

## Caracterización de la coagulación enzimática de leche en polvo entera

*Characterization of whole milk powder rennet coagulation properties*

**Sbodio<sup>1</sup>, O.A., Tercero<sup>1</sup>, E.J., Martinez<sup>2,3</sup>, E.D.,  
Didier<sup>2,3</sup>, M.J. y Revelli<sup>1</sup>, G.R.**

Instituto de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral.  
INTEC (UNL – CONICET). Santa Fe, Argentina.  
CCT – CONICET. Santa Fe, Argentina.

### Resumen

La automatización en el proceso de elaboración de quesos requiere el desarrollo de dispositivos para el monitoreo de la etapa de coagulación. El uso de una sonda de hilo caliente de platino es una alternativa valiosa en el estudio de la fase primaria de la coagulación. Los efectos de las variables críticas: temperatura, concentración de enzima coagulante y pH sobre las respuestas: tiempo de coagulación (TC), tiempo al punto de máxima inflexión ( $t_{max}$ ) y firmeza del coágulo en unidades de voltaje a los 30 minutos de agregado el coagulante ( $V_{30}$ ), en el proceso de coagulación por quimosina fueron estudiados usando la sonda mencionada. Leche en polvo entera del tipo "comercial" reconstituida durante 22 horas fue utilizada para realizar los ensayos. En el experimento se aplicó un diseño rotacional compuesto y metodología de superficie de respuesta. Usando análisis de regresión lineal, los modelos de 2° orden obtenidos, predijeron satisfactoriamente los efectos de la temperatura, concentración de enzima coagulante y pH sobre el log TC ( $R^2$ : 0,9473),  $t_{max}$  ( $R^2$ : 0,9550) y  $V_{30}$  ( $R^2$ : 0,9560). El TC disminuyó significativamente con el incremento de la concentración enzimática ( $p$ : 0,0020), la temperatura ( $p$ : 0,0259) y con la disminución del pH ( $p$ : 0,0005). La respuesta  $t_{max}$  fue afectada negativamente por el pH ( $p$ : 0,0005) y la concentración enzimática ( $p$ : 0,0022), además se incrementó con el aumento de la temperatura ( $p$ : 0,0190). La temperatura fue el principal factor que incidió negativamente en el  $V_{30}$  ( $p$ : 0,0039). En las condiciones estudiadas el voltaje no alcanzó su valor máximo ni comportamiento asintótico en 60 minutos. La evaluación subjetiva de técnicos queseros indicó que las características del gel eran no apropiadas para su corte y manejo. La disminución del pH inicial y el agregado de  $CaCl_2$  aumentarían los niveles de voltaje y permitirían mejorar las propiedades del gel en el proceso de elaboración de queso a partir de leche en polvo entera.

**Palabras clave:** leche en polvo, quimosina, coagulación, sonda de hilo caliente.

### Summary

The automation in cheese making requires the development of sensor devices to monitor coagulation process, especially the hydrolysis and firming phase. The use of a platinum hot wire probe is an important alternative for studying the primary phase of renneting of reconstituted

Recibido: octubre de 2012

Aceptado: marzo de 2014

1. Instituto de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral. 1° de Mayo 3250 (CP: 3000). Santa Fe, Argentina. e-mail: sbodio@fiq.unl.edu.ar

2. INTEC (UNL – CONICET). Güemes 3450 (CP: 3000). Santa Fe, Argentina.

3. CCT – CONICET. Ruta Nac. N° 168 S/N, Pje. El Pozo (CP: 3000). Santa Fe, Argentina.

whole milk powder commercial type. In this study, we measured the effects of the critical variables (temperature, enzyme concentration and pH) on the responses: coagulation time (CT), time of maximum inflection point ( $t_{max}$ ) and clot firmness in voltage units at to the 30 minutes of aggregate the quimosine ( $V_{30}$ ) of renneting milk process using a platinum hot wire probe and a central composite design. Commercial dry whole milk was reconstituted for 22 hours and coagulated using quimosine. A linear regression analysis, 2<sup>nd</sup> order model, was able to predict satisfactorily the effects of temperature, enzyme concentration and pH on log CT ( $R^2$ : 0.9473),  $t_{max}$  ( $R^2$ : 0.9550) y  $V_{30}$  ( $R^2$ : 0.9560). We observed a significant decrease in CT when the enzyme concentration (p: 0.0020) and temperature (p: 0.0259) were increased and also when the pH was decreased (p: 0.0005). The value of  $t_{max}$  was negatively affected by the pH (p: 0.0005) and the enzyme concentration (p: 0.0022). In addition, the response  $t_{max}$  increased with higher temperature (p: 0.0190). This study shows that the temperature was the main variable that induced a decrease in  $V_{30}$  (p: 0.0039). Under these conditions, the voltage did not reach the maximum asymptotic value in 60 minutes. Since the cheesemaker are unable to observe the appropriate voltage for cutting and curd management, the addition of  $CaCl_2$  and the lowering pH could improve the dry whole milk powder coagulation properties.

**Key words:** dry whole milk, quimosine, coagulation, platinum hot wire probe.

### Introducción

La elaboración de queso es un proceso complejo, que implica en esencia, la remoción de agua o suero de la leche. De esta manera, los sólidos obtenidos pueden ser manejados en forma controlada. El proceso es acelerado por el desarrollo de acidez producida por bacterias lácticas y el aumento de la temperatura (Payne et al, 1993). La producción de queso tiene importancia económica y nutricional significativa para la industria de los alimentos. Económica, por la gran cantidad de toneladas que se producen en el mundo, y nutricional porque es un producto que aporta nutrientes esenciales (Ca, P, proteínas de alto valor biológico, entre otros).

