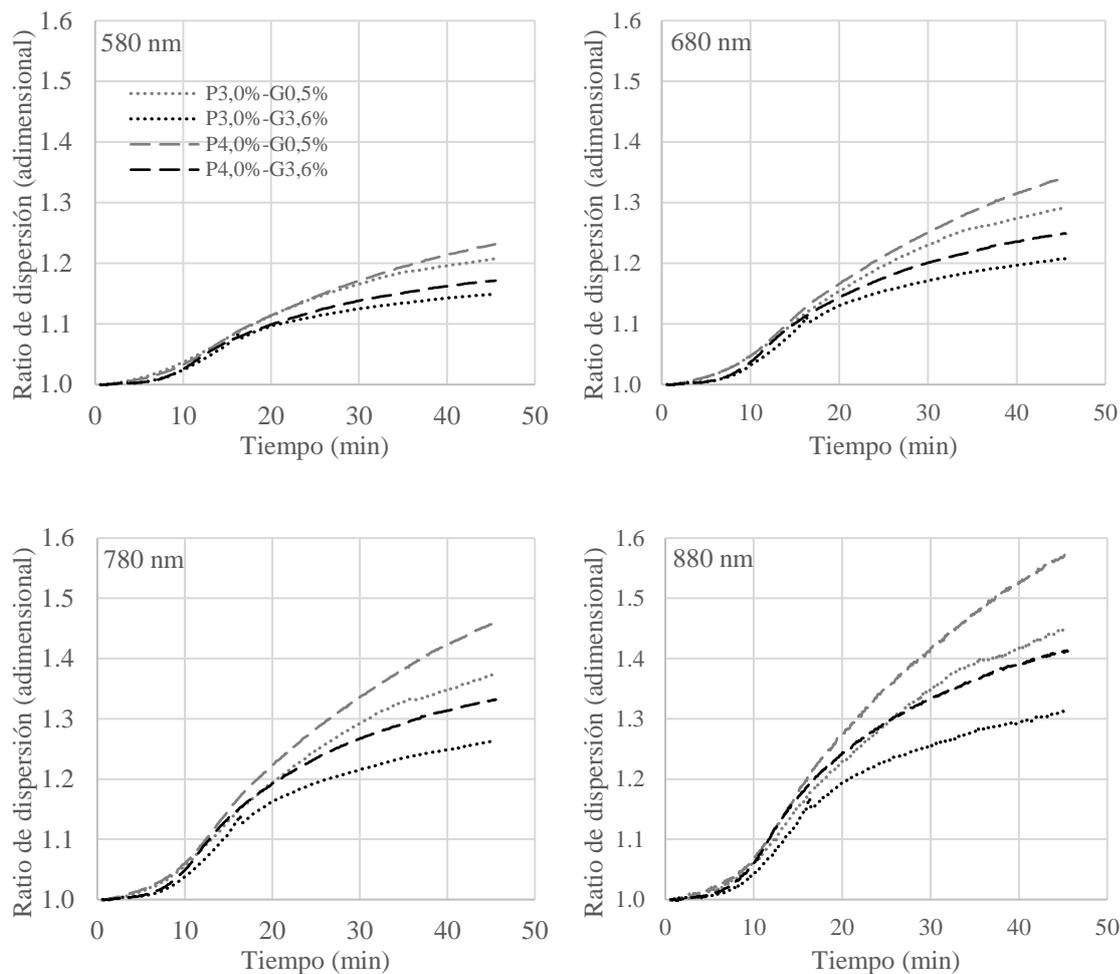


Figura 7. Perfiles de la ratio de dispersión de luz usando una sonda multifibra con diámetro de 600 μm a cuatro longitudes de onda, en función de la concentración de grasa y proteína.

La Figura 8 compara los valores de R_{inf} que corresponde al último valor de ratio de dispersión de luz para cada tratamiento, tomado a los 45 min para todos los ensayos. Se observa que, si bien el valor medio de R_{inf} para la sonda de mayor diámetro (600 μm) es ligeramente superior, esta arroja una mayor desviación asociada a una mayor separación entre las curvas y por tanto una mayor sensibilidad a los diferentes niveles de proteína y grasa estudiados. Por otra parte, conviene que la respuesta no presente demasiado ruido y es notable que, para la fibra de 600 μm , a 880 nm el perfil de dispersión de luz arroja una alta dispersión de los datos (curvas menos suavizadas). Es por esta razón que el diámetro de sonda y la longitud de onda seleccionados para desarrollar los ensayos posteriores fueron 600 μm y 780 nm, respectivamente.

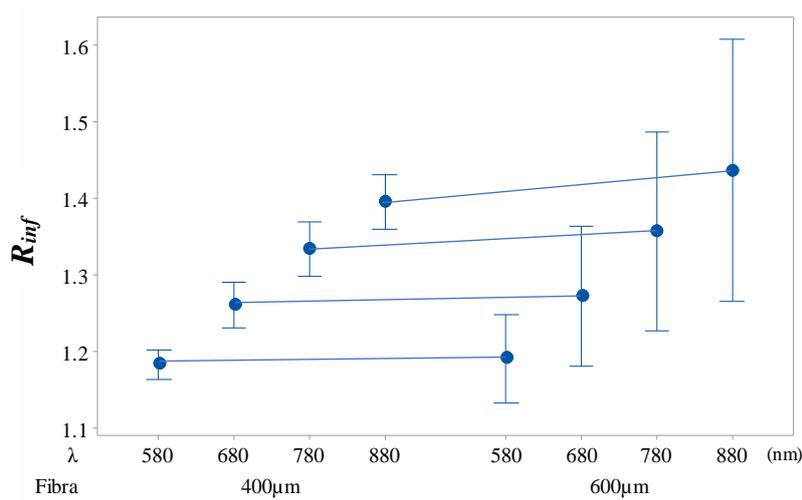


Figura 8. Intervalos de R_{inf} en función del diámetro de fibra y la longitud de onda.

4.3. Respuesta óptica y reológica en función de las concentraciones de CaCl_2 y proteína

En la Figura 9 se muestra un ejemplo de uno de los perfiles de dispersión de luz obtenido al emplear la sonda multifibra seleccionada. Es evidente que tanto el perfil como las derivadas resultantes son similares a las obtenidas al usar la sonda convencional (Figura 4) y a las obtenidas por otros autores (Fagan et al., 2007; Arango et al., 2013, 2015; Salvador et al., 2019), además el incremento en la ratio de dispersión osciló de 27 a 35 % luego de 45 minutos, que se encuentra dentro de los rangos establecidos para leche de vaca de 30 a 50 % (Nicolau et al., 2015) y por tanto es posible determinar los parámetros ópticos y analizar su comportamiento de acuerdo a como se ha realizado en trabajos previos.

