



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Desarrollo de quesos funcionales y aprovechamiento de proteínas de lactosuero”

Tesista: Diana Raquel Palatnik

Director/a: Dra Mercedes Campderros

Codirector/a: Dra Noemí Zaritzky

Año: 2019

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mi papá, a mi mamá por su apoyo incondicional.

A mi hermana y a mi hermano por estar siempre.

A mi compañero, amigas y amigos por su cariño, ánimo y apoyo infinito.

A mi Directora de Tesis, Dra. Mercedes Campderrós, por su asesoramiento, estímulo y acompañamiento permanente.

A mi Co-Directora, Dra. Noemí Zaritzky por su gran aporte y por su siempre buena predisposición.

A Noelia Rinaldoni por su valiosa colaboración y su buena voluntad en el desarrollo de las actividades de laboratorio.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio, por sus mates de todos los días y por ayudarme siempre que lo necesité.

A mis compañeras y compañeros de docencia por todo el apoyo brindado.

A las personas de INTI Lácteos que me recibieron tan bien y me ayudaron en todas las labores en mi estadía

También quisiera agradecer a las siguientes instituciones:

A la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis.

Al Instituto de investigación en tecnología química (INTEQUI- UNSL-CONICET)

Al Centro de investigaciones y desarrollo en criotecnología de alimentos (CIDCA)

A la Universidad Nacional de La Plata.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

A los Proyectos de investigación de la UNSL y de Agencia 2-9304, 2-3114, 2-0918 y PICT 2012-0155.

Al Instituto Nacional de Tecnología Industrial INTI.

A la empresa “Milkaut” y a la empresa “La Blanquita” por la materia prima donada.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

a) Trabajos Publicados

- “Soft cheese-like products development enriched with soy protein concentrates”, A.N. Rinaldoni, D.R. Palatnik, N. Zaritzky, M. Campderrós. LWT- Food Science and Technology (Elsevier), 55 (2014) 139-147.
- Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein formulation”, D. R. Palatnik, M.V. Ostermann Porcel, U.González, N. Zaritzky y M. E. Campderrós. LWT- Food Science and Technology (Elsevier), 63 (2015) 331-338.
- Development of reduced fat cheeses with the incorporation of agave fructans”. D. R. Palatnik, P. Aldrete Herrera, A. N. Rinaldoni, R.I.Ortiz Basurto and M.E. Campderrós. International Journal of Dairy Technology (Wiley), 69 (2016).

Trabajo de divulgación

- “Recuperación de proteínas de lactosuero de queso de cabra y su aprovechamiento en una formulación proteica”. V. Ostermann Porcel, D. R. Palatnik, M. E. Campderrós. Revista de Tecnología Láctea Latinoamericana, N° 81. Editorial Publitec, Bs.As., (2014), 56-62.

b) Presentaciones en Congresos Internacionales (con referato)

1. “Elaboración de quesos blancos conteniendo proteínas de soja”. Rinaldoni A., Randazzo, G., Palatnik, D., Campderrós, M. III Congreso Internacional en Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Mendoza, agosto 2012

2. Desarrollo de un aderezo a partir de un concentrado de proteínas de lactosuero de cabra”. Palatnik, D, Ostermann Porcel, V, Zaritzky N, Campderrós, M. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, noviembre 2014.
3. “Recuperación de proteínas de lactosuero de queso de cabra”. Ostermann Porcel V, Palatnik D, González U, Campderrós M. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, noviembre 2014.
4. Estudio de diferentes formas de incorporación de inulina a una matriz quesera”, Palatnik, D, Zaritzky N, Campderrós, M. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria “CLICAP 2015”, San Rafael, 15-17 de abril de 2015.
5. "Desarrollo de productos con valor agregado a partir de leche de cabra" Palatnik D, Osterman Porcel V, González U, Rinaldoni N, Campderrós M. XX Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología de los Alimentos SOCHITAL 2015, Chillán, Chile, 19-21 de octubre de 2015.
6. "Elaboración de quesos bajos en grasa conteniendo inulina" Palatnik D, Rinaldoni N, Campderrós M, Zaritzky N. XX Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología de los Alimentos SOCHITAL 2015,19-21 de octubre de 2015.
7. Desarrollo de un queso de cabra untable conteniendo inulina”, Palatnik, D., Rinaldoni, N., Ostermann Porcel, V., Campderrós M. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016), Córdoba, noviembre de 2016.
8. Incorporación de inulina en el desarrollo de un queso untable”. D. Palatnik, D. Corrales, M. L. Rolon, M.L.Castells, H. Montero, G. Aranibar, M. Campderrós y N. Zartizky. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. CLICAP 2018- San Rafael, Mendoza, abril de 2018.

c) Presentaciones en Congresos Nacionales (con referato)

1. “Elaboración de queso funcional conteniendo inulina”, D. Palatnik, A.N. Rinaldoni, S. Picco, Pérez Padilla, M. Campderrós. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CYTAL`11, Buenos Aires, 19-21 de octubre 2011.

2. “Estudio de parámetros experimentales para la obtención de un queso descremado funcional”. Palatnik, Rinaldoni, Campderrós. II Simposio Argentino de Lactología, Santa Fe, agosto 2012.
3. “Desarrollo de quesos funcionales con el agregado de fructanos de Agave”. Palatnik, D.; Aldrete Herrera, P.; Rinaldoni, A.; Ortiz Basurto, R. y Campderrós, M. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CYTAL`13, Rosario, 23-25 de octubre 2013.
4. “Desarrollo de un postre lácteo conteniendo combinaciones de edulcorantes naturales (Stevia y sucralosa)”. Rodríguez Furlán, L.; Orozco, A.; Palatnik, D; Campderrós, M. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CYTAL`13, Rosario, 23-25 de octubre 2013.

d) Seminarios Dictados

- **Semi Jornada INTEQUI**, Instituto de Investigaciones en Tecnología Química INTEQUI en carácter de expositora. Abril 2016. Título del Trabajo: Desarrollo de un queso funcional, conteniendo inulina.

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción y Antecedentes	1
1.1. Queso	1
1.1.1. Orígenes	1
1.1.2. Definición de queso	1
1.1.3. Clasificación	2
1.1.4. Materias Primas	4
1.1.4.1. Leche	5
1.1.4.2. Fermentos o starters	5
1.1.4.3. Cuajo	6
1.1.4.4. Sal: Cloruro de sodio	9
1.1.4.5. Aditivos de la leche	9
1.1.5. Producción de queso en Argentina	9
1.1.5.1. El comienzo de la actividad	10
1.1.5.2. El sector en la actualidad	11
1.1.5.3. Consumo interno y exportación	11
1.1.5.4. Producción de leche y queso de cabra en Argentina	12
1.1.6. Valor nutricional del queso	13
1.2. Subproducto de la elaboración de queso: Lactosuero	15
1.2.1. Generalidades	15
1.2.2. Definición de Lactosuero	16
1.2.3. Composición del lactosuero	17
1.3. Alimentos Funcionales	21
1.3.1. Definición	21
1.3.2. Tipos de alimentos funcionales	23
1.3.3. Propósito de los alimentos funcionales	24
1.3.4. Prebióticos	24
1.3.4.1. Inulina	25
1.3.4.2. Fructanos de agave	27
1.3.5. Concentrados de soja	28

1.3.5.1. Definición	28
1.3.5.2. Usos	29
1.4. Tecnología de membranas	30
1.4.1. Definición	30
1.4.2. Aplicación de tecnología de membrana en la industria de alimentos	31
1.5. Objetivos del trabajo de Tesis Doctoral	35
1.6. Descripción General del presente Trabajo de Tesis Doctoral	36
Capítulo 2: Materiales y Métodos	39
2.1. Determinaciones de la Composición Centesimal	39
2.1.1. Determinación de proteínas totales	39
2.1.2. Determinación del contenido de ceniza	43
2.1.3. Determinación de humedad	44
2.1.4. Determinación de contenido graso	44
2.1.5. Determinación de azúcares disueltos por refractometría	47
2.1.6. Determinación del contenido de inulina por HPLC	48
2.2. Determinaciones físico-químicas	49
2.2.1. Determinación de pH	49
2.2.2. Determinación de ión cloruro por Método de Mohr	50
2.2.3. Determinaciones de parámetros reológicos	51
2.2.4. Análisis de textura	54
2.2.4.1. Ensayo de penetración de la muestra	55
2.2.4.2. Ensayo TPA	57
2.2.5. Análisis instrumental de color	58
2.2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	60
2.3. Análisis microbiológicos	62
2.4. Análisis Sensorial	62
2.4.1. Tipos de análisis	63
2.5. Proceso de liofilización	64

Capítulo 3: Tecnología de Membranas. Definiciones y Aplicaciones	67
3.1. Introducción	67
3.2. Definiciones de conceptos básicos de membrana	69
3.2.1. Diferentes estructuras de las membranas	69
3.2.2. Proceso de Separación: Diferentes corrientes intervinientes	71
3.3. Procesos de membranas que emplean la presión como fuerza Impulsora	72
3.4. Ensuciamiento de membranas de micro y ultrafiltración	77
3.4.1. Fenómeno de polarización por concentración	79
3.5. Equipos y Configuraciones empleadas en Procesos de Membranas impulsados por presión	81
3.6. Proceso de Ensuciamiento- Protocolos de limpieza	85
3.6.1. Métodos de limpieza de membranas poliméricas	86
3.7. Resultados y Discusión de las aplicaciones de la tecnología de m membrana al procesamiento de quesos funcionales y utilización de sub productos	88
3.7.1. Proceso de reducción del contenido graso en leche destinada a la producción de quesos	88
3.7.2. Obtención de fracciones de fructanos de distinto grado de polimerización	90
3.7.3. Obtención del concentrado proteico de soja	91
3.7.4. Obtención de un concentrado proteico de lactosuero de queso de cabra.	95
3.7.4.1. Concentración de la proteína de suero caprino por MF-UF y Liofilización	96
3.8. Procedimiento de limpieza de la membrana de UF empleado en las experiencias realizadas con las diferentes matrices de alimentación.	99
3.9. Conclusiones	100

Capítulo 4: Desarrollo de quesos funcionales con fructanos	102
4.1. Introducción	102
4.2. Desarrollo de quesos blandos	103
4.2.1. Etapas de elaboración de quesos blandos	103
4.2.1.1.Desarrollo de quesos blandos con inulina	108
4.2.1.2.Desarrollo de quesos blandos con fructanos de agave	115
4.3. Quesos crema (tipo untable) con agregado de inulina	124
4.3.1 Desarrollo de queso crema con inulina GR	127
4.3.2. Desarrollo de quesos crema con inulina HP	128
4.3.3. Análisis Sensorial de queso crema	131
4.3.3.1.Análisis del perfil de textura de quesos crema	131
4.3.3.2.Análisis del perfil de flavor de quesos crema	132
4.3.3.3.Determinación instrumental de textura de queso crema	135
4.4. Conclusiones	138
Capítulo 5: Desarrollo de quesos conteniendo concentrados de proteínas de soja	140
5.1. Proceso de elaboración de queso crema con CPS	140
5.2. Caracterización de los quesos	142
5.3. Estudio de rendimiento de los quesos desarrollados	144
5.4. Determinación de parámetros reológicos en los quesos con y sin CPS	146
5.5. Análisis del perfil de textura	147
5.6. Análisis Sensorial	149
5.7. Análisis instrumental de color	150
5.8. Análisis de la microestructura	152
5.9. Estudio de vida útil	153
5.9.1. Determinaciones microbiológicas durante el almacenamiento	154
5.9.2. Determinación de sinéresis	157
5.9.3. Determinación de acidez expresada como Ácido Láctico	158