Para controlar la elaboración de queso, es necesario conocer con rigurosidad la composición de la leche, sus aspectos microbiológicos y especialmente manejar las variables críticas que caracterizan el proceso. Particularmente, el pH inicial, la temperatura, la concentración y tipo de enzima coagulante y el  $CaCl_2$  adicionado. Una vez determinados correctamente los niveles de las variables, es importante controlar las respuestas: tiempo de coagulación (TC), tiempo al punto de máxima inflexión ( $t_{max}$ , parámetro directamente relacionado al tiempo de corte) y voltaje o firmeza del

coágulo ( $V_{30}$ ). Esta última, es crítica para la calidad y el rendimiento del producto final (Bynum y Olson, 1982; Hori, 1985). Cortar antes de que el coágulo alcance la firmeza apropiada causa pérdidas de grasa y "finos" (Mayes y Sutherland, 1984; Riddell-Lawrence y Hicks, 1988) mientras que cortando demasiado tarde, se observa retención de suero y por consiguiente mayor velocidad de acidificación (Van Slyke y Price, 1952; Wilson y Reinbold, 1965). Lograr optimizar el tiempo de corte, mejora el rendimiento, pudiéndose controlar la humedad del coágulo (Ustunol et al, 1991).

La caracterización de la coagulación por quimosina de leche en polvo entera del mercado, permitiría estudiar la viabilidad de elaborar algunos tipos de quesos a partir de ella. La utilización de este tipo de sustrato observa escaso tratamiento en la Literatura. El comportamiento de este tipo de sustrato está sujeto a las condiciones térmicas a las que es sometida la leche antes de su secado (en general reciben un tratamiento de entre 90 y 92 °C, 2 minutos, que le aseguran a las empresas una buena reducción de la carga bacteriana en el producto final), al proceso de deshidratación y rehidratación, y probablemente, al manejo de los niveles de las varia-

bles que son necesarios modificar. El tratamiento térmico mencionado, produce importantes cambios en las características de la leche en polvo. La remoción de agua durante el proceso de secado promueve el pasaje de Ca desde el suero hacia las micelas, que además aumentan su tamaño (Martin et al, 2007). La coagulación por quimosina de leche reconstituida es más lenta que la de leche cruda. La firmeza del gel es mejorada incrementando el tiempo de reconstitución. Sin embargo, el gel producido por leche cruda presenta mayor firmeza que el de la leche reconstituida (Martin et al, 2008). Las condiciones del tratamiento térmico provoca desnaturalización de las proteínas solubles y complejas interacciones entre proteínas del suero, micelas de caseína, minerales y glóbulos grasos (Singh y Waungana, 2001) que resultan en prolongados tiempos de coagulación y reducidas firmezas de los geles (Dalglish, 1992).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de las variables temperatura, pH inicial y concentración de enzima coagulante sobre las respuestas TC,  $t_{max}$  y  $V_{30}$  en la coagulación enzimática de leche en polvo entera del tipo comercial reconstituida.

## Materiales y Métodos

### Diseño experimental

Los efectos sobre el tiempo de coagulación (TC), tiempo al punto de máxima inflexión

( $t_{max}$ ) y voltaje a los 30 minutos de agregado el coagulante ( $V_{30}$ ) de las tres variables críticas: temperatura, concentración enzimática y pH que caracterizan el proceso de la coagulación enzimática, fueron estudiados utilizando un diseño rotacional centrado (Myers y Montgomery, 1995), totalmente al azar, de manera de minimizar la incidencia de factores extraños sobre la variabilidad. El diseño rotacional corresponde a un factorial, que para el caso de este experimento es  $2^3$  (2 niveles, 3 variables) con dos puntos axiales (-1,682 y +1,682). Los valores seleccionados para iniciar el experimento son -1 y +1, estos niveles observan el límite de la región de trabajo real. Los rangos de las tres variables independientes temperatura, concentración de enzima coagulante y pH se presentan en el Cuadro 1. Estos, fueron considerados de acuerdo a los niveles que utiliza la industria quesera en el proceso de elaboración de los tres tipos de pasta (dura, semidura y blanda). El diseño fue reordenado de tal manera de lograr ajustar un polinomio de 2° orden en temperatura ( $x_1$ ), concentración enzimática ( $x_2$ ) y pH ( $x_3$ ). En las condiciones del centro del diseño se realizaron 4 réplicas (4, 7, 8 y 12) de manera de estimar el error experimental. La conversión de las variables codificadas a variables no codificadas está dada por las siguientes ecuaciones: Temperatura =  $3 \cdot x_1 + 35$ , Concentración enzimática =  $0,010 \cdot x_2 + 0,025$  y pH =  $0,10 \cdot x_3 + 6,50$ .

**Cuadro 1:** Variables independientes y sus niveles. Diseño central compuesto.

**Table 1:** Independent variables and their levels. Central composite design.

Variables	Símbolos	Niveles de variables codificadas				
		-1,682	-1	0	1	+1,682
Temperatura (°C)	$x_1$	29,94	32	35	38	40,04
Concentración enzimática (UR/ml)	$x_2$	0,0082	0,015	0,025	0,035	0,042
pH	$x_3$	6,33	6,40	6,50	6,60	6,67

### Ensayo de coagulación

Leche en polvo entera instantánea del tipo comercial, de alto grado de calentamiento (WPNI < 1,4), provista por la empresa Milkaut (MILKAUT S.A., Frank, Santa Fe, Argentina), fue utilizada para preparar el sustrato. El mismo se obtuvo disolviendo 240 g de polvo en dos litros de agua destilada a 40 °C. Se agregó como conservante, azida sódica (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) en dosis de 200 mg por litro de leche. La completa disolución se logró con vigorosa agitación durante 15 – 20 minutos. El sustrato fue preservado a temperatura ambiente (15 – 18 °C) durante 22 horas con el objeto de obtener la mayor fuerza del gel, de acuerdo a lo propuesto por Martin et al (2008).