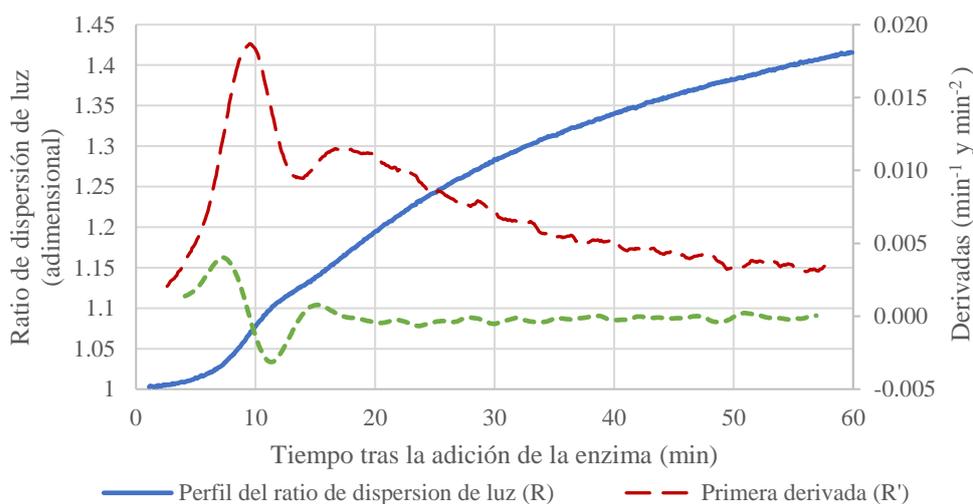


Figura 9. Perfil de dispersión de luz obtenido durante la coagulación enzimática de la leche (proteína 4,0 %; CaCl_2 250 mg L^{-1}) usando una sonda multifibra con diámetro de 600 μm a 780 nm, con sus respectivas derivadas.

El ANOVA mostrado en la Tabla 2 describe el efecto de las concentraciones de CaCl₂ añadido y proteína sobre los parámetros ópticos y reológicos evaluados en este estudio. La réplica no tuvo efectos significativos sobre ninguno de los parámetros evaluados y por tanto no se incluyó en el análisis. Se observa que la concentración de proteína afectó significativamente el voltaje inicial (V_0), el parámetro óptico t_{2max} y todos los parámetros reológicos. Se evidencia que la proteína ejerce un efecto significativo sobre la variabilidad de los tiempos de agregación (t_{ag} , $t_{G'1}$) y endurecimiento (t_{F30} , $t_{G'30}$), mientras que la variable t_{max} , en gran medida relacionada con la fase de hidrólisis al representar el lapso de tiempo entre la adición de la enzima y el inicio de la agregación micelar, se vio afectada por el CaCl₂ añadido, seguramente como consecuencia del descenso del pH asociado. De hecho, todos los parámetros ópticos, excepto V_0 , y los reológicos, excepto t_{ag} , se vieron afectados por la cantidad de CaCl₂ añadido.

Tabla 2. Análisis de varianza y valores F del efecto de la proteína, el CaCl₂ su interacción sobre los parámetros ópticos y reológicos durante la coagulación enzimática de la leche a 780 nm.

Parámetros	R ²	Fuente de variación		
		Proteína (GL=2)	CaCl ₂ (GL=2)	Proteína* CaCl ₂ (GL=4)
t_{max}	0,723	2,75 ^{ns}	11,41 ^{**}	4,67 ^{**}
t_{2max}	0,695	6,31 ^{**}	8,89 ^{**}	2,67 ^{ns}
t_{2min}	0,749	1,56 ^{ns}	16,3 ^{***}	4,51 [*]
t_{max2}	0,479	1,44 ^{ns}	4,75 [*]	1,05 ^{ns}
$t_{G'1}$	0,570	5,42 [*]	4,16 [*]	1,18 ^{ns}
$t_{G'30}$	0,888	59,95 ^{***}	6,5 ^{**}	2,5 ^{ns}
t_{ag}	0,534	6,64 ^{**}	0,95 ^{ns}	1,35 ^{ns}
t_{F30}	0,939	126,78 ^{***}	6,18 ^{**}	3,16 [*]
$tg \delta_{30min}$	0,695	11,32 ^{**}	4,31 [*]	2,45 ^{ns}
V_0	0,799	31,03 ^{***}	2,71 ^{ns}	0,99 ^{ns}

$N=27$; GL , grados de libertad; R^2 , coeficiente de determinación; ^{*} $P<0,05$, ^{**} $P<0,01$, ^{***} $P<0,001$, ^{ns} no significativo. Para la definición de las variables ver las secciones 3.4.2 y 3.5 del apartado de materiales y métodos.

La interacción proteína por CaCl₂ resultó ser significativa para los parámetros ópticos t_{max} y t_{2min} , así como para el parámetro reológico t_{F30} . El efecto de dicha interacción sobre el tiempo de endurecimiento, t_{F30} , se presenta en la Figura 10, donde puede observarse que el tiempo que toma el gel desde el inicio del endurecimiento ($t_{G'1}$) hasta el momento de corte reológico ($t_{G'30}$) se reduce casi que de manera lineal con el aumento de proteína y que la adición de CaCl₂ parece no afectar este parámetro por encima de 200 mg L⁻¹, excepto a una concentración de 3,6 % de proteína.

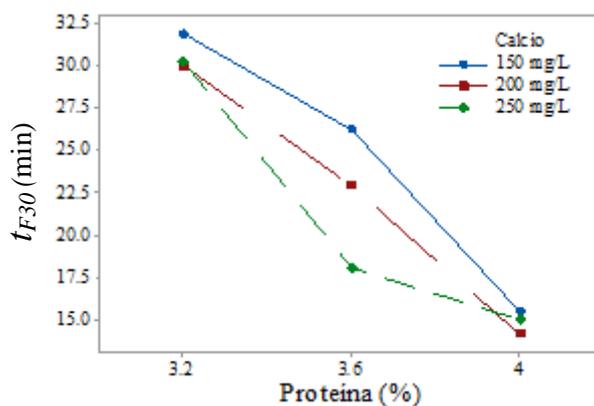


Figura 10. Efecto de la interacción Proteína*CaCl₂ sobre el tiempo de endurecimiento t_{F30} .