5.9.4. Determinación de pH	158
5.9.5. Resultados obtenidos durante el estudio de vida útil	158
5.10. Conclusiones	161
Capítulo 6: Aprovechamiento del subproducto lactosuero	163
6.1. Introducción	163
6.2. Separación de Proteínas de Lactosuero por Tecnología de Membranas	165
6.3. Caracterización funcional de los concentrados proteicos	165
6.3.1. Determinación y resultados de la solubilidad proteica	167
6.3.2. Capacidad de retención de agua	170
6.3.3. Capacidad de retención de grasas	171
6.3.4. Preparación de geles y medidas reológicas de acuerdo al pH	171
6.3.5. Capacidad emulsionante y estabilidad	181
6.3.6. Determinación de la capacidad de formación de espuma y su Estabilidad	185
6.4. Caracterización proteica por electroforesis SDS-PAGE	188
6.5. Comparación entre diferentes concentrados proteicos liofilizados	191
6.6. Aplicación del concentrado proteico de lactosuero de queso caprino. Desarrollo de un aderezo	192
6.6.1. Formulación y resultados de la caracterización físicoquímica de las muestras	192
6.6.2. Resultados de las determinaciones de composición físicoquímica de los aderezos	194
6.6.3. Análisis del perfil de textura	196
6.6.4. Análisis sensorial de aderezos	198
6.6.5. Análisis del color superficial de aderezos	201
6.7. Conclusiones	201
Capítulo 7: Conclusiones	203

Nomenclatura

208

Referencias

211

Capítulo 1

Introducción y Antecedentes

Diana Palatnik



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Queso

1.1.1. Orígenes

La elaboración del queso, junto con el pan, el vino y la cerveza, es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos que el hombre ha realizado. Se cree que este producto tiene su origen en la costumbre de pueblos del mediterráneo de transportar la leche en odres hechos con pieles de animales, o con estómagos o vejigas. En algún momento se utilizó un estómago fresco, con restos de enzimas coagulantes y el resultado final, sin buscarlo, fue el queso.

Durante siglos, la elaboración del queso se ha ido modificando y refinando. Su fabricación se mantuvo como una actividad artesanal hasta la aplicación de las bases científicas, que comenzaron a principios del siglo XX, permitiendo la fabricación a gran escala. En la actualidad las variedades de queso más populares se elaboran industrialmente y el queso es un producto muy importante en la dieta de muchos países (Castañeda y col., 2005).

1.1.2. Definición de queso

El Código Alimentario Argentino (CAA), en su Artículo 605 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006) define al queso como:

“el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes”. Se entiende por Queso Fresco el que está listo para el consumo poco después de su fabricación. Se entiende por Queso Madurado el que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso.

De acuerdo a la FAO/OMS: “es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos”. Según la composición: “es el producto, fermentado o no, constituido esencialmente por la caseína de la leche, en forma de gel más o menos deshidratado que retiene casi toda la materia grasa, si se trata de queso graso, un poco de lactosa en forma de ácido láctico y una fracción variable de sustancias minerales (Veisseyre,1988).

1.1.3. Clasificación

El CAA clasifica los quesos de acuerdo al contenido de materia grasa y al contenido de humedad.

- Según el **contenido de materia grasa** del extracto seco en porcentaje, los quesos se clasifican en:

Extra graso o Doble crema: cuando contengan no menos del 60%.

Grasos: cuando contengan entre 45,0 y 59,9%.

Semigrasos: cuando contengan entre 25,0 y 44,9%.

Magros: cuando contengan entre 10,0 y 24,9%.

Descremados: cuando contengan menos de 10,0%.

- Según el **contenido de humedad**, en porcentaje, los quesos se clasifican en:

Quesos de baja humedad (generalmente conocidos como de pasta dura): humedad hasta 35,9%.

Quesos de mediana humedad (generalmente conocidos como de pasta semidura): humedad entre 36,0 y 45,9%.

Quesos de alta humedad (generalmente conocidos como de pasta blanda o macíos): humedad entre 46,0 y 54,9%.

Quesos de muy alta humedad (generalmente conocidos como de pasta muy blanda o mole): humedad no menor a 55,0%. Los quesos de muy alta humedad se clasificarán a su vez de acuerdo con: si han recibido o no, tratamiento térmico luego de la fermentación, en: Quesos de muy alta humedad tratados térmicamente y quesos de muy alta humedad sin tratamiento térmico.

Otras clasificaciones y criterios de clasificación son los siguientes:

a) Según su pasta

- Quesos de pasta blanda: Generalmente son quesos con un porcentaje de humedad alto. Se caracterizan por ser producidos con leche de vaca. En algunos casos llevan el agregado de crema. Algunos de los quesos de pasta blanda son: queso Blanco, Petit Suisse, Cottage, Mozzarella, Caccio, Crema, Cuartirolo, Cremoso, Brie y Camembert, Limburgo o Romadur, Por Salut o Saint Paulin y Criollo.

- Quesos de pasta semi dura: Son quesos de mediana o alta humedad. El contenido en grasa puede variar de grasos, semigrasos a muy grasos. Pueden ser elaborados con leche entera o leche estandarizada (leches cuyo porcentaje de grasa ha sido modificada, generalmente tienen un porcentaje graso del 3%), acidificada por cultivos de bacterias lácticas y coaguladas por cuajo y/o enzimas específicas. Algunos pueden presentar ojos pequeños o medianos. Asimismo, tienen un tiempo de maduración que varía según el tipo de queso entre un mes y tres meses. Pertenecen a este grupo los quesos Gruyere, Gruyerito, Emmenthal, Pategrás o Queso Gouda, Fontina o Colonia, Pategrás Sándwich, Holanda, Cheddar, quesos de masa lavada, Danbo, Tandil, Tybo, Tilsit, Prato, Minas Frescal, Cacciocavallo.

- Quesos de pasta dura: Estos se caracterizan por ser quesos madurados, semigrasos grasos, de baja humedad, que se obtienen por coagulación de la leche por medio de cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas, complementada por la acción de bacterias lácticas específicas. Las características distintivas de estos quesos es que su masa es cocida, prensada y madurada. Asimismo, tienen un contenido aproximado de 32 gr de grasa en 100 gr del extracto seco. Pertenecen a este grupo quesos como el Reggiano, Reggianito, Parmesano, Sbrinz. Los quesos Sardo y Romano se caracterizan por tener baja humedad. Son quesos que han sido madurados, elaborados con leche entera o parcialmente descremada, coagulada por cuajo de cabrito o cordero y/o enzimas específicas.

- Quesos fundidos o reelaborados: Son el producto obtenido por el desmenuzado, mezcla, fusión y emulsión por medio de calor y agentes emulsionantes de una o más variedades de quesos. Pueden ser con o sin adición de otros productos lácteos y/o sólidos de origen lácteo y/o especias, condimentos u otras sustancias alimenticias y en el cual el queso constituye el ingrediente lácteo utilizado como materia prima en mayor cantidad en la base

láctea. Estos quesos se comercializan como queso fundido, queso procesado o queso procesado pasteurizado.

- Quesos fundidos por ultra alta temperatura: Recibe el nombre de Requesón el producto en el cual la base láctea no contenga grasa y/o proteínas de origen no lácteo. Este tipo de queso de acuerdo a la materia prima utilizada puede denominarse Requesón, Requesón Cremoso y Requesón de Manteca. Puede tener el agregado de especias y/o condimentos y/o sustancias alimenticias agregadas.

- Quesos de pasta hilada: Esta denominación se le confiere al queso Provolone hilado. Es un queso madurado en un tiempo de entre 3 a 8 meses; y su forma de elaboración es similar a la de los quesos de pasta dura. Aquellos quesos cuya maduración varía entre los 2 y 3 meses se los denomina Provolone hilado semiduro.

- Quesos rallados: Son aquellos que se obtienen por el desmenuzado o rallado de la masa de una o hasta cuatro variedades de quesos de baja y/o mediana humedad. Se los puede clasificar de acuerdo con las variedades de quesos utilizadas: • Elaborados con una única variedad de queso, • Elaborados únicamente con quesos de baja humedad, • Elaborados con quesos de mediana humedad con o sin quesos de baja humedad

b) De acuerdo al método de coagulación de la caseína, se clasifican en quesos al cuajo (enzimáticos), queso de coagulación ácida (ácido láctico, cítrico, acético), queso de coagulación de ambos métodos.

c) De acuerdo al microorganismo utilizado en la maduración y la textura del queso, se clasifican en quesos de ojos redondeados, granulares y quesos de textura cerrada.

En el presente trabajo de tesis doctoral, y buscando la mejor manera de incorporación y retención de la inulina y otros ingredientes funcionales, se elaboraron diferentes tipos de quesos de alta humedad o de pasta blanda, que a continuación se describen.

1.1.4. Materias Primas

Los ingredientes básicos, además de la leche, que se utilizan en la fabricación del queso son: cultivos de levaduras o bacterias llamadas starters; cuajo, ácidos o enzimas coagulantes; sal; aditivos autorizados según el tipo de queso y según la legislación de cada país.

1.1.4.1. Leche

Según el CAA, la leche es definida como el líquido obtenido en el ordeño higiénico de vacas bien alimentadas y en buen estado sanitario. Cuando es de otros animales se indica expresamente su procedencia; por ejemplo, leche de cabra y leche de oveja.

Según las últimas estadísticas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (S.A.G.P. y A.), existen hoy en el país 14.000 tambos. El 50 por ciento de la producción de leche de esos tambos se destina a la actividad quesera.