Un vaso de precipitado con dos litros del sustrato -leche reconstituida- fue inmerso en un baño termostático (Haake F2-C, Germany, precisión 0,1 °C) a las diferentes temperaturas del ensayo (30, 32, 35, 38 y 40 °C) de acuerdo al diseño, de manera de cumplir con las 22 horas de tiempo de disolución. Una cantidad fija de CaCl<sub>2</sub> (3,6 mM) (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) fue agregado al sustrato. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se ajustaron los diferentes niveles de pH propuestos por el diseño (6,33, 6,40, 6,50, 6,60 y 6,67) utilizando ácido láctico al 85% (Mallinckrodt, Chemical Work, Argentina) y/o NaOH al 40% (Cicarelli, Santa Fe, Argentina). Un peachímetro Orion Research EA 940, equipado con un electrodo Hamilton Bonaduz AG, CH-7402 (Bonaduz, Switzerland) y calibrado con tres soluciones buffer (pH: 4,01, 7,00 y 10,00) (Hamilton Bonaduz, Switzerland) fue utilizado para el ajuste del pH.

El sensor que registra los cambios de viscosidad durante la coagulación enzimática, está por una sonda de hilo caliente de platino (diámetro 0,025 mm) de 50 Ω alojada en una termovaina de acero inoxidable 3A, EHEDG (Intempco Controls Ltd., Quebec, Canada). Los materiales usados para alojar la termorresistencia corresponden a aquellos que no modifican la transferencia térmica (patente en trámite) y, que en conjunto constituyen el

sensor de viscosidad. El mismo observa conexión Kelvin de 4 hilos, por un par de ellos se excita con una corriente continua constante de 130 mA, provista por un generador de corriente (6177C, 0 a 50 V, 0 – 500 mA, Hewlett Packard, Santa Clara, California, USA), y por el otro se toma los cambios de la señal medidos en milivolts, característicos de los cambios de viscosidad en el sistema Hori (1985). La medición es obtenida a través de un multímetro (Keitley Instruments Inc., Cleveland, Ohio, USA) que digitaliza la información. La señal es tomada por una PC, utilizando un software desarrollado por el grupo de investigación de forma tal de obtener los perfiles de voltaje vs tiempo. Con estos perfiles, el software determina el tiempo de coagulación (TC) de acuerdo a Kopelman y Cogan (1975),  $t_{max}$ , que corresponde al tiempo en el punto de máxima inflexión (cambio de signo de la derivada  $dv/dt$ ) y  $V_{30}$  (voltaje a los treinta minutos de agregado el coagulante). Una vez ajustada las variables del diseño, el sensor descrito previamente, es inmerso en la leche. La estabilización de la temperatura se logra entre 30 y 40 minutos. Alcanzado el estado estacionario, se adiciona el coagulante quimosa (Chy-Max 950 IMCU, Chr. Hansen SAIC, Buenos Aires, Argentina) manteniendo agitación suave y en cantidades que determinan la concentración final de acuerdo al diseño (0,0082, 0,015, 0,025, 0,035 y 0,042 UR/ml de leche). El agregado del coagulante determina el inicio del experimento, y el voltaje medido se registra automáticamente a intervalos de 10 segundos, durante 60 minutos. El perfil de voltaje vs tiempo que genera el sensor fue empleado para seleccionar los niveles de las tres respuestas TC,  $t_{max}$  y  $V_{30}$ .

Las metodologías analíticas aplicadas para realizar el análisis composicional y microbiológico de la leche en polvo utilizada en la experiencia fueron las siguientes: para determinar materia grasa se utilizó la Norma FIL-IDF 9C (FIL-IDF, 1987), para determinar proteínas totales verdaderas la Norma FIL-IDF 20B (FIL-IDF, 1993), humedad según Norma FIL-IDF 26 (FIL-IDF, 1982), la determinación

de microorganismos aerobios mesófilos viables se realizó según la Norma FIL-IDF 100B (FIL-IDF, 1991), coliformes totales según Norma FIL-IDF 73A (FIL-IDF, 1985) y coliformes fecales de acuerdo a la Norma APHA (APHA, 1992). El grado de calentamiento (WPNI) se realizó de acuerdo a la Norma FIL-IDF 114 (FIL-IDF, 1982).

El perfil de voltaje vs tiempo que genera el sensor fue empleado para registrar el comportamiento de respuesta durante 60 minutos y seleccionar los diferentes niveles de TC,  $t_{max}$  y  $V_{30}$ . El Cuadro 2 muestra los niveles de las

variables codificadas y las correspondientes respuestas experimentales.

#### Análisis estadístico

Para el análisis de regresión, el ajuste de los modelos de 2° orden y la generación de las superficies de respuestas, se utilizó el programa Statgraphics Plus versión 7.1 (1994). Los ensayos para verificar que los residuos satisfacen la asunción de normalidad, independencia y aleatoriedad, se realizaron de acuerdo a Montgomery (1991).

**Cuadro 2:** Variables codificadas de Temperatura, Concentración de enzima coagulante y pH con las respuestas experimentales TC,  $t_{max}$  y  $V_{30}$ .

**Table 2:** Coded variables of Temperature, Enzyme concentration and pH with experimental responses CT,  $t_{max}$  and  $V_{30}$ .