De acuerdo con el análisis de medias para proteína (Tabla 3), el parámetro t_{2max} arrojó diferencias significativas entre 3,2 % y 4,0 % demostrando que tal incremento en el nivel de proteína provocó un retraso de la etapa hidrólisis, retrasando así el inicio de la agregación micelar. Lo anterior se atribuye a que a concentraciones de proteína mayores a 3 % ocurre un descenso en el ratio enzima:caseína provocando una saturación de enzima por el sustrato, con lo que se requiere un mayor tiempo para generar suficiente hidrólisis de la κ -CN e inducir la agregación de las micelas (Fox et al., 2017; Salvador et al., 2019).

La Tabla 3 también muestra que los tiempos de gelificación ($t_{G'1}$) y de agregación (t_{ag}), así como los tiempos de corte reológico ($t_{G'30}$) y de endurecimiento del gel (t_{F30}), disminuyeron significativamente al incrementar la concentración de proteína de 3,2 % a 4,0 %. La reducción en estos parámetros también fue observada por Arango et al. (2018b) y Salvador et al. (2019), quienes atribuyeron este comportamiento al incremento en el número de colisiones entre los residuos de *para*- κ -caseína al aumentar la concentración de proteína debido a la reducción de las distancias medias entre las micelas, acelerando así las dos etapas básicas de formación del gel (agregación micelar y desarrollo de la firmeza). El parámetro $tg \delta_{30min}$ disminuyó significativamente a niveles altos de proteína, lo que se traduce en geles más firmes y con menor tendencia a la sinéresis como explica Arango (2015). Finalmente, el incremento significativo y lineal del voltaje inicial, V_0 , en función del aumento de proteína ($V_0 = 147 \cdot P(\%) + 878$; $R^2 = 0.9996$) coincide con las observaciones obtenidas por Pérez (2019) al evaluar, mediante el sensor de dispersión de luz convencional, el efecto de cuatro concentraciones de proteína (3.2, 3.3, 3.4 y 3.5 %) sobre dicho parámetro. Si bien, Pérez (2019) obtiene un valor de R^2 muy similar ($R^2 = 0.996$) al del presente estudio, la pendiente de la recta fue bien diferente, siendo muy superior en el caso de la sonda multifibra (147 vs 0,35). Esto demuestra que la sonda multifibra es sustancialmente más sensible a la concentración de proteína en la leche de partida,

lo cual no interfiere de forma relevante a la hora de determinar la ratio de dispersión de luz que se emplea en la estimación del módulo de elasticidad del gel, precisamente porque la ratio es una forma de normalización de la señal frente a su intensidad inicial en función de la composición. Sin embargo, posibilitaría, al menos teóricamente, la estimación de la concentración de proteína con la misma sonda *inline* de determinación de G' . Esta posibilidad es muy atractiva, ya que podría facilitar, la incorporación de la proteína en los modelos de predicción a fin de generalizar su empleo en condiciones variables de concentración de proteína, sin dependencia de instrumentos NIR como por ej., MilkoScan.

Tabla 3. Comparación de medias de parámetros ópticos y reológicos, obtenidos durante la coagulación enzimática de leche desnatada, en función de la concentración de proteína.

Proteína (%)	t_{2max} (min)	$t_{G'1}$ (min)	$t_{G'30}$ (min)	t_{ag} (min)	t_{F30} (min)	$tg \delta_{30min}$ (adim)	V_0 (V)
3,2	7,3 ^b	19,1 ^a	49,7 ^a	9,2 ^a	30,6 ^a	0,277 ^a	1,348 ^c
3,6	7,7 ^{ab}	19,6 ^a	42,0 ^b	9,5 ^a	22,3 ^b	0,277 ^a	1,409 ^b
4,0	8,1 ^a	17,0 ^b	31,8 ^c	6,5 ^b	14,9 ^c	0,270 ^b	1,465 ^a

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ($P < 0,05$); Número de réplicas = 3: Número de observaciones, $N = 27$. Para la definición de las variables ver las secciones 3.4.2 y 3.5 del apartado de materiales y métodos.

Los resultados de comparación de medias (Tabla 4) según la concentración de $CaCl_2$ añadido muestran que todos los parámetros tanto ópticos, t_{max} , t_{2max} , t_{2min} y t_{max2} , como reológicos, $t_{G'1}$, $t_{G'30}$, así como los tiempos calculados de agregación y endurecimiento, t_{ag} y t_{F30} , disminuyeron significativamente al pasar de 150 a 200 $mg L^{-1}$, mientras que no hubo efecto significativo con el incremento adicional de calcio a 250 $mg L^{-1}$. Como la adición de $CaCl_2$ se traduce en un aumento tanto de calcio libre como coloidal, que además se asocia a un descenso de pH, los resultados obtenidos reflejan claramente el aumento de la velocidad tanto de la fase de hidrólisis por efecto del pH (descenso de t_{max}) como de las fases de formación del gel (agregación micelar $-t_{ag}$ y desarrollo de la dureza del gel $-t_{F30}$), favorecidos por la mayor presencia de iones Ca^{2+} y de CCP, con lo cual, además, se obtuvieron geles más firmes de acuerdo con el descenso significativo de los valores de $tg \delta_{30min}$. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Arango (2015) quien atribuyó este comportamiento a la solubilización de iones H^+ y el consecuente descenso de pH como resultado de la adición de $CaCl_2$, que actuó incrementando la actividad de las enzimas y produciendo un efecto indirecto en la aceleración de la hidrólisis. Además este descenso de pH también genera una disminución de la repulsión electrostática intermicelar, al neutralizar la carga negativa neta de las micelas ocasionando una mayor atracción entre ellas, acelerando así la gelificación (Sandra et al., 2012).

Tabla 4. Comparación de medias de parámetros ópticos y reológicos, obtenidos durante la coagulación enzimática de la leche desnatada, en función de la concentración de CaCl_2 .

CaCl_2 (mg L^{-1})	t_{max} (min)	t_{2max} (min)	t_{2min} (min)	t_{max2} (min)	$t_{G'1}$ (min)	$t_{G'30}$ (min)	t_{F30} (min)	$tg \delta_{30min}$ (adim)
150	10,9 ^a	8,2 ^a	13,0 ^a	20,6 ^a	20,0 ^a	44,4 ^a	24,5 ^a	0,278 ^a
200	9,8 ^b	7,4 ^b	11,7 ^b	18,8 ^b	18,0 ^b	40,3 ^b	22,3 ^b	0,274 ^b
250	9,8 ^b	7,5 ^b	11,6 ^b	18,2 ^b	17,7 ^b	38,7 ^b	21,1 ^b	0,273 ^b

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ($P < 0,05$); Número de réplicas = 3: Número de observaciones, $N = 27$. Para la definición de las variables ver las secciones 3.4.2 y 3.5 del apartado de materiales y métodos.