La leche utilizada en quesería debe cumplir con los siguientes requisitos:

a) Tener buena calidad físico-química y microbiológica: existen factores que afectan la coagulación de la leche que están ligados a su composición (cantidad de proteínas solubles, balance salino, pH, etc.). Por otro lado, la carga microbiana por razones obvias afecta la calidad sanitaria, la inocuidad del queso y la vida útil del mismo.

b) Estar libre de inhibidores (residuos de detergentes, cloro, antibióticos, etc.) especialmente en la elaboración de quesos con la utilización de cultivos lácticos, lo cual no quiere decir que en aquellos que no se utilicen cultivos iniciadores, pueda permitirse la presencia de residuos químicos, debe recordarse la influencia sobre la salud pública de dichos residuos.

c) No debe ser almacenada por largos periodos, preferiblemente debe ser fresca. El almacenamiento prolongado de la leche aún a temperaturas de refrigeración, produce cambios en el balance salino y reducción del tamaño de la micela de caseína por un aumento de la cantidad de caseína soluble (β -caseína) y paralelamente aumenta el grado de hidratación de la micela, todo lo cual se traduce en problemas para la coagulación enzimática de la leche. La mayoría de estos efectos pueden corregirse si la leche se mantiene por 30 minutos a una temperatura de 30-36°C antes de la coagulación.

La leche que se utiliza en la elaboración de quesos puede ser entera o parcialmente descremada. Además, la leche debe ser pasteurizada.

1.1.4.2. Fermentos o starters

Los fermentos son microorganismos seleccionados, no tóxicos, cuyo principal rol tecnológico es la acidificación de la leche. Además, cumplen otras importantes funciones: reducen el potencial redox (+250 mV en leche a -150 mV en queso), compiten con la flora

adventicia, protegen el producto contra patógenos, juegan un papel esencial en el desarrollo de sabor y aroma. Según el tipo de microorganismo utilizado en la elaboración de los quesos se obtienen distintos tipos (Madrid Vicente, 1996):

- Quesos veteados: como el roquefort, donde se produce por toda su masa el crecimiento de mohos *Penicillium*.
- Quesos de moho blanco, tales como el Camembert, en los cuales se desarrollan hongos blancos como *Penicillium Candidum*.
- Quesos con desarrollo bacteriano en la corteza, tal como el Port Salut, en donde se unta la superficie de los quesos antes de su maduración, con un cultivo de bacterias que se desarrollan dando características especiales a los quesos.
- Quesos madurados por la adición de cultivos bacterianos lácticos. En este grupo se encuentran la mayoría de los quesos. El cultivo de microorganismos lácteos seleccionados en una proporción variable (normalmente del 0,5 al 1,1%) se añade a la leche antes de su coagulación, a una temperatura de 29 a 31°C. Su misión inmediata es la producción de ácido láctico para conseguir el grado de acidez correcto antes de la adición del cuajo, y así conseguir una buena sinéresis.

Los tipos principales de cultivos utilizados en quesería son dos:

- a) Cultivos mesófilos, con las temperaturas óptimas para su desarrollo comprendidas entre los 20 y 40°C
- b) Cultivos termófilos, con temperaturas óptimas de desarrollo comprendidas entre 40 y 45°C.

1.1.4.3. Cuajo

Para que se produzca la coagulación de la leche, es necesario la acción del cuajo o coagulante, que será el responsable de la transformación casearia, es decir la conversión de leche en cuajada.

Los coagulantes que se utilizan en el proceso de elaboración del queso pueden ser enzimáticos o ácidos. En el caso del cuajo enzimático, las enzimas usadas para la coagulación pueden ser clasificadas en cuatro tipos, de acuerdo a la fuente: coagulante animal (renina), coagulante microbiano (enzimas de *R. miehei* y *C. parasítica*), coagulante vegetal extracto

de *Cynara cardunculus* y *Calotropis procera*) y fermentación producida por quimosina (quimosina pura) (<http://www.conocimientosweb.net/dcmt/ficha19355.html>).

En el caso de la coagulación ácida, los principales ácidos utilizados como coagulantes incluyen ácido málico, ácido cítrico, ácido acético, ácido clorhídrico y ácido fosfórico (Muthukumarappan y Swamy, 2017).

La coagulación consiste en la desestabilización de las micelas provocando su precipitación. La Figura 1.1 es una representación gráfica del proceso de coagulación.

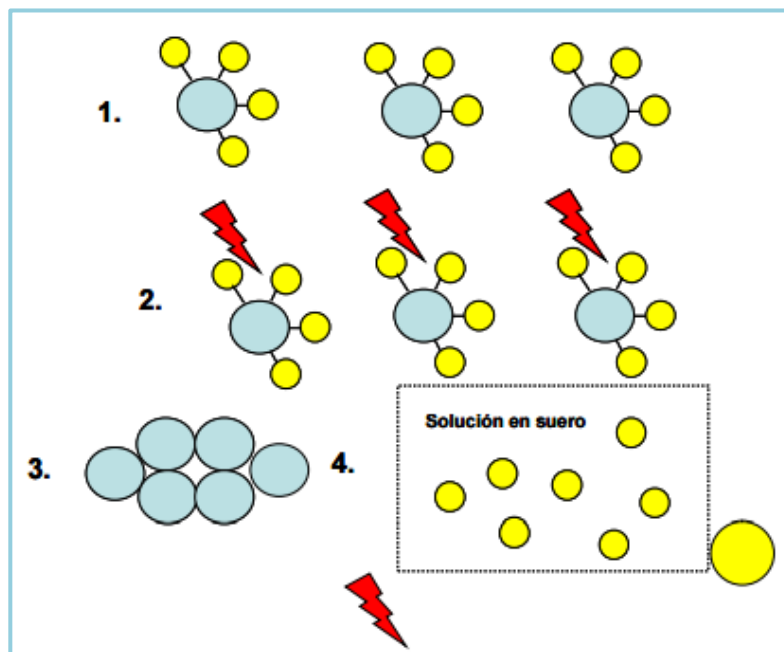


Figura 1.1: Representación esquemática de la coagulación de la leche por enzimas coagulantes (cuajo). 1. Micelas de caseína con la capa de κ -caseína intacta; 2. Ataque de las enzimas sobre los enlaces de la κ -caseína; 3. micelas en las que la κ -caseína ha sido mayoritariamente atacada, en proceso de agregación.

Si observamos atentamente la Figura 1.1., podemos deducir que para que se lleve a cabo la formación de la cuajada, es necesario que se produzca más de una etapa. Concretamente, es necesario que se completen dos etapas o fases:

- ✓ En la primera, llamada fase primaria las enzimas proteasas específicas que conforman el cuajo actúan modificando las micelas de caseína a través de proteólisis limitada (Figura 1.2). El cuajo agregado a la leche hidroliza la kappa-caseína desestabilizando las micelas. Esto se produce porque la renina presente en el cuajo ataca la cadena de

aminoácidos de la κ -caseína, específicamente entre las unidades 105 y 106. Como producto de esta hidrólisis, se obtiene por un lado el caseinomacropéptido (CMP) hidrofílico y soluble que difunde hacia el medio circundante; y por otro lado, se obtiene la para-kappa-caseína que es insoluble y permanece unida al núcleo de la micela.

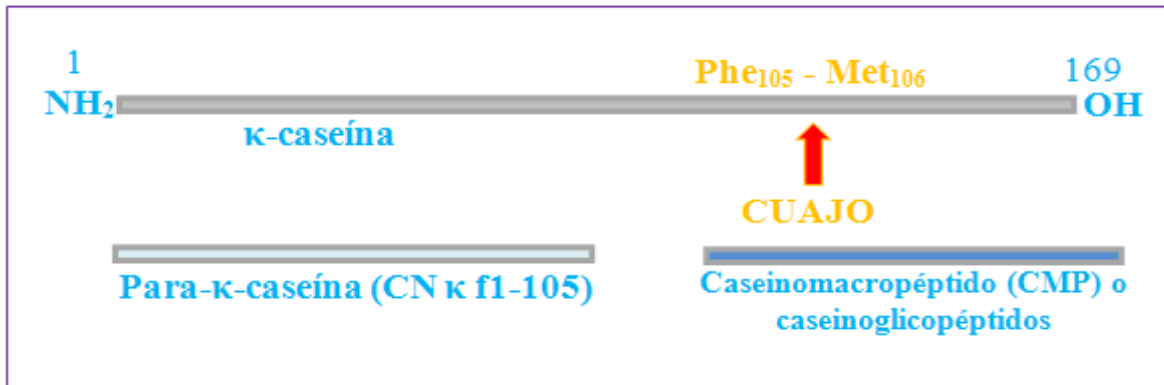


Figura 1.2: Fase primaria de coagulación-hidrólisis de κ -caseína

- ✓ En una segunda etapa, la fase secundaria, se produce la agregación inducida por el calcio de las micelas modificadas por la acción del cuajo. Cuando aproximadamente el 75% de la κ -caseína se ha hidrolizado, las micelas comienzan a agregarse. La paracaseína formada precipita en presencia de iones calcio. Se van formando unos agregados moleculares cada vez mayores, que crecen incluyendo a los glóbulos de grasa. La adición de cloruro de calcio a la leche aumenta la presencia de iones Ca^{2+} , lo que beneficia al proceso de coagulación.

El proceso general (fases primaria y secundaria) de la coagulación está representado en la Figura 1.3:

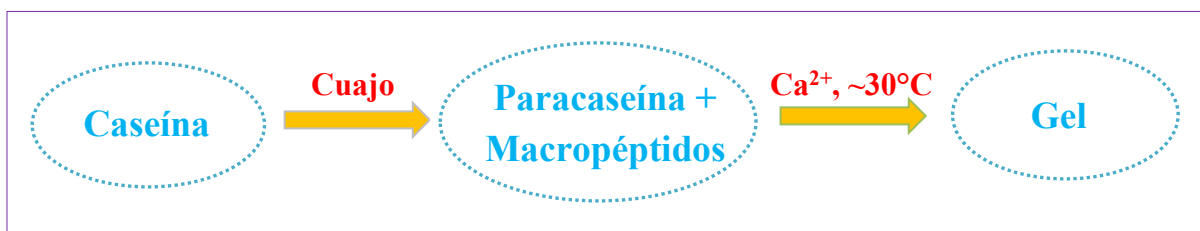


Figura 1.3: Proceso general de la coagulación de la caseína

1.1.4.4. Sal: Cloruro de sodio

La sal se adiciona con el objetivo principal de darle sabor al queso, aunque además sirve para alargar la vida útil de los mismos al frenar el crecimiento microbiano disminuyendo la actividad de agua. El porcentaje ideal depende del tipo de queso y del gusto del consumidor, aunque se puede decir que puede estar entre el 2 y el 3%.

1.1.4.5. Aditivos de la leche

Con el objetivo de corregir y mejorar las características de la leche para fabricar quesos se suelen utilizar algunos productos entre los que se destacan los siguientes (Madrid Vicente, 1996):

Cloruro de calcio (CaCl₂): El cloruro de calcio tiene como función darle mayor firmeza mecánica a la cuajada como se describió. Esto es particularmente importante cuando se trata de leche pasteurizada porque, durante la pasteurización, se da un proceso normal de descalcificación parcial de las caseínas.

Nitratos sódico y potásico: utilizados en las dosis apropiadas inhiben el desarrollo de bacterias butíricas y coliformes.

Colorantes: se utilizan para conseguir un color uniforme del queso, independientemente de las variaciones estacionales del color de la leche.

