



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Estudio de la microestructura y aplicación de
sensores ópticos en la elaboración de
quesos de cabra

D^a. Silvia Rovira Garbayo

2013

AGRADECIMIENTO

Son muchas personas las que me han ayudado en la consecución de esta tesis doctoral, y con este apartado desearía acordarme de todas y cada una de ellas.

A mis directores el Dr. José Laencina y la Dra. M^a Belén López Morales que han hecho posible la consecución de esta Tesis Doctoral. Gracias Dr. Laencina por brindarme la ocasión de entrar e iniciar mi actividad en esta estupenda Universidad y por enseñarme a ser una buena profesional dedicada a los demás. Gracias Belén por transmitirme tus conocimientos, por confiar en mí y animarme día a día con sinceridad a crecer profesional y personalmente. Por compartir conmigo tantos momentos, tantas alegrías, y por enseñarme a trabajar en equipo y con profesionalidad.

A M^a Dolores Garrido, actual directora de mi grupo de investigación y del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia, por su interés en mi trabajo, por compartir su tiempo y experiencia profesional.

Al Dr. Eduardo Ferrandini por tantos momentos alegres y experiencias enriquecedoras.

A mis compañeros de equipo Belén, Pedro, Miriam, Macarena, Rocío y Mariella y Khalid porque todos me habéis dado un ingrediente diferente para poder elaborar esta ardua receta. Gracias “despachito” por vuestra paciencia, simpatía y confianza. A mi compañero Victor, hemos formado un gran equipo y vivido grandes momentos, gracias por tu apoyo.

Finalmente, a la Dra. M^a Paz de Peña por formarme desde que inicie mis estudios en la Universidad de Navarra y guiarme a lo largo de mi trayectoria personal y profesional.

A mi padre, ya no estás con nosotros pero sé que tenías mucha ilusión de compartir este momento conmigo, te has quedado a las puertas aunque has estado presente en cada una de las líneas que componen esta Tesis Doctoral. Gracias por todo lo que me has dado, sé que te has esforzado mucho por darnos a las tres siempre lo mejor.

A mi madre y mis hermanas porque siempre les he necesitado y les necesitaré. Gracias por apostar por mí, por ayudarme incondicionalmente y darme la oportunidad de recomenzar tantas veces.

A mis suegros por su apoyo y comprensión, por acogerme como a una hija más y por cuidar de los míos. No sé como agradeceros todo lo que hacéis día a día.

A mis hijas Rocío y Sofía por sus sonrisas y abrazos diarios que me hacían ver los días de otro color.

Y en especial, a mi marido José Joaquín Hernández Roca por estar siempre a mi lado, por su seguridad y confianza, por su ánimo, por enseñarme día a día a respetarme a mí y a los demás, por su cariño, su amor, su alegría y comprensión. Gracias por darme todo a cambio de nada, y por formar conmigo una familia tan especial.

RESUMEN

El sector quesero se sitúa en la actualidad en un lugar destacado dentro del marco de la Unión Europea gracias a la innovación y desarrollo así como a la modernización de instalaciones y equipos. Las mayores inversiones se emplean en la mejora de procesos y el desarrollo de nuevos elaborados. En consecuencia, el futuro de las empresas lácteas está orientado a la calidad del producto así como a la optimización de las instalaciones de producción para reducir costes, mejorar rendimientos y sistemas, así como garantizar un suministro adecuado de la línea de producción contribuyendo a la sostenibilidad medioambiental. En definitiva, el sector lácteo se apoya en la inversión en investigación y desarrollo, aumentando la competitividad de las empresas y garantizando un futuro más prometedor.

En este contexto, los sensores en línea de fabricación suponen una innovación tecnológica importante que puede proporcionar resultados prometedores. Huang *et al.* (2008) sostienen que las técnicas on-line en la fabricación de productos lácteos pueden implantarse en la línea de producción sin grandes dificultades en su entorno industrial, detectando posibles fallos, monitorizando y evaluando de forma continua y en tiempo real la evolución del producto. El desarrollo de nuevos sensores mejora la automatización de la industria alimentaria pero, para poder implantar un sensor con dichas características, es preciso conocer en profundidad los procesos de cambio que sufre la materia prima y sus ingredientes a lo largo de la elaboración del queso. Para este cometido, el estudio microestructural de la matriz proteica aporta una información relevante y a tener en cuenta para el diseño, desarrollo y implantación del sensor en línea.

El primer objetivo del estudio que se recoge en esta Memoria corresponde a la determinación de la composición fisicoquímica del queso de Murcia al Vino -contenido proteico y fracciones nitrogenadas, grasa, humedad, así como la determinación del perfil de ácidos grasos totales de este tipo de queso-. A este respecto se considera la medida en la que se ven afectadas estas características por los diferentes productores y por las estaciones del año en las que son fabricados.

El estudio de los cambios que se producen en la microestructura del coágulo de caseína durante las fases del proceso de elaboración del queso -desarrollando un método que permitiese la observación y cuantificación de las modificaciones que tienen lugar, principalmente durante las etapas de coagulación y sinéresis- ha sido objeto de una especial atención mediante la aplicación de la microscopía electrónica, que ha permitido obtener resultados novedosos y de interés.

Finalmente, se plantea el estudio de la adaptación de un prototipo de sensor óptico en línea de retrodispersión luminosa (Large Field of View) para el control de la coagulación y sinéresis en la elaboración de queso de Murcia al Vino, comparando los resultados con los parámetros más significativos relativos a los mismos.

Los resultados obtenidos muestran que la composición de los quesos estudiados no difiere significativamente entre los distintos productores, pero la estación del año si resulta relevante, pues influye significativamente en los valores físicoquímicos, afectando a la calidad del producto y su rentabilidad debido a las diferencias importantes observadas en el rendimiento quesero. El desarrollo y aplicación de un procedimiento de microscopía electrónica de barrido y análisis de imagen ha conducido a la cuantificación de distintos parámetros microestructurales (número de poros, perímetro y área de los mismos, grosor de la hebra y porosidad) a lo largo de la elaboración del queso, permitiendo la descripción de la microestructura durante los procesos de coagulación y sinéresis. Con la aplicación de un sensor en línea durante estas dos etapas se define el perfil espectral de la elaboración del queso de cabra bajo condiciones industriales, desarrollando algoritmos de predicción de la textura, humedad y rendimiento quesero.

In the industrial context of the European Community, the dairy manufacturing sector has an important and growing position. The economic developments in this sector have been acceptable, nevertheless, in order to further improve its competitiveness is necessary to focus on technological innovation, enhancing the manufacturing process automation, and ensuring the complete traceability.

Food processing systems must be designed to detect and compensate day to day changes of raw materials, in order to achieve higher quality, increase yields and reduce fabrication costs improving processing efficiency. In this context, on-line sensors are considered innovative tools, which can provide promising results. For a useful application, sensors must fulfill several requirements such as cleanability, stability during processing and equipment disinfestations, easy use and processing couple, between others. As it was described by Huang *et al.* (2008), on-line techniques in food processing can be assembled in the production line and take place under realistic environment, can early detect possible failures, can permanent monitor the processing conditions and can assess those conditions at any desired time. Development of new continuous process control sensors in food processing would have potential to increase the levels of process automation in the food industry.

In order to implement a sensor with those characteristics, it is necessary to know in depth the changes produced in the raw materials and ingredients throughout cheese making. In this sense, the microstructural study of the protein matrix has proved to be a useful tool as provides extensive information relevant to consider for the design, development and implementation of an on line sensor.

The first aim of the study is to characterize the physicochemical composition of Murcia al Vino cheese by determining cheese macro and micronutrients content, and the extent to which they are affected by different manufacturers and seasons. The second aim is to develop and implement a

method for the quantification of the microstructural changes that occur during coagulation and syneresis in cheese making.

The final aim corresponds to the implementation of an optical Large Field of View prototype sensor for the on-line monitoring of coagulation and syneresis in cheese making.

The results obtained show that the physicochemical composition does not differ significantly between cheese manufacturers, but the season is relevant as affected cheese physicochemical composition, which is of great importance for cheese quality and, therefore, profitability. The development and application of a scanning electron microscopy and image analysis method has allowed the quantification of different microstructural parameters (number of pores, perimeter and area thereof, the strand thickness and porosity) along cheese manufacture that has been especially important when introducing an on line sensor as the quantified microstructural variations along cheese making had a certain evolve of the spectrum obtained by the online sensor applied.

Resumen**Summary****Índice de figuras****Abreviaturas, símbolos y acrónimos**

I.	Introducción.....	9
	I.1 La coagulación y sinéresis en la elaboración del queso	11
	I.3. El papel de la microestructura en la elaboración de queso	17
	I.2. Optimización de procesos	18
II.	Objetivo.....	21
III.	Antecedentes y revisión bibliográfica.....	25
	III.1. El estudio microestructural del queso	27
	III.2. Sensores en la industria láctea	45
IV.	Metodología.....	61
	IV.1. Elaboración de queso de Murcia al Vino	63
	IV. 2. Composición fisicoquímica del queso:	64
	IV.2.1. pH	64
	IV.2.2. Actividad de agua (a_w)	64
	IV.2.3. Capacidad de retención de agua	64
	IV.2.4. Extracto Seco	65
	IV.2.5. Determinación del contenido en grasa y perfil de ácidos grasos.	65
	IV.2.6. Concentración de nitrógeno total y fracciones nitrogenadas.	67

IV. 3. Análisis de la microestructura:	67
IV.3.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	69
IV.3.2. Análisis de Imagen	70
IV.4. Instrumentos para la monitorización en línea de los procesos de coagulación y sinéresis.	72
IV.5. Análisis estadístico	74
V. Resultados y discusión.....	75
	77
V.1. Physicochemical study of Murcia al Vino cheese.	87
V.2. Hot topic: Microstructure quantification by scanning electron microscopy and image analysis of goat cheese curd.	95
V.2.1 Microstructure of industrially manufactured goat cheese during syneresis.	129
V.3. Application of a Large Field-of-View sensor during coagulation and syneresis in fresh goat cheese.	137
V.4. Usefulness of the LFV sensor for physicochemical, textural and yield predictions under industrial goat cheese manufacturing conditions.	
VI. Resumen global.....	151
VII. Conclusiones.....	163
VIII. Bibliografía.....	167

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	13
Relación entre el grado de producción de ácido láctico hasta la etapa de desuerado y la estructura básica del queso. (Lawrence <i>et al.</i> , 1983)	
FIGURA 2	15
2. a) Micrografía electrónica del glóbulo de grasa presente en la estructura tridimensional de la cuajada (Rovira <i>et al.</i> , 2011); b) Diagrama de los tamaños relativos del glóbulo de grasa, una bacteria y una micela de caseína (Inda, 2000).	
FIGURA 3	28
Diferencias entre los equipos y las imágenes obtenidas por microscopia electrónica y óptica.	
FIGURA 4	29
Imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica.	
FIGURA 5	33
Imágenes obtenidas mediante SEM de queso turco blanco elaborado a partir de crema homogeneizada y sin homogeneizar (Karaman <i>et al.</i> , 2012).	
FIGURA 6	34
Imágenes obtenidas mediante SEM en queso iraní blanco. (A): queso con mayor contenido en grasa; (B): queso con bajo contenido en grasa. Madadlou <i>et al.</i> (2005).	
FIGURA 7	38
Imágenes obtenidas mediante SEM de queso iraní blanco. Queso procedente de la coagulación a 34°C (a); a 37°C (b) y a 41.5 °C (c). Madadlou <i>et al.</i> (2006).	
FIGURA 8	48
Diseño del sistema desarrollado por Xin <i>et al.</i> (2006) para determinación directa del contenido en grasa y proteína de la leche.	
FIGURA 9	52
Diseño del sensor CoAguLab™. Imagen propiedad de Reflectronics, Inc.	

FIGURA 10	53
Diseño del sensor CoAguLite™. Imagenes propiedad de Reflectronics, Inc.	
FIGURA 11	56
Espectro infrarrojo de queso procesado (Fagan <i>et al.</i> , 2007c).	
FIGURA 12	58
Diseño, configuración e imagen del prototipo LFV (Fagan <i>et al.</i> , 2007a; Fagan <i>et al.</i> , 2008).	
FIGURA 13	68
Diseño experimental para el análisis de la microestructura de la cuajada a lo largo de la elaboración del queso.	
FIGURA 14	70
Imagen SEM a 6500 aumentos.	
FIGURA 15	71
Procedimiento para la determinación de la porosidad a partir de la imagen SEM.	
FIGURA 16	71
Identificación topológica y cuantificación del número de poros de la imagen SEM.	
FIGURA 17	72
Identificación y medición del grosor de la hebra.	
FIGURA 18	73
Instrumentación para la monitorización en línea (a: sensor Coagulite™; b: sensor LFV; c: cuba experimental).	

α	alpha
β	beta
%	tanto porciento
®	nombre registrado
μm	micrómetro
2D	dos dimensiones
3D	tres dimensiones
Ca^{2+}	calcio libre
cm	centímetro
CSLM	Microscopia Electrónica de Barrido Confocal Láser
EM	ésteres metílicos
$\text{Fe}_{105}\text{-Me}_{106}$	enlaces 105 y 106 de los aminoácidos fenilalanina y metionina.
FID	Detector de ionización de llama
g	gramos
GC	cromatografía de gases
Kg	kilogramo
κ	Kappa
l	litro
LFV	prototipo sensor con un haz de largo campo de visión
LM	Microscopio de Luz
M	molaridad
MIR	infrarrojo medio
mg	miligramo
mM	milimolar
mm	milimetro
MPa	mega Pascales
N	normalidad
NIR	infrarrojo cercano

nm	nanometro
°C	grados Celsius
R	ratio
R'_{\max}	máximo valor de la primera derivada de la ratio de dispersión (min^{-1}).
R_{cut}	ratio de dispersión en el tiempo de corte visual (adimensional).
R_{\max}	ratio de dispersión a tiempo t_{\max} (adimensional).
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
t_{cut}	tiempo desde la adición de la enzima hasta el corte visual (min).
t_{\max}	tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la primera derivada (min).
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
TM	marca registrada
$t_{\text{vat emptying}}$	tiempo (momento) en el que se vacía la cuba
UE	Unión Europea
V_0	Voltaje inicial
W	vatio
x	número de aumentos

“Frater qui adjuvatur a fratre
quasi civitas firma”- El hermano
ayudado por su hermano es tan fuerte
como una ciudad amurallada-

San Josemaría Escrivá de Balaguer

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La coagulación y sinéresis en la elaboración de queso

El primer paso en la elaboración de la mayoría de los quesos es la coagulación proteica, inducida mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas y fermentos lácticos. Este proceso se divide fundamentalmente en dos fases: la fase primaria o enzimática y la fase secundaria o de agregación. Algunos autores incluyen como una tercera fase la sinéresis o expulsión de lactosuero, así como la conformación estructural de la red proteica (Inda, 2000).

La fase primaria corresponde a la hidrólisis específica de la *k*-caseína, localizada en la superficie de las micelas de caseína, por la acción de enzimas proteolíticas (quimosina principalmente). La acción enzimática produce una ruptura en el enlace proteico Fe₁₀₅-Met₁₀₆ de la *k*-caseína, generando dos péptidos con propiedades muy diferentes. El glicomacropéptido es un fragmento hidrofílico y soluble, formado por los residuos de aminoácidos 106 a 169. Este fragmento, que representa cerca del 4% de la caseína total (Callanan, 1991), pasa a formar parte del lactosuero. El otro fragmento, formado por los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la *k*-caseína, se denomina para-*k*-caseína, es altamente hidrofóbico y permanece enlazado a las micelas (Inda, 2000).

Esta reacción produce una reducción drástica de la carga eléctrica negativa de la superficie de las micelas, que posibilita el acercamiento de las micelas así modificadas y facilita la agregación de las micelas, en la que el calcio (Ca^{2+}) juega un papel importante como acelerador del proceso. Las fases primaria y secundaria de la coagulación se superponen, iniciándose la agregación antes de completarse la reacción enzimática (Inda, 2000).

A partir de aquí la elaboración de queso se puede considerar como la eliminación de agua o, lo que es lo mismo, concentración de sólidos, a partir del gel o coágulo formado mediante la acción del cuajo u otras enzimas coagulantes. Como describe Inda (2000), en este proceso de deshidratación, la caseína y la materia grasa de la leche se concentran por un factor de 8 a 10 veces, dependiendo del contenido de agua final en el queso.

El grado de modificación de la estructura inicial de las micelas de caseína depende en gran medida de la pérdida de fosfato de calcio, y esta pérdida a su vez depende del pH en el momento del desuerado. La Figura 1 muestra la relación de la evolución del pH hasta el desuerado y la estructura del queso.

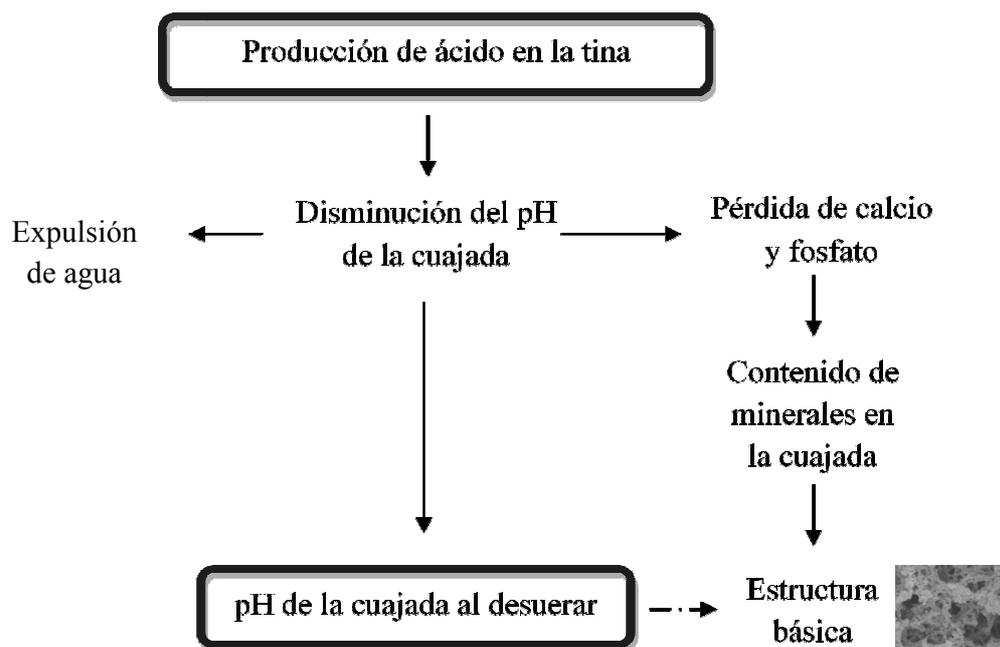


FIGURA 1. Relación entre el grado de producción de ácido láctico hasta la etapa de desuerado y la estructura básica del queso. (Lawrence *et al.*, 1983 y Inda, 2000)

En el caso de quesos blancos en los que no se emplean fermentos o cultivos lácticos y el queso tiene un pH muy similar al de la leche, la eliminación del agua se realiza principalmente mediante el corte uniforme a diferentes tamaños de la cuajada, la agitación, el reposo y el calentamiento gradual de la mezcla de cuajada y lactosuero, que determinan la humedad final del queso (Inda, 2000).

El proceso de coagulación se ve afectado por numerosos factores cuyo control es importante con el fin de garantizar las propiedades del producto final. Entre los factores más importantes destacan el pH, la temperatura, la fuerza iónica, la concentración de la enzima, el balance salino y la composición química de la leche. Por ejemplo, el tiempo de coagulación aumentan a niveles altos de pH (6,6-6,7) (Okigbo *et al.*, 1985), mientras que a niveles bajos de pH (3-4), la actividad hidrolítica es mayor y produce una disminución del rendimiento quesero. Generalmente, el proceso de coagulación se desarrolla a pH 6,3-6,6; sólo cuando hay una acidificación directa (coagulación mixta) la coagulación tiene lugar a pH 5,6. La temperatura habitual de coagulación a 30-32°C permite una

floculación más rápida con un menor porcentaje de hidrólisis de la κ -caseína (Dalglish, 1983), pero una coagulación a 35 °C supondría la hidrólisis de un 65% de la κ -caseína (Carlson *et al.*, 1986). Diferencias en la composición de la leche, tanto en el contenido proteico como en su balance salino, afectan al desarrollo de la fase enzimática de la coagulación. De hecho, cualquier modificación en la naturaleza o en la cantidad de proteína en un queso modificará su estructura (Adda *et al.*, 1982). Por ejemplo, la firmeza de un queso aumenta en proporción a la relación proteína/agua y el pH determina las características de la textura del queso. El tiempo de coagulación disminuye al incrementar la concentración de la enzima adicionada.

La adición de Ca^{2+} en forma de cloruro de calcio, es un factor importante en la coagulación de la leche y aumenta la firmeza de la cuajada, siempre y cuando la concentración no sea mayor de 10 mM (Lucey y Fox, 1993). Por otro lado, la acidificación de la leche aumenta la actividad de los iones Ca^{2+} , disminuyendo el tiempo de coagulación (Lucey y Fox, 1993).

En la leche entera, la materia grasa es el segundo componente más importante que condiciona la formación de la estructura y el rendimiento cuantitativo en quesería. La grasa está presente como glóbulos rodeados por una membrana constituida principalmente por fosfolípidos y proteínas. El diámetro de estos glóbulos varía entre 0.1 μm y 10 μm (Evans, 1986) con un valor medio del rango entre 3 y 4 μm (Bylund, 1995). La Figura 2 muestra el glóbulo graso en leche de cabra. La Figura 2a muestra una fotografía de la microestructura de cuajada de leche de cabra en la que se puede observar un glóbulo de grasa entre los poros de la red tridimensional (Rovira *et al.* 2011). La Figura 2b ilustra, para fines de comparación, el tamaño del glóbulo de grasa (3 - 4 μm) en relación con el tamaño de una micela de caseína (20 - 600 nm) y de una bacteria (1 μm), según Inda (2000).

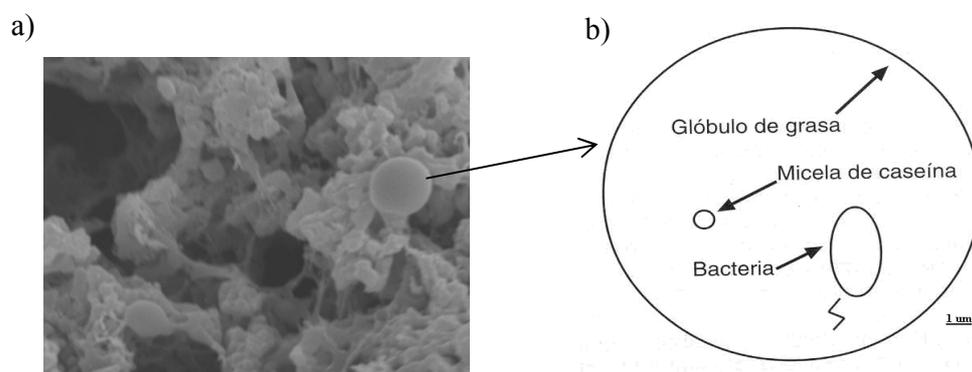


FIGURA 2. a) Micrografía electrónica del glóbulo de grasa presente en la estructura tridimensional de la cuajada (Rovira *et al.*, 2011); b) Diagrama de los tamaños relativos del glóbulo de grasa, una bacteria y una micela de caseína (Inda, 2000).

Generalmente no se homogeniza la leche destinada para la elaboración de queso, aunque esta técnica se práctica en algunas ocasiones. La homogenización de la leche produce una reducción en el tamaño de los glóbulos de grasa y, por consiguiente, un aumento en el área superficial de la misma, lo que altera la membrana original que resulta insuficiente para recubrir toda la superficie resultante de la homogenización (Inda, 2000).

Cuando se homogeniza la leche, las micelas de caseína se adsorben rápidamente para cubrir los glóbulos de grasa recién formados. Los glóbulos de grasa en la leche homogenizada contienen suficiente caseína adsorbida como para que su densidad aumente, lo que es un mecanismo de estabilización contra la separación de crema (Morr, 1975) y constituye la razón por la cual se homogeniza la leche para su consumo como tal (Inda, 2000).

Los glóbulos de grasa se pueden comportar como núcleos de copolimerización que refuerzan el gel de caseína (Aguilera y Kessler, 1989). La grasa recubierta de proteína puede enlazar cantidades adicionales de proteína y ayudar así a la formación del gel reforzado (Inda, 2000).