Adicionalmente, en el presente estudio se evidenciaron correlaciones significativas ($P < 0,05$) de los parámetros ópticos de tiempo entre sí, que es coherente con lo observado con la sonda convencional ($0,73 < r < 0,98$). De manera similar, los parámetros reológicos se correlacionaron entre sí ($0,68 < r < 0,99$), mostrando correlaciones entre $t_{G'1}$ y $t_{G'30}$ ($r = 0,78$) que también es coherente con observaciones anteriores, y entre los tiempos de agregación (t_{ag}) y endurecimiento (t_{F30}) como es de esperar ($r = 0,76$). Se evidenció también una correlación negativa de $t_{G'30}$ ($r = -0,88$) y t_{F30} ($r = 0,91$) con V_0 , debido al efecto de la proteína sobre V_0 ($r = 0,93$) y sobre la dureza del gel, es decir, sobre $t_{G'30}$ ($r = -0,91$) y t_{F30} ($r = -0,95$), indicando que a mayor proteína se obtendrá un mayor V_0 y menores tiempos de endurecimiento. Adicionalmente, se observaron correlaciones significativas de la concentración de proteína con V_0 , pH y tamaño de partícula (TP) ($r = 0,93$, $-0,91$ y $0,96$, respectivamente) y de TP con pH ($r = -0,78$), que explica las de $t_{G'30}$ y t_{F30} con pH ($r = 0,91$ y $0,94$) y con TP ($r = -0,85$ y $-0,88$). Esta información es importante teniendo en cuenta que las correlaciones de Pearson y el ANOVA son análisis de diferente naturaleza y por tanto refuerza todo lo discutido en el ANOVA de páginas anteriores.

4.4. Comportamiento de los coeficientes del modelo de predicción

El efecto de la proteína y el CaCl_2 añadido sobre los parámetros (a, b, c y d, codificados según lo descrito en la sección 3.6) del modelo propuesto por Arango y Castillo (2018) para la predicción de G' del gel, durante la coagulación, a partir de la ratio de dispersión de luz, se muestran en la Tabla 5. Es evidente que los valores F son considerablemente elevados en relación con el efecto de la proteína, en comparación con el CaCl_2 , especialmente con respecto a los parámetros c y d.

Tabla 5. Análisis de varianza y valores F del efecto de la proteína, el CaCl₂ y su interacción sobre los parámetros del modelo de predicción del módulo elástico (G') de Arango y Castillo (2018).

Parámetro	R ²	Fuente de variación		
		Proteína (GL=2)	CaCl ₂ (GL=2)	Proteína* CaCl ₂ (GL=4)
<i>a</i>	0,672	9,84**	4,47*	2,09 ^{ns}
<i>b</i>	0,590	6,38**	4,32*	1,13 ^{ns}
<i>c</i>	0,969	264,76***	0,31 ^{ns}	6,71**
<i>d</i>	0,931	104,36***	8,9**	4,33*

$N=27$; GL , grados de libertad; R^2 , coeficiente de determinación; * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, ^{ns} no significativo. Parámetros del modelo de predicción; *a*, *b*, *c* y *d* (ver sección 3.6).

En la Tabla 6 se observa que dos de los parámetros (*a* y *b*) disminuyeron significativamente a concentraciones de proteína mayores a 3,6 %. El parámetro *c* disminuyó al aumentar la concentración de proteína; mientras que lo contrario ocurrió con *d*. El efecto observado sobre los parámetros del modelo, tanto en función de la proteína como del CaCl₂, muestran un comportamiento coherente relacionado con las etapas de agregación y endurecimiento, así como con la firmeza del gel. Como consecuencia, no sorprende que los resultados de predicción de G' se hayan ajustado bien al comportamiento real de la matriz proteica durante la coagulación.

Es importante resaltar, que los cuatro parámetros de ajuste del modelo varían de forma aproximadamente lineal tanto en función de la concentración de proteína como de CaCl₂, lo que abriría la posibilidad de incluir ambos factores en los modelos de predicción, con el fin de modelizar todas las condiciones ensayadas con un solo set de coeficientes de calibración.

Tabla 6. Comparación de medias de los parámetros del modelo de predicción del módulo elástico (G') en función de las concentraciones de proteína y CaCl₂.

Parámetro	Proteína (%)			R ² Ajuste lineal	CaCl ₂ (mg·L ⁻¹)			R ² Ajuste lineal
	3,2	3,6	4,0		150	200	250	
<i>a</i>	1,40 ^a	1,38 ^a	1,35 ^b	0,987	1,40 ^a	1,37 ^{ab}	1,36 ^b	0,923
<i>b</i>	1,21 ^a	1,22 ^a	1,18 ^b	0,519	1,22 ^a	1,19 ^b	1,19 ^b	0,750
<i>c</i>	131,99 ^a	122,14 ^b	113,35 ^c	0,999	122,86 ^a	122,38 ^a	122,25 ^a	0,901
<i>d</i>	0,22 ^c	0,26 ^b	0,35 ^a	0,953	0,26 ^b	0,28 ^a	0,29 ^a	0,964

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes ($P<0,05$); Número de réplicas = 3; Número de observaciones, $N = 27$. Parámetros del modelo de predicción; *a*, *b*, *c* y *d* (ver sección 3.6).

4.5. Calibración y validación del modelo de predicción

Cabe destacar en este punto que ésta es una etapa compleja que requirió bastante trabajo, ya que cada combinación de los factores evaluados (es decir, cada tratamiento) que comprendía tres réplicas y por ende tres coagulaciones arrojaba entre 380 y 1000 datos de ratio de dispersión (Anexo 1) en función del tiempo que tardaba cada coagulación dependiendo de la concentración de proteína y CaCl_2 . Esto procedía de archivos con 3684 perfiles de coagulación, en espectros de aproximadamente 200 a 1100 nm. Se tuvieron que probar múltiples estrategias de calibración por lo que los datos debían ser cuidadosamente revisados, ajustados individualmente con la herramienta de Solver y posteriormente graficados para una correcta interpretación y por tanto fue la etapa que demandó más tiempo en el presente estudio.

Tabla 7. Parámetros estadísticos de ajuste del modelo de predicción del módulo de almacenamiento (G'), usando tres calibraciones y tres validaciones por tratamiento.