Enzimas diversas: se agregan micro-encapsuladas a la leche para que actúen durante la maduración, acortándola.

Agua oxigenada: en algunas variedades de queso se permite el agregado de agua oxigenada para su conservación.

Catalasa: en el caso de agregar agua oxigenada, también se permite la adición de catalasa que ayuda a desdoblarse el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

En la actualidad existen sistemas para mantener y controlar mejor la calidad de la leche (frío, bactofugación, etc.), con lo que se pueden disminuir e incluso suprimir los aditivos.

1.1.5. Producción de queso en Argentina

La Argentina ocupa un lugar de privilegio en el ámbito internacional en lo que respecta a la producción de queso, ubicándose hoy como el séptimo productor mundial de

este producto. Fue a mediados del siglo XIX cuando esta actividad productiva desarrolló su mayor crecimiento para alcanzar un importante protagonismo en la actualidad.

1.1.5.1.El comienzo de la actividad

Antes de 1850 se registran escasos datos sobre la producción quesera nacional. La alimentación de la población basada en carne era la justificación de la presencia de vacunos y ovinos en la región, ambos de escasa aptitud lechera. Se han encontrado registros del año 1617 de las Cartas Anuas en donde una autoridad jesuita expresaba que "de las vacas se obtenía leche para consumo y para elaborar queso, manteca y requesón; de las cabras y ovejas, leche para quesos". En 1788 aparece la actividad lechera como alternativa a la poca rentabilidad de los chacareros cercanos a la villa de Buenos Aires por venta de carne y cuero (actividad principal de la economía rioplatense). Domingo Faustino Sarmiento describe en "Facundo" que en 1810 existía una incipiente y casera producción de quesos. Hay además referencias que mencionan a los ranchos como los lugares donde comienzan a elaborarse los primeros quesos que se vendían en las calles, casa por casa, o en algunos negocios. Precisamente fue el queso denominado "tambero" el producto fresco o sazonado que se elaboraba allí.



A partir de 1886 se produjeron importantes cambios que significaron trascendentes para la expansión y mejora de la industria láctea nacional:

- ✓ La introducción al país de la primera desnatadora centrífuga en el año 1886 y consecuentemente la aparición de numerosos establecimientos industriales para la elaboración de manteca lo que trajo como consecuencia un gran aumento de la producción y notables volúmenes de exportación de este producto y de caseína.
- ✓ La multiplicación de "lecherías" en la ciudad de Buenos Aires (una muy famosa por su higiene fue "La Martona", que Vicente Casares instaló en 1899), en las cuales los clientes podían beber un vaso de leche y adquirir panes de manteca envuelta en papel impermeable.
- ✓ La obligatoriedad de pasteurizar la leche destinada a consumo público en todo el ámbito de la ciudad de Buenos Aires en el año 1907 (un año antes que en la ciudad de Chicago y cinco años antes que en la ciudad de Nueva York).

- ✓ La implementación del embotellado de la leche en el año 1910.
(www.quesosargentinos.gov.ar).

1.1.5.2. El sector en la actualidad

De los 14.000 tambos registrados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (S.A.G.P. y A.), el 50 por ciento de la producción de leche se destina a la actividad quesera (se divide en un 50% para elaborar quesos blandos, 35% para los semiduros y 15% para duros), el 24% se destina



a leche en polvo, el 19% va a leche fluida, pasteurizada y esterilizada, y el 7% restante a otros subproductos. Según el Centro de la Industria Lechera (2011), el sector industrial lechero está compuesto por algo más de 1.100 empresas registradas, que incluyen desde las más grandes hasta tambos fábrica (pequeños establecimientos que procesan sólo la leche que producen).

De esta manera, comparando a la Argentina con otros países reconocidamente lecheros, el país se caracteriza por tener una gran proporción de empresas lácteas, las cuales procesan la mitad de la producción nacional de leche y la transforman en quesos. Y a su vez, la mitad de esta producción quesera es desempeñada por más de mil pequeños establecimientos (<http://www.quesosargentinos.gov.ar/paginas/arg.htm>).

1.1.5.3. Consumo interno y exportación

La leche y los productos lácteos son componentes importantes de nuestra alimentación. El consumo de queso varía considerablemente de un país a otro. Japón y México tienen un consumo de queso per cápita bajo, 1,7 y 2,7 kg/año. En contraste, Grecia, Francia, Alemania, Holanda e Italia tienen un consumo per cápita mayor a 20 kg/año respectivamente (O'Callaghan y col., 2017). En América Latina, la Argentina es el país de mayor consumo de quesos con un consumo per cápita de 12 kg/año. Chile y Venezuela alcanzan niveles de 4 kg/año, Brasil alcanza los 2 kg/año y en Colombia apenas tienen un consumo de casi 1 kg/año.

La producción de queso mundial está proyectada a aumentar en un 19% entre 2008 y 2020 debido a un desarrollo continuo de la gama de productos disponibles y un aumento en el consumo de una dieta de estilo occidental.

De los quesos elaborados en Argentina, entre el 70 y el 75% de la producción es comercializada en el mercado interno: aproximadamente 13.000 tambos proveen a unas 870 queserías. Argentina es el séptimo productor mundial de quesos en un mercado relativamente estable.

Los quesos argentinos, en los últimos años, han sido el segundo producto lácteo en exportación (el primero es la leche en polvo). Un dato importante es que el queso llega a ocho de diez hogares argentinos (<http://www.quesosargentinos.gob.ar/>).

El consumo de queso en Argentina se distribuye del siguiente modo: el 43% se concentra en Gran Buenos Aires, un 23% se consume en la región Central, en el Litoral 18% y el 16% restante se divide entre Cuyo y el Noroeste del país.

Si se analizan las ventas en supermercados, los consumidores argentinos eligen, principalmente, los quesos blandos, con el 68,5 por ciento del volumen de ventas. Luego, le siguen los semiduros (22,8%) y los duros, que son los de mayor precio (5%). Los quesos agrupados en la categoría de “especiales”, que agrupa desde quesos untables hasta quesos en hebras, representan el 3% de las ventas de quesos en los grandes centros comerciales argentinos.

1.1.5.4. Producción de leche y queso de cabra en Argentina

Luego de la leche de vaca como materia prima para producción de queso, se encuentra la leche de cabra. En el mundo, la cantidad de cabras alcanza los 816 millones, siendo China el país con mayor rodeo (196 millones). Le siguen en importancia India (120 millones), Pakistán (57 millones) y Sudán (42 millones). La población caprina argentina representa sólo el 0,5% de la población mundial. Si bien también se destina a carne, cuero y pelo, las cabras generalmente se emplean en la producción de leche.

Entre otras propiedades, la leche de cabra cuenta con la capacidad de bajar el colesterol y favorecer la absorción de grasa, proteínas y minerales. El desarrollo de la producción caprina argentina está principalmente en manos de pequeños productores de

escasos recursos y bajo nivel sociocultural, constituyéndose en una de las principales actividades para el sustento familiar en zonas rurales.

Argentina tiene 4 millones de cabras distribuidas principalmente en tres provincias: Santiago del Estero (17,4% del hato caprino), Neuquén (16,7%) y Mendoza (16,6%). Existen aproximadamente unos 50.000 productores de cabras -carne, leche o fibras- concentradas en un 42% en el NOA. La producción de carne es, por tradición, la función más importante de la cría caprina argentina, principalmente en las zonas áridas y semiáridas del Noroeste argentino. Sin embargo, en los últimos años, la producción lechera ha evolucionado notablemente en diferentes regiones como, por ejemplo, en los alrededores de la ciudad de Bs. As., cuyo producto es utilizado principalmente para la producción de quesos artesanales. Uno de los puntos críticos más sobresalientes del sector es el alto grado de estacionalidad en la producción de leche. La concentración se realiza en épocas tales como la primavera y el verano, mientras que el consumo en los principales centros comerciales se mantiene relativamente constante a través del año (a excepción de los meses de enero y febrero que se percibe una leve caída). En el país se procesan aproximadamente 1,5 millones de litros de leche al año, de los que se obtienen alrededor de 150 toneladas de queso. En el 2006, se exportaron 848 toneladas de productos y subproductos caprinos por un valor de 5,2 millones de dólares. En materia de queso las exportaciones son de tipo marginal, donde sólo se exportó 1 tonelada de queso y con destino a Brasil (http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar/pcias_pdfs/cordoba/UIA_lacteo_caprino_08.pdf).

1.1.6. Valor nutricional del queso

El queso es un alimento con un alto valor nutricional ya que aporta proteínas, grasas, vitaminas y minerales a nuestra dieta.

- **Proteínas:** las proteínas que provee el queso son de alto valor biológico con perfil de aminoácidos muy favorables y de buena digestibilidad. Una ración de queso puede proporcionar 15 g de proteínas, es decir, entre el 20% y 30% de las recomendaciones diarias.
- **Minerales:** contiene grandes cantidades de calcio y fósforo. Además, contiene magnesio y sodio. El calcio es el más importante tanto por la cantidad que aporta como por su alta biodisponibilidad. Interviene en diversas funciones de nuestro organismo. No sólo

colabora en el mantenimiento de los huesos y dientes, sino que también interviene en la secreción de hormonas, enzimas y contracción de los músculos. Una ración de queso aporta 1.000-1.200 mg diarios. El fósforo por su parte participa en la producción de algunas proteínas y hormonas además de, junto con el calcio, fortalecer el esqueleto.

- **Vitaminas:** Aporta vitaminas A, D, B2 y B12. La vitamina A es necesaria para el crecimiento normal, la reproducción y el desarrollo fetal. La vitamina D colabora en la absorción del calcio y consecuentemente, ayuda al mantenimiento de la estructura ósea. La vitamina B12 interviene en el buen funcionamiento del sistema nervioso y el aparato cardiovascular. La vitamina B2 colabora en la obtención de energía de los alimentos, interviene en el mantenimiento de la piel, favorece la formación de anticuerpos, colabora en el mantenimiento de las mucosas.
- **Grasas:** Contiene grasas saturadas y colesterol al igual que todo alimento de origen animal. El porcentaje de grasas varía según el tipo de queso.

El queso es ideal para el crecimiento (infancia, adolescencia). Un adulto que pueda consumirlo sin contraindicación o límites médicos puede tomar 125 g de queso fresco al día.

Sin embargo, el alto contenido de grasas altamente saturadas y por ello peligrosas (entre 20 y 30 g cada 100 g), los altos valores de colesterol (90-100 mg/100 g) y el excesivo sodio (alrededor de 1 g por 100 g, casi la dosis extrema diaria) determinan que el queso tenga restricciones a su consumo (Lucas y col., 2008; Panjkota Krbavcic y col., 2004).