Se han estudiado los efectos de estas variables en el tamaño de los glóbulos de grasa, en la adsorción de proteína por unidad de área superficial de grasa y en la composición de la proteína adsorbida (Cano-Ruiz y Richter, 1997). Estos autores observan que al aumentar la presión de homogenización, disminuye el diámetro promedio de los glóbulos de grasa y aumenta la "carga proteica" (mg de proteína por metro cuadrado de área superficial de materia grasa). En función del tipo de queso, la homogenización de la materia grasa puede o no ser adecuada. Por ejemplo en queso fresco resulta apropiado aumentar la presión de homogenización que produce el aumento del área superficial de los glóbulos grasos. Sin embargo, una presión excesiva puede ser contraproducente, por lo que la presión ejercida debe cuantificarse y evaluarse en un contexto más general, que incluya otros atributos importantes tales como la textura del queso resultante (Inda, 2000).

Después de la coagulación la sinéresis es el siguiente proceso más importante en la elaboración del queso, ejerciendo un gran impacto en la calidad del producto final (Dejmek y Walstra, 2004). Este proceso se define como la expulsión del suero de la cuajada facilitada con el corte, agitación y calentamiento de la cuajada. Las condiciones en las que se desarrolla la coagulación y sinéresis definen las propiedades finales del queso por su influencia en la humedad, el contenido en proteína y el contenido grasa. El extracto seco del queso, la composición fisicoquímica del suero y las características del producto final están determinados por las condiciones aplicadas durante la sinéresis y, por lo tanto, por la liberación del suero por acciones mecánicas y físicas ejercidas durante el procesamiento (Rovira *et al.* 2011).

Como fue descrito por Daviau *et al.* (2000), el control de la sinéresis es considerado una etapa crucial en la tecnología quesera. Rovira *et al.* (2012) confirman que la monitorización en línea de la sinéresis es una herramienta útil para conseguir la humedad deseada del producto final, aunque las condiciones de la coagulación y sinéresis deben ser cuidadosamente controladas. Dichos autores

lograron predecir el rendimiento quesero y las propiedades de textura del producto final a través de la monitorización en línea de la sinéresis.

I.2 El papel de la microestructura en la elaboración de queso

El consumidor demanda productos equilibrados y de calidad, y asocia estos dos términos a marcas de confianza y a productos acogidos a Denominación de Origen.

Con el fin de garantizar la calidad de un producto es necesario que éste cumpla una serie de requisitos tecnológicos y de seguridad alimentaria englobando todas las etapas del proceso de elaboración para así garantizar la ausencia de irregularidades y minimizar el coste que supondría la eliminación de un lote completo o la venta al consumidor de productos de calidad irregular.

La microestructura de los alimentos es un factor determinante de la textura y de las características sensoriales, que condiciona la calidad final del producto (Stanley, 1987). Las interacciones entre los componentes que conforman el producto elaborado - como por ejemplo, las uniones proteicas y los glóbulos de grasa adheridos a las micelas de caseína- determinan la textura, fragilidad, cohesividad y elasticidad percibida por el consumidor.

El estudio y la caracterización de la microestructura de la cuajada, base de la elaboración del queso, se puede relacionar con los atributos que definen la percepción final del consumidor y permiten predecir; por lo tanto, la estabilidad y aceptación sensorial del producto final. Más aún, si la microestructura viene determinada no sólo por las características naturales del producto sino también por su procesado, el control de la microestructura de cada una de las etapas que conforman el proceso de elaboración del queso se ha de considerar como una herramienta útil para obtener información relacionada con las propiedades sensoriales del queso.

El estudio en profundidad de la microestructura del queso a lo largo del procesado puede aportar datos cuantitativos de la conformación de la microestructura durante la coagulación así como de la evolución de la sinéresis de la cuajada, ligado a su vez con parámetros químicos vinculados a la textura, tales como la capacidad de retención de agua de la matriz proteica y el contenido de humedad.

Los métodos instrumentales empleados para determinación de propiedades mecánicas y reológicas relacionadas con la textura del queso, responden a la acción de las fuerzas aplicadas sobre la estructura del alimento, por este motivo se ven afectadas por los parámetros que definen el método de análisis. La determinación de los parámetros relacionados con la textura se realiza habitualmente mediante técnicas destructivas, difíciles de aplicar en muestras de baja consistencia y que requieren de volúmenes de muestra elevados que encarecen la determinación. Un único método que permita a su vez visualizar con una buena resolución, cuantificar con un error mínimo y de forma repetitiva todos los parámetros a considerar, sin necesidad de grandes volúmenes y consistencias determinadas, permitiría minimizar la manipulación de la muestra y rentabilizar el tiempo total requerido para la determinación del conjunto de parámetros, sirviendo posteriormente para la predicción de otras propiedades químicas relacionadas, y la predicción de la textura final del producto.

I.3 Optimización de procesos

El sector quesero ha evolucionado a lo largo de estos últimos treinta años de forma gradual. La actividad quesera industrial está desarrollando su potencial y su modernización mediante la realización de inversiones en instalaciones, equipos y personal cualificado que hacen que en la actualidad se sitúe en un lugar destacado dentro del marco de la UE. Hasta ahora, la mayor inversión ha recaído en el perfeccionamiento de procesos y productos lácteos, contando con un total del 68% del importe económico total destinado para la inversión en el sector lácteo (Ramírez, 2008).

Entre las grandes inversiones realizadas, destaca el planteamiento dentro de este mismo sector del desarrollo de tecnologías en línea que permitan el seguimiento y control de las diferentes fases de producción que condicionan la calidad del producto final, favoreciendo la optimización del proceso de elaboración y la homogeneidad del elaborado final. Estas tecnologías en línea son necesarias para el control del corte de la cuajada y el proceso de desuerado, ambas encaminadas a garantizar la calidad y autenticidad del producto, así como la tradición quesera española.

Los recientes avances en el manejo de la fibra óptica y en el diseño de diminutos circuitos integrados permiten la adaptación, a bajo coste, de la espectrometría de *NIR* (infrarrojo próximo) a la línea de elaboración, mediante el empleo de sensores de reducido tamaño que no dañan la cuajada. La determinación del tiempo óptimo de corte es, si cabe, más importante en las industrias de carácter artesanal, normalmente menos automatizadas, debido a una gran variabilidad en la composición físico-química entre los diferentes lotes de leche y a una mayor variación del esquema general de producción (Van Hooydonk y Van den Berg, 1988).

El corte de la cuajada en un momento óptimo permite la optimización del proceso de elaboración, mejorando el rendimiento quesero, incrementando la calidad y garantizando una mayor homogeneidad del producto (Gunasekaran y Ay, 1996; Payne *et al.*, 1998), ya que el corte anticipado produce una pérdida de grasa y proteína en suero por falta de rigidez del coágulo y por el contrario, un retraso en el mismo da lugar a una mayor retención de suero en la cuajada -como consecuencia de una pérdida de permeabilidad-, generando quesos con un mayor contenido de agua.

En la actualidad, la realización del corte en la industria quesera se realiza atendiendo a dos criterios: a) se efectúa a un tiempo prefijado desde la adición del

enzima o b) viene determinado por el maestro quesero de forma más o menos subjetiva.

Existe una gran variación del tiempo de corte al estar éste influenciado por numerosos factores que afectan a la cinética de coagulación y a la dureza de la cuajada (Gunasekaran y Ay, 1996). De esta forma el tiempo de corte prefijado no se ajusta a las características de la materia prima, a los tratamientos previos ni a las condiciones de elaboración, lo que incide de forma negativa en el rendimiento y textura del queso, dificultando así, la obtención de un producto normalizado. La realización del corte en base al juicio del maestro quesero puede ser aceptable si la evaluación se realiza correctamente, lo que depende en gran medida de la experiencia y habilidad del operario responsable (Hori, 1985).

La completa automatización de la producción de queso, requiere el desarrollo de un método de medida en línea efectivo para la predicción del tiempo de corte, mejorando el rendimiento quesero, incrementando la calidad y garantizando una mayor homogeneidad del producto (Gunasekaran y Ay, 1996; Payne *et al.*, 1998). Por otra parte, la implementación de dicho método redundaría en la mejora de la gestión técnica de las queserías, en aspectos tales como: adaptación del proceso a las características de la materia prima, optimización de la producción con desaparición de tiempos muertos, optimización de la producción con el aumento del rendimiento y la mejora del control y automatización de procesos.

II. OBJETIVO

La finalidad principal de esta investigación es contribuir a la mejora de la calidad tecnológica de los quesos de cabra, mediante el estudio de la evolución de los geles de coagulación enzimática en el procesado industrial. De este objetivo principal derivan una serie de objetivos específicos:

- 1) Evaluar la composición fisicoquímica de la Denominación de Origen de Queso de Murcia al Vino y estudiar el efecto ejercido por la estacionalidad y el lugar de producción.
- 2) Desarrollo y puesta a punto de un método de visualización de la matriz proteica en tres dimensiones mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) aplicado a la elaboración de Queso de Murcia al Vino.
 - a. Desarrollo y puesta a punto de un método apropiado para la obtención de imágenes por SEM.
 - b. Definición de parámetros estructurales derivados del SEM que describan la microestructura del queso de cabra.
 - c. Puesta a punto de un método de análisis de imagen que permita la cuantificación de los parámetros estructurales anteriormente descritos.
 - d. Evaluación de los datos obtenidos.
- 3) Estudiar la aplicación de un sensor con un campo de visión amplio (prototipo “LFV sensor”) durante la coagulación y sinéresis en la producción de quesos de cabra.
- 4) Evaluar la utilidad del prototipo de sensor LFV para la monitorización en línea de la elaboración industrial de Queso de Murcia al Vino.

III. ANTECEDENTES

III.1. El estudio microestructural del queso

Las técnicas y procedimientos analíticos que se han ido desarrollando para el estudio de la microestructura de alimentos en los últimos años han renovado el interés del desarrollo de estudios específicos sobre su aplicación a los productos lácteos. En particular, en la industria quesera dichas aplicaciones se han centrado en el estudio de las relaciones entre la microestructura, la textura y las propiedades sensoriales que constituyen un parámetro de interés para la optimización de las prácticas de fabricación.

Diversos investigadores han destacado la importancia de una selección adecuada de los procedimientos y las técnicas de análisis a seguir para la evaluación de la microestructura con el fin de obtener resultados apropiados y útiles para la comunidad científica y técnica (Everett y Auty, 2008).

La microestructura del queso ha sido ampliamente estudiada; de hecho se han publicado revisiones científicas en relación con: los métodos actuales de análisis de la microestructura del queso (Everett y Auty, 2008), técnicas de análisis de imagen empleadas para el estudio de la microestructura de los alimentos (Falcone *et al.*, 2006), y finalmente, implicaciones tecnológicas y microbiológicas de la microestructura del queso (Pereira *et al.*, 2009).

El estudio de la conformación estructural de los alimentos a nivel microscópico se ha realizado por una gran variedad de técnicas entre las que se encuentra el microscopio de luz (LM) que resuelve detalles del orden de micrón mediante el empleo de un haz de luz en el rango de las longitudes de onda del visible, y el microscopio electrónico que emplea un haz de electrones de muy corta longitud de onda que permite obtener una mayor resolución (Figura 3).

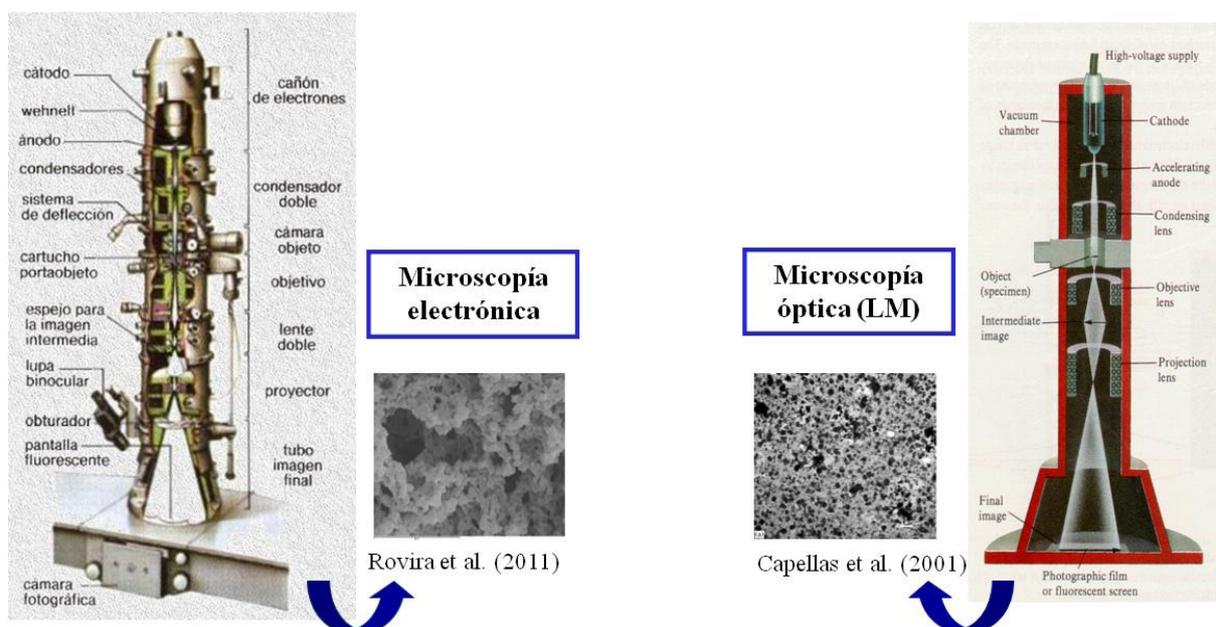


FIGURA 3. Diferencias entre los equipos y las imágenes obtenidas por microscopía electrónica y óptica.

Dentro de la microscopía electrónica destaca el empleo de la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía de barrido laser confocal (CSLM). Como se puede observar en la Figura 4, cada una de ellas permite el estudio de diferentes características de la microestructura del queso. La técnica SEM proporciona información sobre morfología, características de la superficie de partículas y conformación, mientras que con la TEM podemos observar la estructura interna y detalles

ultraestructurales. La CSLM permite realizar perfiles de superficie, medir profundidades y definir parámetros volumétricos (Figura 4).

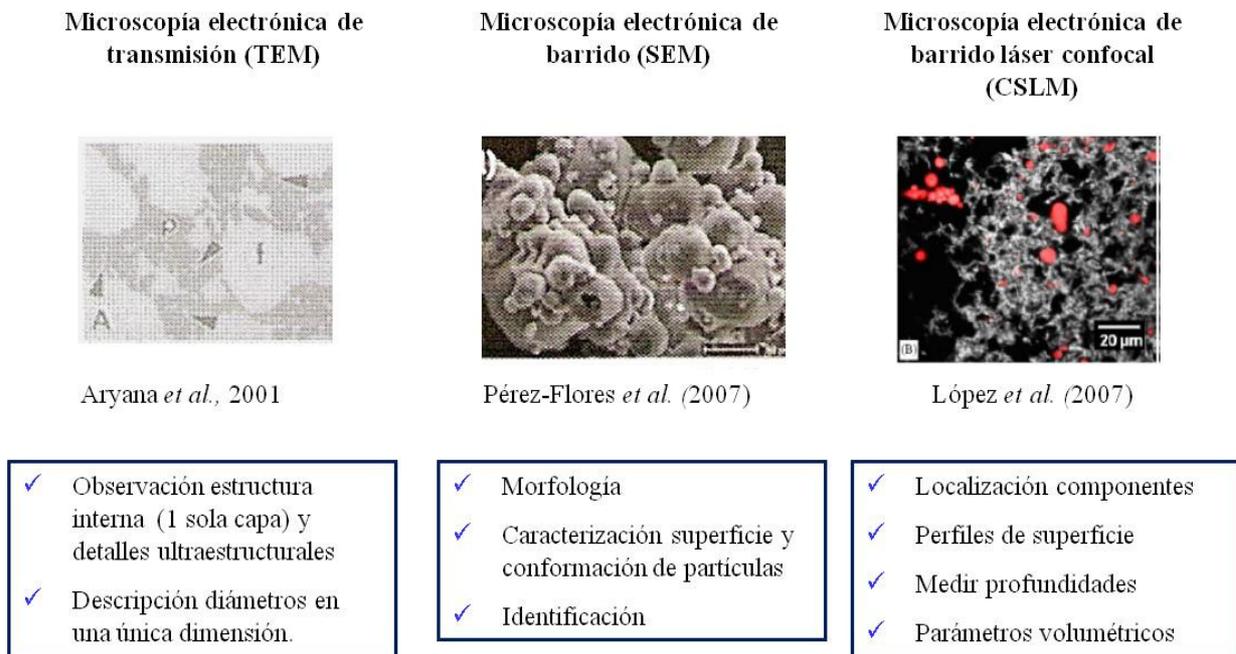


FIGURA 4. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica.

La técnica de barrido SEM crea una imagen ampliada de la superficie de la muestra sin la necesidad de cortarla en capas y con menos etapas de preparación. Dicha técnica, a diferencia del TEM, explora la superficie de la imagen punto por punto. Un haz muy concentrado de electrones permite recorrer la muestra de forma semejante al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión, a medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Los microscopios electrónicos de barrido pueden llegar a una ampliación de 200.000 veces el tamaño real de la muestra ofreciendo, a diferencia del TEM, imágenes tridimensionales reales de la superficie del objeto que luego permiten su análisis mediante soportes lógicos de un sistema avanzado (software) que son específicos para dichas técnicas.

Se han desarrollado pocos estudios de la microestructura de quesos mediante microscopía electrónica, ya sea de TEM, SEM o CSLM, y además la

metodología empleada para la observación y análisis de las imágenes obtenidas no permite la determinación cuantitativa de parámetros relacionados con la microestructura, pero sí una descripción visual y una determinación de diámetros orientativos de los componentes que la integran.

El empleo de CSLM ha permitido el desarrollo de diferentes estudios en queso, como por ejemplo el estudio de los glóbulos de grasa en la estructura del queso tipo Emmental y su evolución durante los procesos de elaboración y maduración (Ding *et al.*, 1998; López *et al.*, 2007; Muthukumarappan *et al.*, 1995). También se han realizado estudios que relacionan el rendimiento quesero con el proceso de gelificación de la leche de partida (Auty *et al.*, 1999), la permeabilidad de los geles de caseína que conforman la cuajada (Zhong *et al.*, 2004), y por último, la relación entre la localización de los exopolisacáridos en el queso y su correlación con el análisis sensorial (Hassan *et al.*, 2002 y Pereira *et al.*, 2006).

Ding *et al.* (1998) han llevado a cabo un procedimiento de reconstrucción de imágenes tridimensionales para la evaluación de la microestructura mediante el empleo de CSLM aplicado en muestras de queso Cheddar, consiguiendo la validación del método de reconstrucción de imágenes 2-D a 3-D con una variación entre ambas de 2-5% para la variable tamaño del objeto y 1-8% para la variable forma.

Tras el estudio realizado por Everett *et al.* (1995) se ha resaltado la importancia del empleo de imágenes 3-D para describir de forma más completa y real la estructura de la matriz compleja, pues la mera utilización de imágenes 2-D únicamente permite conocer la forma y la superficie en un único plano sin poder determinar cómo es su unión y distribución en los ejes X, Y, Z de la estructura tridimensional. Estos autores han realizado mediante CSLM una comparación entre el tamaño y forma de los glóbulos de grasa en queso Cheddar con bajo contenido en grasa observando que los glóbulos de grasa se encuentran cubiertos tanto por proteínas propias de la leche de partida en un modelo no específico

como de proteínas derivadas de procesos de desnaturalización como la lactoalbúmina procedente de la desnaturalización por calentamiento de la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina. Según Ding *et al.* (1998) la microscopía tridimensional se está convirtiendo en la última tendencia para el análisis de la microestructura y la definición de la textura de los alimentos.

Langton *et al.* (1996) han empleado el LM con el objetivo de estudiar los microporos que conforman geles proteicos de distintas características consiguiendo únicamente la visualización de los mismos. Para poder evaluar de forma más detallada el tamaño de las partículas y los poros que conforman la estructura recurre a la técnica de TEM que permite su medida en un único plano pero no la partícula en sus tres dimensiones, por lo que posteriormente aplica SEM, para estudiar la agregación de las partículas y su estructura tridimensional, pero sin determinar el tamaño y el número de las mismas. Además estos autores correlacionan la microestructura con la percepción sensorial de la textura determinada a través de un panel de cata entrenado.

La técnica de transmisión (TEM) ha resultado una herramienta útil para el estudio de la reorganización de las submicelas de caseína durante el almacenamiento de la Mozzarella, y la observación del efecto de la utilización de leche homogeneizada y no homogeneizada en la estructura final de la misma (Kimber *et al.*, 1975).

La técnica de barrido (SEM) ha sido empleada por numerosos autores con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la matriz del queso, pero con fines muy diversos.

Por ejemplo, algunos autores se han centrado en la aplicación de SEM para el estudio de los componentes grasos incluidos en la matriz proteica del queso (Gunasekaran y Ak, 1999; Karaman *et al.*, 2012; Madadlou *et al.*, 2005; Madadlou *et al.*, 2006).

Gunasekaran y Ak (1999) aplican un método de análisis tridimensional para estudiar las diferencias microestructurales en quesos Cheddar con distintos niveles de contenido graso (34.4%, 13.9% y 3.9%), con el fin de evaluar el número, tamaño, forma y localización de los glóbulos de grasa en el queso Cheddar en su primer mes de maduración. El tamaño de los glóbulos de grasa se determina cuantificando el número de elementos de volumen (*voxels*) digitalizados en la imagen aplicando posteriormente la fórmula correspondiente al diámetro de una esfera. La forma se determina aplicando la esfericidad (factor de forma tridimensional) adaptando todos los glóbulos de grasa a la forma de una esfera. Estos autores concluyen que el contenido en grasa es directamente proporcional al número, volumen y tamaño de los glóbulos de grasa, aunque esta conclusión no puede considerarse definitiva pues la reconstrucción de las imágenes procedentes de las muestras con un contenido elevado en grasa resulta compleja y no ofrece resultados estadísticamente satisfactorios.

Karaman *et al.* (2012) estudian la influencia de la homogenización y el contenido en grasa de la crema en las propiedades microestructurales del queso Turco blanco. Las imágenes obtenidas a 2500-3000 aumentos permiten visualizar diferencias entre los quesos procedentes de crema homogeneizada a 20 MPa y los de crema no homogeneizada (Figura 5). Los quesos procedentes de crema no homogeneizada muestran una matriz proteica más densa, con una mayor irregularidad en el tamaño y distribución de las cavidades libres (Figura 5, a, b, c y d), mientras que los quesos procedentes de crema homogeneizada muestran un mayor número y dispersión de partículas de grasa, lo que confirma la disminución de la pérdida de grasa en suero por el proceso de homogeneización. Además estos quesos muestran cavidades libres de menor tamaño. Si se compara la microestructura en función del mayor o menor contenido en grasa, los quesos con mayor contenido en grasa (Figura 5 a₁ y c₁) muestran cavidades libres de mayor tamaño y una matriz más heterogénea que los quesos con menor contenido en grasa (Figura 5 b₁ y d₁).