Tratamiento		Calibración ¹					Validación ²				
P (%)	Ca ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	G'_{med}	G'_{pred}	R^2	SEP	CV	G'_{med}	G'_{pred}	R^2	SEP	CV
3,2	150	30,0±0,0	30,2±0,1	0,9998	0,19	0,9	30,1±0,0	34,7±19,0	0,9949	10,51	52,5
3,2	200	30,1±0,0	29,9±0,3	0,9996	0,39	1,9	30,1±0,0	31,2±13,4	0,9996	9,14	45,6
3,2	250	30,0±0,0	30,0±0,1	0,9998	0,18	0,9	30,1±0,0	30,3±4,6	0,9994	3,06	15,3
3,6	150	30,1±0,0	30,1±0,3	0,9995	0,32	1,6	30,1±0,0	34,9±23,9	0,9869	13,63	67,9
3,6	200	30,0±0,0	30,0±0,1	0,9997	0,20	1,0	30,0±0,0	30,4±2,9	0,9976	2,06	10,3
3,6	250	30,0±0,0	29,6±0,1	0,9997	0,21	1,0	30,0±0,1	29,8±4,5	0,9996	2,96	14,8
4,0	150	30,1±0,0	30,3±0,4	0,9997	0,23	1,1	30,1±0,0	33,8±20,7	0,9977	11,18	55,6
4,0	200	30,0±0,0	30,2±0,3	0,9997	0,22	1,1	30,1±0,1	30,0±4,0	0,9996	2,27	11,3
4,0	250	30,0±0,0	30,0±0,2	0,9998	0,17	0,8	30,0±0,0	30,8±10,0	0,9997	6,31	31,4
Media		30,1±0,0	30,0±0,2	0,9997	0,23	1,2	30,1±0,0	31,8±2,1	0,9972	6,79	33,8

¹Cada calibración se realizó con los datos de dos réplicas en un rango de G' entre 5 y 30 Pa. Los valores corresponden a valores medios y desviaciones estándar de las tres calibraciones posibles por tratamiento (ver sección 3.6). ²Cada validación se realizó con los datos de la réplica independiente no usada en el set de calibración. Los valores corresponden a valores medios y desviaciones estándar de las tres validaciones posibles por tratamiento (ver sección 3.6). R^2 , coeficiente de determinación; SEP, error estándar de predicción (Pa); CV, coeficiente de variación (%); G'_{pred} y G'_{med} , valores de G' predicha y medida cuando $G' = 30$ Pa, respectivamente. Número de experimentos, $N = 27$; N_c , Número de puntos por cada calibración, $244 < N_c < 736$. N_v , número de puntos por cada validación, $118 < N_v < 388$.

Al realizar las calibraciones y validaciones con las tres réplicas en todas las combinaciones posibles, tal como se detalló en la sección 3.6 de materiales y métodos, se evidenció un buen ajuste de los datos al modelo durante la calibración (Tabla 7), con errores de predicción (SEP) inferiores a 0,4 Pa y coeficientes de variación (CV) menores al 2 %. Sin embargo, al realizar la validación estos parámetros se incrementaron, alcanzando valores para SEP y CV de 2,06 a

13,63 Pa y 10,3 a 55,6 % respectivamente, a pesar de mostrar altos coeficientes de determinación (R^2). Este último parámetro estadístico arrojó resultados entre 0,987 y 0,999 para todas las calibraciones y validaciones realizadas lo que, de acuerdo con el criterio de Malley y coladores (2005) para clasificar el éxito de las calibraciones, se considera una calibración excelente ($R^2 > 0,95$). Los modelos predictivos fueron capaces de explicar entre un 98,7 y 99,9 % de la variación de los valores de G'_{30} observados en el experimento.

La validación del modelo mejoró sustancialmente al emplear en la calibración las dos replicas más lejanas a la media de las tres y validar con la réplica restante (Tabla 8). De esta manera se obtuvieron valores más bajos de SEP y de CV en la validación. Los valores de SEP oscilaron entre 1,06 y 6,89 Pa y el CV estuvo entre 5,3 y 34,4 %. Esto representa una mejora media de 60,5 % y de 60,3 % para SEP y CV, respectivamente, en comparación con el procedimiento de calibración inicial (Tabla 7).

Tabla 8. Parámetros estadísticos de ajuste del modelo de predicción del módulo de almacenamiento (G'), usando dos calibraciones y una validación por tratamiento.

Tratamiento		Calibración ¹					Validación ²				
P (%)	Ca (mg·L ⁻¹)	G'_{med}	G'_{pred}	R^2	SEP	CV	G'_{med}	G'_{pred}	R^2	SEP	CV
3,2	150	30,1±0,1	30,2±0,1	0,9997	0,20	1,0	30,1	34,4	0,9992	3,33	16,6
3,2	200	30,1±0,0	30,0±0,3	0,9996	0,33	1,7	30,0	38,0	0,9993	6,89	34,4
3,2	250	30,0±0,0	30,0±0,1	0,9998	0,18	0,9	30,1	32,6	0,9979	2,06	10,4
3,6	150	30,1±0,0	30,2±0,4	0,9996	0,30	1,5	30,1	25,0	0,9994	4,00	20,0
3,6	200	30,0±0,0	30,0±0,1	0,9997	0,21	1,0	30,0	32,1	0,9876	1,86	9,3
3,6	250	30,0±0,0	29,6±0,1	0,9997	0,20	1,0	30,1	31,9	0,9989	1,06	5,3
4,0	150	30,1±0,1	30,2±0,5	0,9997	0,22	1,1	30,1	29,7	0,9980	1,06	5,3
4,0	200	30,0±0,0	30,2±0,3	0,9997	0,21	1,0	30,2	31,9	0,9993	1,53	7,6
4,0	250	30,0±0,0	30,0±0,2	0,9998	0,17	0,8	30,0	33,0	0,9996	2,35	11,7
Media		30,1±0,0	30,0±0,2	0,9997	0,22	1,1	30,1±0,1	32,1±3,5	0,9989	2,68	13,4

¹Cada calibración se realizó con los datos de las dos réplicas más distantes del promedio, en un rango de G' entre 5 y 30 Pa. Los valores corresponden a la única calibración posible por tratamiento (ver sección 3.6). ²Cada validación se realizó con los datos de la réplica más cercana al promedio no usada en el set de calibración. Los valores corresponden a la única validación posible por tratamiento (ver sección 3.6). R^2 , coeficiente de determinación; SEP, error estándar de predicción (Pa); CV, coeficiente de variación (%); G'_{pred} y G'_{med} , valores de G' predicha y medida cuando $G' = 30$ Pa, respectivamente. Número de experimentos, $N = 27$; N_c , Número de puntos por cada calibración, $244 < N_c < 657$. N_v , número de puntos por cada validación, $130 < N_v < 388$.

Para el nivel más bajo de proteína evaluado (3,2 %) se obtuvieron en la validación valores de SEP entre 2,06 y 6,89 Pa (Figura 11), siendo el tratamiento con 250 mg L⁻¹ de CaCl₂ el que mostró el mejor ajuste al modelo, mientras que el tratamiento con 200 mg L⁻¹ de CaCl₂ arrojó

el mayor valor de SEP. Con niveles de proteína de 3,6 %, el ensayo con 250 mg L⁻¹ de CaCl₂ arrojó la mejor predicción de G' con SEP = 1,06 Pa (Figura 12). Finalmente, la Figura 13 muestra que a una concentración de 4,0 % de proteína se obtuvieron buenas predicciones de G' con los tres niveles de calcio evaluados.