Corrida N°	Niveles de las variables			Respuestas		
	Temperatura ( $x_1$ )	Concentración de enzima coagulante ( $x_2$ )	pH ( $x_3$ )	TC (min)	$t_{max}$ (min)	$V_{30}$ (mV)
1	-1	-1	-1	2,08	3,08	155
2	-1	1	-1	1,65	1,68	147
3	-1,682	0	0	2,91	4,27	148
4	0	0	0	2,17	3,07	140
5	1	-1	1	4,21	5,22	127
6	1	1	1	2,52	3,48	131
7	0	0	0	2,30	3,28	129
8	0	0	0	2,16	3,28	134
9	1	-1	-1	1,74	2,27	124
10	-1	-1	1	4,23	5,90	143
11	0	-1,682	0	45,6	5,92	139
12	0	0	0	1,94	2,68	138
13	0	0	-1,682	1,61	1,67	134
14	1	1	-1	1,49	1,67	114
15	-1	1	1	3,15	4,82	149
16	0	1,682	0	1,85	2,68	140
17	1,682	0	0	2,07	3,08	112
18	0	0	1,682	4,01	5,50	141

### Resultados y Discusión

La composición de la leche en polvo entera comercial utilizada para preparar el sustrato, observó los siguientes indicadores: materia grasa: 27,16%, proteínas totales verdaderas: 26,47%, humedad 2,95%, recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables:  $3,1 \times 10^3$  UFC/g, coliformes totales < 0,4 UFC/g y coliformes fecales < 0,3 UFC/g.

Tiempo de coagulación,  $t_{max}$  y  $V_{30}$  son importantes parámetros, toda vez que sus niveles muestran una estrecha relación con la calidad y el rendimiento del producto final. Las tres mejores ecuaciones, para estas respuestas, fueron obtenidas usando el procedimiento del máximo coeficiente de determinación ( $R^2$ ), incluyendo las variables independientes (temperatura, concentración enzimática y pH, y considerando una adición constante de  $CaCl_2$  (1,8 mM). Los resultados del ANOVA para los modelos ajustados son ilustrados en el Cuadro 3.

El test de Fisher indica, que en términos de la superficie de respuesta para TC, hubo falta de ajuste significativo ( $p < 0,05$ ). Por esta razón los resultados experimentales fueron modificados a través de transformaciones matemáticas, adoptando log TC en lugar de TC. Las respuestas log TC,  $t_{max}$  y  $V_{30}$  de acuerdo al F-test fueron significativas a un nivel de confianza del 5%. Los coeficientes de variación fueron relativamente bajos, como lo muestra el Cuadro 3, por consiguiente midieron razonablemente la reproducibilidad de los modelos. En el Cuadro 4 se reportan las mejores ecuaciones de predicción para cada una de las variables, todas exhiben falta de ajuste no significativo mayor que 0,05, de lo que se infiere que los modelos parecen ser adecuados, para los datos observados, al nivel de confianza del 95%.

El análisis de varianza (ANOVA, Cuadro 3) y los coeficientes de regresión (Cuadro 4) para log TC, explican el 94,73% de la variabi-

**Cuadro 3:** ANOVA para los modelos ajustados log TC (min),  $t_{max}$  (min) y  $V_{30}$  (mV).

**Table 3:** ANOVA for the fitted models log CT (min),  $t_{max}$  (min) and  $V_{30}$  (mV).

Coeficientes	log TC			$t_{max}$			$V_{30}$		
	gl	sc	F	gl	sc	F	gl	sc	F
$x_1$	1	0,0161449	17*	1	1,71624	21,45*	1	1863,41	66,49*
$x_2$	1	0,100733	106,08*	1	7,7118	96,49*	1	2,58639	0,09
$x_3$	1	0,255388	268,94*	1	21,5647	269,47*	1	42	1,52
$x_1 \cdot x_2$	1	0,000475	0,50	1	0,00245	0,03	1	3,05245	0,11
$x_1 \cdot x_3$	1	0,00007	0,07	1	0,18	2,25	1	105,825	3,78
$x_2 \cdot x_3$	1	0,0041847	4,41	1	0,08405	1,05	1	91,4753	3,26
$x_1^2$	1	0,0022018	2,32*	1	0,206782	2,58*	1	44,1685	1,58
$x_2^2$	1	0,0187837	19,78	1	1,53902	19,23	1	34,1924	1,22
$x_3^2$	1	0,0043363	4,57	1	0,116671	1,46	1	11,1763	0,40
Falta de ajuste	5	0,019246	4,05	5	1,30558	3,26	5	18,1013	0,13
Error puro	3	0,0028489		3	0,240075		3	84,0719	
Total	17	0,41946		17	34,3961		17	2323,09	
$R^2$		0,9473			0,955			0,9560	
CV (%)		8			8,01			3,89	

\*Significativo a nivel del 5%, CV (%): coeficiente de variación,  $R^2$ : coeficiente de determinación, gl: grados de libertad, sc: suma de cuadrados.

lidad, y dado que el valor de P para la falta de ajuste es  $> 0,05$ , concluimos que el modelo, así ajustado, es adecuado en las condiciones ensayadas. Cuatro efectos, a saber,  $x_1$  (p: 0,0259),  $x_2$  (p: 0,0020),  $x_3$  (p: 0,0005) y  $x_2^2$  (p: 0,0211), observan que son significativamente diferentes de cero a un nivel de confianza del 95%. Los coeficientes de las ecuaciones de predicción nos indican que la influencia positiva mayor la determina el pH, resultando en un incremento del TC a medida que aumenta el pH, y la influencia negativa mayor esta dada por la concentración de enzima coagulante. La fórmula de regresión sugiere que el pH de la leche es el factor fundamental a controlar, en coincidencia con Hori (1985) que estudió el efecto en leche en polvo y Okigbo et al (1985) que lo hicieron en leche fluida. La influencia negativa de la concentración enzimática coincide con hallazgos reportados, para diferentes sustratos, con Storry y Ford (1982), Hori (1985), Okigbo et al (1985) y Brown y Collinge (1986). La medida de la respuesta del TC proporcionada por el sensor confirma el cumplimiento de la Ley de Holter que expresa que el TC está correlacionado linealmente con la inversa de la concentración enzimática (Holter, 1932).