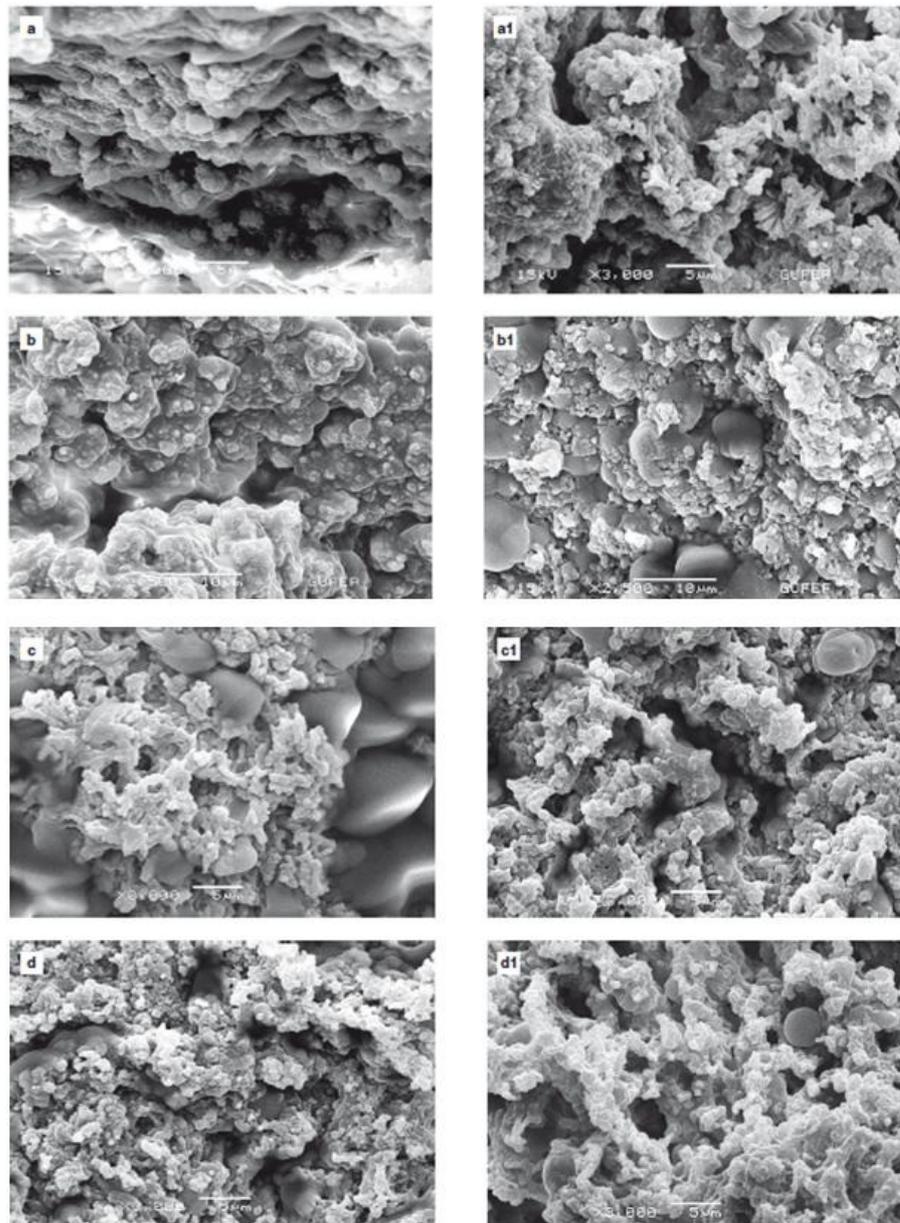


FIGURA 5. Imágenes obtenidas mediante SEM de queso turco blanco elaborado a partir de crema homogeneizada y sin homogeneizar. (a₁ y c₁): microestructura del queso turco procedente de crema homogeneizada con mayor contenido en grasa; (b₁ y d₁): microestructura del queso turco procedente de crema homogeneizada bajo en grasa; (a, b, c y d) quesos turcos procedentes de crema no homogeneizada. (Karaman *et al.*, 2012).

Madadlou *et al.* (2005) han empleado la técnica SEM para analizar de forma visual las diferencias en la microestructura derivadas del aumento del contenido en grasa del queso blanco iraní. Como puede observarse en la Figura 6 a partir de las imágenes obtenidas por estos autores, los quesos de mayor contenido en grasa (Figura 6a) presentan una matriz proteica abierta en cuyas cavidades libres se encuentran los glóbulos de grasa, mientras que en el caso de los quesos con bajo contenido en grasa (Figura 6b), la estructura es más compacta.

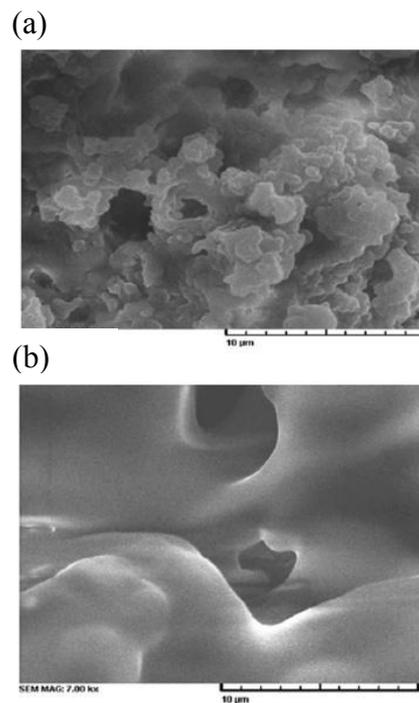


FIGURA 6. Imágenes obtenidas mediante SEM en queso iraní blanco. (a): queso con mayor contenido en grasa; (b): queso con bajo contenido en grasa. Madadlou *et al.* (2005).

Rahimi *et al.* (2007) estudian el efecto de la reducción del contenido en grasa y de la proteólisis sobre la textura y las propiedades funcionales de un queso blanco bajo en grasa de variedad iraní. En el análisis, se determinan características sensoriales, microestructurales, reológicas y el carácter fundente del producto. Estos autores concluyen que la reducción del contenido en grasa tiene efectos negativos en la textura (aumentando su dureza) y en las características sensoriales. El carácter fundente y el rendimiento quesero disminuyen al reducir el contenido

en grasa. La concentración del cuajo empleada en la elaboración de este tipo de queso, afecta positivamente a la percepción sensorial de la textura, mejorando el carácter fundente y los parámetros instrumentales de dureza, pero este aumento en la concentración del cuajo causa una reducción del rendimiento.

Algunos autores han estudiado la incorporación de distintos ingredientes (goma de mezquite, proteínas de soja, aditivos sustitutivos...) y su efecto en la microestructura con el objetivo de mejorar las características de la matriz proteica en los quesos bajos en grasa. El estudio de la influencia de la adición de hidratos de carbono y proteínas ha sido objeto de numerosas publicaciones (Kucukoner y Haque, 1995; Ma *et al.*, 1997; Messina y Messina, 1992). En ellas se confirma la idoneidad de su aplicación para mejorar las características de los quesos bajos en grasa. Para la elaboración de este tipo de quesos se han empleado también otros tipos de aditivos con el objetivo de sustituir total o parcialmente la grasa del queso.

Hernández-Tinoco *et al.* (2004) analizan mediante SEM el efecto de la adición de goma de mezquite y proteínas de soja a distintas concentraciones en la microestructura de quesos de bajo contenido en grasa. El gel obtenido tras la adición de proteínas de soja en la leche muestra una microestructura igual de firme y porosa que la control pero con unas cavidades más grandes, lo que incrementa su fragilidad ante los trabajos mecánicos llevados a cabo en los tratamientos posteriores de elaboración. El gel obtenido tras la adición de goma de mezquite presenta las mismas características que el obtenido con la adición de proteínas de soja. Sólo tras la adición de una mezcla de goma de mezquite y proteínas de soja se observan diferencias visuales, una microestructura más compacta, menos porosa y con poros de menor tamaño comparados con el queso control.

Lobato-Caballeros *et al.* (2007) analizan la adición de aceite de canola en leche como sustitutivo de la grasa en queso fresco. Los quesos frescos así elaborados muestran un menor grado de unión entre las cadenas de caseína, con

fibras proteicas de menor diámetro, lo que generaba una mayor porosidad en el queso. Las imágenes de SEM obtenidas en este estudio muestran que la sustitución total o parcial de la grasa láctea con aceite de canola produce quesos con una estructura menos estable y compacta, que afecta a la textura y rendimiento del producto final.

En la literatura científica también se hallan artículos relacionados con el estudio de la microestructura durante la fabricación de queso (Boutrou *et al.*, 2002; Buffa *et al.*, 2001; Impoco *et al.*, 2007).

La estructura tridimensional del queso se ve modificada por las tecnologías aplicadas en el proceso de elaboración de los quesos. El desarrollo de esta matriz proteica también se ve afectada por otros factores, como los cultivos iniciadores y de afinado empleados, la temperatura a lo largo de la coagulación y sinéresis, el pH, el trabajo de la cuajada..., que modifican las características del producto final. Aquellos parámetros que influyen en la microestructura, juegan un papel importante en las propiedades del queso final percibidas por los consumidores (Pereira *et al.*, 2009).

Los cambios en la composición de la cuajada o en las fuerzas físicas y químicas involucradas en la producción del queso están directamente relacionadas con cambios en la textura del producto final (Gunasekaran y Ak, 1999). El queso es el producto obtenido tras la coagulación de la leche y la sinéresis de la cuajada, donde la cuajada es sometida a diferentes tratamientos mecánicos (corte, agitación, reposo, desuerado...) hasta obtener el producto final. Todos estos procesos modifican la conformación de la matriz proteica, aunque los cultivos iniciadores utilizados también tienen una notable influencia en la microestructura final de queso (Pereira *et al.*, 2009). Por tanto, es necesario entender el comportamiento de la microestructura durante el proceso de fabricación del queso, para así poder mejorar el rendimiento y las características organolépticas del queso (Noronha y O'Riordan, 2008).

Antes de la coagulación, las micelas de caseína presentes en la leche no muestran tendencia a la agregación (Dalglish, 1997). Al coagular la leche se inicia el fenómeno de agregación micelar aportando una clara transición de una dispersión estable a una matriz proteica tridimensional que configura la microestructura inicial de la cuajada. Como fue descrito por Kimber *et al.* (1975) y Oberg *et al.* (1993), la microestructura va evolucionando a lo largo de los procesos mecánicos y fisicoquímicos que tienen lugar en la elaboración del queso desde la formación de la cuajada hasta la maduración.

Entre los pocos trabajos que se encuentran relativos a la microestructura de la cuajada durante toda la elaboración de queso, destaca el realizado por Boutrou *et al.* (2002) que relaciona el pH y el contenido en calcio, magnesio, sodio, potasio, fosfato inorgánico, citrato, lactosa, lactato, etc., con la evolución de las propiedades reológicas y de la microestructura a lo largo de la elaboración y el desuerado del producto, mediante la aplicación de compresión uniaxial, SEM y TEM. Mediante la aplicación de SEM se observa que a lo largo del desuerado disminuye la visualización de poros al progresar la fusión entre las partículas. En la descripción de las imágenes se identificaron las hebras, las bacterias ácido-lácticas y la agrupación de partículas a 5000 y 20000 aumentos. Este estudio también aporta información del tamaño orientativo de las micelas y aglomerados micelares y de los poros que conforman la matriz proteica para cada uno de los tiempos de elaboración seleccionados.

El trabajo publicado por Oberg *et al.* (1993), consiste en la caracterización mediante distintas imágenes obtenidas por SEM durante la elaboración del queso mozzarella, mostrando la evolución visual de la microestructura y como las micelas se agregan entre sí hasta formar la matriz proteica del producto final.

La microestructura muchas veces se considera un complemento en el estudio de diferentes aspectos de la transformación del queso, y no un objetivo en sí de la investigación. De hecho, en la literatura científica se hallan artículos relacionados con la microestructura y la influencia de distintos factores en etapas

concretas de la elaboración de queso (coagulación, salado, maduración...) (Karami *et al.*, 2009; Lobato Caballeros *et al.*, 2007, Lobato Caballeros *et al.*, 2008; Melilli *et al.*, 2005, Nidhi *et al.*, 2008...).

Como describen Madadlou *et al.* (2005) cada variedad de queso tiene su estructura tridimensional que refleja los cambios químicos y microbiológicos en el queso. Madadlou *et al.* (2005) y Madadlou *et al.* (2006) estudian la influencia en la microestructura de distintos factores de la etapa de coagulación. El primer grupo de autores analizan la influencia de la concentración de cuajo en la microestructura del queso iraní blanco observando que el empleo de una concentración dos y tres veces superior a la concentración normal de cuajo para esa variedad, genera matrices con una mayor porosidad (Madadlou *et al.*, 2005). El segundo grupo de autores realizan el mismo procedimiento aplicado en el estudio anterior pero con el objetivo de analizar la influencia de la temperatura de coagulación en la microestructura del queso (Madadlou *et al.* 2006). La Figura 7 muestra las imágenes obtenidas. Como se observa el queso procedente de la coagulación a mayor temperatura (41,5°C) muestra una matriz más compacta y homogénea.

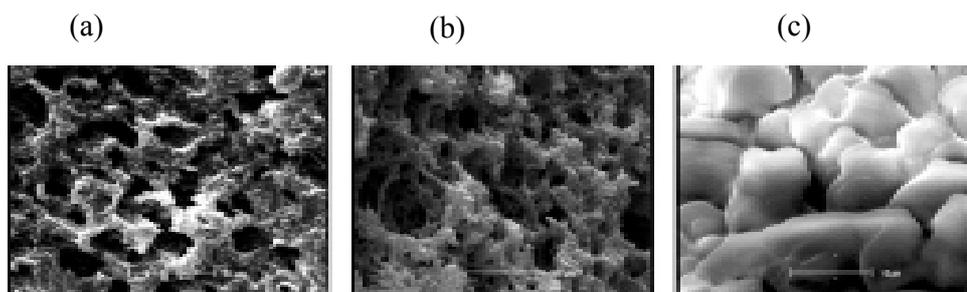


FIGURA 7. Imágenes obtenidas mediante SEM de queso iraní blanco. Queso procedente de la coagulación a 34°C (a); a 37°C (b) y a 41.5 °C (c). Madadlou *et al.* (2006).

Castillo *et al.* (2005) y Thorvaldsson *et al.* (1999) se centran en el estudio de la microestructura al objeto de determinar la influencia de la temperatura, la velocidad de calentamiento, la concentración del inóculo y el pH en la

coagulación. Estos autores observan cambios tanto en la estructura y dimensión de los poros como en la gelificación y desuerado del producto. El pH juega un papel importante en las modificaciones que tienen lugar en la red proteica del queso -ya que se relaciona de forma directa con cambios químicos en la conformación estructural de la cuajada-, afectando a su estructura. También la actividad de agua y el contenido en sal afectan de forma indirecta a las propiedades reológicas del producto (Pinho *et al.*, 2004).

Herbert *et al.* (1999) analizan las diferencias entre la cuajada procedente de coagulación ácida y la procedente de coagulación enzimática, observando una menor consistencia y capacidad de retención de agua de la cuajada procedente de la coagulación ácida de la leche.

Wium *et al.* (2003) determinan el efecto de las condiciones de la coagulación en la microestructura de queso Feta libre de grasa elaborado con leche ultrafiltrada. Una dosis elevada de quimosina, una temperatura elevada así como un tiempo de coagulación alto da lugar a una microestructura más compacta y reorganizada, favoreciendo la reagrupación de las cadenas proteicas.

El corte de la cuajada es un proceso importante en la elaboración del queso. Los estudios en la microestructura del queso se han centrado, en su mayoría, en los agregados proteicos, como se entrelazan entre sí para constituir la matriz proteica, tan característica del queso. Esta agregación depende del tamaño de los granos de cuajada obtenidos tras el corte de la misma. Se ha determinado que, por el tamaño de los agregados proteicos, se puede predecir el estrés del alimento al someterlo a una presión hasta su fractura, y el trabajo necesario, entendido como la energía que se requiere para fracturarlo, por lo que se pueden predecir los parámetros que caracterizan la textura y estabilidad física del queso. (Wium *et al.*, 2003).

También se han realizado estudios de la microestructura durante el salado del queso. Melilli *et al.* (2005) caracterizan los cambios en la porosidad y la

estructura de la superficie del queso durante el salado del mismo observando que la superficie antes del salado es porosa, con unas cavidades de forma irregular que se encuentran distribuidas uniformemente, mientras que el queso tras el salado presenta una matriz más compacta con cavidades pequeñas distribuidas de forma paralela a la superficie del queso. Estos resultados coinciden con los cambios visualizados por Cooke *et al.* (1995) en queso Mozzarella, y Madadlou *et al.* (2007) en queso iraní blanco, quienes observan que una mayor concentración de sal producía una microestructura más compacta pero con una distribución de los poros heterogénea. McMahon *et al.* (2009) constatan que no sólo la concentración de sal y el tiempo de salado es importante en los cambios microestructurales sino que la temperatura de la salmuera también ejerce un notable impacto en la evolución de la matriz tridimensional del queso durante el salado.

En los estudios relativos a la microestructura del queso final o del queso durante su maduración, se denomina poro al espacio libre entre las partículas que conforman la matriz sólida. Buffa *et al.* (2001) han observado que los quesos con una matriz proteica de estructura abierta con un número elevado en poros y cavidades irregulares, tienen menor elasticidad que los quesos con una matriz más compacta y regular. Pero para poder definir de forma cuantitativa el grado de abertura de la estructura, y su posterior relación con la textura, es necesario considerar otros factores además de la porosidad, pues una estructura puede tener una misma porosidad en cuanto a porcentaje de espacio libre, pero no tener el mismo número de cavidades. El área libre puede deberse a un solo poro de grandes dimensiones o por una variedad de poros de pequeñas o medianas dimensiones; constituye el espacio total libre el mismo, pero reflejan estructuras muy distintas.

Aryana *et al.*, (2001), emplean SEM para determinar la influencia de la maduración de los quesos de la variedad Vallegret y Edam en la microestructura. Comparando los quesos de una semana de elaboración con quesos de 6 y 11 meses de maduración, se observa que para la variedad Vallegret los quesos curados presentan estructuras fibrosas que no se observan en los madurados. En

ambas variedades sin proceso de maduración, se detecta la presencia de estructuras porosas de pequeño tamaño y sutiles hendiduras que no se aprecian en los quesos madurados. Además se visualiza que los quesos madurados presentaban capas proteicas en la interfase grasa-proteína. Por tanto se afirma que la maduración afecta de forma notable la microestructura de los quesos. Un comportamiento similar ha sido observado por Fallico *et al.* (2006) en quesos de la variedad Piacentinu Ennese, después de 2, 4 y 6 meses de maduración.

Pierre *et al.*, (1999) caracterizan la microestructura del queso en relación a la composición del mismo durante el proceso de maduración y determina que en las primeras etapas de maduración los cambios químicos y físicos se desarrollan de forma más rápida, con un aumento en el contenido en nitrógeno soluble y una disminución de la humedad, coincidiendo con lo señalado por Attaie *et al.* (1996). Además, estos autores observan que a medida que el contenido de humedad disminuía, la microestructura del queso resultaba visualmente más compacta y con una menor presencia de cavidades libres.

Karami *et al.* (2009) analizan las propiedades microestructurales de la grasa durante la maduración acelerada, aplicando lipasas comerciales en queso Feta variedad iraní fabricado a partir de leche ultrafiltrada. Las imágenes obtenidas mediante SEM muestran que un mayor nivel de lipasas, o del periodo de maduración, conlleva una menor presencia de glóbulos de grasa.

También se han desarrollado estudios de la evolución de la microestructura durante el almacenamiento del queso. Tunick *et al.* (1997) observan que durante el almacenamiento del queso la dimensión de las micelas de caseína cambiaba formando largos agregados, pero no se aprecian diferencias significativas entre la porosidad del queso fresco y el queso almacenado. Estos efectos se han relacionado con el proceso de proteólisis de la matriz proteica del queso. Con este estudio también se determina que las submicelas de caseína se reorganizaban de forma diferente en función de la aplicación o no de un proceso de

homogeneización de las leches de partida, relacionando este hecho con una disminución de la proteólisis.

El empleo de una tecnología u otra en la elaboración también afecta a la microestructura del queso y por tanto, a las características de textura del producto final. Fallico *et al.* (2006) han analizado la microestructura durante la elaboración del queso italiano Piacentinu Ennese, con el objetivo de caracterizar su matriz tridimensional y evaluar el impacto de la tecnología empleada en la elaboración. La matriz proteica del queso tradicional presenta una estructura permeable y bien distribuida con un sistema de espacios libres originariamente ocupados por suero y glóbulos de grasa. Las micelas de caseína se unen entre sí para formar una estructura con poros y hebras sin orientación definida. Los quesos elaborados por una tecnología distinta a la tradicional (leche pasteurizada, con cultivos iniciadores y cuajo comercial, cubas industriales y prensado mecánico) mostraron una matriz de hebras más cortas y de menor continuidad que refleja una menor fusión de las micelas de caseína y una mayor porosidad, tal y como describen Buffa *et al.* (2001) en quesos de cabra elaborados a partir de leche fresca y leche pasteurizada, respectivamente.

Como ha sido descrito por Fenoul *et al.* (2008), la mayoría de los estudios realizados en la microestructura del queso se han llevado a cabo mediante la observación de las imágenes procedentes de la microscopía. Los análisis cualitativos de las fotografías sólo permiten describir la estructura, de modo que para determinar las diferencias y las relaciones con otros factores es necesario realizar un análisis cuantitativo.

La microscopía electrónica de barrido es uno de los métodos que se han utilizado para estos propósitos, pero no el más empleado. Hasta ahora la aplicación de SEM, -como se ha recogido a lo largo de este capítulo-se ha limitado a un análisis meramente descriptivo o de cuantificación orientativa. En los últimos años se han desarrollado programas de análisis de imagen que permiten cuantificar de forma directa por semejanza a figuras geométricas, aunque

no se obtienen resultados que reflejen fielmente la realidad asimétrica y tridimensional de los distintos poros que conforman la microestructura de la matriz proteica característica de la cuajada y el queso, por lo que tampoco se podría predecir la textura final del producto.

Este es el caso del estudio realizado por Impoco *et al.*, (2007) que analizan por SEM de forma cuantitativa la porosidad de la microestructura de distintas variedades de quesos de origen siciliano. Como sostienen estos autores, en los estudios científicos, la evaluación visual cualitativa es insuficiente para determinar diferencias internas en la microestructura, por lo que está cobrando especial relevancia la descripción de las imágenes en términos cuantitativos. En este caso las imágenes obtenidas a un total de 500 y 1000 aumentos permiten en un principio la cuantificación de parámetros tales como la porosidad -entendida como el porcentaje del área porosa en relación al porcentaje total del área de la muestra- y el perímetro y área de cada uno de los poros, adaptándolos a formas geométricas mediante el cálculo de un factor de forma en el que los diámetros máximos y mínimos que delimitan el poro, se emplean para la cuantificación de su superficie, y corresponden a los puntos más alejados del borde del poro sobreestimando o subestimando en función de cada poro el área total y los parámetros relativos a la forma del mismo, como la redondez, el factor de forma y el aspecto del radio del poro. Finalmente, este estudio aporta únicamente datos relativos al término de porosidad, ofreciendo para los otros parámetros seleccionados, una explicación de las consideraciones a tener en cuenta para su medición, pero sin ser aplicadas a las muestras problema. Más que una aplicación concreta del conjunto de parámetros, el estudio se centra en el desarrollo y la explicación del funcionamiento del soporte lógico de un sistema informático para la determinación de los parámetros relacionados con la forma por semejanza a figuras geométricas, la porosidad y la direccionalidad del poro.

Se ha logrado determinar el tamaño y la forma de los gránulos de cuajada en quesos suizos curados y semi-curados (Rüegg *et al.*, 1987). Como sostiene Inoue (1986) la cuantificación de la microestructura se ve facilitada por el análisis de

imagen por ordenador. De hecho en los últimos años el procesamiento de la imagen por ordenador está siendo cada vez más empleado en la industria alimentaria con grandes avances como el desarrollado por Impoco *et al.*, (2007), comentado anteriormente.

Otro avance importante fue el publicado por Ding y Gunasekaran (1998), quienes han desarrollado un método de análisis tridimensional basado en la reconstrucción de imágenes en dos dimensiones obtenidas por CSLM. Esta metodología la aplican para evaluar el número, tamaño y forma de los glóbulos de grasa dispersos en la matriz tridimensional del queso.

Se han desarrollado muchos métodos visuales de microscopía óptica y electrónica para la caracterización de la microestructura de distintos alimentos entre ellos la cuajada y el queso. No obstante, con ninguna técnica visual de microscopía en dos y tres dimensiones se han cuantificado, de forma repetitiva y reproducible, parámetros concretos de microestructura.

Ding y Gunasekaran (1998) afirman que el conocimiento de la microestructura ha de ser un precedente para la regulación de la textura y de otros atributos alimentarios.