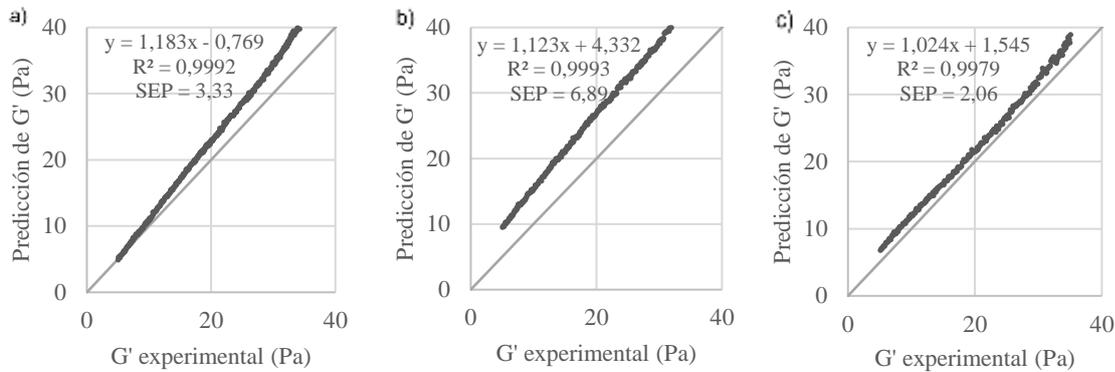


Figura 11. Validación del modelo de predicción del módulo de almacenamiento (G') a una concentración de 3.2 % de proteína. Los datos de validación corresponden a la réplica más cercana a la media entre las tres. R^2 , coeficiente de determinación; SEP, error estándar de predicción (Pa); N, número de datos de validación: a) datos a 150 mg L⁻¹ de CaCl₂. N = 388; b) datos a 200 mg L⁻¹ de CaCl₂. N = 322; c) datos a 250 mg L⁻¹ de CaCl₂. N = 277.

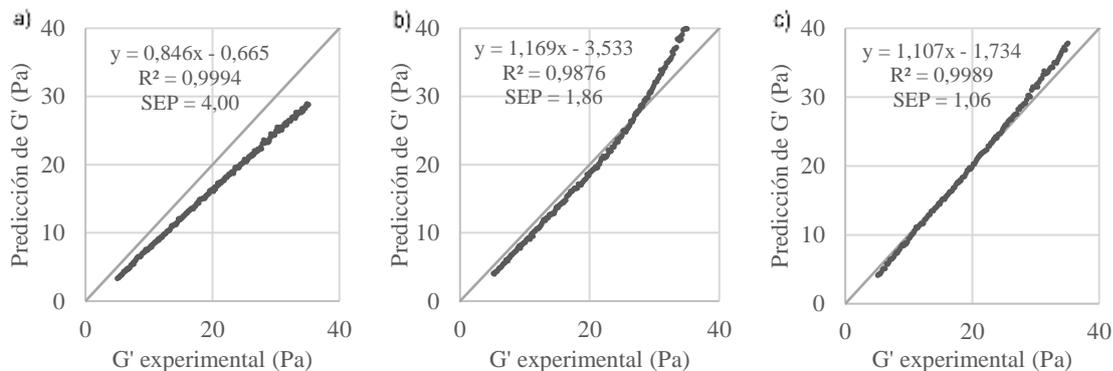


Figura 12 Validación del modelo de predicción del módulo de almacenamiento (G') a una concentración de 3.6 % de proteína. Los datos de validación corresponden a la réplica mas cercana a la media entre las tres. R^2 , coeficiente de determinación; SEP, error estándar de predicción (Pa); N, número de datos de validación: a) datos a 150 mg L⁻¹ de CaCl₂. N = 235; b) datos a 200 mg L⁻¹ de CaCl₂. N = 206; c) datos a 250 mg L⁻¹ de CaCl₂. N = 154.

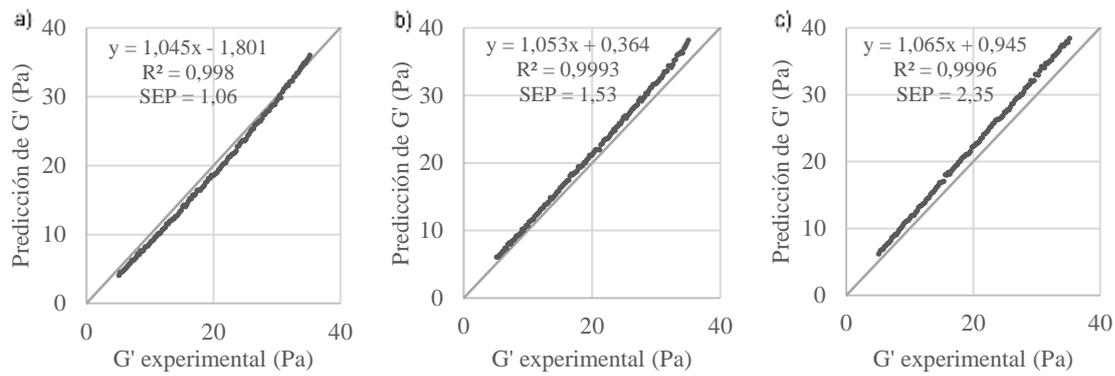


Figura 13. Validación del modelo de predicción del módulo de almacenamiento (G') a una concentración de 4.0 % de proteína. Los datos de validación corresponden a la réplica mas cercana a la media entre las tres. R^2 , coeficiente de determinación; SEP, error estándar de predicción (Pa); N, número de datos de validación: a) datos a 150 mg L^{-1} de CaCl_2 . $N = 141$; b) datos a 200 mg L^{-1} de CaCl_2 . $N = 137$; c) datos a 250 mg L^{-1} de CaCl_2 . $N = 130$.

CONCLUSIONES

El uso de una sonda multifibra con diámetro de 600 μm a una longitud de onda de 780 nm permite obtener la mejor respuesta óptica del sensor durante la coagulación enzimática de la leche, en comparación con la sonda de 400 μm , pues muestra mayor sensibilidad a las variaciones en el contenido de proteína y grasa de la leche y menor dispersión de la respuesta en cada caso.