A partir de estas consideraciones, la mayor demanda actual del mercado, es la elaboración de quesos con contenido graso reducido para minimizar los efectos negativos. Con el propósito de compensar texturalmente el producto se pueden emplear diferentes tipos de almidones en los llamados “quesos de imitación” o análogos de queso (Duggan y col., 2008; Mounsey y O’Riordan, 2001). No obstante, más interesante resulta la adición de algún ingrediente, que aporte características funcionales específicas, como diversos cultivos de bacterias acidolácticas (Gomes da Cruz y col., 2009) que le confieren propiedades probióticas o, el empleo de polisacáridos con propiedades benéficas para la salud. Dentro de éste último grupo es de destacar la inulina, con la cual se han realizado algunas experiencias en quesos de imitación, en los que además aporta cualidades en la textura del producto (Henelly y col., 2006; Meyer y col., 2011).

1.2. Subproductos de la elaboración de queso: Lactosuero

1.2.1. Generalidades

El suero de quesería es un subproducto líquido de color verdoso amarillento que se obtiene luego de la precipitación y remoción de la caseína durante la elaboración del queso y representa entre el 80-90% del volumen total de la leche que va a ser procesada. Tiene una alta carga de carbono (DQO = 50-102 g/l) y contiene aproximadamente el 50% de los nutrientes de la leche original: lactosa (39-60 g/l; aproximadamente el 90% de la carga orgánica), grasas y proteínas (39-60 g/l y 27-60 g/l, respectivamente), y sales minerales (4,6-8 g/l), principalmente representados por NaCl, KCl y fosfatos de calcio (Prazeres y col., 2012; Colombo y col., 2016). Las estadísticas indican que una importante porción de este subproducto es descartado como efluente, lo cual crea un serio problema ambiental debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo, produciendo una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas. Cuando el suero se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto (Parra Huertas, 2009). Debido a esto, la disposición de este desecho es un desafío para la industria láctea, principalmente para las pequeñas y medianas empresas que no poseen una planta de tratamiento de desechos.

En el caso de producción de queso de cabras, es más marcado el descarte del suero como residuo, ya que las producciones son en general más pequeñas y artesanales, como ocurre en la provincia de San Luis. En efecto, en el país se procesan aproximadamente 1,5 millones de litros de leche por año, de los que se obtienen alrededor de 150 toneladas de queso artesanal en tambos, en su mayoría, de mano de obra familiar (http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/procal/estudios/04_Caprino/SectorCaprino_Argentina.pdf).

Como se mencionó, el lactosuero contiene proteínas de gran valor tanto nutricional como económico. Cerca del 70% de la proteína cruda que se encuentra en el suero corresponde a proteínas con un valor nutritivo superior al de la caseína. Las proteínas del suero son solubles en un amplio rango de pH y se desnaturalizan, individualmente y en solución, entre los 64 y 85°C, y a partir de esa temperatura empiezan a agregarse y a gelificar. Las proteínas séricas mayoritarias son la β -lactoglobulina (β -LG) y la α -lactoalbúmina (α -LA) y están fuertemente correlacionadas con el valor nutritivo y algunas propiedades

funcionales, tales como la capacidad gelificante y emulsionante. También se encuentran en concentraciones importantes la seroalbúmina (BSA) e inmunoglobulinas. La concentración de estas proteínas difiere de una especie a otra, siendo mayor en la leche de oveja y similar en la leche de vaca y cabra. Las proteínas minoritarias incluyen la lactoferrina y distintas enzimas como la plasmina y la lactoperoxidasa (Sturniolo, 2010).

1.2.2. Definición de Lactosuero

Según el Capítulo VIII correspondiente a Alimentos Lácteos del Código Alimentario Argentino, en el Artículo 582 - (Res 879, 5.6.85): "Con la denominación de Sueros de Lechería, se entienden los líquidos formados por parte de los componentes de la leche, que resultan de diversos procesos de elaboración de productos lácteos, a saber:

1. Suero de queso: es el subproducto líquido proveniente de la elaboración de quesos.
2. Suero de manteca: es el subproducto líquido proveniente del batido de la crema en la obtención de manteca.
3. Suero de caseína: es el subproducto líquido proveniente de la elaboración de caseínas.
4. Suero de ricota: es el líquido resultante de precipitar por el calor, en medio ácido, la lactoalbúmina y la lactoglobulina del suero de queso.

Cuando estos productos se utilicen como materias primas para la elaboración de productos alimenticios, deberán ser pasteurizados o esterilizados antes o durante el proceso de elaboración de dichos productos, no debiendo presentar un recuento mayor de 100 UFC bacterias coliformes/g después del tratamiento térmico. Queda prohibido alimentar animales con sueros de lechería que no hayan sido pasteurizados o esterilizados. Se exceptúa de esta exigencia los sueros provenientes de procesos de elaboración en los que se aplicaron dichos tratamientos"

1.2.3. Composición del lactosuero

La composición del lactosuero depende de varios factores tales como el tipo de coagulación utilizada para la precipitación de la caseína (enzimática o ácida), de las técnicas de elaboración queseras empleadas, del tratamiento al que se somete el suero líquido (tratamientos térmicos, pre-concentración, recuperación de los finos de caseína). Además, la composición del suero va a depender de las características químicas de la leche de la que proviene cuya composición también varía en función de diferentes factores como la época de lactación, alimentación, clima, raza, de las diferencias individuales de los animales y de los tratamientos previos (homogeneización, centrifugación, tratamiento térmico) que experimenta antes de la fabricación quesera (Parra Huertas, 2009; Sanmartín Estrada, 2010).

Si bien son diversos los factores que afectan al suero, a modo general podemos describir los siguientes componentes del suero:

- **Lactosa:**

La lactosa es el principal hidrato de carbono de la leche y, además, el principal componente del lactosuero (aparte del agua), constituyendo aproximadamente el 4,4 - 4,9% del total del suero (~ el 75% del extracto seco). Es un disacárido formado por una molécula de glucosa y otra de galactosa, que se sintetiza en la glándula mamaria. La concentración de lactosa en el suero depende de la proporción de lactosa original que ha sido degradada a ácido láctico, sin embargo, es un valor bastante constante.

La lactosa es un azúcar reductor, que en algunas circunstancias, puede reaccionar con los grupos aminos de las proteínas. Es una fuente de energía que juega un papel importante en la absorción del calcio. Posee una solubilidad limitada y una baja dulzura lo que restringe, en muchas ocasiones, su uso en alimentos, por lo que se suele hidrolizar antes de su utilización. La coloración amarillenta del suero puede ocurrir tras un tratamiento térmico prolongado o por reacciones de pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) entre la lactosa y las proteínas séricas.

Los sueros ácidos presentan menor contenido de lactosa que los sueros dulces, y consecuentemente, un alto contenido en ácido láctico ya que durante la fermentación bacteriana parte de la lactosa se transforma en ácido láctico.

- **Proteínas séricas:**

Las proteínas séricas son el componente de mayor valor nutricional y económico. Como proteínas de suero o proteínas solubles se engloba un conjunto de proteínas que permanecen en la fase líquida tras la precipitación de las caseínas a pH 4,6 y 20°C (Cheftel y col., 1989).

Algunos péptidos de bajo peso molecular procedentes de la hidrólisis de las caseínas, al ser solubles al pH y la temperatura citada también se incluyen en este grupo de proteínas. Estas proteínas constituyen aproximadamente el 0,7% del suero (8-11% del extracto seco). Además el suero también contiene 0,2-0,3% de nitrógeno no proteico.

El contenido proteico del suero depende en su mayor parte del tipo de coágulo y de su tratamiento y la presencia en el mismo de partículas de la cuajada puede aumentarlo considerablemente. En la leche, el 80% de las proteínas son caseínas; sin embargo, éstas se agregan en la cuajada durante la formación del queso, mientras que las proteínas séricas no quedan retenidas en la cuajada permaneciendo disueltas en la porción acuosa. Las proteínas séricas son incluso un grupo más heterogéneo que las caseínas, y tienen pocas características en común, exhibiendo una serie de propiedades únicas que dependen de su peso molecular, de su composición y su secuencia aminoacídica:

- Son solubles bajo condiciones que no lo son las caseínas (a pH 4,6-4,7).
- La mayoría son proteínas globulares.
- Se desnaturalizan fácilmente con el calor, mientras que las caseínas son más estables.
- Las caseínas presentan fuertes regiones hidrofóbicas mientras que las proteínas séricas poseen un mayor balance entre residuos hidrofílicos e hidrofóbicos.
- No se ven muy afectadas por el pH y las sales. No están fosforiladas y son insensibles al calcio.
- Presentan una estructura secundaria y terciaria más organizada que las caseínas debido a una distribución más uniforme de los tipos de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica y a la presencia de puentes disulfuro (lo que implica que poseen grandes cantidades de cisteína a diferencia de lo que ocurre en las caseínas).

Las proteínas del suero son solubles en un amplio rango de pH y se desnaturalizan, tanto individualmente como en solución, a temperaturas entre 64 y 85 °C, y a partir de esta temperatura empiezan a agregarse y a gelificar. La desnaturalización implica la pérdida de solubilidad proteica.

A continuación, se describen las proteínas mayoritarias:

- **β -lactoglobulina (β -LG):** Es la proteína mayoritaria en el suero de la leche de los ruminantes. Representa alrededor del 60% del total de las proteínas del suero de la leche de vaca, variando la concentración entre 2,3 y 4,9 g/l. En la leche de cabra la concentración se encuentra entre 1,8 y 2,8 g/l. Sin embargo, esta proteína no está presente en la leche humana y de roedores.

La β -lactoglobulina es poco estable frente a agentes desnaturalizantes tales como el calor, los álcalis, los compuestos orgánicos y los metales pesados, debido a la ausencia de grupos fosfatos, el bajo contenido en prolina (Pro) y la presencia de cisteína (Cys), cistina y metionina (Met). La acción de la temperatura sobre esta proteína provoca la disociación del dímero a monómero, la posterior desnaturalización del monómero con la exposición de los grupos sulfhidrilo y la formación de agregados siendo este proceso reversible o no en función de la intensidad y la duración del tratamiento.

- **α - lactoalbúmina (α -LA):** Representa el 25% de las proteínas del suero. En la leche de vaca la concentración varía entre 0,8 y 1,2 g/l y entre 0,6 y 1,1 g/l en la leche de cabra. La α - lactoalbúmina presenta una configuración estable a valores de pH entre 5,4 y 9, y es más estable al calor que la β -lactoglobulina. Se ha comprobado que liga fuertemente dos átomos de calcio y que la eliminación de este catión del medio provoca un cambio conformacional de la proteína y el incremento de la sensibilidad a agentes desnaturalizantes, como el calor o los productos químicos.
- **Seroalbumina (SA):** Se encuentra en el suero en una concentración aproximada de 0,3 g/l. Es una proteína de baja estabilidad térmica por lo que se desnaturaliza fácilmente. Tiene tendencia a unirse a otras moléculas, principalmente a ácidos

grasos, lo que le sirve de protección frente al ataque enzimático y a la desnaturalización térmica.