Como describen Karlsson *et al.*, (2007) en la coagulación inducida de la leche se pueden diferenciar tres fases, la primera fase de hidrólisis enzimática de la *k*-caseína, una segunda fase de agregación de las micelas de caseína donde se desarrolla el gel y una tercera fase en la que se forma la red tridimensional de la matriz proteica en la que de forma simultánea se produce un fenómeno de micro-macrosinéresis. La consistencia en cada una de estas etapas es muy diferente, por eso resulta interesante la aplicación de un método tanto de microscopía como de análisis de la imagen, en los tiempos de elaboración correspondientes a estas fases, porque así se afirmaría la aceptabilidad del método en muestras de muy baja consistencia como es el caso de la primera fase, y geles de una mayor consistencia que corresponden al último proceso previo al moldeado y prensado del queso

pudiendo ser aplicado con posterioridad a intervalos más cortos durante el desuerado y así profundizar en el estudio de la sinéresis. Este propósito, se ha conseguido con una de las publicaciones que forman esta Memoria de Tesis Doctoral, logrando cuantificar de forma repetitiva distintos parámetros microestructurales a lo largo de la coagulación y sinéresis del queso.

III.2. Sensores en la industria alimentaria láctea

Muchas de las variaciones en la calidad tecnológica y la seguridad alimentaria de los quesos comercialmente disponibles, residen en las diferencias observadas durante la formación del gel, donde el tiempo de corte y la sinéresis son factores decisivos durante la elaboración. La ausencia de criterios avanzados del seguimiento de la coagulación enzimática y sinéresis es objeto de diversos trabajos entre los que destacan la aplicación de sensores ópticos on-line.

Como describen Sbodio y Revelli (2012), desde 1932 comenzaron a utilizarse técnicas objetivas para la monitorización en continuo de las propiedades de los geles, como por ejemplo la utilización de diferentes viscosímetros que permiten analizar los cambios de viscosidad durante la agregación de las micelas (Scott *et al.*, 1961). Mediante el método visual desarrollado por Berridge (1952) se puede determinar el tiempo de floculación de las micelas de caseína en la fase de agregación. Autores como Hostettler *et al.* (1955) y, más tarde, Green *et al.* (1978) estudian imágenes de microscopía electrónica para determinar la extensión de la agregación y coagulación en la elaboración de queso.

Tsouli *et al.* (1975) han propuesto medir la conductividad eléctrica durante la coagulación y, más recientemente, Dejmek (1989) aplica medidas de conductividad para observar la evolución durante la coagulación y relacionarla con cambios de viscosidad, con resultados más esperanzadores que los obtenidos por los autores previamente citados.

En 1976, se desarrolla un sistema mecánico conocido como Curd Firmness Tester (CFT) que emplea la medición de la manometría para valorar la oscilación hidráulica y la presión transmitida por el gel. Este sistema permite controlar la firmeza al momento del corte de la cuajada mejorando la recuperación de grasa y caseína (Bynum y Olson, 1982); también permite estudiar la influencia de la concentración de caseína sobre el tiempo de corte de la cuajada (Garnot *et al.*, 1982). Garnot *et al.* (1982) emplean este dispositivo mecánico (CFT) para evaluar la firmeza del gel de un queso elaborado con leche ultrafiltrada ($3\pm 0,1\text{g}/100\text{g}$), observando que la concentración de proteína influye en el tiempo de corte de la cuajada, disminuyendo exponencialmente con el incremento del contenido proteico.

Otra técnica desarrollada en la década de los años ochenta es la geometría oscilatoria, sometiendo al gel a ondas de oscilación sinusoidal a través de reómetros oscilatorios (Bohlin *et al.*, 1984).

Richardson *et al.* en 1985 diseñaron un sensor de oscilación vertical conocido como Vatimer, que fue modificado años después por Ridell-Lawrence *et al.* (1988), quienes emplean el sensor modificado para el estudio de la influencia de la firmeza de la cuajada en el rendimiento quesero. Este sensor permite monitorizar de forma continua durante la coagulación la variación de la resistencia mecánica del gel tras la fuerza aplicada en la oscilación vertical.

También se ha utilizado la espectroscopia de difusión para el estudio de la movilidad molecular de la cuajada al inicio de la coagulación estableciendo relaciones con el tiempo de relajación del gel (Horne y Davidson, 1990).

Por el momento no se ha conseguido un sistema completamente eficaz y adecuado para el seguimiento de la coagulación así, como para la determinación objetiva del tiempo ideal de corte, si bien es cierto que algunos métodos, entre los que destacan las técnicas térmicas, de ultrasonidos y especialmente las de dispersión de radiación infrarroja cercana (NIR), parecen estar demostrando una

utilidad práctica interesante por su carácter no destructivo y su fácil limpieza y manejo, ya que se sirven de sensores específicos que pueden ser instalados en las cubas industriales de cuajado. De hecho en los años noventa, los instrumentos que más se han aplicado en la industria corresponden aquellos denominados métodos del alambre caliente (Hot Wire Method) como el sistema OPTISET y los métodos NIR. La utilización de estos sistemas en el control de la coagulación de la leche durante la elaboración de queso mejora la calidad y consistencia de la cuajada.

La espectroscopia por NIR se basa en de la radiación electromagnética de longitudes de onda del rango 780-2500 nm, correspondientes al infrarrojo próximo, y se utiliza habitualmente para el análisis sensorial, y de la composición fisicoquímica de la materia prima, así como del producto final (Osborne, 1986). Para ello se emplean medidas de transmisión y de reflexión difusa, siendo ésta última la más aplicada (Skoog *et al.*, 2001). La radiación penetra en la capa superficial de las partículas, excita los enlaces de las moléculas del analito dispersándose en todas las direcciones, dando lugar a un espectro de reflectancia (Castillo, 2001).

Kawamura *et al.* (2003) han diseñado un sistema en línea basado en la radiación de la región NIR para la evaluación de la calidad de la leche durante el ordeño mediante la determinación de su contenido en materia grasa, en proteína, lactosa, células somáticas, y nitrógeno ureico en leche. Estos mismos autores han realizado con el mismo equipo un nuevo estudio en el año 2005 para mejorar la solidez de los modelos de calibración en línea (Kawasaki *et al.*, 2005). Otra tecnología aplicada en leche es la tecnología de dispersión de luz láser desarrollada por Xin *et al.* (2006) para la determinación rápida y simple del contenido en grasa y proteína. Basado en la teoría de dispersión de luz láser, la relación de la intensidad de luz dispersada a la intensidad de la luz transmitida, que se denomina método del ratio transmisión-dispersión, que es adoptado como el parámetro óptico que representa el contenido de grasa y proteína en la leche. De esta manera, la influencia de la fluctuación de la potencia de la fuente de luz se elimina y en consecuencia, la exactitud de la determinación se mejora. Este

sistema es a tiempo real y cubre los requerimientos de la industria quesera; se ha implementado como método de control de la composición química de la leche de partida para la producción de distintos derivados lácteos.

Como se observa en la Figura 8, la fuente del sistema es un láser HE-NE (a) que emite una longitud de onda de 632.8 nm a la potencia de 2 mW; el rayo láser generado atraviesa el obturador (b) y llega a la zona de medición (c). Este sistema incluye dos detectores de fotodiodos (d), que convierten las señales de transmisión y dispersión respectivamente en señales de energía eléctrica continua de aproximadamente 10^{-8} mA, y, a continuación, a través del convertidor CA/CC (e), las señales se envían al microprocesador (f), que se conecta a través del puerto de serie en el computador (g).

La leche homogeneizada se envía a la zona de medición a través de una bomba eléctrica (h). Así se determina a tiempo real el contenido en grasa y proteína de la leche.

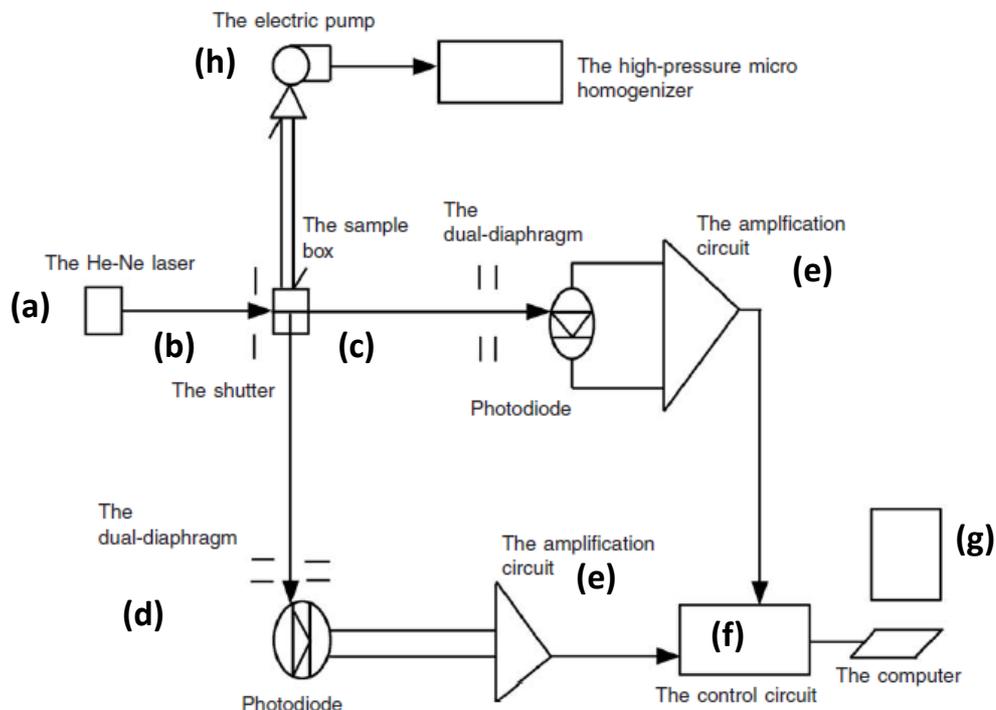


FIGURA 8. Diseño del sistema desarrollado por Xin *et al.* (2006) para determinación directa del contenido en grasa y proteína de la leche.

Las primeras aplicaciones de NIR en productos queseros fueron la determinación de grasa, proteína y humedad en diferentes variedades de queso (Cheddar, Colby, Parmesano, Romano y Gruyère). Frankhuizen (1992) ha aplicado NIR para clasificar diferentes variedades de queso Edam y Gouda según el grado de maduración.

Klenke y Schneemann (1993) también han usado radiación infrarroja cercana para la determinación en línea del contenido de materia seca en el proceso de fabricación del queso y en 2001, Adamopoulos *et al.* (2001) aplican esta técnica para la caracterización de su origen geográfico en el control de la elaboración tradicional del queso Feta, obteniendo espectros NIR a longitudes de onda de 1940, 2180 y 2310 nm en relación a la humedad, proteína y grasa, respectivamente. Mertens *et al.* (2002) monitorizan la coagulación de forma continua a través de la señal de reflectancia infrarroja cercana en una única longitud de onda. Karoui, *et al.* (2006) han seguido trabajando con espectroscopía MIR para la determinación de los parámetros químicos en queso Emmental comparando los resultados obtenidos a partir de la aplicación del modelo de regresión por mínimos cuadrados, frente a los métodos tradicionales para la determinación de estos parámetros. Y por último, González-Martín *et al.* (2007) emplean esta técnica para la predicción inmediata y simultánea de grasa, humedad, proteína y contenido de cloruro en quesos elaborados con mezclas de leche, de oveja y de cabra, curado y en diferentes momentos de su elaboración.

La tecnología NIR también se ha empleado para el estudio de la coagulación en leche de cabra, vaca y oveja mediante un sensor mixto que combina una sonda térmica y un sensor óptico de transmisión NIR (Raynal y Remeuf, 2000).

En la última década se han desarrollado varios dispositivos en línea para el seguimiento de la coagulación en la elaboración de queso. La principal ventaja de estos dispositivos es la optimización de la humedad, rendimiento y calidad del queso. Inicialmente, los dispositivos que se habían desarrollado para el seguimiento experimental de la coagulación realizaban mediciones reológicas

inapropiadas para su utilización comercial en la fabricación de queso. Los sistemas actualmente disponibles para este propósito son muy sensibles a los cambios que tienen lugar en la formación del gel alrededor del punto de corte, cambios que se producen cuando el gel ha alcanzado una cierta consistencia. Esta sensibilidad supone una fuente de error ya que dicha consistencia puede depender de numerosos factores (por ej.: el nivel proteico), influenciando el ratio de firmeza de la cuajada que puede no estar relacionada con el ratio de formación del gel (O' Callaghan, *et al.*, 1999).

Sharma *et al.* (1993) realizan mediciones en línea del tiempo de coagulación y la firmeza de la cuajada, mediante un viscosímetro bajo la técnica de vibración torsional. Observan como la viscosidad disminuye en la primera fase de la coagulación, consecuencia de una reducción de la micela de caseína. Esta disminución era más pronunciada a temperaturas de coagulación superiores. Krenkel, *et al.* (1996) emplean también la técnica de vibración torsional para el estudio de la influencia de la adición de calcio, contenido en grasa y la forma de agregación de contenido proteico en la coagulación de la leche, observando que el sensor era sensible a la adición de cloruro cálcico y a una variación proteica de 0.3% en el caso de leches descremadas.

Payne *et al.* (1993) utiliza un sistema de dispersión NIR a 950 nm para la monitorización de la coagulación de la leche a distintos niveles de grasa, concentración de enzima coagulante, temperatura y pH, manteniendo un nivel proteico constante. Con este estudio observan que se puede predecir el tiempo de corte con un error estándar menor de 120 segundos, al encontrar una alta correlación entre el tiempo de corte (T_{cut}) y el ratio de la señal del sensor introduciendo como variable la concentración de proteína de la leche en el modelo de predicción. Estos autores también observan que a 820 nm la reflectancia difusa responde linealmente a la concentración de grasa en la leche en un rango de 1-5%. Payne *et al.* (1996) también encuentran una alta correlación entre el momento de la elaboración en el que se procede al primer corte (T_{cut}), y el tiempo correspondiente al punto más alto de radiación dispersa (T_{max}) utilizando una

longitud de onda de 880 nm. Esta observación, permite el desarrollo de un algoritmo de predicción del tiempo de corte mejorando la automatización en la elaboración de queso, pues este tiempo, que suele ser determinado de forma visual por el quesero, difiere notablemente de una elaboración a otra (Castillo *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2006a; Castillo *et al.*, 2006b). Esta técnica ha sido patentada bajo dos nombres: CoAguLabTM (para análisis en laboratorio) y CoAguliTeTM (diseñado para ser acoplado en la cuba quesera permitiendo su aplicación a nivel experimental y industrial), dos sensores de fibra óptica que monitorizan la coagulación de la leche y predicen el tiempo de corte de la cuajada (Castillo *et al.*, 2001; Payne *et al.*, 1993), su aplicación ha sido objeto de diversos estudios, algunos de ellos realizados en el Grupo de Investigación donde se ha llevado a cabo esta Memoria.

El sensor CoAguLabTM es un sistema óptico de seguimiento y medición de la cinética de las enzimas empleadas en la coagulación de la leche. Este instrumento está equipado con dos celdas de medición de 80 mL para las pruebas de emparejado. Ha sido específicamente diseñado para proporcionar un control apropiado de la temperatura y para la determinación precisa y repetitiva de la actividad coagulante en leche. El sistema controla la temperatura, la retrodispersión de la luz y el pH para cada cuba de 80 mL. Permite determinar la velocidad de reacción enzimática de la coagulación, con la valoración simultánea del pH y temperatura. A partir del perfil de retrodispersión de la luz durante la coagulación permite la predicción de distintos parámetros o índices de coagulación en la elaboración de queso como por ejemplo el tiempo de corte (T_{cut}), el tiempo de inflexión de la primera derivada (T_{max})... Este sensor está provisto de dos cubas, cada una de ellas con un termoresistor (sensor resistivo de temperatura), una fibra óptica (880 nm) y una sonda de pH (Figura 9).

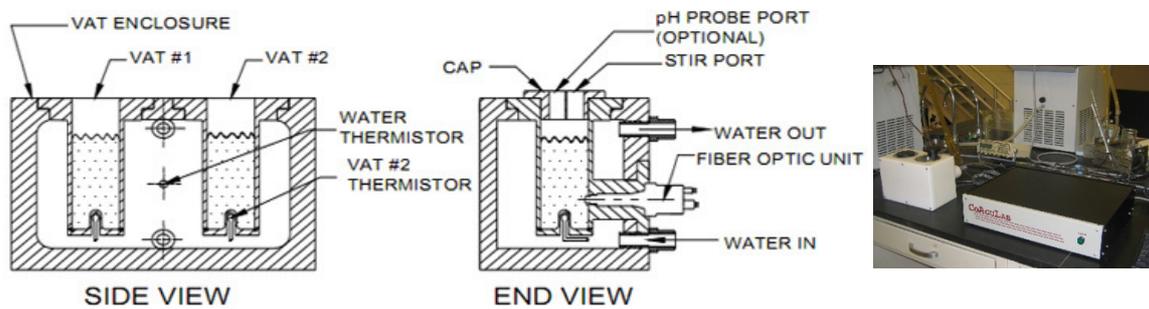


FIGURA 9. Diseño del sensor CoAguLab™. Imagen propiedad de Reflectronics, Inc.

El sensor CoAguLite™ es un sistema que sigue el mismo funcionamiento descrito para el CoAguLab™ pero que ha sido diseñado para su acoplamiento en cuba. Este sensor es una tecnología empleada para el control en línea de la coagulación. Proporciona un control uniforme del tiempo de corte, reduce la grasa del suero y mejora el control de la humedad. Este sistema permite a su vez determinar la velocidad de la reacción enzimática de la coagulación de la leche permitiendo ajustar los cambios en la temperatura, pH, calcio añadido y la concentración de cuajo o enzimas coagulantes. El uso de fibras ópticas de pequeño tamaño permite la medición precisa de pequeños cambios en la agregación de la caseína. El sensor integra un algoritmo de procesamiento de datos y un modelo de predicción que se utilizan para implementar esta tecnología. Este sensor al igual que el CoAguLab™ permite determinar el parámetro T_{max} , comentado anteriormente pero directamente en la cuba industrial (o planta piloto). Este índice es una medida directa de la cinética de coagulación determina a partir de la primera derivada del ratio de reflectancia difusa (Figura 10) y se utiliza para predecir el tiempo de corte a partir de la siguiente ecuación: $T_{cut} = BETA \cdot T_{max}$ (Payne *et al.*, 1993). BETA es una constante seleccionada por el quesero que calibra el sistema.

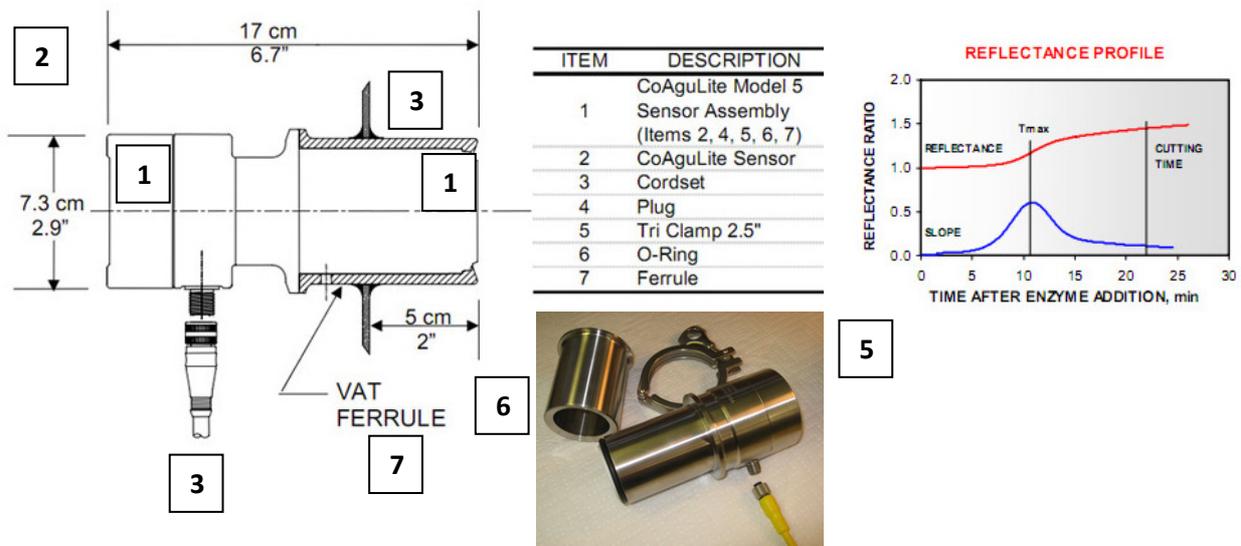


FIGURA 10. Diseño del sensor CoAguLite™. Imágenes propiedad de Reflectronics, Inc.

Este sensor de fibra óptica consiste de una fibra óptica de emisión de luz de 600 μm y otra del mismo diámetro para la transmisión de la reflectancia difusa al fotodetector. La fuente de luz corresponde a una luz infrarroja LED de 880 nm (Castillo *et al.*, 2000). La Figura 10 muestra los distintos elementos necesarios para su acople en la cuba quesera.

El sensor CoAguLite™ ha sido empleado para el estudio del efecto de la temperatura, la concentración del inóculo y la concentración de cloruro cálcico (Castillo *et al.*, 2006a y Castillo *et al.*, 2006b) concluyendo que el sensor es apropiado para la monitorización on-line durante la coagulación. Fagan *et al.* (2007a) ponen de manifiesto la correlación entre la respuesta del sensor y las propiedades fisicoquímicas del producto, como la humedad que a su vez se relaciona con la seguridad del producto. De hecho, el sensor no sólo permite la predicción del tiempo de corte, sino también de otros índices de fabricación quesera como el rendimiento quesero y, además puede ser empleado para el desarrollo de algoritmos de predicción de humedad y pérdida de grasa en el suero (Fagan *et al.*, 2007a).

El estudio de la sinéresis en la elaboración de productos queseros, es otro factor relevante para la optimización de los procesos. La sinéresis, como se ha comentado con anterioridad, es el fenómeno por el que se libera espontáneamente el lactosuero, como consecuencia de la reorganización de las micelas de caseína en la red tridimensional a través de enlaces de hidrógeno principalmente. Aplicado a los geles de coagulación enzimática, el suero de la cuajada, y su eliminación en la sinéresis, no sólo determina la humedad del coágulo sino también el contenido mineral y en lactosa, influyendo en el pH y en el desarrollo y contenido en microorganismos. Como estos factores interactúan entre sí, influyen la producción enzimática y su actividad y, por lo tanto, determinan la estabilidad, calidad y seguridad del producto. Un seguimiento en línea de este proceso, a lo largo de la cadena de producción, permitiría el control óptimo de la misma, que garantiza una normalización de los elaborados y un mayor rendimiento en la producción y rentabilidad en la industria quesera.

El estudio y control de la sinéresis tiene una serie de dificultades evidenciadas por las numerosas y variadas técnicas que se aplican. Walstra *et al.*, (1986) y Walstra (1993) han revisado distintas técnicas propuestas para cuantificar la sinéresis como son la medida de la contracción de la cuajada, determinada por los cambios de peso (Castillo *et al.*, 2006a; Lodaite, 2001), el área (Renault *et al.*, 1997), el volumen (Lawrence, 1991) o la masa. También la medida de la expulsión de suero (Castillo *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2006a, Daivau *et al.*, 2000; Marschall, 1982), o del grado de dilución determinado mediante la agregación de un trazador (Beeby, 1959; Grundelius *et al.*, 2000) o mediante un trazador natural como los glóbulos de grasa láctea. (Castillo *et al.*, 2005a).

La mayoría de los estudios realizados sobre cinética de la sinéresis se han llevado a cabo mediante la medición directa o indirecta de la masa o volumen del suero del queso exudado desde el interior de los granos de la cuajada. Algunos autores determinan directamente el grado de contracción de la cuajada debido a la dificultad de esas determinaciones (Walstra y Jenness, 1984). Van Dijk (1986) y

Van Dijk y Walstra (1986) la estudian mediante el empleo de microscopía electrónica. Pero todas estas técnicas no permiten un seguimiento en línea en las propias industrias productoras. Lodaite (2002) ha empleado un sensor láser para monitorizar la contracción, que si podría aplicarse en línea a escala industrial, pero aún no constan estudios en los que se haya aplicado.