La sonda multifibra de 600 μm a longitud de onda de 780 nm permite monitorizar con éxito la coagulación enzimática de la leche, pues arroja un perfil de dispersión de luz NIR similar al obtenido con la sonda convencional y por ende permite determinar los parámetros ópticos habituales derivados del mismo que, por otra parte, contienen información equivalente en relación con las diferentes fases de coagulación de la leche. Adicionalmente, el voltaje inicial de la sonda, V_0 , responde en aproximadamente dos órdenes de magnitud más a las variaciones de concentración de proteína en la leche, lo que permitiría estimar la concentración de proteína con la misma sonda de predicción de G' , sin comprometer la calidad de la estimación, al emplearse como predictor R que, al ser una ratio con respecto a V_0 , es una señal normalizada.

La sonda multifibra evaluada permite predecir con éxito ($\text{SEP} < 7 \text{ Pa}$) la dureza de la cuajada empleando el modelo de predicción del módulo elástico del gel propuesto, resultando ser una buena alternativa a la sonda convencional, lo que permitiría reducir el costo de implementación del sistema óptico a nivel industrial.

REFERENCIAS

- AOAC (2005). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA
- Arango, O. (2015). *Aplicación de dispersión de luz de infrarrojo próximo en la producción de derivados lácteos bajos en grasa con inulina*. Tesis doctoral. UAB, España.
- Arango, O., Castillo, M. (2018). A method for the inline measurement of milk gel firmness using an optical sensor. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3910–3917.
- Arango, O., Trujillo, A. J., Castillo, M. (2013). Influence of fat replacement by inulin on rheological properties, kinetics of rennet milk coagulation, and syneresis of milk gels. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 1984–1996.
- Arango, O., Trujillo, A. J., Castillo, M. (2015). Predicting coagulation and syneresis parameters of milk gels when inulin is added as fat substitute using infrared light backscatter. *Journal of Food Engineering*, 157, 63–69.
- Arango, O., Trujillo, A. J., Castillo, M. (2018a). Modelling gelation and cutting times using light backscatter parameters at different levels of inulin , protein and calcium. *LWT - Food Science and Technology*, 91, 505–510.
- Arango, O., Trujillo, A. J., Castillo, M. (2018b). Monitoring the effect of inulin , protein , and calcium on milk coagulation phases using a fibre optic sensor. *International Dairy Journal*, 81, 80–86.
- Castillo, M., Payne, F. A., López, M. B., Ferrandini, E., Laencina, J. (2005). Optical sensor technology for measuring whey fat concentration in cheese making. *Journal of Food Engineering*, 71(4), 354–360.
- Castillo, M. (2006). Cutting time prediction methods in cheese making. In D. Heldman (Ed.), *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*, 1(1–7). Boca Ranton: Taylor & Francis Group.
- Castillo, M., Arango, O. (2018). *A method and a system for determining gel firmness values from inline optical measurements*. Barcelona, España. Patente N° EP3036527 B1.
- Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., Lopez, M. B. (2000). Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 10, 551–562.

- Castillo, M. (2001). *Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, España.
- Cosgrove, N. (2000). *Design and development of an ultrasonic measuring system to monitor milk coagulation*. Master thesis. National University of Ireland, Dublin, Ireland.
- Dagleish, D. G., Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 449–467.
- Fagan, C. C., Castillo, M., Payne, F. A., Donnell, C. P., Callaghan, D. J. (2007). Effect of cutting time , temperature , and calcium on curd moisture , whey fat losses , and curd yield by response surface methodology. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4499–4512.
- Fagan, C. C., Leedy, M., Castillo, M., Payne, F. A., O'Donnell, C. P., O'Callaghan, D. J. (2007). Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 61–67.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of Cheese Science* (Second Edi). Springer.
- 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, 911–917.
- Horne, D. S., Lucey, J. A. (2017). *Rennet-Induced Coagulation of Milk. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Fourth Edi, Vol. 1). Elsevier Ltd.
- Koc, A., Ozer, B. (2008). Nondestructive monitoring of renneted whole milk during cheese manufacturing. *Food Research International*, 41, 745–750.
- Kübarssepp, I., Henno, M., Kart, O., Tupasela, T. (2005). A comparison of the methods for determination of the rennet coagulation properties of milk. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A*, 55, 145–148.
- Lewis, M. J. (2011). The measurement and significance of ionic calcium in milk - A review. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 1–13.
- Lin, M. J., Lewis, M. J., Grandison, A. S. (2006). Measurement of ionic calcium in milk. *International Journal of Dairy Technology*, 59(3), 192–199.

- Malley, D. F., McClure, C., Martin, P. D., Buckley, K., McCaughey, W. P. (2005). Compositional analysis of cattle manure during composting using a field-portable near-infrared spectrometer. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(4–6), 455–475.
- Martin, G. J., Williams, R. P., Dunstan, D. E. (2007). Comparison of casein micelles in raw and reconstituted skim milk. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4543–4551.
- McMahon, D. J., Brown, R. J. (1982). Evaluation of Formagraph for Comparing Rennet Solutions. *Journal of Dairy Science*, 65(8), 1639–1642.
- Nicolau, N., Buffa, M., O’Callaghan, D. J., Guamis, B., Castillo, M. (2015). Estimation of clotting and cutting times in sheep cheese manufacture using NIR light backscatter. *Dairy Science and Technology*, 95(4), 495–507.
- O’Callaghan, D. J. (2011). Cheese: Gel Firmness and Its Measurement. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition* (pp. 585–590).
- O’Callaghan, D. J., Mulholland, E. P., Duffy, A. P., O’Donnell, C. P., Payne, F. A. (2001). Evaluation of hot wire and optical sensors for on-line monitoring of curd firmness during milk coagulation. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 40(2), 227–238.
- Passos, E. F., Monteiro, P. S., Oliveira, R. C., Martins, J. G., Alves, H. G., Brandão, S. C. (1999). Predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production using a heated thermistor. *Journal of Food Science*, 64(5), 879–882.
- Payne, F. A., Crofcheck, C. L., Nokes, S. E., Kang, K. C. (1999). Light backscatter of milk products for transition sensing using optical fibers. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 42(6), 1771–1776.
- Pérez, B. (2019). *Dispersión de luz NIR durante la coagulación de leche desnatada. Efecto de la concentración de proteína y temperatura sobre el voltaje inicial*. Tesis de grado. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Salvador, D., Arango, O., Castillo, M. (2019). In-line estimation of the elastic module of milk gels with variation of temperature protein concentration. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 354–360.
- Sandra, S., Ho, M., Alexander, M., Corredig, M. (2012). Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave

spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 75–82.

Taifi, N., Bakkali, F., Faiz, B., Moudden, A., Maze, G., Decultot, D. (2006). Characterization of the syneresis and the firmness of the milk gel using an ultrasonic technique. *Measurement Science and Technology*, 17, 281–287.