El mismo análisis de varianza para  $t_{max}$  muestra que las variables  $x_1$  (p: 0,0190),  $x_2$  (p: 0,0022),  $x_3$  (p: 0,0005) y  $x_2^2$  (p: 0,0022), son significativamente diferentes de cero al nivel de confianza del 95%. El nivel de significación P para la falta de ajuste (Cuadro 4) es mayor que 0,05, lo que indica que el modelo es adecuado en las condiciones estudiadas. Además, el coeficiente de determinación  $R^2$ : 0,9550, explica que el modelo contempla el 95,5% de la variabilidad de  $t_{max}$  es decir es altamente satisfactorio. El factor positivo que afecta la variable pH, es el más importante, demostrando que cuando el pH se incrementa aumenta sustancialmente el valor de la respuesta  $t_{max}$ . Las pendientes negativas, que afectan a las variables temperatura y concentración enzimática, nos muestran que la respuesta disminuye con el aumento de las mismas. Los estimados muestran que las influencias decrecen en el orden: pH, concentración enzimática y temperatura. El tiempo de corte de la cuajada está también relacionado al  $t_{max}$ . Payne et al (1993) mostraron que el tiempo de corte se puede expresar de manera simple como: Tiempo de Corte =  $\beta \cdot t_{max}$ .

**Cuadro 4:** Mejores ecuaciones de predicción para log TC,  $t_{max}$  y  $V_{30}$  usando tres variables independientes: Temperatura, Concentración enzimática y pH.

**Table 4:** Best prediction equations for log CT,  $t_{max}$  and  $V_{30}$  using three independent variables: Temperature, Enzyme concentration and pH.

Variables dependientes	Ecuaciones de predicción	R <sup>2</sup>	p
log TC	$\log TC = 0,331882 - 0,0343812 \cdot x_1 - 0,0858791 \cdot x_2 + 0,136742 \cdot x_3 + 0,0131911 \cdot x_1^2 - 0,0077045 \cdot x_1 \cdot x_2 + 0,0028555 \cdot x_1 \cdot x_3 + 0,0385288 \cdot x_2 - 0,022871 \cdot x_2 \cdot x_3 + 0,018512 \cdot x_3^2$	0,9473	0,1394
$t_{max}$	$t_{max} = 3,09606 - 0,35448 \cdot x_1 - 0,7519 \cdot x_2 + 1,56653 \cdot x_3 + 0,127835 \cdot x_1^2 + 0,0175 \cdot x_1 \cdot x_2 - 0,15 \cdot x_1 \cdot x_3 + 0,34875 \cdot x_2^2 - 0,1025 \cdot x_2 \cdot x_3 + 0,09602 \cdot x_3^2$	0,9550	0,1796
$V_{30}$	$V_{30} = 135,387 - 11,6804 \cdot x_1 - 0,435161 \cdot x_2 + 1,76417 \cdot x_3 - 1,86832 \cdot x_1^2 - 0,617703 \cdot x_1 \cdot x_2 + 3,63705 \cdot x_1 \cdot x_3 + 1,64384 \cdot x_2^2 + 3,38148 \cdot x_1 \cdot x_3 + 0,939818 \cdot x_3^2$	0,9560	0,9749

p: Falta de ajuste.

Recientemente, Fagan et al (2007) reportaron ecuaciones que permiten predecir las pérdidas de grasa, humedad y el rendimiento de la cuajada en función de  $t_{max}$ , concluyen que a tiempos prolongados de  $t_{max}$  mayores serán las pérdidas de grasa, mayor el contenido de humedad y mayor el rendimiento de la cuajada. En general, los técnicos queseros también sostienen que el tiempo de corte de la cuajada es entre 1,5 y 2 veces el tiempo de coagulación. Por consiguiente el monitoreo del TC y  $t_{max}$  durante el proceso puede contribuir a estimar el tiempo de corte.

El modelo ajustado para la respuesta  $V_{30}$  muestra que un solo efecto ( $x_1$ ) es  $< 0,05$ , siendo entonces la temperatura la única variable significativamente diferente de cero a un nivel de confianza del 95%. El valor de P para la falta de ajuste es  $> 0,05$  ( $p: 0,9749$ ), por lo que podemos considerar que el modelo es adecuado. De la observación de las pendientes, inferimos que la temperatura es la variable más influyente (Cuadro 4). El efecto  $x_1$  muestra el coeficiente más alto (11,6804), es decir la variable temperatura muestra la influencia negativa mayor, casi de manera excluyente. En suma, de acuerdo al modelo, el aumento de la temperatura implica una disminución de  $V_{30}$ . Este comportamiento podría explicarse porque la fase de agregación está relacionada a la disminución de la carga neta, con predominio de enlaces hidrofóbicos (Walstra, 1993), que juegan un rol importante en modular las interacciones entre las micelas coaguladas (Zoon et al, 1988). Los enlaces hidrofóbicos de la caseína y la fijación de iones Ca son muy dependientes de la temperatura (Peri et al, 1990). Se puede concluir que el desarrollo de la firmeza es un proceso complejo. Los resultados en este ensayo son contradictorios con los hallazgos de Taifi et al (2006), estos autores usaron ultrasonido para estudiar la firmeza de un gel de leche en polvo comercial, y reportaron que la misma se incrementa con el aumento de la temperatura. En otro ensayo, utilizando leche cruda y registrando el proceso con un viscosímetro Brookfield, Kowalchuk y Olson (1977) observaron un dramático efecto positivo de la