Como describen Fagan *et al.* (2007a, b y c) el control de la sinéresis es una herramienta útil, pues puede ser utilizada para la determinación del contenido de humedad final deseado, pero requiere de un control de las condiciones de coagulación y procesado. En los últimos años, se ha profundizado en el estudio de técnicas que permitan este control mediante la monitorización en línea, tanto de la coagulación como de la sinéresis, y la predicción de índices de producción como el tiempo de corte y parámetros fisicoquímicos. Las técnicas de espectroscopia infrarroja son rápidas, sensibles y no invasivas. A pesar de que no pueden ser empleadas para la monitorización en línea de la fabricación de queso, son apropiadas para el control remoto a tiempo real en las líneas de procesado, para comprobar y cuantificar la composición de proteínas, grasa y humedad (Curda y Kukackova, 2004).

Una de estas tecnologías, ya comentada anteriormente y que también se ha aplicado en la sinéresis, es la espectroscopia NIR. Esta tecnología es la más estudiada en la actualidad y la que sola (González-Martín *et al.*, 2008) o unida a una fibra óptica de reflectancia remota ha mostrado una mayor potencialidad en el control de procesos (Rodríguez Otero *et al.* 1995y 1997).

Como han descrito González-Martin *et al.* (2008), las técnicas convencionales de reflectancia requieren una compleja y extensa calibración, y además, una manipulación de la muestra de forma previa al análisis, lo que impide su utilización para el control a tiempo real en las líneas de producción. La tecnología NIR empleada por estos autores permite de forma experimental la predicción instantánea y simultánea del contenido en grasa, proteína y cloruro de

los quesos de mezcla de distintos tiempos de maduración, pero no ha sido empleada para la predicción en línea a lo largo de la elaboración.

Algunos autores han llegado a asignar el contenido de los principales constituyentes del queso (grasa, proteína y humedad) a determinadas bandas del espectro infrarrojo, cuantificando el contenido de algunos de los constituyentes a partir del área del pico correspondiente en el espectro (Chen *et al.* 1998; Mazzerrolles *et al.*, 2001). Por otro lado, Fagan *et al.* (2007c) evaluaron el potencial de la espectroscopia de infrarrojo medio (MIR) para la determinación de determinados atributos sensoriales tales como la firmeza, fragilidad, cremosidad..., obteniendo resultados prometedores.

Como se observa en la Figura 11, a partir de un espectro infrarrojo medio se pueden identificar distintos componentes a través del número de pico correspondiente a las absorciones de enlaces característicos de cada molécula y cuantificarlos calculando las áreas relacionadas. Esta metodología presenta diversas limitaciones, por lo que todavía no se ha aplicado para la determinación en línea al procesado industrial de queso.

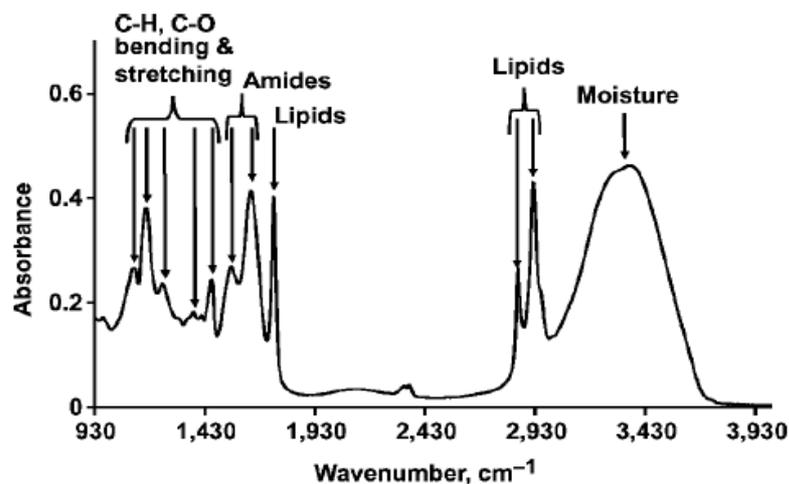


FIGURA 11. Espectro infrarrojo de queso procesado (Fagan *et al.*, 2007c).

También Guillemín *et al.* (2006) emplean un sensor en línea NIR a 700 nm para determinar la distribución del tamaño de partículas de caseína en el suero, mostrando una potencial aplicación a escala industrial.

Renault *et al.* (1997) ha empleado diferentes programas de procesamiento de imágenes por ordenador mediante diferentes soportes lógicos de un sistema avanzado (software) para monitorizar la contracción de los granos de cuajada durante la sinéresis, que han permitido hacer simulaciones 3D de la pérdida de suero durante la sinéresis a nivel experimental. Algunos de esos sistemas han sido acoplados a una cuba quesera a escala piloto, como por ejemplo el sistema aplicado por Everard *et al.*, (2007), quienes estudian la variación de color de la cuajada y el suero en cuba, relacionándola con la evolución de la sinéresis y bajo diferentes condiciones de agitación y pH. Estos autores evidencian que el sistema es únicamente eficaz sobre la superficie de la cuajada y bajo agitación suave, que supone una limitación para la monitorización de la sinéresis.

La tecnología comercialmente disponible CoAguLite™, comentada anteriormente, también se ha aplicado para la monitorización en línea de la sinéresis en la elaboración de queso. Como describen Fagan *et al.* (2007a) y Mateo *et al.* (2009a) esta técnica ofrece buenos resultados para el control en línea de la coagulación, con lo que su aplicación durante la sinéresis permitiría ofrecer al mercado una única tecnología para la monitorización en línea de los procesos con una mayor relación con el contenido en humedad del queso y el rendimiento quesero.

Los primeros resultados obtenidos tras la aplicación del sensor CoAguLite™ muestran que la aplicación de esta tecnología en la sinéresis podría generar resultados prometedores, sin embargo, tras los estudios realizados por Fagan *et al.* (2007a y b) se ha confirmado que la presencia de dos fases (suero y cuajada) tras el corte de la cuajada producen una elevada dispersión de los datos derivados del CoAguLite™ que se acentúa a lo largo de la evolución de la

sinéresis, lo que dificulta la monitorización de los cambios físicos de la cuajada a lo largo de la elaboración, y por tanto, dificulta el desarrollo de modelos de predicción de la humedad, la pérdida de grasa en suero y el rendimiento quesero (Fagan *et al.*, 2007b). Por este motivo, es preciso desarrollar otra tecnología que permita la monitorización de la sinéresis de forma repetitiva y reproducible con datos estadísticamente significativos. El desarrollo de un nuevo sensor de retro-reflexión de luz con un amplio campo de visión (LFV) “Novel Light Backscatter” permite la monitorización del proceso de coagulación y sinéresis de la cuajada, la predicción del rendimiento, la humedad y la pérdida de grasa en suero mejorando el control del proceso durante la elaboración de queso (Castillo *et al.*, 2005b; Fagan *et al.*, 2007a, b y c; Fagan *et al.*, 2008; Mateo *et al.*, 2009b).

El sensor LFV ha sido diseñado por la Universidad de Kentucky y está provisto de una sonda con un amplio campo de visión, conectada por un lado a una lámpara halógena de tungsteno y por el otro a un conector roscado para cable coaxial unido a una fibra óptica que se conecta a un espectrómetro con un rango espectral de 360-2000 nm (Figura 12). El funcionamiento y las configuraciones de este sensor han sido detalladas por Fagan *et al.* (2007a)

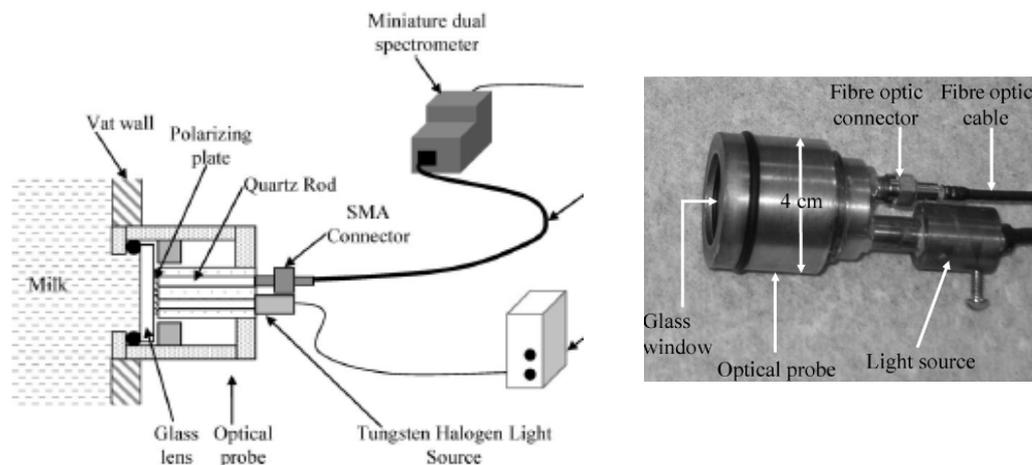


FIGURA 12. Diseño, configuración e imagen del prototipo LFV (Fagan *et al.*, 2007a; Fagan *et al.*, 2008).

Este prototipo se ha empleado para la monitorización de la sinéresis a través de parámetros relacionados con el color (coordenadas CIElab) de la cuajada y el suero. Los parámetros de color derivados de la aplicación de este sensor permitieron la predicción de índices de sinéresis (rendimiento del lactosuero, grasa en lactosuero, humedad de la cuajada, extacto seco del suero, firmeza del gel...) (Everard *et al.*, 2008).

El sensor LFV se ha empleado también en diferentes diseños experimentales en los que se ha estudiado la variación de distintos factores (diferentes niveles de proteína y grasa en la leche, niveles de firmeza del gel, intensidades de corte del gel, velocidades de agitación...) demostrando la capacidad del sensor de predecir la humedad, la pérdida de grasa en suero, y el rendimiento quesero durante la sinéresis (Fagan *et al.*, 2008; Mateo *et al.*, 2010). Sin embargo, las distintas composiciones y etapas consideradas a la hora de experimentar con el prototipo, difieren de las que normalmente se emplean en la industria quesera. En cada uno de estos estudios, la agitación es continua durante toda la sinéresis, sin tener en cuenta la contribución de etapas como el reposo, calentamiento y lavado de la cuajada, que normalmente se llevan a cabo en la elaboración del queso y que ejercen un importante impacto en las propiedades del queso y en el rendimiento final. Además, estos estudios han empleado leche en polvo reconstituida y no leche pasteurizada, por lo que los modelos de predicción desarrollados por estos autores pueden no adecuarse bien a la hora de aplicar el sensor LFV en leche fresca o pasteurizada, pues es preciso tener en cuenta las variaciones de la materia prima a la hora de implantar el sensor en la industria. Como describen Fagan *et al.* (2007a) es preciso validar el sensor a escala piloto utilizando la práctica estándar empleada por la industria para la elaboración de queso, permitiendo determinar la utilidad del sensor para su implementación en la fabricación industrial de los distintos tipos de queso.

Rovira *et al.* (2012a) aplican el sensor LFV bajo las condiciones y etapas comúnmente empleadas para la elaboración de queso fresco. Estos autores confirman que para la aplicación del sensor LFV en la coagulación y sinéresis de leche de cabra es preciso utilizar longitudes de ondas distintas a las propuestas por otros autores, en concreto seleccionan las longitudes de 990, 1000 y 1010 nm como las más apropiadas, pues muestran una mejor dispersión de los datos y unos modelos de predicción con mejores coeficientes de regresión. Estos autores confirmaron la utilidad de dicho sensor durante la elaboración de queso fresco de cabra aportando un perfil del ratio del LFV para dicha elaboración. A partir de las configuraciones descritas por estos autores, Rovira *et al.* (2012b) analizan la utilidad del LFV para la predicción del contenido de humedad, el rendimiento, la dureza, elasticidad y adhesividad del queso de Murcia al Vino. El objetivo de estos autores era desarrollar nuevos algoritmos de predicción que emplearan parámetros sencillos de determinar en la industria, y fáciles de comprender por los maestros queseros. Con este estudio se desarrollan un total de 27 modelos distintos con la definición de 11 parámetros nuevos que permiten definir el tiempo de corte, el contenido de humedad, la textura y el rendimiento en la elaboración de queso de Murcia al Vino. Además, estos autores confirman la utilidad del sensor para el control en línea de la humedad de la cuajada durante la elaboración de este tipo de queso con un error del 5%, permitiendo al maestro quesero seleccionar una humedad de la cuajada determinada, garantizando que dicha humedad será alcanzada antes de la maduración. Poder estandarizar la humedad de la cuajada de forma previa a la maduración permite corregir las variaciones de humedad entre los distintos lotes, que suponen importantes variaciones en el rendimiento quesero, un problema importante en la industria quesera cuyos profesionales intentan resolver.

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Elaboración de queso de Murcia al Vino

Para la realización de los diferentes ensayos experimentales recogidos en esta memoria de Tesis Doctoral, se emplearon muestras de cuajada de queso de Murcia al Vino procedentes de distintas queserías de la Región de Murcia, elaborado según el procedimiento establecido para esta Denominación de Origen (B.O.E. 25 de octubre de 2001). El queso de Murcia al Vino es un queso de cabra prensado de pasta lavada, semicurado, de forma cilíndrica bañado en vino tinto y con un tiempo mínimo de maduración de 45 días.

Tras la pasteurización de la leche se adiciona el cloruro cálcico y los cultivos iniciadores a la leche de cabra de forma previa a la adición del cuajo. La marca comercial y las concentraciones de dichos sustratos varían en función del fabricante del queso de Murcia al Vino, y se detallan en cada uno de los artículos científicos publicados (ver Resultados y Discusión).

En nuestras experiencias, cuando la leche alcanza una temperatura de 32-34 °C se adiciona el cuajo (el tipo de cuajo y dosis especificada, se detalla en cada uno de los artículos recogidos en esta memoria de Tesis Doctoral) a una concentración de 0,026 mg/L. Transcurridos 30-40 minutos tras la adición del cuajo al visualizar la consistencia de la cuajada se realiza el primer corte. Tras este primer corte, la cuajada se deja reposar y seguidamente se realiza un segundo corte, se desuera (15% del volumen inicial de leche), lava, agita, reposa, moldea, prensa, se sumerge en salmuera, y finalmente, se trata la corteza y se baña el

queso en vino tinto. Los tiempos, temperaturas y características de cada una de estas etapas pueden diferir entre las distintas queserías.

IV. 2. Composición fisicoquímica del queso:

IV.2.1. pH

Las determinaciones de pH en el queso se realizan mediante pH-metro (micropH 2001, Crison®, Barcelona, España) con electrodo combinado de vidrio (52-02, Crison®, Barcelona, España). Previamente el equipo se calibra con disoluciones estándar de pH 7,00 y 4,02 (Crison®, Barcelona, España) a temperatura ambiente. Las mediciones de pH se llevan a cabo sobre (5 g ± 0,1 g) de la muestra triturada y dispersa en 30 mL de agua destilada con multiagitador magnético (AGIMATIC-N, P. Selecta S.A, Barcelona, España) durante 10 minutos.

IV.2.2. Actividad de agua (a_w)

La determinación de la a_w en el queso se realiza mediante el equipo Novasina® (TH 200, Novasina AG, Lachen, Suiza). Para la calibración del aparato se emplean disoluciones salinas saturadas patrones con valores de humedad relativa conocidas (LiCl·H₂O 11%, KCH₃ 23%, MgCl₂·6H₂O 33%, Mg(NO₃)₂·6H₂O 53%, NaCl 75%, BaCl₂·2H₂O 90% y K₂CrO₇ 98%). La calibración se inicia con la disolución salina de mayor valor de humedad relativa en sentido decreciente. La determinación se realiza por duplicado.

IV.2.3. Capacidad de retención de agua

La determinación de la capacidad de retención de agua de las muestras de cuajada se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Pandey *et al.* (2000). 30 g ± 0.1 mg de cuajada se centrifugan (MEDITRONIC BL, P. Selecta

S.A, Barcelona, España) a 4500g durante 10 minutos. Se determina el volumen total de sobrenadante y se expresó siguiendo la siguiente fórmula propuesta por Pandey *et al.* (2000).

$$\text{CRA} = [(P_0 \times H_0/100) - P_E] \times [100 / (P_0 - P_E)]$$

CRA: Capacidad de retención de agua

P₀= Peso (g) inicial de la cuajada antes de la centrifugación

P_E= Peso (g) del exudado

H₀= Humedad inicial

IV.2.4. Extracto Seco

Se desecan 3g ± 0,1 g en estufa con circulación forzada (ST 6120, HERAEUS, Barcelona, España) hasta peso constante siguiendo la Norma IDF (2004). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

IV.2.5. Determinación del contenido en grasa y perfil de ácidos grasos.

El contenido de grasa total se determina utilizando un butirómetro Van-Gulik-Gerber según el método Van-Gulik descrito en la Norma ISO (2008). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

La determinación de la composición de los ácidos grasos totales se realiza de acuerdo a lo descrito por Ferrandini (2006). En primer lugar se realiza una extracción lipídica con una etapa previa de homogeneización en un equipo ultraturrax Janke & Kunkel (T25 IKA-Labortechnik, Alemania) de la muestra triturada (1,0-1,5 g ± 0,1mg) a la que se le había agregado 7 mL de H₂O destilada a 70°C. A continuación se agregan 3 mL de NH₄OH, se vuelve a homogenizar y finalmente se lava con 10 mL de etanol absoluto. La mezcla obtenida se vierte en embudo de decantación de 250 mL. Los disolventes orgánicos de la fase apolar se evaporan en rotavapor Büchi mod. 011, (Flawin, Suiza). La temperatura de evaporación se controla a través de un baño termostático Büchi mod. 461 (Flawi,

Suiza) y un equipo de refrigeración Heto mod. Comfort (Barcelona, España). Tras la extracción, la fase lipídica se pesa y congela a -18°C hasta su derivatización.

En la derivatización los ácidos grasos se hidrolizan y metilan hasta obtener los ésteres metílicos (EM) según el procedimiento descrito por Ferrandini (2006). Los EM, se dejan enfriar y se añade una disolución al 3% de H₂SO₄ en metanol anhidro, calentando a ebullición durante 5 minutos. Durante este paso se completa la esterificación favoreciéndose además la estabilización de los EM. Se suspende el calentamiento, se deja enfriar y se añade n-hexano con agitación, para favorecer la disolución de los ésteres en este solvente. Se deja enfriar el contenido y a continuación se vierte en un matraz aforado de 10 mLmezclándolo con una solución sobresaturada de NaCl hasta la separación de dos fases bien diferenciadas. La fase superior transparente contiene los EM disueltos en n-hexano.

El contenido de dicha fase se refrigera en hielo picado y se analiza mediante cromatografía de gases (GC 8000 series, Fisons Instruments Inc, Milan, Italia) con un detector de ionización de llama (FID-80). Se utiliza una columna capilar HP5 - de 30m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno con Fenil Metil Siloxano entrecruzado 5% y 0,25 µm de espesor de película- (Hewlett-Packard, Barcelona, España). La identificación de los EM se realiza mediante comparación con los tiempos de retención de los patrones de referencia: EM del ácido butírico, B2503; EM del ácido caproico C5049; EM del ácido caprílico C3375; EM del ácido cáprico C2125; EM del ácido láurico L7272; EM del ácido mirístico M3378; EM del ácido palmítico P5177; EM del ácido palmitoleico P6087; EM del ácido esteárico S 5376; EM del ácido oleico O 4754; EM del ácido linoleico L1876 y EM del ácido linolénico L2626) todos ellos suministrados por Sigma (Madrid, España).

Los ésteres se cuantifican usando el EM del ácido undecanoico (Sigma U 0250, Madrid) como estándar interno, y a partir de las rectas de calibrado de cada ácido graso. El registro cromatográfico y la integración de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante Chrom Card, software de Fisons Instruments (Milán, Italia), y la concentración de cada ácido graso se expresa en (%).

IV.2.6. Contenido de nitrógeno total y fracciones de nitrógeno soluble.

La determinación del contenido de nitrógeno total se realiza mediante el método Kjeldahl a partir de $0,5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ mg}$ de queso, según la norma IDF/RM (2008). La muestra se destila y valora en un equipo automático (M323, Büchi, Flawil, Suiza), y mediante un valorador automático (702 SM Titrino, Metrohm S.A, Herisau, Suiza), respectivamente. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

La determinación de las distintas fracciones nitrogenadas -nitrógeno soluble en agua (WSN); soluble a pH 4.4 (pH_{4.4} SN); nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (TCASN 12%); nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico al 5% (PTASN 5%) y nitrógeno soluble en etanol al 28.5% (ETSN 28.5%)- se realizaron según el procedimiento descrito por Bütikofer *et al.* 1993.

IV. 3. Análisis de la microestructura

La recogida de las muestras de cuajada y suero se realiza en botes estériles de 250 mL a tiempos preestablecidos, desde el inicio de la coagulación hasta el vaciado de la cuba, que se separándolas mediante el uso de un tamiz de acero inoxidable de 75 μm . A continuación se procede al primer fijado con disolución de glutaraldehído, formaldehído y tampón cacodilato 0,2 M y se procede al traslado de las mismas en refrigeración hasta los laboratorios de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Murcia.

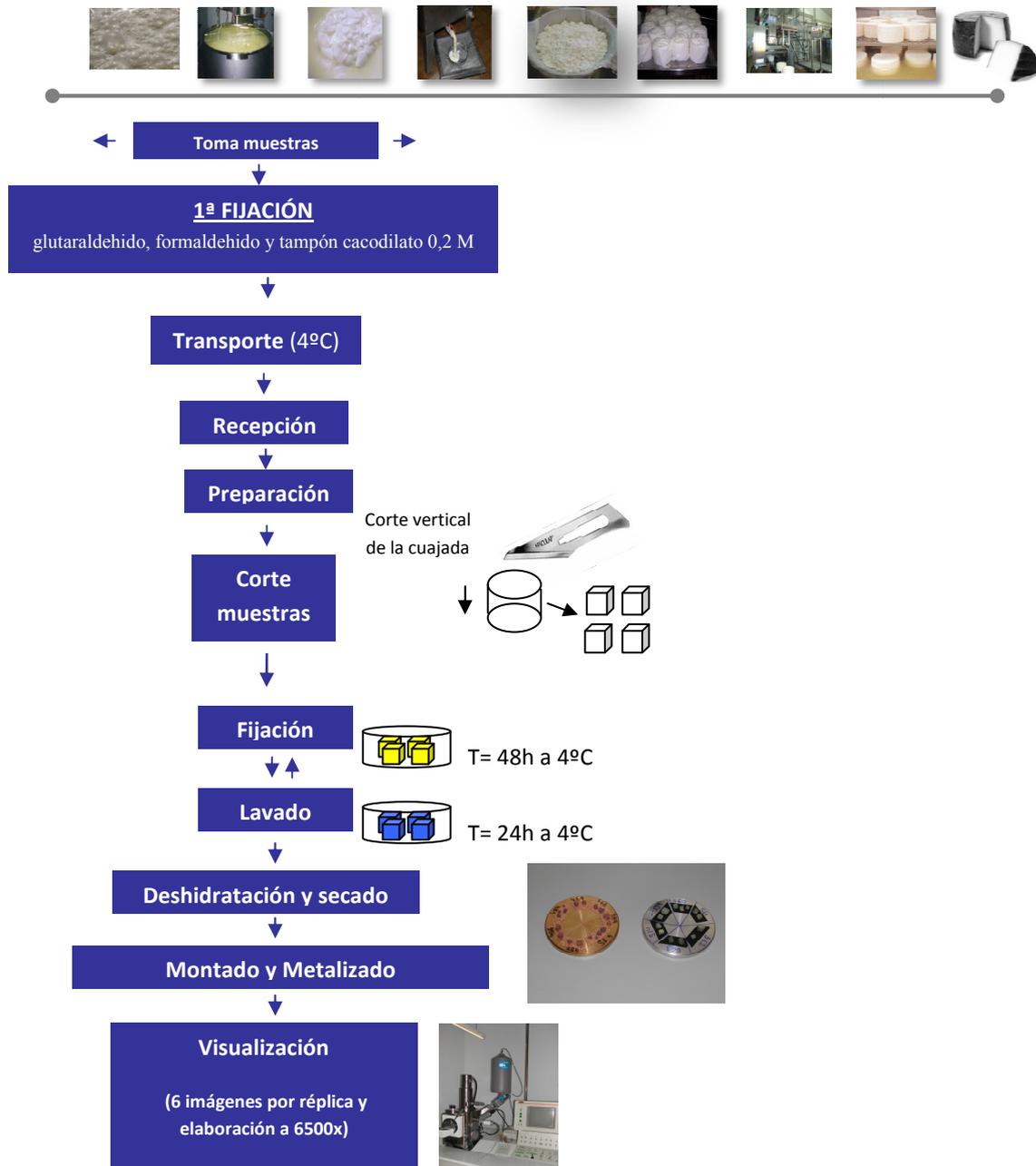


FIGURA 13. Diseño experimental para el análisis de la microestructura de la cuajada a lo largo de la elaboración del queso.