- **Inmunoglobulinas (Ig):** La concentración de Ig es de 0,6 g/l en el suero y diez veces mayor en el calostro.

- **Lactoferrina (Lf):** Las lactoferrinas constituyen una familia de glicoproteínas homólogas presentes en la leche de todas las especies vertebradas. Lactoferrina es la principal proteína de fijación de hierro en la leche de humanos y de yegua, por lo que desempeña un papel importante en el control de la absorción de este mineral y en la selección de la flora intestinal del neonato. Además, actúa en el sistema de defensa del organismo frente a las infecciones bacterianas debido a la formación de un complejo de la enzima con el tiocianato y el peróxido de hidrógeno. La leche humana contiene más de 2 mg de lactoferrina por ml dicha cantidad es 10-100 veces más que la contenida en la leche de cabra.

- **Proteínas menores y nitrógeno no proteico (NPN):** Las proteínas menores incluyen transferrinas, ferritina, proteasa peptona, calmodulina (calcio unido a proteína), prolactina y proteína de unión de folato. La leche de vaca y cabra contienen aproximadamente la misma cantidad de transferrina 20-200 µg/ml mientras que la leche humana contiene menos de 50 µg. El contenido de prolactina en la leche de cabra y vaca es de 44±5 µg y 50±1 µg respectivamente. Las concentraciones de proteínas ligante de folato en leche de cabra son más altas que en la leche de vaca. La fracción de proteasa peptona ha sido caracterizada como una fosfoglicoproteína insoluble en ácido tricloroacético 12%, es estable al calor y soluble en ácido a pH 4,6. El contenido de nitrógeno no proteico en la leche de cabra y humana es más alto que en la leche de vaca. El NPN incluye: amoníaco, urea, creatinina, creatina, ácido úrico, α amino nitrógeno y otros.

La concentración de estas proteínas da lugar a la obtención de concentrados proteicos de suero:

Concentrados proteicos de suero de queso: estos productos se obtienen por ultrafiltración seguida de liofilización del suero de queso. Tienen un alto contenido de proteínas séricas y un bajo contenido de grasas.

1.3. Alimentos Funcionales

1.3.1. Definición

Según la American Dietetic Association (ADA) Se entiende usualmente bajo la denominación de alimento funcional a cualquier alimento o ingrediente potencialmente saludable que pueda proveer beneficios a la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene.

La primera evidencia escrita sobre la existencia de alimentos funcionales, se encuentra en China en el año 1000 a.C. En Asia existe una larga tradición de atribuir propiedades curativas o terapéuticas a los alimentos y hierbas, basadas en tradiciones populares.

Hipócrates, el famoso médico griego, hace más de 2000 años atrás, dejó en su legado la frase mítica, “Que el alimento sea tu medicina y la medicina tu alimento” y si bien no utilizaba el término alimento funcional, implícitamente se estaba refiriendo a que el consumo de determinados alimentos podría ayudar a prevenir enfermedades. Situados en el siglo XXI, esta filosofía del “alimento como medicina” es la base del paradigma de los alimentos funcionales (Cadaval y col., 2005).

En los últimos años, ha aumentado considerablemente el interés de los responsables de la salud pública y de los consumidores por conocer la relación entre la dieta y la salud. Se ha investigado y demostrado que muchos alimentos tradicionales como las frutas, las verduras, el pescado y la leche contienen componentes beneficiosos para nuestro organismo. Los expertos recomiendan seguir una dieta sana, variada y equilibrada como la mejor manera de prevenir ciertas enfermedades. Sin embargo, los nuevos estilos de vida han provocado el abandono de ciertos hábitos de alimentación saludables que durante años han formado parte de nuestra historia y tradición. En la sociedad actual, la aparición de muchas enfermedades está relacionada con desequilibrios alimentarios frecuentemente provocados por la falta de

tiempo para cocinar, la enorme oferta de alimentos que hace difícil la toma de decisiones adecuadas, generando que no se ingieran todos los nutrientes que se necesitan o las cantidades adecuadas. Como consecuencia de esta situación, surgen los alimentos ‘funcionales’ que pueden compensar los desequilibrios alimentarios y garantizan las ingestas de nutrientes recomendadas por los especialistas en nutrición (Aranceta y Serra, 2003). En la actualidad no hay consenso a nivel internacional para definir a este grupo de alimentos, debido a que resulta muy complejo incluir en una sola categoría la amplia variedad de productos cuyos ingredientes y efectos en el organismo son muy diversos. A ello se suma la necesidad de tener una sólida fundamentación acerca de sus propiedades, ya que en muchos casos sus efectos pueden ser influidos por la interacción con sustancias provenientes de otros alimentos y/o del propio organismo.

A fines de la década de los noventa, luego de numerosos estudios de evaluación de la literatura existente, el ILSI (International Life Sciences Institute) Europa los definió de la siguiente forma: “un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas”. No se trata de comprimidos ni cápsulas, sino de productos que forman parte de un régimen normal. Cabe aclarar que los alimentos funcionales no curan ni previenen por sí solos alteraciones ni enfermedades, no son indispensables y sus efectos benéficos deben estar científicamente fundamentados. En este contexto, cobra relevancia la confusión existente hoy entre los consumidores, e incluso entre los mismos profesionales de la salud, sobre los alimentos funcionales y los beneficios que cada uno de ellos aporta a la salud (http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/55/articulos/R55_07_untemacomplejo.pdf).

Como se ha desarrollado anteriormente, la idea y uso de alimentos funcionales se remonta a tiempos antiguos, sin embargo el concepto de alimento funcional “per se” nace en Corea del Sur en los años 80s. En esa época, las autoridades alimentarias coreanas tomaron conciencia que para controlar los gastos en salud era necesario el desarrollo de alimentos que mejoraran la calidad de vida de la población, cubriendo ciertas 'deficiencias pandémicas'. Durante esos años se estableció por primera vez en Japón el concepto nutricional de

"Alimentos solamente naturales" (en inglés Foods for Only Natural, FON). A partir de allí, la demanda de este tipo de alimentación ha crecido espectacularmente en este país asiático.

De a poco fue apareciendo en diversos países europeos la necesidad de regular este tipo de alimentación. Es así que nacen proyectos específicos dentro del área de alimentación funcional bajo el auspicio del ILSI. Las patentes relacionadas al diseño de alimentos funcionales y su beneficio económico han generado gran interés por parte de la industria alimentaria. Los países industrializados deben encarar innovaciones y desafíos vinculados con la alimentación y la salud de la población ya que muchos factores interactúan para generar esta necesidad como: un enorme incremento del costo de la atención de la salud, mayor esperanza de vida, aumento del conocimiento científico, avances en tecnología alimentaria y en investigaciones sobre nutrición, y cambios en el estilo de vida. A su vez, cada vez más consumidores son conscientes de su autocuidado y buscan productos que contribuyan a su salud y bienestar. Ello lleva a la industria a desarrollar constantemente nuevos productos fortificados, enriquecidos, o con agregados de ciertas sustancias, así como alimentos libres de algún componente considerado nocivo (alérgenos, grasa, etc.).

1.3.2. Tipos de alimentos funcionales

Un alimento puede ser clasificado como funcional si durante su procesado se le ha realizado cualquiera de estas operaciones:

1. Eliminación de un componente alimenticio conocido como causante o determinante de una enfermedad. Ejemplos pueden ser las proteínas alergénicas de ciertos alimentos, la eliminación de la lactosa de ciertos productos lácteos.
2. Incremento en la concentración de un componente alimenticio. Esta operación de fortificación, o adición de un componente activo, hace que la dosis diaria del mismo se acerque a las recomendaciones de los organismos reguladores, lo que a la larga redundará en una disminución de riesgos de enfermedad.
3. Adición de un componente que no está presente en la mayoría de los alimentos. No necesariamente debe ser un macronutriente o un micronutriente.
4. Reemplazo de macronutrientes. Por regla general un macronutriente (como puede ser la grasa).

5. Incremento de la biodisponibilidad o estabilidad de un componente conocido con el objeto de producir un efecto funcional o reducir la aparición de enfermedades.

1.3.3. Propósito de los alimentos funcionales

Algunos de los alimentos funcionales se han diseñado para cubrir ciertos aspectos como:

1. **Funciones gastrointestinales.** Estas funciones incluyen aquellas que están asociadas a la microflora bacteriana en el colon, mediar en la actividad endocrina del tracto gastrointestinal, actuar sobre la actividad inmune del tracto, control de la biodisponibilidad (sobre todo de minerales), control del tiempo de tránsito.

2. **Sistemas redox y antioxidante.** Estos sistemas requieren un insumo balanceado de antioxidantes y (pro-) vitaminas así como de componentes alimentarios tales como los polifenoles y otros antioxidantes naturales de origen vegetal. Las actividades redox y la protección antioxidante son muy importantes para las células y tejidos y su desequilibrio se asocia con la aparición de diversas enfermedades. A pesar de estas hipótesis fundadas existen todavía problemas en la comunidad científica a la hora de demostrar los efectos beneficiosos de los antioxidantes en los alimentos funcionales.

3. **Metabolismo de macronutrientes.** Este objetivo es específico del metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos, y ácidos grasos.

4. **Fortalecimiento durante la gestación** - El alimento de la madre y del feto son objetivos en algunos alimentos funcionales, un ejemplo es el ácido fólico.

5. **Metabolismo xenobiótico** y su modulación mediante componentes no-nutritivos, tal como algunos fitoquímicos.

6. **Modificar el humor y la capacidad psicológica**

(Diplock y col., 1998).

1.3.4. Prebióticos

Los prebióticos son una especie de alimentos funcionales, definidos como: "Ingredientes no digeribles que afectan beneficiosamente al organismo mediante la

estimulación del crecimiento y actividad de una o varias cepas de bacterias en el colon, mejorando la salud".

Tanto los fructanos ramificados (los del agave) como los lineales (los de la raíz de la achicoria, inulina) son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas y pueden ser fermentados por la microflora colónica produciendo ácidos grasos de cadena corta (Crispín - Isidro y col., 2015).

En el presente trabajo de tesis, se emplearon ingredientes funcionales con características prebióticas como los polisacáridos entre ellos inulina y fructanos y otros como los concentrados proteicos de soja cuya incorporación en los alimentos contribuye a incrementar el contenido de proteínas de origen vegetal y podría aumentar el rendimiento a partir de proteínas de menor costo (Rinaldoni y col., 2014).

A continuación, se describen los mencionados ingredientes.

1.3.4.1. Inulina

La inulina es un carbohidrato de reserva que puede encontrarse en muchos vegetales como la achicoria, el ajo, la cebolla, etc. Es decir que está presente en nuestra dieta diaria.

Fue aislada por primera vez en 1804, a partir de la especie *Inula helenium*, por el científico alemán Rose. Más tarde, en 1818, Thomson, un científico británico, le dio el nombre actual (Madrigal y Sartoris, 2007).