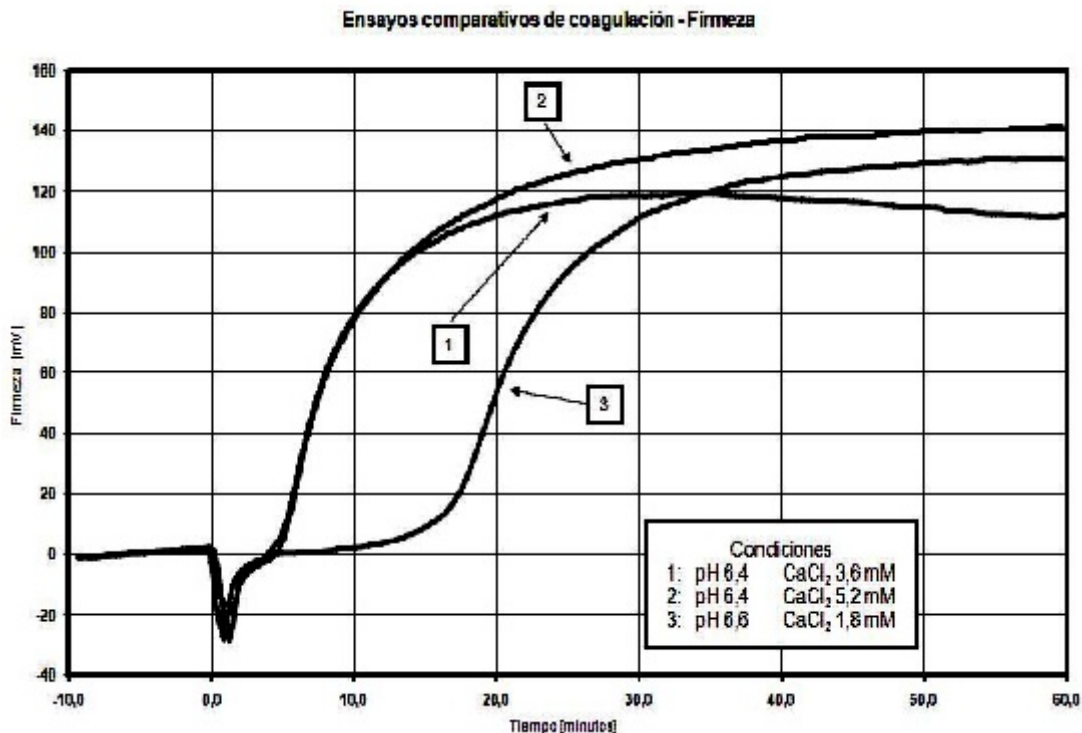
temperatura sobre la misma propiedad. Sin embargo, otros autores, entre ellos Ramet y Weber (1980) y Storry y Ford (1982) usando ultrasonido y el Formagraph, respectivamente, mostraron que la fuerza de un gel, se reduce con el incremento de la temperatura, en coincidencia que las observaciones de este ensayo.

Si asumimos que el voltaje representa el valor de la firmeza del coágulo, el monitoreo de  $V_{30}$  adquiere relevancia debido a que está demostrado que las propiedades físicas en el momento del corte de la cuajada son factores que influyen en la pérdida de grasa en el suero (Ridell-Lawrence y Hicks, 1988; Fagan, 2007) y la calidad del queso (Van Slyke y Price, 1952; Wilson y Rainbold, 1965; Bynum y Olson, 1982; Hori, 1985; Okigbo et al, 1985).

La Figura 1, ilustra que bajo condiciones estándares de elaboración de quesos, cuando la leche en polvo entera reconstituida es coagulada a pH: 6,6, temperatura: 35 °C, concentración de enzima 0,004 UR/ml de leche y el agregado de 1,8 mM de  $CaCl_2$  (condición 3) la señal que emite el sensor, muestra un crecimiento constante de la firmeza durante 60 minutos de ensayo, es decir que la coagulación no alcanza un nivel máximo de firmeza ni el característico comportamiento asintótico que se logra con leche cruda sometida a pasteurización. Además, en las condiciones estudiadas, las evaluaciones de los técnicos queseros no observaron una firmeza apropiada para el corte y operaciones sobre el gel, en concordancia con Hori (1985), quien utilizando un dispositivo que usa el mismo principio, reportó que la viscosidad de muestras de leche en polvo reconstituida coagulada por la acción de enzimas, nunca alcanza el valor requerido de firmeza apropiado para el corte.

En relación a los resultados presentados, se puede inferir que estamos en presencia de un sustrato que ha sufrido modificaciones de sus propiedades para coagular. Estas alteraciones, pueden ser atribuidas al proceso de elaboración de leche en polvo. Se reporta que la deshidratación promueve la transición de Ca del suero a las micelas de caseínas, que a





Las condiciones 1, 2 y 3 se coagularon a una Temperatura de 35 °C y una Concentración enzimática de 0,004 UR/ml de leche.

**Figura 1:** Perfiles comparativos de coagulación enzimática de leche en polvo entera.

**Figure 1:** Comparative profiles of enzyme whole milk powder rennet coagulation.

su vez aumentan su tamaño y no revierten después de la rehidratación. La reconstitución de leche en polvo no forma un gel fuerte, aún después de 22 horas y no alcanza el valor de firmeza que muestra la leche cruda original (Martin et al, 2007, 2008). Además, altos tratamientos térmicos (temperaturas superiores a los 70 °C) producen desnaturalización de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulinas. Estas proteínas desnaturalizadas se ligan a la  $\kappa$ -caseína en la superficie de la micela, formando complejos solubles y también complejos solubles de proteínas de suero. Reciente-

mente Kethireddipalli et al (2010), demostraron que la incapacidad de coagular por acción de la quimosina, en leche tratada térmicamente, es atribuible al efecto sinérgico de las micelas modificadas por acción del calor, los complejos solubles formados entre  $\kappa$ -caseína y proteínas solubles y otros componentes dializables del suero.