IV.3.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Para el análisis de la muestra por microscopia electrónica de barrido se empleo el método descrito por Boutrou *et al.* (2002) al que se realizaron unas modificaciones. El procedimiento seguido para el análisis de la microestructura de la cuajada se recoge en la Figura 13.

Las muestras de cuajada se cortan en cubos de 2 a 6 mm, 4 cubos para cada uno de los dos tiempos seleccionados por día de elaboración, y se fijan mediante una disolución de glutaraldehído, formaldehído y tampón cacodilato 0,2 M como describe la técnica de MacDowell y Triumph (1976) durante 24 horas a 4°C. Posteriormente las muestras se lavan con tampón cacodilato 0,2 M y sacarosa durante 24h a 4°C, con el fin de garantizar que no haya restos de la disolución fijadora en la muestra, hecho que puede aportar conductividad a la muestra impidiendo su posterior visualización. A continuación se fijan en tetraóxido de osmio al 1 por ciento y se lavan según el proceso antes descrito.

Una segunda etapa del procesado de las muestras corresponde a la deshidratación con acetona al 30%, 50%, 70%, 90%, 100% durante 40 minutos respectivamente. Posteriormente, se procede al secado de punto crítico con acetona 100% y CO₂ líquido (CPD-020, Balzers Union, Balzers, Liechstenstein).

Las muestras se soportan con un adhesivo doble capa de carbono y se recubren con oro mediante con el metalizador 200A, Biorad, Polaron Division, Watford, Reino Unido. Por último se observan al Microscopio Electrónico de Barrido (Jeol T-300, Sollentuna, Suecia). Para cada cubo de muestra procesada se capturaron 6 imágenes a 6500 aumentos (Figura 13) y una resolución de 1024x786 para su posterior análisis. La Figura 14 muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas mediante el tratamiento descrito en la Figura 13.

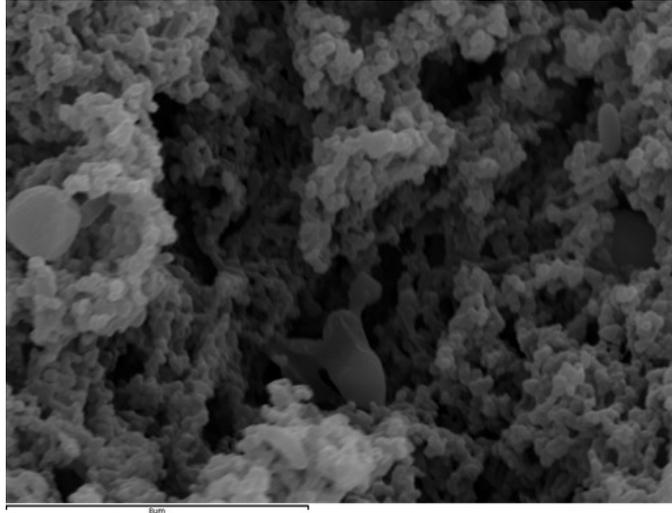


FIGURA 14. Imagen obtenida mediante SEM a 6500 aumentos.

IV.3.2. Análisis de Imagen

A partir de las imágenes capturadas por microscopía electrónica se analiza, en primer lugar, la porosidad definida como el porcentaje del área total libre determinada en la conformación estructural de la muestra (Impoco *et al.*, 2007). En la bibliografía se han descrito diferentes parámetros relacionados con el poro, unidad estructural correspondiente a la cavidad libre entre varias uniones proteicas (Buffa *et al.*, 2001); de esta unidad se definen tres variables: el número de poros observados para superficie considerada de la muestra, el área de cada uno de los poros y su perímetro. El último parámetro cuantificado corresponde al grosor de la hebra definido como el vector de la distancia lado a lado de la misma, siempre perpendicular al vector de dirección de la unión. Todos estos valores son estudiados mediante un programa de análisis de imagen (Mip.4.5 Consulting Image Digital, Barcelona, España).

Para la cuantificación de la porosidad es necesario realizar como etapa previa un proceso de normalización (Figura 15a) de todas las imágenes -para garantizar un buen contraste-y la calibración según la barra de calibrado en función de los aumentos de la imagen. Este proceso de calibración es importante

pues permite establecer la equivalencia entre píxeles cuantificados y su magnitud en micras.

A continuación se procede a una segmentación de los niveles de gris (Figura 15b) para seleccionar el área correspondiente a los poros de la muestra. El resultado de esta segmentación de los niveles de gris es una imagen en blanco y negro (Figura 15c) que el software cuantifica como un área en micras relativa a la ocupación total de los poros señalados, que permite a su vez relacionarlo con el campo de interés: el cálculo del porcentaje de porosidad para esa imagen (Figura 15).

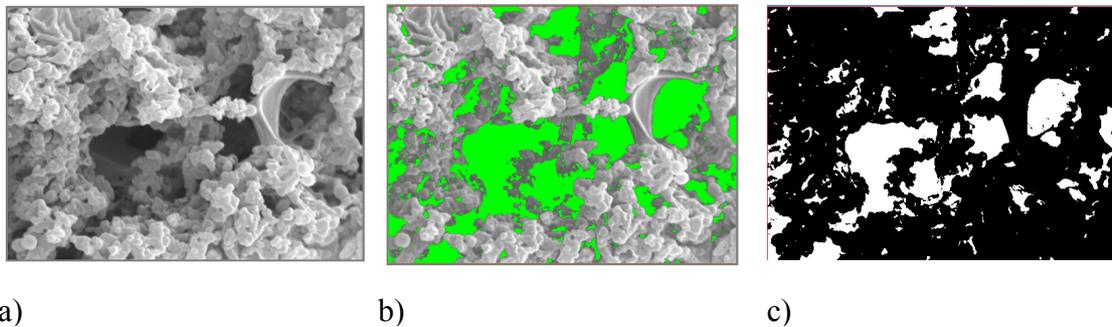


FIGURA 15. Procedimiento para la determinación de la porosidad a partir de la imagen SEM.

Para estimar el número, área y perímetro de los poros se lleva a cabo un proceso similar al anterior. En primer lugar, se procede a la normalización de la imagen, posteriormente se segmentan los niveles de gris pero se realiza una identificación topológica de las unidades de interés según sus coordenadas (Figura 16). Es así como se logra la cuantificación de cada uno de los poros presentes en la estructura tridimensional.

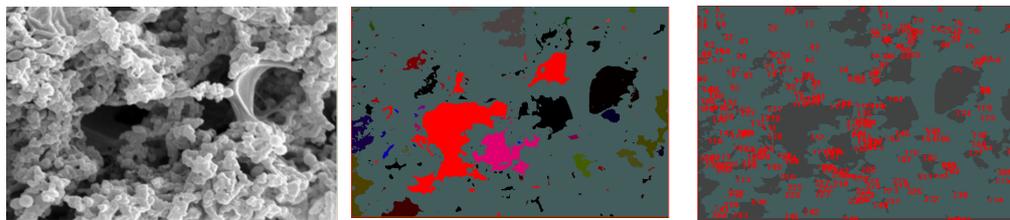


FIGURA 16. Identificación topológica y cuantificación del número de poros de la imagen SEM.

Además de identificar el número de poros presentes, se determina el área y perímetro de cada uno, teniendo en cuenta todas las irregularidades de su estructura, y no por semejanza a figuras geométricas, ni considerando un factor de forma. El área y el perímetro del poro se calculan estableciendo la equivalencia del total de píxeles de la cavidad libre y el contorno en micras, teniendo en cuenta todas las irregularidades de la forma. La unión de los píxeles entre sí permite la conformación de la línea que define el perímetro irregular del poro.

Para la medida del grosor de la hebra se procede a la utilización de medidas interactivas. De esa forma, trazando líneas de forma perpendicular al vector de dirección de la unión y en función de los criterios preseleccionados, se diseña de forma interactiva, a mano alzada, el vector de la distancia de los dos lados de la hebra (Figura 17).

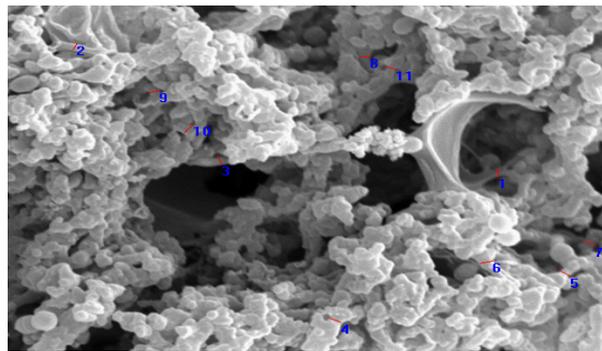


FIGURA 17. Identificación y medición del grosor de la hebra

IV.4. Instrumentación para la monitorización en línea de los procesos de coagulación y sinéresis.

Se acoplaron dos sensores a una cuba experimental doble cero de 12L de acero inoxidable (15 cm x 13.3 cm x 15 cm) con sistema de corte/agitación automática (Perinox S.A, Burgos, España). A esta cuba se le adaptan dos sensores ópticos. El primer sensor, CoAguLite™ (Reflectronics, Inc., Lexington, Kentucky, Estados Unidos de América) determina la reflectancia difusa a una longitud de onda de 880 nm y el segundo sensor corresponde a un prototipo de

sensor de retro-reflexión de luz con un amplio campo de visión (LFV) desarrollado por Fagan *et al.* (2007a), que cuantifica la dispersión de la reflectancia difusa en un rango de longitud de onda de 200-1100 nm (Figura 18).



FIGURA 18. Instrumentación para la monitorización en línea (a: sensor CoAguLite™; b: sensor LFV; c: cuba experimental).

La respuesta de la retrodispersión de la luz emitida por los dos sensores acoplados se monitoriza de forma continua desde el momento de la adición de cuajo (t_{c0}) hasta el final de la sinéresis ($t_{vat\ emptying}$).

Los datos de respuesta del Coagulite™ se registran cada 10 s. El voltaje inicial (V_0) se calcula como la media de cuatro medidas previas a la adición del cuajo. La relación de la retrodispersión de la luz (Ratio) y el tiempo máximo de la primera derivada (t_{max}) se calcula según el procedimiento descrito por Fagan *et al.* (2007a). El tiempo de corte (t_{cut}) se determina utilizando la siguiente ecuación (Payne *et al.*, 1993):

$$t_{cut} = \beta \cdot t_{max}$$

β : Constante determinada por el maestro quesero en base al tipo de leche y elaboración. En este estudio BETA = 3. (Ver apartado III.2).

En este estudio se utilizan todas las señales emitidas por el sensor LFV en el rango de 300-1100. El sensor proporciona mediciones cada 100 milisegundos y cada espectro se deriva de 100 mediciones del sensor. El espectro se procesa automáticamente cada 10 segundos después de restarle la señal correspondiente al espectro negro, y el espectro resultante se reduce a 20 promedios divididos en bandas de 40 nm realizando la media de la respuesta óptica para las longitudes de onda que constituyen cada banda. Para calcular el valor $V_0(w)$ se realiza una media de los valores de voltaje para los primeros catorce segundos. La relación de retrodispersión de la luz del sensor LFV (R) y el t_{max} se determina según el procedimiento descrito por Fagan *et al.* (2008). El porcentaje de incremento del ratio en la coagulación se determina a partir de la diferencia porcentual entre el ratio al inicio de la coagulación y el ratio correspondiente al punto de inflexión de la primera derivada (ratio en t_{max}). El porcentaje de disminución del ratio durante la sinéresis se determina como la diferencia porcentual entre el ratio desde el punto de inflexión de la primera derivada y el ratio correspondiente al vaciado de la cuba.

IV.5 Análisis estadístico.

El programa estadístico empleado ha sido el SPSS v15.0 (2006, SPSS Ibérica S.L.U. Madrid, España). Se han realizado diferentes análisis descriptivos, tanto intragrupal como intergrupales, test de Shapiro-Wilks para determinar la distribución normal de los datos, ANOVA para el análisis de variaciones significativas entre muestras y estudios, correlaciones de Pearson para estudiar la existencia o no de interacción entre las variables estudiadas, análisis de contrastes post-hoc test de Tukey y análisis de regresión lineal multivariante para el desarrollo de los algoritmos de predicción.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Physicochemical study of Murcia al Vino cheese

M.B. López, E. Ferrandini, M. Rodriguez, J.D. Roca, E. Haba, A. Luna, S. Rovira

Small Ruminant Research 106: 154– 159 (2012)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.008>

ABSTRACT: This study provides information on the physicochemical properties of “Murcia al Vino” cheese, and the extent to which they are affected by different manufacturers and seasons. All the physicochemical parameters showed significant differences between cheeses. It was observed that the season affects cheese composition, including the total fatty acid profile, particularly in the summer months, although no significant differences were found for any of the proteolysis parameters. The results of this study showed that cheeses made in spring have the best physicochemical composition with lower NaCl content, better fatty acid profile and the same degree of proteolysis. The amount of polyunsaturated fatty acids (5.16%) found was higher than that mentioned by other authors for this type of cheese. The polyunsaturated fatty acid profile may be considered an added value in Murcia al Vino cheeses.

En el presente artículo he sido responsable del tratamiento de datos mediante análisis estadístico de los resultados, así como su interpretación. Además desarrollé el artículo en su conjunto, tanto el manuscrito como la exposición de los datos recogidos en la publicación, bajo la supervisión de la Dra. M^a Belén López Morales, y realicé las modificaciones que los revisores estimaron oportunas para la publicación del mismo en la revista **Small Ruminant Research**.

Coautores:

Dra. M^a Belén López

- Profesora Titular de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* mbelen@um.es

Dr. Eduardo Ferrandini

- Profesor contratado doctor de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* eferrand@um.es

Dña. Marta Rodríguez

- Becaria FPI del Instituto IMIDA
- *Dirección:* Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), Calle Mayor, s/n, E-30150, La Alberca, Murcia, España
- *e-mail:* lamartica@hotmail.com

D. José David Roca

- Responsable de calidad de Murgaca S.A.
- *Dirección:* MURGACA S.A, Calle Berlín nº 43, 30353 Cartagena, España.
- *e-mail:* cartagena@murgaca.com

D. Eduardo Haba y D. Antonio Luna

- Técnico responsable y director, respectivamente, del Consejo Regulador de la Denominación de Origen de “Queso de Murcia” y “Queso de Murcia al Vino”.
- *Dirección:* Consejo Regulador de la Denominación de Origen de Queso de Murcia y Queso de Murcia al Vino, Avda. de Levante, 53, Entresuelo 9, E-30520 Jumilla, Murcia, España.
- *e-mail:* quesosdemurcia@gmail.com

Hot topic: Microstructure quantification by scanning electron microscopy and image analysis of goat cheese curd

S. Rovira, M. B. López, E. Ferrandini, J. Laencina
Journal Dairy Science 94:1091–1097 (2011)
doi: 10.3168/jds.2010-3996

ABSTRACT: Five microstructural parameters of goat cheese curd (number of pores, their area and perimeter, strand thickness, and porosity) were studied by scanning electron microscopy and image analysis. Image analysis was used to characterize and quantify differences in all parameters and to provide a procedure for the measurement of strand thickness. The micrographs provided visual evidence of differences in the protein matrix and were quantified by image analysis at 3 production times: 34 ± 1 min (cutting), 154 ± 6 min (before molding), and 293 ± 35 min (after pressing). The data showed that this procedure is an adequate tool for quantifying differences in the parameters analyzed in industrial samples despite their natural heterogeneity. The procedure was reproducible and repetitive for the first 2 production times because no significant intragroup differences were observed. Significant differences were found when comparing the values of the microstructure parameters analyzed at 34 ± 1 min and those corresponding to 154 ± 6 min and 293 ± 35 min, but no significant differences between samples analyzed at 154 ± 6 min and 293 ± 35 min were found. All microstructure parameters analyzed were related at a significance level of at least 95%. This procedure enables the characterization of the microstructure of industrial goat cheese curd.

Coautores:

Dr. José Laencina

- Profesora Catedrático de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* laencina@um.es

Dra. M^a Belén López

- Profesora Titular de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* mbelen@um.es

Dr. Eduardo Ferrandini

- Profesor contratado doctor de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* eferrand@um.es

Application of a Large Field-of-View sensor during coagulation and syneresis in fresh goat cheese manufacture

Rovira, S., V. Garcia, M.B. López.

International Journal of Dairy Technology 64:1-6 (2012)

doi: 10.1111/j.1471-0307.2011.00747.x

ABSTRACT: A light backscatter sensor with a Large Field of View (LFV) was used for the online monitoring of fresh Goat cheese during coagulation and syneresis. A CoAguLite™ sensor was used as a reference at 880 nm. To select the appropriate wavelength and configuration details for the LFV sensor for this type of cheese and manufacturing design, which was found to be 990, 1000 and 1010 nm. The light backscatter ratio followed a sigmoid increase during coagulation, which was lower than that observed during cow milk coagulation, and decreased asymptotically after cutting at the same rate as previously found for cow-milk curd. The fat losses and curd moisture could be predicted (R^2 : 0.71, SEP: 0.04 and R^2 : 0.98, SEP: 0.05, respectively) from the time taken to reach the maximum of the slope of the light backscatter ratio during coagulation (t_{max}) and from the LFV backscatter ratio. The reflectance ratio was strongly influenced by the fat losses and t_{max} , which explained variations in the moisture content.

En el presente artículo realicé el conjunto del análisis experimental con la colaboración del doctorando Víctor García, el análisis estadístico y su interpretación, y finalmente, elaboré la totalidad del manuscrito bajo la supervisión de la Dra Dña. M^a Belén López Morales. Además realice todas las modificaciones que los revisores estimaron oportunas para la publicación del mismo en las revista **International Journal of Dairy Technology** figurando como primer autor.

Coautores:

Dra. M^a Belén López

- Profesora Titular de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* mbelen@um.es

D. Victor García

- Doctorando de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* victor.garcia1@um.es

Usefulness of a large field of view sensor for physicochemical, textural, and yield predictions under industrial goat cheese (Murcia al Vino) manufacturing conditions.

Rovira S., García V., Ferrandini E., Carrión, J., Castillo M., López M. B
Journal Dairy Science 95, 6320-6331 (2012).
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5561>

ABSTRACT: The applicability of a light backscatter sensor with a large field of view was tested for on-line monitoring of coagulation and syneresis in a goat cheese (Murcia al Vino) manufactured under industrial conditions. Cheesemaking was carried out concurrently in a 12-L pilot vat and a 10,000-L industrial vat following the normal cheesemaking protocol. Cheese moisture, whey fat content, hardness, springiness, and adhesiveness were measured during syneresis. The results obtained show that cutting time is best predicted by considering the coagulation ratio at the inflection point and the percentage increase in the ratio during coagulation, with no need for the first derivative. The large field of view reflectance ratio provided good results for the prediction of moisture content, yield, hardness, springiness, and adhesiveness of the final cheese.

En el presente artículo realicé el conjunto del análisis experimental con la colaboración del doctorando Víctor García, el análisis estadístico y su interpretación. Elaboré la totalidad del manuscrito bajo la supervisión de la Dra M^a Belén López Morales y realicé todas las modificaciones que los revisores estimaron oportunas para la publicación del mismo en la revista **Journal Dairy Science** figurando como primer autor.

Coautores:

Dra. M^a Belén López

- Profesora Titular de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* mbelen@um.es

D. Víctor García

- Doctorando de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* victor.garcial@um.es

Dr. Eduardo Ferrandini

- Profesor contratado doctor de la Universidad de Murcia
- *Dirección:* Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo E-30071, Murcia, España
- *e-mail:* eferrand@um.es

Dr. José Carrión

- Director Técnico de la Central Quesera Montesinos S.L.
- *Dirección:* Central Quesera Montesinos S.L., Calle Vereda Real s/n, 30520 Jumilla, Murcia, España; *e-mail:* j.carrion@montesinos.es

Dr. Manuel Castillo Zambudio

- Profesor Asociado de la "Universitat Autònoma de Barcelona"
- *Dirección:* Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Valles); *e-mail:* manuel.castillo@uab.es

VI. RESUMEN GLOBAL

Hasta el día de hoy, se han desarrollado numerosos estudios científicos, con el objetivo de conocer en profundidad no sólo la elaboración de quesos de cabra y todos los procesos que tienen lugar durante la misma, sino también, su composición química, microbiológica, las características estructurales y sensoriales del producto.

El primer objetivo de esta memoria de Tesis Doctoral es la evaluación de la composición fisicoquímica del Queso de Murcia al Vino acogido a la Denominación de Origen y estudiar la influencia de la estacionalidad y el lugar de producción, tal y como ha sido descrito para otras variedades de queso como el queso Babia-Laciana (Argumosa *et al.*, 1992) y Majorero (Martín-Hernández *et al.*, 1992).

A través del primer estudio de esta memoria de Tesis Doctoral (López *et al.*, 2012), se caracteriza la composición fisicoquímica -pH, extracto seco, proteína, grasa, actividad de agua y NaCl-, el perfil de ácidos grasos totales, y las fracciones nitrogenadas del queso de Murcia al Vino, comparando además los perfiles y la composición en distintas estaciones del año y de distintas factorías. No se aprecian diferencias significativas en la composición fisicoquímica de los quesos de los diferentes fabricantes seleccionados, aunque si se observan diferencias en los quesos en función de distintas estaciones del año. En concreto, el pH, el contenido en grasa, NaCl y la actividad de agua se modifican en función a la estacionalidad. En relación a las fracciones nitrogenadas se observan leves diferencias en WSN, ETSN, TCASN y PTASN entre los fabricantes, pero no se aprecian diferencias significativas según la estacionalidad. En el perfil de ácidos grasos totales, se determinan diferencias en función de los fabricantes -aunque no para todos los ácidos grasos- y a la estación del año, aunque la estacionalidad influye únicamente en el contenido contenido de C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}, principalmente entre invierno y verano. Algunos autores han relacionado estas variaciones en la composición del queso con cambios en la composición del pienso entre invierno y verano (Lucas *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos para la caracterización de este tipo de queso son similares a los publicados por Tejada

et al. (2008), aunque estos autores no estudian la influencia de los dos factores considerados en este trabajo.

Encontrar diferencias en el perfil de ácidos grasos totales del queso en función de la estacionalidad y el fabricante es de especial importancia pues, como fue descrito por Poveda *et al.* (2006), la composición en ácidos grasos tiene relación con las características sensoriales de los quesos, sobretodo en la percepción de la acidez y los aromas del queso.

Como se concluye en el trabajo mencionado anteriormente (López *et al.*, 2012), la estacionalidad condiciona la composición fisicoquímica, pero no la proteólisis, que es un parámetro importante tanto para la calidad como para la rentabilidad quesera. El invierno es la estación del año más favorable para la elaboración de este tipo de queso al reunir un perfil graso más apropiado.

Para garantizar la calidad de un queso es necesario que éste cumpla una serie de requisitos tecnológicos y de seguridad alimentaria, en el que la organización estructural es un factor determinante. El estudio y caracterización de la microestructura de la cuajada, base de la elaboración del queso, es una herramienta útil para relacionar dicha estructura con la percepción final del consumidor, y predecir por tanto su aceptación. Más aún, si la microestructura viene determinada no sólo por las características naturales del producto sino también por su procesado, el control de la microestructura en cada una de las etapas que conforman el proceso de elaboración del queso se ha de considerar una herramienta útil para las propiedades sensoriales y de textura deseadas.

El segundo objetivo de esta memoria de Tesis Doctoral (Rovira *et al.*, 2011) plantea el desarrollo de un método que permita la visualización y el análisis cuantitativo de la evolución de la matriz proteica durante la elaboración de queso de cabra, aplicado a quesos de la misma Denominación de Origen considerada en el primer objetivo de esta memoria de Tesis Doctoral.

Para la consecución de dicho objetivo se desarrolla un procedimiento para la obtención de imágenes por SEM y su posterior tratamiento con el fin de poder

cuantificar los parámetros microestructurales definidos después de un análisis de las imágenes obtenidas.