Walstra, P., Wouters, J. T., Geurts, T. J. (2006). *Dairy science and technology* (Second). CRC Press.

Weber, F. (1989). El desuerado del coágulo. In A. Eck (Ed.), *El Queso* (Omega S.A., pp. 21–23). Barcelona.

ANEXO

Imágenes de la plantilla empleada en cada una de las calibraciones/ validaciones.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1271	34	3.2	150	RA	1.129094	1.196332	1.279191	1.364600	2766	46.4	1.278191	31.13634	14.82321	266.1162			
1272	34	3.2	150	RA	1.129546	1.196647	1.278097	1.36387	2752	46.5	1.278097	31.25448	14.80483	270.5311			
1273	34	3.2	150	RA	1.129328	1.196883	1.277204	1.362422	2736	46.6	1.277204	31.37262	14.84616	273.7730			
1274	34	3.2	150	RA	1.129898	1.196777	1.279452	1.365334	2804	46.7	1.279452	31.49076	14.87443	276.1026			
1275	34	3.2	150	RA	1.129863	1.197325	1.278881	1.364783	2810	46.8	1.278881	31.60889	14.95854	277.2344			
1276	34	3.2	150	RA	1.130546	1.198443	1.27904	1.363604	2816	46.9	1.27904	31.72704	14.98962	280.1345			
1277	34	3.2	150	RA	1.130743	1.198257	1.280199	1.368013	2822	47	1.280199	31.84518	15.21865	276.4416			
1278	34	3.2	150	RA	1.130776	1.197942	1.280149	1.369452	2828	47.1	1.280149	31.96332	15.20886	280.712			
1279	34	3.2	150	RA	1.130807	1.198744	1.281038	1.368901	2834	47.2	1.281038	32.08146	15.38533	278.7607			
1280	34	3.2	150	RA	1.130772	1.199432	1.280733	1.3678	2840	47.3	1.280733	32.1996	15.32457	284.7668			
1281	34	3.2	150	RA	1.130651	1.198961	1.280638	1.368884	2846	47.4	1.280638	32.31774	15.30584	289.4048			
1282	34	3.2	150	RA	1.130635	1.19957	1.280468	1.367107	2852	47.5	1.280468	32.43588	15.2721	294.5353			
1283	34	3.2	150	RA	1.131427	1.193225	1.281491	1.365248	2858	47.6	1.281491	32.55402	15.47553	291.6748			
1284	34	3.2	150	RA	1.131991	1.193929	1.281821	1.371595	2864	47.7	1.281821	32.67216	15.54144	293.4656			
1285	34	3.2	150	RA	1.131060	1.193483	1.280930	1.369416	2870	47.8	1.280930	32.7903	15.36544	303.6256			
1286	34	3.2	150	RA	1.131603	1.193684	1.281889	1.368323	2876	47.9	1.281889	32.90844	15.555	301.1417			
1287	34	3.2	150	RA	1.131817	1.200316	1.282805	1.369195	2882	48	1.282805	33.02658	15.73832	298.8632			
1288	34	3.2	150	RA	1.132226	1.200912	1.283674	1.372295	2888	48.1	1.283674	33.14472	15.5142	296.8905			
1289	34	3.2	150	RA	1.132595	1.201193	1.282862	1.369518	2894	48.2	1.282862	33.26286	15.75023	308.6321			
1290	34	3.2	150	RA	1.132314	1.20101	1.283691	1.369302	2900	48.3	1.283691	33.381	15.31746	304.3752			
1291	34	3.2	150	RA	1.132405	1.200945	1.281519	1.3678	2906	48.4	1.281519	33.49914	15.4812	304.648			
1292	34	3.2	150	RA	1.132861	1.201882	1.283906	1.373251	2912	48.5	1.283906	33.61728	15.96036	311.7457			
1293	34	3.2	150	RA	1.132939	1.202129	1.284878	1.37208	2918	48.6	1.284878	33.73542	16.15844	308.9502			
1294	34	3.2	150	RA	1.13395	1.202834	1.285441	1.374112	2924	48.7	1.285441	33.85356	16.27326	309.0671			
1295	34	3.2	150	RA	1.133578	1.202536	1.285486	1.372003	2930	48.8	1.285486	33.9717	16.28256	312.9057			
1296	34	3.2	150	RA	1.133547	1.202401	1.285604	1.373808	2936	48.9	1.285604	34.08984	16.30663	316.2425			
1297	34	3.2	150	RA	1.134034	1.203374	1.28678	1.372514	2942	49	1.28678	34.20798	16.47136	316.6395			
1298	34	3.2	150	RA	1.134188	1.203271	1.286881	1.374156	2948	49.1	1.286881	34.32612	16.52773	316.7828			
1299	34	3.2	150	RA	1.134289	1.203204	1.286895	1.374437	2954	49.2	1.286895	34.44426	16.57177	319.4261			
1300	34	3.2	150	RA	1.133995	1.203837	1.286998	1.374242	2960	49.3	1.286998	34.5624	16.59312	322.895			
1301	34	3.2	150	RA	1.134387	1.204216	1.287332	1.378576	2966	49.4	1.287332	34.68054	16.66213	324.6629			
1302	34	3.2	150	RA	1.134963	1.204636	1.288383	1.378627	2972	49.5	1.288383	34.79868	16.88018	321.0727			
1303	34	3.2	150	RA	1.13532	1.204636	1.288111	1.378686	2978	49.6	1.288111	34.91682	16.82349	327.2687			
1304	34	3.2	150	RA	1.135395	1.204807	1.289349	1.378819	2984	49.7	1.289349	35.03496	16.87313	329.852			
1305																	

The spreadsheet is divided into several functional areas:

- TARIFA DE PIEDRA:** A table with columns for 'Inchales' (141, 122, 103, 82, 61) and 'Parametro' (1.607, 1.229, 80.993, 0.221, 5.086).
- CUADRO DE PIEDRA R1, R2, R3:** Three tables for calibration, each with columns for 'CALIBRACION', 'SUMA CU', 'SUMA IN', 'SEP', 'R2', 'R3', and 'CV'. They include numerical values and formulas.
- Gráfico:** A line graph titled 'C prod vs. C ajust' showing three data series (R1, R2, R3) and a linear fit line. The x-axis is 'C ajust (mm)' and the y-axis is 'C prod (mm)'. The legend indicates R1 (blue), R2 (black), and R3 (yellow).
- SOLVER:** A section for solving equations, with a 'REAL-ZVAL-TARIFA DE PIEDRA' table and a 'Parametro' table containing values for 'a', 'b', 'c', and 'd'.