Los antecedentes de disminución del Ca sérico y aumento del tamaño de las micelas de caseína, sumado a experiencias que indican que las leches sufren modificaciones por la aplicación de diferentes tratamientos térmicos

cos, demuestran que se puede recuperar su coagulabilidad usando diferentes alternativas, entre ellas el agregado de  $\text{CaCl}_2$ . La propiedad de coagular puede ser restaurada con el agregado de  $\text{CaCl}_2$  (Udabage et al, 2001). Waungana (1995) mostró que la adición de  $\text{CaCl}_2$  resulta en la disminución del TC y formación de geles fuertes en leches tratadas y no tratadas. La acidificación de leche que ha sufrido un tratamiento térmico resulta en cortos tiempos de coagulación e incremento de la firmeza del gel (Singh et al, 1988). Recientemente, Sbodio et al (2010) mostraron que leches con moderado tratamiento térmico (20% de desnaturalización) revierten su comportamiento a la coagulación con el agregado de 3,6 mM de  $\text{CaCl}_2$  y bajando el pH a 6,4. Teniendo en cuenta esta experiencia y con el propósito de mejorar su comportamiento a la coagulación del sustrato leche en polvo entera reconstituida, se coaguló a pH 6,4 con el agregado de 3,6 y 5,2 mM de  $\text{CaCl}_2$ . En la Figura 1 se representan los perfiles obtenidos bajo tres condiciones. La condición 1 representa la coagulación a temperatura (35 °C), concentración enzimática (0,004 UR/ml leche), a bajo pH (6,4) y una concentración de 3,6 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La respuesta  $V_{30}$  resulta en un nivel de 118 mV, no obstante no constituye, a juicio de los técnicos queseros, condición adecuada de firmeza para el corte de la cuajada. La señal del sensor, observa que la misma alcanza un determinado valor y luego decae, debido probablemente a la presencia de microsinéresis. En cambio, a pH 6,4 con el agregado de 5,2 mM de  $\text{CaCl}_2$  (condición 2), a temperatura y concentración enzimática similar a la condición 1, la firmeza se incrementa sustancialmente,  $V_{30}$  alcanza un valor de 130 mV, es decir 8% superior al nivel obtenido en la condición anterior. Logra un valor máximo a partir de los 50 minutos y un comportamiento asintótico. En estas condiciones los técnicos queseros determinaron que, aproximadamente a los 30 minutos, las características del coágulo son las apropiadas para el corte. De la comparación de los perfiles obtenidos bajo las tres condiciones surge claramente el mejoramiento de la coagulación.

En general, los técnicos queseros cortan la cuajada entre 1,5 y 2 veces el TC. En cambio, para este tipo de sustrato el tiempo de corte es más prolongado que aquel producido con leche fluida. Se podría inferir que al no descender la señal, el gel retendría mayor humedad, por consiguiente será necesaria modificar las operaciones de corte y agitación. En suma, bajar el pH y agregar 5,2 mM de  $\text{CaCl}_2$  modifican las características del gel, mejora su firmeza y retiene más humedad debido probablemente al predominio de enlaces puente Ca en lugar de enlaces hidrofóbicos.

### Conclusiones

El uso de un sensor de estas características y el diseño rotacional centrado permitieron estudiar la influencia de las variables críticas temperatura, concentración enzimática y pH sobre las tres respuestas de interés tecnológico TC,  $t_{\text{max}}$  y  $V_{30}$  utilizando leche en polvo entera.

El TC y  $t_{\text{max}}$  estuvieron significativamente influenciados por las tres variables estudiadas. En cambio, la temperatura es la variable que mostró la principal influencia sobre  $V_{30}$ . El voltaje, en las condiciones estudiadas creció indefinidamente, durante 60 minutos de experiencia y no alcanzó el valor máximo ni un comportamiento asintótico característico de la respuesta. En condiciones estándares de elaboración industrial, a juicio de los técnicos queseros, las características del coágulo no permitirían determinar el momento del corte. Se puede inferir que el sustrato está fuertemente modificado, consecuencia del tratamiento térmico y el proceso de deshidratación. La modificación de los niveles de las variables pH (6,4) y el agregado de cantidades superiores de  $\text{CaCl}_2$  (5,2 mM) permitieron observar un importante mejoramiento de la coagulabilidad, de esa manera permitirían el procesamiento de la cuajada. Concluimos que es necesario profundizar más aún en el comportamiento de este tipo de sustratos, particularmente en las operaciones poscorte de la cuajada.

### Agradecimientos

El presente estudio se desarrolló en el marco del proyecto CAI + D 2009. Proyecto especial, no subsidiado (Universidad Nacional del Litoral). Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Mario Chiovetta (CCT – CONICET, Santa Fe) por el apoyo financiero, y al Ing. Carlos Meinardi (Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral) por su excelente asistencia técnica.