- Industrialmente se obtiene principalmente de la raíz de la achicoria (*Cichoriumintybus*) y se la utiliza como ingrediente funcional en muchos alimentos ya que presenta ventajas tecnológicas y propiedades beneficiosas para la salud. La inulina junto a la oligofructosa y los fructooligosacáridos, forma parte de los llamados fructanos que también tienen uso en alimentos. Si bien recientemente se ha demostrado que la inulina proveniente de raíces de achicoria (GP 12) posee un grado de ramificación mínimo (1-2%) (Lara-Fiallos y col., 2017), la estructura química de la inulina consiste en una cadena lineal de moléculas de fructosa unidas por enlaces glicosídicos β -(2-1) (n=2-60) que terminan en una de glucosa unida a la última molécula de fructosa por un enlace α -(1-2) (Roberfroid, 2007). Estos enlaces son los responsables de que la inulina no sea digestible como lo sería cualquier carbohidrato (Figura.1.4).

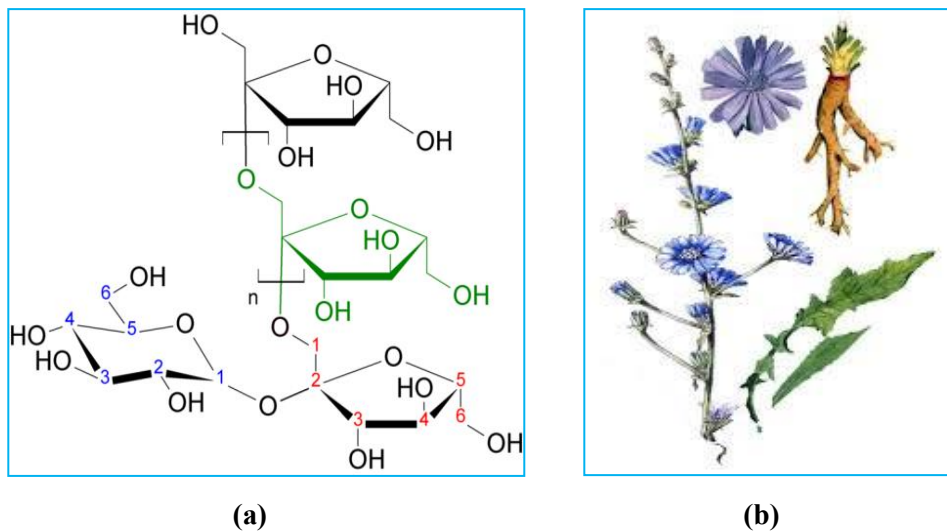


Figura 1.4: (a) Fórmula desarrollada de la inulina (b) Planta de achicoria (*Cichorium intybus*)

La inulina se utiliza en los alimentos por su capacidad de beneficiar el crecimiento de las bacterias benéficas del colon. Esto se debe a que la inulina no es digerida en la parte alta del intestino debido a los enlaces β -(2-1) que unen a las moléculas de fructosa. En el colon conviven bacterias perjudiciales y bacterias benéficas. Éstas fermentan los hidratos de carbono específicos, y a su vez mantienen el entorno de colon ligeramente ácido lo que favorece a las bacterias beneficiosas y evita que las perjudiciales u otros agentes patógenos se multipliquen. Al llegar al colon, la inulina es hidrolizada y fermentada por las bacterias benéficas allí presentes ayudando a mantener un ambiente sano. De esta manera, este tipo de compuestos se comportan como fibra dietética. Esto resulta muy interesante ya que hay alimentos con poco o nulo contenido de fibra como el queso, que pueden ser enriquecidos con inulina, obteniendo un alimento más saludable.

Los fructooligosacáridos (FOS) y los fructanos tipo inulina han sido los más estudiados como prebióticos incorporados a diferentes matrices alimenticias (Poinot y col., 2010; Rinaldoni y col., 2012, Rubel y col., 2014; Rodriguez Furlán y col., 2015, Palatnik y col., 2016). Además, su eficiencia como crio-protector de proteínas de plasma bovino ha sido recientemente demostrada (Rodriguez Furlán y col., 2010). Por otra parte, se utiliza ampliamente como ingrediente de alimentos funcionales por el suministro de fibra dietética, bajo valor calórico, disposición hipoglucémica, con una mejor biodisponibilidad de la

absorción de calcio y magnesio, reducción del riesgo de cáncer y el refuerzo de la respuesta inmune (Niness, 1999; Wang, 2009; Neyrinck y col., 2015).

La capacidad de formar geles es determinante en su uso como sustituto de grasas en productos lácteos, untables, aderezos, salsas y otros productos en los que las propiedades funcionales que otorgan las grasas son indispensables para lograr los efectos sensoriales deseados por los consumidores. Guggisberg y col. (2009), Guven y col. (2005), Kip y col. (2006) y Pasephol y col. (2008) mostraron que la adición de inulina especialmente de cadena larga en un yogur bajo en grasa se tradujo en una mayor cremosidad. Otros mostraron que este efecto también se produce en el queso bajo en grasa (Hennelly y col., 2006, Koca y Metin, 2004 y Pagliarini y Beatrice, 1994), en helado de yogur (El-Nagar, y col., 2002), en mousse de chocolate (Cardarelli y col., 2008) y en flanes (Tárrega y Costell, 2006; González-Tomás y col., 2009).

1.3.4.2. Fructanos de agave

Los fructanos se encuentran entre los prebióticos más estudiados. Son polímeros derivados de la molécula de sacarosa (Gibson y col., 2004; Henelly y col., 2006; Niness, 1999). Una fuente natural rica en estos compuestos son las plantas de agave, que pertenecen a la familia de *Agavaceae*; tienen tallos muy cortos, por los que sus hojas parecen crecer desde la raíz, formando una roseta. Sus hojas son verdes azuladas, de más de un metro en plantas salvajes, terminando en una espina marrón (Peña-Alvarez y col., 2004). Son abundantes en las regiones áridas de América Latina, siendo México considera como el centro de origen y diversidad biológica de las especies de agave. La diversidad taxonómica de ese país ha llevado al desarrollo de industrias para la producción de bebidas alcohólicas, fundamentalmente el tequila y recientemente, la producción de jarabe de agave y fructanos. La planta de agave toma entre 8 y 12 años para alcanzar la madurez. En este momento se produce la “jima”, que es un proceso manual de corte de las hojas y separación del tallo (Figura 1.5).

Los fructanos son considerados prebióticos ya que estimulan el crecimiento de bacterias benéficas para el organismo, como las bifidobacterias, e inhiben el crecimiento de bacterias patogénicas, además, no son digeridos por el sistema digestivo.



Figura 1.5: Jima de una planta de agave

1.3.5. Concentrados de soja

1.3.5.1. Definición

Las proteínas de soja presentan gran interés debido a su alta calidad nutricional y a la capacidad de reducir triglicéridos y colesterol. La Figura 1.6 muestra la planta y el poroto de soja.

Los concentrados comestibles de proteína de soja están disponibles como productos comerciales desde 1959. En los últimos años estos productos se han convertido en ingredientes importantes y bien aceptados por muchas industrias de alimentos. En muchas aplicaciones, simplemente sustituye las harinas de trigo. En otras tienen características específicas que no pueden ser realizadas con dichas harinas. Históricamente la necesidad del desarrollo de concentrados de proteína de soja se debió principalmente a partir de dos consideraciones: para aumentar la concentración de proteínas y para mejorar el sabor (Berk, 1992).

Los concentrados proteicos de soja presentan un contenido de proteína de entre el 52% y el 65% y contienen la mayoría de la fibra presente originalmente en las semillas de soja.

Existen también los “aislados de proteínas de soja” que contienen aproximadamente un 85%-90% de proteínas. Tanto en el caso de los concentrados como en el de los aislados, el proceso de fabricación tiene como objetivo reducir o eliminar los factores antinutrientes

presentes en la soja, especialmente los oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa) y las proteínas antigénicas (http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/concentrado-deprote%C3%ADna-de-soja-fermentaci%C3%B3n).

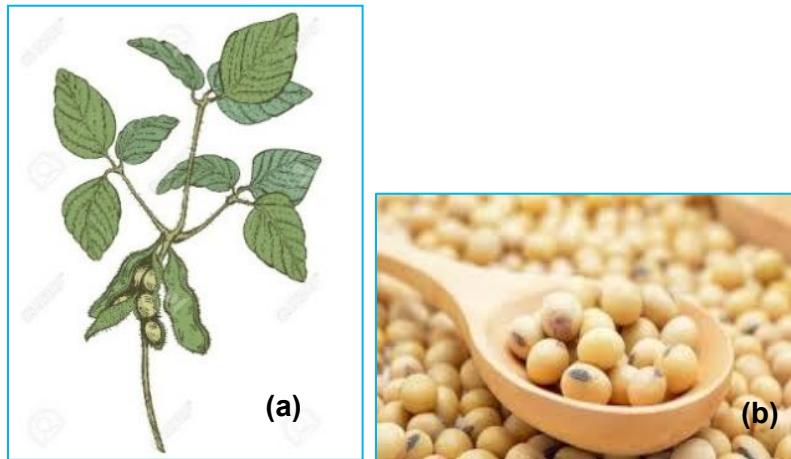


Figura 1.6: (a) Planta de soja (b) Porotos de soja

1.3.5.2. Usos

Además de la calidad nutricional de las proteínas de soja, los concentrados proteicos se utilizan ampliamente como ingrediente funcional en una amplia variedad de alimentos debido a que tiene un alto poder emulsionante y es buen absorbente de grasas, tiene una alta solubilidad y dispersabilidad.

Estos concentrados se usan principalmente en comidas precocinadas, cereales de desayuno y en algunos productos cárnicos. La proteína de soja concentrada se emplea en los productos cárnicos y avícolas para incrementar la retención de agua y grasa y mejorar los valores nutricionales (más proteínas, menos grasas). También se ha reportado el uso de concentrados proteicos de soja en quesos untables (Rinaldoni y col., 2014).

Asimismo se usan en comida para mascotas, sustitutos de la leche para terneros y cerdos, e incluso para algunas aplicaciones no alimentarias.

Una forma de obtener concentrados proteicos o realizar separaciones selectivas de componentes de la leche es mediante el uso de tecnología de membranas ya que a través de ellas se efectúa la separación de una corriente en dos fracciones sobre la base del tamaño molecular o de partícula. En el Capítulo 3 se detallan las aplicaciones de la tecnología de

membrana en el presente trabajo de tesis. A continuación, se describen algunos aspectos generales de esa tecnología.

1.4. Tecnología de membranas

1.4.1. Definición

La tecnología de membranas se ha convertido en una parte importante de la tecnología de la separación en los últimos decenios. Sus principales ventajas radican en el hecho que trabaja sin la adición de productos químicos, con un uso relativamente bajo de la energía siendo un proceso que se puede conducir con relativa facilidad. La tecnología de la membrana es un término genérico para una serie de procesos de separación diferentes y muy característicos, los cuales tienen en común el uso de una membrana.