Mediante el método de microscopía electrónica de barrido y el análisis de imagen aplicado, se cuantifica de forma repetitiva y reproducible, parámetros tan concretos como la porosidad, número, área y perímetro de los poros (teniendo en cuenta su irregularidad) y el grosor de la hebra de unión. Este método permite analizar la red tridimensional de la cuajada desde el inicio de la formación del gel hasta la maduración del queso, a diferentes intervalos de tiempo durante la coagulación y sinéresis, a pesar de que la consistencia débil de la matriz, y su contenido en suero, hace dificultosa la aplicación de esta técnica.

En efecto, la consistencia en cada una de estas etapas es muy diferente. Por ello ha resultado interesante la aplicación conjunta del método tanto de microscopía como de análisis de imagen, en los tiempos de elaboración correspondientes a las distintas fases del procesado (corte, reposo, agitación, lavado, calentamiento, moldeado y prensado), porque así se confirma la adecuación del método en muestras de muy baja consistencia como es el caso de la primera fase, y geles de una mayor consistencia que corresponden al último proceso previo al moldeado y prensado del queso.

Son muchos los factores que afectan al grado y extensión de la sinéresis como la composición inicial de la leche, los tratamientos tecnológicos previos, la coagulación, las propiedades reológicas del gel al corte, los tratamientos mecánicos de la cuajada, etc. Aún así, en el artículo V.2, se ha relacionado la formación tridimensional con la humedad; de forma más concreta, se ha confirmado una relación estadísticamente significativa entre una microestructura más compacta y un menor contenido en humedad, entre el tiempo de coagulación y la porosidad de la cuajada y entre la porosidad y el porcentaje de humedad. También se establece una relación estadísticamente significativa entre el grosor de las hebras de unión micelar, durante la formación de la cuajada y la porosidad. Además, se ha observado que la reducción de la firmeza y la agregación en la

sinéresis están influenciadas por la contracción de la cuajada -que se determina por el grosor de la hebra-, la composición de la grasa del suero y la porosidad.

El estudio en profundidad de la microestructura del queso a lo largo del procesado ha aportado datos cuantitativos de la microestructura durante la elaboración y evolución de la cuajada, relacionándolo, a su vez la microestructura con parámetros químicos asociados a la textura, como la capacidad de retención de agua de la matriz proteica y la humedad.

A través del artículo V.2 y V.2.1 derivados de esta Tesis Doctoral, no sólo se ha logrado desarrollar y aplicar un procedimiento de análisis de imágenes tridimensionales obtenidas por SEM sino que se han determinado diferencias cuantitativas en la microestructura (número de poros, área, perímetro, grosor de la hebra y porosidad). Todos estos se determinan en diferentes momentos de la elaboración industrial de queso de cabra describiendo la influencia de las distintas etapas del procesado en la microestructura de la cuajada. Tras los resultados obtenidos en ambos estudios se concluye que el procedimiento desarrollado es apropiado para la cuantificación del número área y perímetro de los poros, el grosor de la hebra y la porosidad, que posibilita la caracterización de la microestructura del queso de cabra. Este procedimiento también permite la detección y cuantificación de cualquier cambio estructural acaecido entre las distintas etapas de elaboración.

Con el primer estudio de microestructura se constata que los procesos mecánicos y térmicos que constituyen las operaciones de trabajo en cuba de la cuajada (corte, lavado, agitado y reposo) ejercen alteraciones en la microestructura, pero que es preciso identificar de forma concreta que impacto ejercen cada uno de estos procesos unitarios por separado. Este primer estudio en el que se analiza la reproducibilidad del método de cuantificación desarrollado, estudia muestras en tres momentos de la fabricación del queso que difieren notablemente entre sí, y entre los que hay numerosas etapas intermedias, por lo que no se concreta durante que etapas se produce la mayor diferenciación de la microestructura. Para poder aportar información relevante era preciso analizar

muestras en cada una de las etapas por separado, logrando así relacionar los cambios producidos en dichas etapas con parámetros fisicoquímicos de especial importancia en el queso.

Esta identificación se ha realizado en el segundo estudio (Rovira *et al.*, 2013). Tras la aplicación del procedimiento descrito pero a intervalos de tiempo más cortos, y realizando distintos análisis de contraste, se establece que el agitado y reposo de la cuajada del queso son las etapas que infieren las características más diferenciadas con una mayor influencia en la evolución de la matriz proteica.

También se constata que durante la sinéresis se produce una disminución constante de la porosidad mientras que el número, área y perímetro de los poros disminuye de forma irregular. Esto indica que no hay una misma evolución de los distintos parámetros microestructurales durante la elaboración del queso. Algunos autores han discutido que la microestructura y los parámetros que la definen evolucionaban de la misma forma durante la coagulación y la sinéresis de la cuajada (Dejmek y Walstra, 2004).

Este hecho resalta la importancia de la aplicación de un análisis cuantitativo para describir la evolución de un proceso, ya que la sola visualización de las imágenes no aporta una información detallada de lo que sucede realmente en la matriz.

Mediante el análisis cuantitativo se observa que el porcentaje de disminución de la porosidad es muy similar al porcentaje de disminución de la humedad y la pérdida de grasa en suero, lo que indica una relación entre dichos parámetros. Otro aspecto importante es que, aún observándose una correlación entre la porosidad y los demás parámetros microestructurales, las etapas de procesado que más afectan a la porosidad no influyen en el resto de parámetros microestructurales. No se determina una relación entre el grosor de la hebra (contracción de la cuajada) con el área y perímetro de los poros, pero sí con el número de poros y la porosidad. El grado de contracción de la cuajada es inversamente proporcional a la porosidad, el número de poros, la humedad, la capacidad de retención de agua y la pérdida de grasa con el suero.

La elevada correlación entre los parámetros estudiados, especialmente la relación de la porosidad, área y perímetro del poro con la humedad, capacidad de retención de agua y la pérdida de grasa en suero, confirman la enorme potencialidad del empleo de SEM unida al análisis de imagen para la predicción de características finales en el queso de cabra.

Además, los datos derivados de estas publicaciones han aportado conocimientos necesarios para relacionar las características microestructurales con las respuestas obtenidas a partir de la aplicación de sensores ópticos en línea al proceso de fabricación de la misma variedad de queso.

Una vez conocida la evolución de la microestructura durante la elaboración del queso, se plantea estudiar la utilidad de la aplicación de un sensor con un campo de visión amplio (prototipo “LFV sensor”) durante la coagulación y sinéresis en la producción de quesos de cabra, como sistema en línea de control del proceso. Para desarrollar este tercer objetivo era preciso evaluar, en primer lugar, la aplicación de dicho prototipo en leche de cabra para definir los detalles de configuración y funcionamiento del sensor en la elaboración de queso fresco, con el fin de posteriormente aplicar el sensor para la elaboración de Queso de Murcia al Vino bajo las mismas condiciones de fabricación y protocolos que se llevan a cabo en las queserías. Con todo ello, el objetivo es controlar la humedad del producto final, así como predecir otras características importantes relacionadas con la calidad y seguridad alimentaria, como por ejemplo, la pérdida de grasa en suero, textura del queso, rendimiento quesero, etc.

Durante la evaluación de la aplicación del prototipo LFV en leche de cabra, se observa como la respuesta del sensor durante la coagulación era similar a la del sensor CoAguLite™ de referencia, pero las longitudes de onda que ofrecían una mejor visualización y análisis de la respuesta eran distintas tanto al sensor de referencia como a las observadas para leche de vaca (Fagan *et al.*, 2008). Se seleccionaron aquellas longitudes de onda (990-1000-1010 nm) que ofrecían un mayor incremento en porcentaje de la señal durante la coagulación y un mayor descenso de la señal durante la sinéresis (Rovira *et al.*, 2012a).

Este prototipo de sensor había sido únicamente aplicado a leche de vaca y a nivel experimental (Fagan *et al.*, 2008). Las diferencias entre el perfil de la señal del LFV en leche de cabra (Rovira *et al.*, 2012a) y leche de vaca evidencian la influencia de la diferencia del contenido en grasa y el tamaño del glóbulo graso y caseína de ambas leches. De ahí la importancia de considerar esta etapa preliminar para la determinación de los detalles de configuración del sensor en su aplicación en leche de cabra.

Una vez determinada la configuración final del sensor, se plantea concretar aquellos parámetros considerados de especial relevancia en la fabricación de queso. La predicción del tiempo de corte, la humedad, y el rendimiento quesero es útil para ajustar los procedimientos tecnológicos durante la fabricación del queso y se considera por lo tanto, una herramienta adecuada para garantizar la calidad y rendimiento. Formaggioni *et al.* (2008) y Emmons *et al.* (1990) revisaron las diferentes fórmulas de predicción desarrolladas en la literatura para calcular el rendimiento quesero y la humedad, utilizando diferentes consideraciones teóricas relativas a la distribución de los sólidos y de la humedad durante la coagulación y sinéresis de la cuajada.

El sensor CoAguLite™ utilizado como referencia en este estudio, ha sido aplicado por otros autores para la predicción del tiempo de corte, la humedad, la pérdida de grasa en suero y el rendimiento quesero, con resultados prometedores en su aplicación durante la coagulación (Castillo *et al.*, 2000, Castillo *et al.*, 2002, Castillo *et al.*, 2003; Fagan *et al.*, 2007d). Los algoritmos desarrollados por Fagan *et al.* (2008) y por Mateo *et al.* (2010), con el prototipo LFV para la predicción de dichos parámetros, se han desarrollado bajo condiciones experimentales, sin tener en cuenta el conjunto de etapas que tienen lugar en la fabricación del queso y que son de especial relevancia para la humedad, la pérdida de grasa en suero y el rendimiento quesero. Por este motivo es necesario desarrollar un estudio que evalúe la idoneidad del sensor, no sólo para la predicción de dichos parámetros sino también para el control en línea del proceso.

La primera parte del estudio del artículo V.4 se centra en seleccionar y definir los parámetros a incluir en los algoritmos de predicción, que puedan ser utilizados con facilidad por los maestros queseros. Se definen un total de 21 parámetros de los cuales 13 son definidos por primera vez en este estudio. Finalmente, a partir de los datos obtenidos en trece elaboraciones de queso de Murcia al Vino, se desarrollan un total de siete ecuaciones para la predicción del tiempo de corte de la cuajada, nueve para la predicción de la humedad del queso, dos para la predicción del rendimiento quesero y tres para la predicción de la dureza, elasticidad y adhesividad del queso con unos errores estándar de predicción bajos, y en algunos casos mejores que los obtenidos por otros autores.

Para poder determinar si las ecuaciones de predicción pueden extrapolarse a la industria, se determinan los valores de tiempo de corte, textura, humedad y rendimiento de los quesos obtenidos mediante el mismo procedimiento en cada una de las cubas, la experimental y la industrial. Tras realizar un análisis de varianza, se observa que no hay diferencias significativas entre los quesos obtenidos de ambas cubas por lo que en un principio los algoritmos podrían extrapolarse (*scale up*) a la cuba industrial.

Una vez desarrollados los algoritmos de predicción se selecciona aquel que presenta el mejor coeficiente de variación y error estándar de predicción para el control en línea de la humedad.

Para determinar si la ecuación seleccionada es apropiada para el control en línea de la humedad, se realizan otras 10 elaboraciones de queso de Murcia al Vino, y se logra predecir la humedad con un error estándar de predicción de mínimo 0,75 % y máximo 9,76 %.

De estos resultados, se concluye que las oscilaciones de humedad observadas eran inferiores a aquellas estimadas de forma habitual por los maestros queseros, lo que indica que el sensor es útil para minimizar variaciones grandes de humedad en el producto final. Por último, se evalúa si el sensor es adecuado para controlar la humedad determinada en el producto en el momento de vaciado de la cuba.

Para ello, se seleccionan dos humedades 54 y 57%, y se determina, despejando el ratio del algoritmo de humedad seleccionado con anterioridad, el momento propicio para vaciar la cuba con el fin de obtener la humedad deseada. Tras cuatro elaboraciones para cada una de las humedades establecidas, se demuestra que el sensor determina resultados prometedores para el control en línea de la humedad, y se confirma la idoneidad de la ecuación de predicción de la humedad desarrollada y seleccionada.

La aplicación del prototipo LFV en la industria permite completar la automatización de la producción de queso, pues es un método de medida en línea efectivo para la predicción del tiempo de corte, la humedad y la textura mejorando el rendimiento quesero, incrementando la calidad y garantizando una mayor homogeneidad del producto.

Con ambos estudios se ha logrado ajustar la configuración del prototipo de LFV y garantizar su adecuado funcionamiento a la hora de aplicar el sensor en la industria. Se ha confirmado que este sensor es una herramienta útil para lograr una estandarización del producto antes de la maduración para así minimizar las variaciones de humedad que se producen entre los distintos lotes obtenidos en cada producción que supone una gran preocupación para las queserías ya que redundaría en variaciones en el rendimiento quesero y la calidad final del producto.

VII. CONCLUSIONES

PRIMERA: El estudio de la composición fisicoquímica del Queso de Murcia al Vino, ha permitido caracterizar esta Denominación de Origen, aportando además información de la influencia de la estacionalidad y el fabricante en el contenido de NaCl, fracciones nitrogenadas, humedad y ácidos grasos. No hay diferencias significativas en la composición fisicoquímica de los quesos de los diferentes fabricantes seleccionados, aunque si se observan diferencias en los quesos producidos en distintas estaciones del año.

SEGUNDA: La estacionalidad influye en la composición fisicoquímica del queso de Murcia al Vino pero no en la proteólisis. Tras los resultados obtenidos se puede constatar que el invierno es la estación del año más favorable para la elaboración de este tipo de queso al reunir un perfil graso más apropiado.

TERCERA: El desarrollo y aplicación de un método de microscopía electrónica de barrido y análisis de imagen de la cuajada permite describir la microestructura y la agregación durante la formación del gel y la sinéresis. Mediante la aplicación del método descrito se cuantifica de forma repetitiva y reproducible, parámetros tales como la porosidad, número, área y perímetro de los poros y el grosor de la hebra de unión, pudiendo ser empleado en muestras de muy baja consistencia (tras el corte), y en geles de mayor consistencia, que corresponden al último proceso previo al moldeado y prensado del queso.

CUARTA: La cuantificación de los parámetros microestructurales mediante microscopía electrónica de barrido y análisis de imagen, permite correlacionar la humedad, grasa y capacidad de retención de agua de la cuajada con la microestructura. Los resultados obtenidos indican que el agitado y reposo de la cuajada del queso son las etapas que tienen una mayor influencia en la evolución de la matriz proteica, afectando significativamente al contenido de humedad, capacidad de retención de agua y grosor de la hebra.

QUINTA: La evaluación de la aplicación del prototipo de sensor LFV en leche de cabra confirma que las longitudes de onda que ofrecen una mejor visualización y análisis de la respuesta son distintas a las observadas para leche de vaca, siendo las longitudes de onda 990, 1000 y 1010 nm las que ofrecen un mayor incremento de la señal durante la coagulación y un mayor descenso durante la sinéresis.

SEXTA: La aplicación del prototipo LFV permite describir la evolución de los parámetros ópticos y químicos durante la elaboración de queso fresco de cabra, de forma reproducible y con mejores resultados que el sensor de referencia CoAguLite™.

SÉPTIMA: La definición de parámetros de visualización directa, derivados del perfil del ratio del LFV durante la elaboración de queso de Murcia al Vino permite desarrollar algoritmos de predicción útiles para la industria quesera.

OCTAVA: El sensor LFV es una tecnología eficaz para la monitorización en línea, que permite la predicción del tiempo de corte, humedad y textura de los quesos obtenidos y asegura la calidad y homogeneidad del producto final. Además es una herramienta útil para estandarizar el contenido de humedad antes de la maduración del queso.

NOVENA: Las variaciones de humedad obtenidas en el queso tras la aplicación del algoritmo de predicción desarrollado en esta memoria de Tesis Doctoral son inferiores a las habitualmente obtenidas en la industria quesera, lo que constituiría la primera validación de su empleo a nivel industrial para el control en línea de la humedad.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ADDA, J., GRIPON, J. C. Y L. VASSAL. (1982). The Chemistry of Flavour and Texture Generation in Cheese. *Food Chemistry*, 9, 115-129.

ADAMOPOULOS, K.G., GOULA, A.M., PETROPAKIS, H.J. (2001). Quality control during processing of Feta cheese NIR application. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 431-440.

AGUILERA, J. M. Y H. G. KESSLER. (1989). Properties of mixed and filled-type dairy gels. *Journal of Food Science* 54, 1213-1216.

ARGUMOSA, O., CARBALLO, J., BERNARDO, A., MARTIN, R. (1992). Chemical characterization of a Spanish artisanal goat cheese (Babia-Laciana variety). *Microbiologie, aliments, nutrition* 10, 69-76.

ARYANA, K.J., HAQUE, U.Z. (2001). Microstructure of Jarlsberg type and Edam cheeses as influenced by maturation. *Journal of Food Quality* 24, 337-350.

ATTAIE, R., RONALD, L., RICHTER, RISCH, E. (1996). Manufacturing parameters and rheological characteristics of cheddar-like hard goat cheese. *Journal of Dairy Science* Vol. 79, N° 1.

AUTY, M.A.E., FENELON, M.A., GUINEE, T.P., MULLINS, C., MULVIHILL, D.M. (1999). Dynamic confocal scanning laser microscopy methods for studying milk protein gelation and cheese melting. *Scanning*, 21, 299-304.

BEEBY, R. (1959). A method for following the syneresis of the rennet coagulum in milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 2, 77-79.

BERRIDGE, N.J. (1952). An improved method of observing the clotting of containing rennin. *Journal Dairy Research*, 19, 328-329.

BOHLIN, L., HEGG, P., LJUSBERG-WAHREN, H. (1984). Viscoelastic properties of coagulation milk. *Journal Dairy Science*, 67, 729-734.

B.O.E. Boletín Oficial del Estado (25 de octubre de 2001). Orden de 10 de octubre de 2001 del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, por la que se ratifica el reglamento de las Denominaciones de Origen “Queso de Murcia” y “Queso de Murcia al Vino” y se constituye su Consejo Regulador.

BOURNE, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 41, 163–178.

BOUTROU, R., FAMELART, M.H., GAUCHERON, F., LE GRAET, Y., GASSI, J.Y., PIOT, M., LEONIL, J. (2002). Structure development in a soft cheese curd model during manufacture in relation to its biochemical characteristics. *Journal of Dairy Research* 69, 605-618.

BUFFA, M. N., TRUJILLO, A. J., PAVIA, M., GUAMIS, B. (2001). Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high pressure treated goats' milk. *International Dairy Journal*, 11, 927-934.

BÜTIKOFER, U., RÜEGG, M., ARDÖ, Y. (1993). Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *LWT-Food Science. and Technology*, 26, 271–275.

BYLUND, G. (1995). The Chemistry of Milk. Capítulo 2 en Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Suecia.

BYNUM, D.G., OLSON, N.F. (1982). Influence of curd firmness at cutting on cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. *Journal Dairy Science*, 65, 2281-2290.

CALLANAN, T. (1991). Recovery of Milk Constituents in Cheesemaking (Relation to Process Control). Capítulo 4 en: FACTORS AFFECTING THE YIELD OF CHEESE. Monografía No. 9301. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

CANO-RUIZ, M.E. Y R. L. RICHTER. (1997). Effect of Homogenization Pressure on the Milk Fat Globule Membrane Proteins. *Journal of Dairy Science*, 80, 2732-2739.

CARLSON, A., HILL, G.C., OLSON, N.F. (1986). The coagulation of milk with immobilized enzymes: A critical review. *Enzyme and Microbial Technology*. 8, 642-650.

CASTILLO, M., PAYNE, F. A., HICKS, C. L., LÓPEZ, M. B. (2000). Predicting cutting and clotting time 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, Murcia.

CASTILLO, M., PAYNE, F.A., HICKS, C.L., LAENCINA, J., LÓPEZ, M. B. (2002). Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goat's milk using a light scattering sensor. *International Dairy Journal*, 12, 1019-1023.

CASTILLO, M., PAYNE, F.A., HICKS, C.L., LAENCINA, J., LÓPEZ, M. B. (2003). Effect of protein and temperature on cutting time prediction in goat's milk using an optical reflectance sensor. *Journal Dairy Research*, 70, 205-215.

CASTILLO, M., PAYNE, F. A., LÓPEZ, M. B., FERRANDINI, E., LAENCINA, J. (2005a). Preliminary evaluation of an optical method for modeling the dilution of fat globules in whey during syneresis of cheese curd. *Applied Engineering in Agriculture*, 21, 265–269.

CASTILLO, M., LUCEY J.A., PAYNE F.A., (2005b). The effect of temperature and inoculum concentration on rheological and light scatter properties of milk coagulated by a combination of bacterial fermentation and chymosin. Cottage cheese-type gels. *International Dairy Journal*, 16, 131-146.

CASTILLO, M., LUCEY, J.A., PAYNE, F.A. (2006a). The effect of temperature and inoculum concentration on rheological and light scatter properties of milk coagulated by a combination of bacterial fermentation and chymosin. Cottage cheese-type gels. *International Dairy Journal*, 16, 131-146.

CASTILLO, M., LUCEY, J.A., WANG, PAYNE, F.A. (2006b). Effect of temperature and inoculum concentration on prediction of both gelation time and cutting time. Cottage cheese gels. *International Dairy Journal*, 16, 147-152.

CHEN, M., IRUDAYARAJ, J., MCMAHON, D. (1998). Examination of full fat and reduced Fat Cheddar cheese during ripening by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal Dairy Science*, 81, 2791-2797.

COOKE, P.H., TUNICK, M.H., MALIN, E.L., SMITH, P.W., HOLSINGER V.H. (1995). Electron density patters in low-fat mozzarella cheese during refrigerate storage. Pages 311-320 in Chemistry of Structure- Function

relationships in cheese. E.L. Malin and M.H. Tunick, ed. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 367. Plenum Press, New York.

CURDA, L., KUKACKOVA, O. (2004). NIR spectroscopy: a useful tool for rapid monitoring of processed cheeses manufacture. *Journal of Food Engineering* 61, 557-560.

DALGLEISH, D.G. 1983. Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 50, 331-339.

DALGLEISH, D. G. (1997). Structure-Function Relationships of Caseins. Capítulo 7 en Damodaran, S. y A. Paraf (Editores): *FOOD PROTEINS AND THEIR APPLICATIONS*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, EUA.

DAVIAU, C., PIERRE, A., FAMELART, M.H., GOUDEDRANCHE, H., JACOB, D., GARNIER, M., MAUBOIS, J.L. (2000). Characterisation of whey drainage kinetics during soft cheese manufacture in relation with the physicochemical and technological factors, pH and renneting, casein concentration and ionic strength of milk. *Lait*. 80, 417-432.

DEJMEK, P. (1989). Precision conductometry in milk renneting. *Journal of Dairy Research*, 56, 69-78.

DEJMEK, P., WALSTRA, P. (2004). The syneresis of rennet-coagulated curd. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol 1 (pp. 71-101). P. F. Fox, ed. 3rd ed. Chapman and Hall, London, UK.

DING, K., GUNASEKARAN, S. (1998). Three-dimensional image reconstruction procedure for food microstructure evaluation. *Artificial Intelligence review*, 12, 245-262.

EMMONS, D.B., ERNSTROM, C.A., LACROIX, C., VERRET, P. (1990). Predictive formulas for yield of cheese from composition of milk: A review. *Journal Dairy Science*, 73, 1365-1394.

EVANS, E. W. (1986). Interactions of Milk Components in Food Systems. Capítulo 14 en Birch, G. G. y M. G. Lindley (Editores): INTERACTIONS OF FOOD COMPONENTS. Elsevier Applied Science Publishers, Londres, Inglaterra.

EVERARD, C.D., O' CALLAGHAN D.J., MATEO, M.J., O' DONELL, C.P., CASTILLO, M., PAYNE, F.A. (2008). Effects of cutting intensity and stirring speed on syneresis and curd losses during cheese manufacture. *Journal Dairy Science*, 91, 2575-2582.

EVERARD, C.D., FAGAN C C, O' DONELL, C.P., O' CALLAGHAN D.J., CASTILLO, M., PAYNE, F.A. (2007). Computer vision and colour measurement techniques for inline monitoring of cheese curd syneresis. *Journal Dairy Science*, 90, 3162-3170.

EVERETT, D.W., DING, K., Olson, N.F., GUNASEKARAN, S. (1995). Applications of confocal microscopy to fat globule structure in cheese. In E.L. Malin, & M.H. Tunick (Eds.), Chemistry of structure-function relationship in cheese (pp. 321-330). New York, NY, USA: Plenum Press.