### Bibliografía

- APHA 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Cap. 24.
- Brown, R.J. and Collinge, S.K. 1986. Actual milk coagulation time and inverse of chymosin activity. *J. Dairy Sci.* 69: 956-958.
- Bynum, D.G. and Olson, N.F. 1982. Influence of curd firmness at cutting of Cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. *J. Dairy Sci.* 65: 2281-2285.
- Dalgleish, D.G. 1992. The enzymatic coagulation of milk. In Fox, P. (Ed), *Advance dairy chemistry Volume 1*. Proteins (pp. 579-620). London: Elsevier Science Publishers Ltd.
- Fagan, C.c., Leedy, M., Castillo, M., Payne, F.a., O'donnell, C.P. and 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: 61-67.
- FIL-IDF International IDF Standard 26: 1982. Milk and milk products. Moisture. IDF – Square Vergote 41, B-1040 Brussels, Belgium.
- FIL-IDF International IDF Standard 114: 1982. Milk and milk products. Dried milk – Assessment of heat class. IDF – Square Vergote 41, B-1040 Brussels, Belgium.
- FIL-IDF International IDF Standard 73A: 1985. Milk and milk products. Enumeration of coliforms. IDF – Square Vergote 41, B-1040 Brussels, Belgium.
- FIL-IDF International IDF Standard 9C: 1987. Milk and milk products. Fat matter. IDF – Square Vergote 41, B-1040 Brussels, Belgium.
- FIL-IDF International IDF Standard 100B: 1991. Milk and milk products. Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C. IDF – Square Vergote 41, B-1040 Brussels, Belgium.
- FIL-IDF International IDF Standard 20B: 1993. Milk and milk products. Proteins. IDF – Square Vergote 41, B-1040 Brussels, Belgium.
- Holter, H. 1932. Über die Labwirkung. *Biochemische Zeitschrift.* 225: 160-188.
- Hori, T. 1985. Objective measurement of the process of curd formation during rennet treatment of milk by the hot wire method. *J. Food Sci.* 50: 911-917.
- Kethireddipalli, P., HILL, A.R. and Dalgleish, D.G. 2010. Proteins interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. *International Dairy Journal* 20: 838-843.
- Kopelman, I.J. and Cogan, U. 1975. Determination of clotting power of milk clotting enzymes. *J. Dairy Sci.* 59: 196-199.
- Kowalchuk, A.W. and Olson, N.F. 1977. Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting by rennet. *J. Dairy Sci.* 60: 1256-1259.
- Martin, G.J.O., Willians, R.P.W. and Dunstan, D.E. 2007. Comparison of casein micelles in raw and reconstituted skim milk. *J. Dairy Sci.* 90: 4543-4551.
- Martin, G.J.O., Willians, R.p.w., Choong, C., Lee, B. and Dunstan, D.E. 2008. Comparison of rennet gelation using raw and reconstituted skim milk. *International Dairy Journal.* 18: 1077-1080.
- Mayes, J.J. and Sutherland, B.J. 1984. Coagulum firmness and yield in Cheddar cheese manufacture. *Aust. J. Dairy Technol.* 39: 69-73.
- Montgomery, D.C. 1991. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Editorial Iberoamericana. México.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.C. 1995. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Wiley Series Inc. Probability and Statistics. New York, USA.
- Okigbo, L.m., Richardson, G.h., Brown, R.J. and Ernstrom, C.A. 1985. Effects of pH, calcium chloride and chymosin concentration on coagulation properties of abnormal and normal milk. *J. Dairy Sci.* 68: 2527-2533.
- Payne, F.a., Hicks, C.I., Madangopal, S. and Shearer, S.A. 1993. Fiber optic sensor for predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production. *Transactions of the ASAE* 36: 841-847.
- Peri, C., Pagliarini, E., Lametti, S. and Bonomi, F. 1990. A study of surface hydrophobicity of milk proteins during enzymic coagulation and curd hardening. *J. Dairy Res.* 57: 101-108.

- Ramet, J.P. and Weber, F. 1980. Influence of environmental factors on the enzymatic coagulation of reconstituted milk. *Lait* 60: 1-3.
- Riddell-Lawrence, S. and Hickcs, C.L. 1988. Effect of curd firmness on stirred curd cheese yield. *J. Dairy Sci.* 72: 313-321.
- Sbodio, O.a., Tercero, E.j., Zannier, M.S. y Revelli, G.R. 2010. Tratamiento térmico de leche: influencia del pH y  $\text{CaCl}_2$  en la elaboración de queso cuartiolo. *Revista Internacional del Centro de Información Tecnológica (CIT)* 21: 107-116.
- Singh, H., Shalabi, S.i., Fox, P.f., Flinn, A. and Berry, A. 1988. Rennet coagulation of heated milk: Influence of pH adjustment before and after heating. *J. Dairy Res.* 55: 205-215.
- Singh, H. and Waungana, A. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal.* 11: 543-551.
- STATGRAPHICS PLUS. Version 7.1. 1994. Users guide reference. Statistical Graphics Corp. México, DF. p. 63-73.
- Story, J.E. and Ford, G.D. 1982. Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. *J. Dairy Res.* 49: 469-477.
- Taifi, N., Bakkali, F., Faiz, B., Moudden, A. and Maze, G.D.D. 2006. Characterization of the syneresis and the firmness of the milk gel using an ultrasonic technique. *Meas. Sci. Technol.* 17: 281-287.
- Udabage, P., Mckinnon, I.R. and Augustin, M. A. 2001. Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk. *J. Dairy Sci.* 84: 1569-1575.
- Ustunol, Z., Hicks, C.L. and Payne, F.A. 1991. Diffuse reflectance profiles of eight milk-clotting enzyme preparations. *J. Food Sci.* 56: 411-415.
- Van Slyke, L.L. and Price, W.V. 1952. *Cheese*. New York. Orange Judd Publishing Company. p. 58.
- Walstra, P. 1993. The syneresis of curd. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1. General Aspects. 2<sup>nd</sup> ed. (pp. 141-191), Chapman and Hall. London.
- Waungana, A. 1995. Rennet coagulation properties of heated milks. Master of Technology thesis. Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Wilson, H.L. and Reinbold, G.W. 1965. Longhold Cheddar cheese. In: *American cheese varieties*. New York: Pfizer and Co. p. 22.
- Zoon, P., Van Vliet, T. and Walstra, P. 1988. Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 2. The effect of temperature. *Neth. Milk Dairy J.* 42: 271-294.