EVERETT, D.W., AUTY, M.A.E. (2008). Cheese structure and current methods of analysis. *International Dairy Journal*, 18, 759-773.

FAGAN, C.C., CASTILLO, M., PAYNE, F.A., O'DONNELL, C.P., LEEDY, M., O'COLLAGHAN, D. J. (2007a). Novel online sensor technology for continuous monitoring of milk coagulation and whey separation in cheesemaking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 8836-8844.

FAGAN, C. C., LEEDY, M., CASTILLO, M., PAYNE, F. A., O'DONNELL, C. P., O'COLLAGHAN, D. J. (2007b). Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *Journal Food Engineering*, 83, 61-67.

FAGAN, C.C., C. EVERARD, C.P. O'DONNELL, G. DOWNEY, E.M. SHEEHAN, C.M. DELAHUNTY. (2007c). Evaluating mid-infrared spectroscopy as a new technique for predicting sensory texture attributes of processed cheese. *Journal Dairy Science*, 90, 1122-1132.

FAGAN, C. C., CASTILLO, M., PAYNE, F.A., O'DONNELL, C. P., O'COLLAGHAN, D.J. (2007d). Effect of cutting time, temperature and calcium on curd moisture, whey fat losses and curd yield by response surface methodology. *Journal Dairy Science*, 90, 4499-4512.

FAGAN, C.C., CASTILLO, M., O'DONNELL, C.P., O'CALLAGHAN, D.J., PAYNE, F.A. (2008). On-line prediction of cheese making indices using backscatter of near infrared light. *International Dairy Journal*, 18, 120-128.

FALCONE, P.M., BAIANO, A., CONTE, A., MANCINI, L., TROMBA, G., ZANINI, F., DEL NOBILE, M.A. (2006). Imaging Techniques for the Study of Food Microstructure: A Review. *Advances in Food and Nutrition Research*, 51, 205–263.

FALLICO, E., TUMINELLO, L., PEDILIGGIERI, C., HORNE, J., CARPINO, S., LICITRA, G. (2006). Proteolysis and microstructure of Piacentinu Ennese cheese made using different farm technologies. *Journal Dairy Science*, 89, 37-48.

FERRANDINI, E. (2006). Elaboración de Queso de Murcia al Vino con cuajo natural en pasta. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

FENOUL, F., DENMAT, L., HAMDI, F., CUVELLER, G., MICHON, C. (2008). Technical Note: Confocal Scanning Laser Microscopy and Quantitative Image Analysis: Application to Cream Cheese Microstructure Investigation. *Journal Dairy Science*, 91 1325-1333.

FORMAGGIONI, P., A. SUMMER, P. FRANCESCHI, M. MALACARNE, P. MARIANI. (2008). Cheese yield, factors of variation and predictive formulas. A review focused particularly on grana type cheeses. *Annali della facoltà di medicina veterinaria, Università di Parma (Vol. XXVIII)* 211-232.

FRANKHUIZEN, R. (1992). Near-infrared analysis of dairy products. In *Handbook of near infrared analysis* ; Burns, D. A., Ciurczak, E. W., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, Chapter 22.

GARNOT, P., RANK, T.C., OLSON, N.F. (1982). Influence of protein and fat contents of ultrafiltered milk on rheological properties of gels formed by chymosin. *Journal Dairy Science*, 65, 2267-2273.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I., HERNÁNDEZ-HIERRO, J.M., MORON-SANCHO, R., SALVADOR-ESTEBAN, J., VIVAR-QUINTANA, A., REVILLA, I. (2007). Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheeses with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. *Analytica Chimica Acta*, 604 ,

191–196.

GONZALEZ-MARTÍN, I., GÓNZALEZ-PÉREZ, C., HERNÁNDEZ-HIERRO, J., GÓNZALEZ-CABRERA, J.M. (2008). Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in cheese. *Talanta*, 75, 351-355.

GREEN, M.L., HOPPS, D.G., MORANT, S.V., HILL, V.A. (1978). Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk. II. Process of gel assembly. *Journal of Dairy Research*, 45, 413-422.

GRUNDELIUS, A. U., LODAITE, K., STERGREN, K.O.G., PAULSSON, M., DEJMEK, P. (2000). Syneresis of submerged single curd grains and curd rheology. *International Dairy Journal*, 10, 489-496.

GUILLEMIN, H., TRELEA, I.C., PICQUE, D., PERRET, B., CATTENOZ, T., CORRIEU, G. (2006). An optical method to monitor casein particle size.

GUNASEKARAN, S., AY, C. (1996). Milk coagulation cut-time determination using ultrasonics. *Journal of Food Process Engineering*, 19, 63-73.

GUNASEKARAN, S., AK, M.M. (1999) Three-dimensional characteristics of fat globules in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 1890-1896.

HASSAN, A.N., FRANK, J., QVIST, K.B. (2002). Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal laser microscopy. *Journal of Dairy Science* 85, 1705-1708.

HERBERT, S.A., RIAUBLANC, A., BOUCHET, B., GALLANT, B.J., DEFFOUR, E. (1999). Fluorescence spectroscopy investigation of acid or rennet induced coagulation milk. *Journal Dairy Science*, 82, 2056- 2062.

HERNÁNDEZ-TINOCO, A., RAMOS-RAMIREZ, E.G., FALCONY-GUAJARDO, C., SALAZAR-MONTOYA, J.A. (2004). Rheometry and Scanning Electron Microscopy study of casein curds added with mesquite seed gum and soy proteins. *Latin America Applied Research*, 34, 195-202.

HORI, T. (1985). Objective measurements of the process of curd formation during rennet treatment of milk by the Hot Wire method. *Journal of Food Science*, 50, 911-917.

HORNE, D.S.; DAVIDSON, C.M. (1990). The use of dynamic light-scattering in monitoring rennet curd formation. *Milchwissenschaft*. 45, 712-715.

HOSTETTLER, H., STEIN, J., IMHOF, K. (1955). Die bestimmung des gerinnungspunktes bei der labgerinnung der milch. *Milchwissenschaft*, 6, 196-205.

HUANG, H., YU, H., XU, H., YING, Y. (2008). Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: a review. *Journal of Food Engineering*, 87, 303-313.

IMPOCO, G., CARRATO, S., CACCAMO, M., TUMINELLO, L., LICITRA, G. (2007). Quantitative analysis of cheese microstructure using SEM imagery. *Communications to SIMAI congress, ISSN 1827-9015, Vol. 2*.

INDA, A. (2000). Optimización de Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de Quesería. *Organización de los Estados Americanos (OEA) y la Agencia Alemana de Cooperación para el desarrollo (gtz) (p1-155)*.

INOUE, S. (1986). Video Microscopy, plenum Press, New York. ISBN 0-306-42120-8.

IDF (2004). Cheese and processed cheese products. Determination of total solids content. In: International Dairy Federation. Brussels, *Standard 5534*.

IDF/RM (2008). Determination of the protein content of processed cheese products. In: International Dairy Federation. Brussels, *Standard 25*.

ISO (2008). Determination of Fat Content. Van Gulik Method. International Organization for Standardization, Geneva, *Standard 3433*.

KKARAMAN, A.D., BENLI, M., AKALIN, A.S. (2012). Microstructure of industrially produced reduced and low fat Turkish white cheese as influenced by the homogenization of cream. *Grasas y aceites*, 63, 267-273.

KARAMI, M., EHSANI, M.R., MOUSAVI, S.M., REZAEI, K., SAFARI, M. (2009). Microstructural properties of fat during the accelerated ripening of ultrafiltered-Feta cheese. *Food Chemistry*, 113, 424-434.

KARLSSON, A.O., IPSEN, R., ARDÖ, Y. (2007). Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal*, 17, 674-682.

KAROUI, R., MOUAZEN, A.M., DUFOUR, E., PILLONEL, L., PICQUE, J., DE BAERDEMAEKER, BOSSET, J.O. (2006). Application of the MIR for the determination of some chemical parameters in European Emmental cheeses produced during summer. *International Dairy Journal*, 15, 287-298.

KAWAMURA, S., TSUKAHARA, M., NATSUGA, M., ITOH, K., (2003). On-line near infrared spectroscopic sensing technique for assessing milk quality during milking. *Transactions of the ASAE, Paper Number: 033026*.

KAWASAKI, M., KAWAMURA, S., NAKATSUJI, H., NATSUGA, M. (2005). Online real-time monitoring of milk quality during milking by near infrared spectroscopy, *ASAE Meeting Presentation, Paper Number: 053045*.

KIMBER, A.M., BROOKER, K.M., HOOBS, D.G., PRENTICE, J.H. (1975). Electron microscope studies of the development of structure in Cheddar cheese. *Journal Dairy Research, 41, 389-396*.

KLENKE, M.; SCHNEEMANN, T. L. (1993). Production mit near- infrared-Inline Messungen (The lean production concept using near-infrared inline measurements). *Milchwissenschaft, 44, 944-946*.

KRENKEL, K., SENGE, B., SCHULZE, W.K. (1996). Eine neue methode zur bestimmung des gerinnungsverhaltens von milch. *Milchwirtschaft, 19, 856-862*

KUCUKONER, E., HAQUE, Z.U. (1995). Production of reduced fat (5%) cheddar cheese using different replacers. *Journal of Dairy Science, 78, 332-339*.

LLANGTON, M., ASTRÖM, A., HERMANSSON, A-M. (1996). *Food Quality and Preference Vol.7, n° 3/4, 185-191*.

LAWRENCE, R. C., GILLES, J. E I. K. CREAMER. (1983). The Relationship Between Cheese Texture and Flavour. *Dairy Science and Technology, 18, 175-190*.

LAWRENCE, R. C. (1991). Processing Conditions”. Capítulo 7 en: FACTORS AFFECTING THE YIELD OF CHEESE. Monografía No. 9301. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

LOBATO-CABALLEROS, C., REYES- HERNÁNDEZ, J., BERISTAIN, C.I., HORNELAS-URIBE, Y., SÁNCHEZ-GARCÍA J.E, VERNON-CARTER, E.J. (2007). Microstructure and texture of White fresh cheese made with canoil oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. *Food Research international* 40, 529-537.

LOBATO-CABALLEROS, C., SOSA-PEREZ, A., RODRÍGUEZ-TAFOYA, J., SANDOVAL-CASTILLA, O., PÉREZ-ALONSO, VERNON-CARTER, E.J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W₁/O/W₂ emulsions and skim milk. *LWT-Food Science and Technology* 41, 1847-1856.

LODAITE, K., O. STERGREN, K., PAULSSON, M., DEJMEK, P. (2001). One dimensional syneresis of rennet-induced gels. *International Dairy Journal*, 10/12, 829–834.

LODAITE, K., STERGREN, K. O., SANTOSA, O., ARCHAMBAULTA, E-L., DEJMEK, P. (2002). Fusion of skim milk cheese curd grains: Development of a method to measure the fracture stress of the bonds between fused curd grains. *International Dairy Journal*, 12, 455–461.

LOPEZ, C., CAMIER, B., GASSI, J-Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during manufacture and ripening of Emmental cheese observed by Confocal Laser Scanning Microscopy (CSLM). *International Dairy Journal*, 17, 235-247.

LÓPEZ, M.B., FERRANDINI, E., RODRIGUEZ, M., ROCA, J.D., HABA, E., LUNA, A., ROVIRA, S. (2012). Physicochemical study of Murcia al Vino cheese. *Small Ruminant Research*, 106, 154–159.

LUCAS, A., COULON, J.B., AGABRIEL, C., CHILLIARD, A., ROCK, E., (2008). Relationship between the conditions of goat's milk production and the contents of some components of nutritional interest in Rocamadour cheese. *Small Ruminant Research*, 74, 91–106.

LUCEY, J. A. Y P. F. FOX. (1993). Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1714-1724.

MA, L., Drake, M.A., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. (1997). Rheology of full-fat and low-fat cheddar cheeses as related to type of fat mimetic. *Journal of Food Science*, 62, 748-752.

MADADLOU, A., KHOSROSHAHI, A., MOUSAVI, M.E., (2005). Rheology, microstructure, and functionality of low-fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet. *Journal of Dairy Science*, 88, 3052-3062.

MADADLOU, A., KHOSROSHAHI, A., MOUSAVI, M.E., DJOME, Z.E. (2006). Microstructure and rheological properties of Iranian white cheese coagulated at various temperatures *Journal Dairy Science*, 89, 2359-2364.

MADADLOU, A., KHOSROSHAHI, A., MOUSAVI, M.E., JANSID, F. (2007). The influence of brine concentration on chemical composition and texture of Iranian White cheese. *Journal of Food Engineering*, 81, 330-335.

MARSHALL, R. 1982. An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *Journal Dairy Research*, 49, 329-336.

MATEO, M.J., O'COLLAGHAN, D. J., EVERARD, C. D., CASTILLO, M., PAYNE, F.A, O'DONNELL, C. P. (2009a). Validation of a curd-syneresis sensor over a range of milk composition and process parameters. *Journal Dairy Science*, 92, 5386-5395.

MATEO M J, O'COLLAGHAN D J, EVERARD C D, FAGAN C C, CASTILLO M, PAYNE F A, O'DONNELL C P (2009b) Influence of curd cutting programme and stirring speed on the prediction of syneresis indices in cheese-making using NIR light backscatter. *LWT-Food Science Technology*, 42, 950-955.

MATEO, M. J., D. J. O'CALLAGHAN, C. D. EVERARD, M. CASTILLO, F. A. PAYNE, C.P. O'DONELL. (2010). Evaluation of on-line optical sensing techniques for monitoring curd moisture content and solids in whey during syneresis. *Food Research International*, 43, 177-182.

MAZEROLLES, G., DEVAUZ, M.F., DUBOZ, G., DUPLOYER, M.H., MOUHOUS, N. DUFOUR, E. (2001). Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. *Lait*, 81, 509-527.

MC DOWELL, E. M., B. F. TRUMP. (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 100, 405-414.

MC MAHON, D.J., MOTAWEE, M.M., MCMANUS, W.R. (2009). Influence of brine concentration and temperature on composition, microstructure and yield of feta cheese. *Journal Dairy Science*, 92, 4169-4179.

MEHAIA, M.A., CHERYAN, M. (1983). Coagulation studies of ultra filtration concentrated skim milk. *Milchwissenschaft*, 38, 708-710.

MELILLI, C., CARCÒ, D., BARBANO, D.M., TUMINO, G., CARPINO, S., LICITRA, G. (2005). Composition, Microstructure, and Surface Barrier Layer Development during Brine Salting. *Journal Dairy Science*, 88, 2329-2340.

MERTENS, B.J.A. O'DONELL, C.P. O'CALLAGHAN, D.J. (2002). Modelling near-infrared signals for on-line monitoring in cheese manufacture. *Journal of chemometrics*, 16, 89-98.

MESSINA, M., Y MESSINA, V. (1992). Uso creciente de los alimentos de soya y su función potencial en la prevención del cáncer. *Soya noticias abril-junio* 13-19.

MUTHUKUMARAPPAN, K., GUNASEKARAN, S., JOHNSON, M.E., OLSON, N.F. (1995). Three-dimensional size characterization of fat globules in Cheddar cheese using confocal laser scanning microscope. *Scanning*, 17, V131-V132.

MORR, C. V. (1975). Chemistry of Milk Proteins in Food Processing. Symposium: Milk Proteins in Dairy and Food Processing. *Journal Dairy Science*, 58, 977-984.

NIDHI, B., FOX, P., MCSWEENEY, P.L. (2008). Factors that affect aggregation of rennet-altered casein at low temperatures. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 56-61.

NORONHA N AND O' RIORDAN E.D (2008) Influence of processing parameters on the texture and microstructure of imitation cheese. *European Food Research Technology*, 226, 385-393.

OBERG, C.J., MCMANUS, W., MCMAHON, D.J. (1993). Microstructure of Mozzarella cheese. *Journal Dairy Science*, 83, 1-10.

O'CALLAGHAN, D.J., O'DONELL, C.P., PAYNE, F.A. (1999). Effect of protein content of milk on the storage and loss moduli in renneting milk gels. *Journal of Food Process Engineering*, 22, 249-261.

OKIGBO, L.M.; RICHARDSON, G.H.; ERNSTROM, C.A. (1985). Interactions of calcium, pH, temperature, and chymosin during milk coagulation. *Journal Dairy Science*, 68, 3135-3142.

OSBORNE, B.G., FEARN, T. (1986). Theory of near infrared spectrophotometry. Near infrared spectroscopy in food analysis. England: Longman Scienti & Technical, Longman Group UK Limited (pp. 20-42).

PANDEY, P. K., RAMASWAMY, H.S., ST-GELAIS, D. (2000) Water Holding capacity and gel strength of rennet curd as affected by high-pressure treatment of milk. *Food Research International*, 33, 655-663.

PAYNE, F.A., HICKS, C.L., MADANGOPAL, S., SHEARER, S.A. (1993). Fibre optic sensor for predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production. *Transactions of the ASAE (American Society of Agricultural Engineers)*, 36, 841-847.

PAYNE, F.A., R.C. FREELS, S.E. NOKES, AND R.S. GATES. (1998). Diffuse reflectance changes during the culture of cottage cheese. *Transactions of the ASAE*, 41, 709-713.

PAYNE, F.A., R.S. GATES, AND B.L. FANNIN. (1996). Measurement precision for a fiber optic diffuse reflectance sensor. *Transactions of the ASAE*, 39, 2163-2198.

PEREIRA, R., MATIA-MERINO, L., JONES, V., SINGH, H. (2006). Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: A sensory perspective. *Food Hydrocolloids*, 20, 305-313.

PEREIRA, C.I., GOMES, A.M.P., MALCATA. (2009). Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 213-219.

PIERRE, A., MICHEL, F., LE GRAËT, Y., BERRIER, J. (1999). Soft goat cheeses at different ripening stages: cheese structure, composition and non solvent water. *Lait*, 79, 489-501.

PINHO, O., MENDES, E., ALVES, M, M., FERREIRA, I.M.(2004). Chemical, physical, and sensorial characteristics of “Terrincho” ewe cheese: changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal Dairy Science*, 87, 249-257.

POVEDA, J.M., CABEZAS, L.(2006). Free fatty acid composition of regionally produced Spanish goat cheese and relationship with sensory characteristics. *Food Chemistry*, 95, 307-311.

RAHIMI, J., KHOSROSHAHI, A., MADADLOU, A., AZIZNIA, S. (2007). Texture of Low-Fat Iranian White Cheese as Influenced by Gum Tragacanth as a Fat Replacer. *Journal Dairy Science*, 90, 4058-4070.

RAMÍREZ, M.A. (2008). Evolución quesera en los últimos 30 años situación actual, nuevos productos y tendencias futuras. *ILE: Industrias lácteas españolas*, 358, 149-154.

RAYNAL, K., REMEUF, F. (2000). Effect of storage at 4° C on the physicochemical and renneting properties of milk: a comparison of caprine, ovine and bovine milks. *Journal of Dairy Research*, 67, 199-207.

RENAULT, C., GASTALDI, T.E., LAGAUDE, A., CUQ, J. L FUENTE, B.T. (1997). Mechanisms of syneresis in rennet curd without mechanical treatment. *Journal of Food Science*, 62, 907-910.

RICHARDSON, G.H., OKIGBO, L.M., THORPE, J.D. (1985). Instrument for measuring milk coagulation on cheese vats. *Journal Dairy Science*, 68, 32-36.

RIDDELL-LAWRENCE, S., HICKS, C.L. (1988). Effect of curd firmness on stirred curd cheese yield. *Journal Dairy Science*, 72, 313-321.

RODRÍGUEZ-OTERO, J.L., HERMIDA, M., CEPEDA, A., (1995). Determination of Fat, Protein, and Solids in Cheese by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of AOAC International.*, 78, 802-806.

RODRIGUEZ-OTERO, J.L., HERMIDA, M., CEPEDA, A. (1997). Analysis of Dairy Products by Near-Infrared Spectroscopy: A Review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 2815-2819.

ROVIRA, S., LÓPEZ, M.B., FERRANDINI, E., LAENCINA, J. (2011) Microstructure quantification by scanning electron microscopy and image analysis of goat cheese curd. *Journal Dairy Science*, 94, 1091-1097.

ROVIRA, S., GARCIA, V., LOPEZ, M.B. (2012a). Application of a Large Field of View sensor during manufacture of fresh goat cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 1-6.

ROVIRA S., GARCÍA V., FERRANDINI E., CARRIÓN, J., CASTILLO M., LÓPEZ M. B. (2012b). Usefulness of a large field of view sensor for physicochemical, textural, and yield predictions under industrial goat cheese (Murcia al Vino) manufacturing conditions. *Journal Dairy Science*, 95, 6320-6331.

ROVIRA, S., GARCIA, V., LAENCINA, J., LOPEZ, M.B. (2013). Microstructure of industrially manufactured goat cheese Queso de Murcia al Vino during syneresis. *International Journal of Dairy Technology*, *Accepted Manuscript*.

RÜEGG, M., MOOR, U. (1987). The size distribution and shape of curd granules in traditional swiss hard and semi-hard cheeses. *Food Microstructure* 6, 35-46.
Stanley, D.W. 1987. Food texture and microstructure. In H.R. Moskowitz (ed.) *Food Texture*. Marcel Dekker, Inc.: New York, NY.

SBODIO, O.A., REVELLI, G.R. (2012). Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el “monitoreo” online del proceso. Avances en la Argentina. *Revista Argentina de Lactología*, 38, 236-246.

SCOTT BLAIR, G.W.; OOSTHUIZEN, (1961). A viscometric study of the breakdown of casein in milk by rennin and rennet. *Journal of Dairy Research*, 28, 165-173.

SHARMA, S.K., HILL, A.R., MITTAL, G.S.(1993). Effect of milk concentration pH and temperature on aggregation kinetics and coagulation properties of ultrafiltered (UF) milk. *Food Research International*, 26, 81-87.

SKOOG, D., HOLLER, F. J, NIEMAN, T. (2001). Principios de análisis instrumental. 5º Ed en español. Traducido por M. C. Martín., B. López., M. A. Martín., G. Garcedo y A. I. Olives. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España (pp.1028).

STANLEY, D.W., (1987). Food texture and microstructure. In H.R. Moskowitz (ed.) Food Texture. Marcel Dekker, Inc.: New York, NY.

THORVALDSSON, K., STADING, M., NILSSON, K., KIDMAN, S., LANGTON, M. (1999). Rheology and structure of heat-treated pasta dough: Influence of water content and heating rate. *LWT-Food Science and Technology*, 32, 154-161.

TSOULI, J., FAVRE-BONVIN, G., POLICARD, C., VILLE, A. (1975). Measure, par la methode conductimétrique, de l'activité enzymatique de trois variétés de présure sur lait frais de mélange et du lait reconstitué a partir de poudre dégraissée. *Lait*, 55, 289-294.

TUNICK, M.H., COOKE, P.H., MALIN, E.L., SMITH, P.W., HOLSINGER, V.H. (1997). Reorganization of Casein Submicelles in Mozzarella Cheese during storage. *International Dairy Journal*, 7, 149-155.

VAN DIJK, H.J.M., WALSTRA, P. (1986). Syneresis of curd. 2. One dimensional syneresis renneted milk gels. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 40, 3-30.

VAN HOOYDONK, A.C.M., VAN DEN BERG, G. (1988). Control and determination of the curd-setting during cheesemaking. Brussels, Belgium: *International Dairy Federation, Bulletin 225*

WALSTRA, P., JENESS, P. (1984). Dairy chemistry and physics (p 232). New York, NY, USA: Wiley.

WALSTRA, P., VAN VLIET, T. (1986). The physical chemistry of curd making. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 241-359.

WALSTRA, P. 1993. The syneresis of curd. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1. General Aspects. 2nd ed. (pp. 141-191), Chapman & Hall. London.

WIUM, H., PEDERSEN, P.S., QVIST, K.B. (2003). Effect of coagulation conditions on the microstructure and the large deformation properties of fat-free Feta cheese made from ultrafiltered milk. *Food Hydrocolloids* 17, 287-296.

XIN, Q., LING, H.Z., LONG, T.J., ZHU, Y. (2006). The rapid determination of fat protein content in fresh raw milk using the laser light scattering technology. *Optics and lasers in engineering*, 44, 858-869.

ZHONG, Q.X., DAUBERT, C.R., VELEV, O.D. (2004). Cooling effects on a model rennet casein gel system: Part II. Permeability and microscopy. *Langmuir*, 20, 7406-7411.