En el sentido más general, una membrana puede definirse como un sistema sólido o líquido, cuyo espesor es muy pequeño comparado con su superficie, que actúa como barrera permitiendo el paso de una o más especies a través de ella. En esencia, la membrana actúa como una barrera selectiva dejando pasar a su través unos componentes y reteniendo otros de una mezcla o disolución en función del tamaño molecular. En una operación con membrana hay tres corrientes: alimentación, permeado y rechazo o concentrado. La alimentación es la disolución a tratar y se divide en las otras dos. El permeado está formado por las especies que han atravesado la membrana, mientras que el rechazo o concentrado es la corriente que no ha pasado a través de la membrana (Figura 1.7).

Hay dos formas según las cuales los diferentes componentes de las fases en contacto con la membrana pueden pasar a su través: a) mediante disolución en una cara de la membrana y posterior liberación en la otra, con la consiguiente disolución en la correspondiente fase externa, b) pasando a través de poros (llenos de agua o disolución), que forman parte de la estructura interna de la membrana. En cualquier caso, el proceso está gobernado por las propiedades tanto de la membrana como de las disoluciones en contacto con ella. Las propiedades que más influyen en este proceso de permeación o transporte son: el espesor, la solubilidad de las especies permeantes en la membrana, la carga eléctrica sobre la superficie de la membrana, así como el signo y densidad de aquella, cuando se trata de

permeantes cargados; el diámetro y la tortuosidad de los poros, la carga y la movilidad de los iones transportados a través de los poros.

Hay dos factores que determinan la efectividad de un proceso de filtración de membrana: selectividad y productividad. La selectividad se expresa mediante un parámetro llamado factor de retención o de separación (expresado en $l/m^2 h$). La productividad se expresa mediante un parámetro llamado flujo (expresado en $l/m^2 h$). La selectividad y la productividad dependen de la membrana.

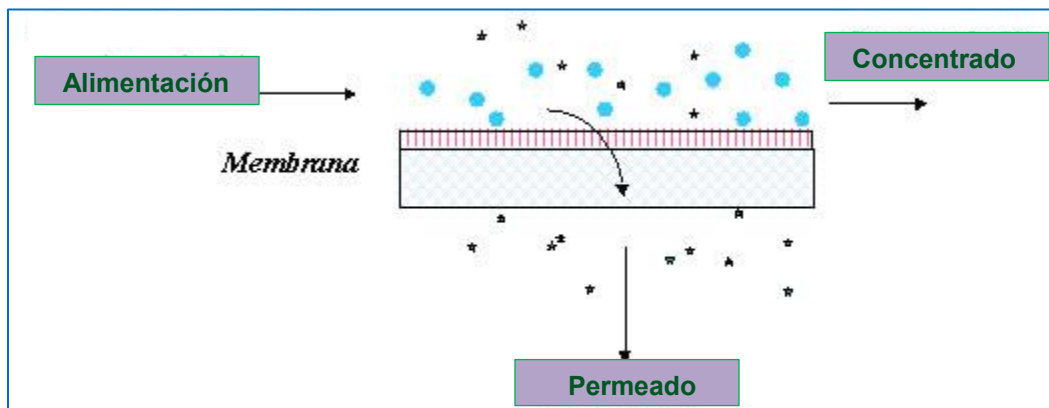


Figura 1.7: Esquema básico del proceso de filtración por membranas

1.4.2. Aplicación de tecnología de membrana en la industria de alimentos

La aplicación de las membranas en las industrias de alimentos y derivadas aumentó drásticamente en los años ochenta. Este es un hecho remarcable considerando que las manufacturas de alimentos son tradicionalmente bastante conservadoras en su acceso a la innovación y utilización de nueva tecnología. Sin embargo, desde su nacimiento en los años sesenta estas técnicas fueron seguidas con interés por parte de los industriales. Dado que esta industria opera con un margen de beneficio más pequeño que en otros sectores resultaba difícil justificar el costo de desechar las operaciones que eran habitualmente usadas, como la evaporación térmica y adoptar nuevas técnicas.

La aceptación de la tecnología de membrana por la industria de alimentos, finalmente, se debió en gran parte a: (a) avances en la ciencia de materiales de membrana (empleo de materiales más robustos y resistentes necesarios para las reglamentaciones de limpieza y sanidad exigidos por la industria); (b) mejoras en los diseños de los equipos; (c) un mejor

entendimiento del proceso de ensuciamiento y (d) un mayor conocimiento de los directivos de empresas alimentarias de la ciencia y tecnología de membranas.

En el fraccionamiento mediante membranas, la separación de una corriente en dos fracciones sobre la base del tamaño molecular o de partícula, es el uso primario de la ultrafiltración y una aplicación importante de la micro-filtración. Ambos procesos trabajan por exclusión de tamaño, permitiendo a las especies pequeñas pasar a través de la membrana mientras que las más grandes son retenidas, siendo un gradiente de presión la fuerza impulsora del proceso.

De lo expuesto, se desprende que la tecnología de separación con membranas parece una elección lógica para el fraccionamiento de la leche o el suero, debido a que se trata de una matriz formada por diferentes componentes de tamaños variados. Por otra parte, las proteínas de la leche son las proteínas animales que desde mayor tiempo y en mayor cantidad consume el hombre, porque se utilizan para reemplazar la leche materna y como alimento esencial de los adultos. Además la leche y sus derivados, entran en la composición de numerosos alimentos domésticos o industriales y esta tendencia sigue en aumento.

La Figura 1.8 muestra la relación existente entre los tamaños de los componentes de la leche y los diferentes procesos de membrana impulsados por presión que pueden emplearse, según sea el objetivo buscado.

A continuación, se desarrollan algunas aplicaciones de las membranas dentro de la industria lechera:

- ✓ **Aprovechamiento y tratamiento del suero lácteo:** El suero de la leche es producido en grandes cantidades a nivel mundial siendo su desecho uno de los importantes problemas de la industria (Steinhauer y col. 2015). El suero contiene más de la mitad de los sólidos presentes en la leche entera, incluyendo el 20% de las proteínas, así como un 75% de materia seca en forma de lactosa, y un 8% de materia seca correspondiente a la fracción mineral. Es por ello que actualmente se le visualiza como una materia prima en lugar de como un desecho, donde el mayor esfuerzo se centra en la recuperación de las proteínas y de muchas de las vitaminas que contiene, como las del complejo B.

Los recuperados presentan una amplia gama de usos industriales como la confitería, la fabricación de bebidas hidratantes, panadería, industria cárnica, etc. En estas

industrias se aprovechan sus propiedades funcionales como la gelificación, la capacidad de retención de agua, la emulsificación y la capacidad espumante (Macedo y col., 2015; Sluková y col. 2016; Palatnik y col., 2015). Algunas investigaciones les otorgan a los concentrados de proteína láctea propiedades estimulantes del sistema inmunológico.

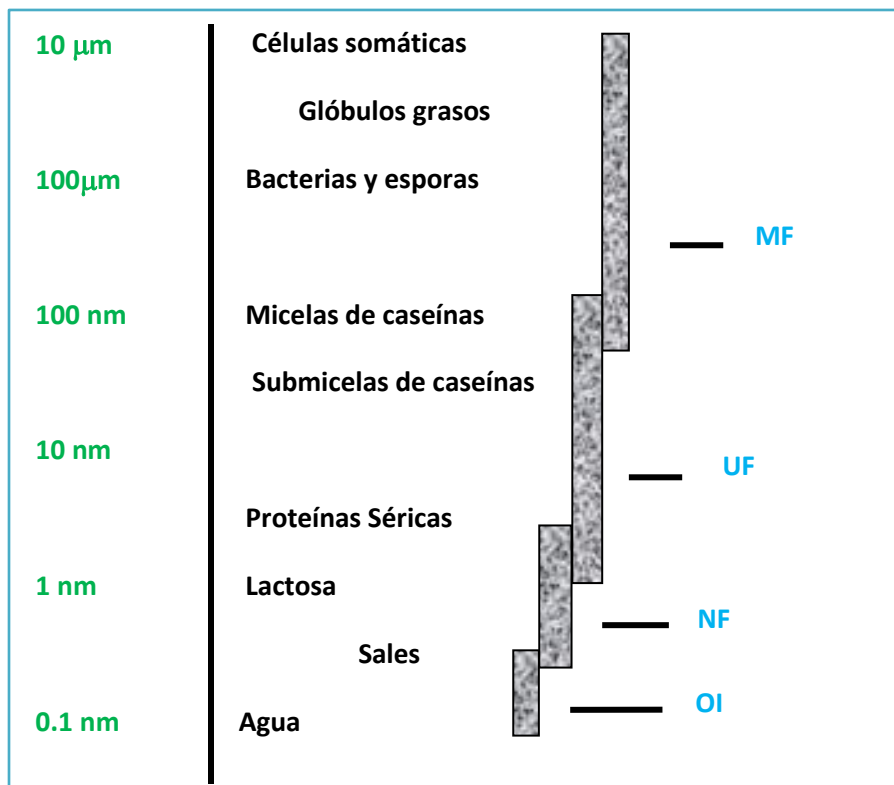


Figura 1.8: Componentes de la leche: tamaño e indicación del proceso de membrana.
MF: microfiltración, UF: ultrafiltración, NF: nanofiltración, OI: Ósmosis inversa

- ✓ **Concentración de la leche para el mejoramiento de sus características técnicas durante la manufactura de productos derivados:** Por medio de los procesos de membranas es posible mejorar las características técnicas de la leche empleando procesos de concentración que eliminan agua, sales minerales y lactosa. Estos generan mejores cualidades de cuajado, mejores rendimientos al incorporarse proteínas que normalmente se pierden en el suero, y menores tasas de sinéresis cuando se procesa la leche (Rinaldoni y col. 2009b; Mercier-Bouchard, 2017).
- ✓ **Filtración de membrana en productos lácteos con fines microbiológicos:** Procesos como la microfiltración son capaces de reducir la cantidad de bacterias y de esporas

sin afectar el sabor de la leche o sus propiedades reológicas generales, gracias a que no emplea ningún tratamiento térmico. Esto a su vez genera una vida útil en refrigeración más prolongadas (15 días) que la lograda por pasteurización tradicional (7 días) (Brans y col., 2004). Lo anterior es especialmente útil en la elaboración de ciertos quesos que tradicionalmente tienen como fundamento el uso de leche cruda.

- ✓ **Separación o reducción de la lactosa de la leche:** La lactosa puede separarse de la leche para formar disoluciones crudas, por medio de la remoción de las proteínas en sueros acidificados empleando microfiltración o ultrafiltración acompañadas de diafiltración (Rinaldoni y col., 2009b; Das y col., 2016).
- ✓ **Generación de bases queseras y pre-queso en polvo:** Por medio de la combinación de ultrafiltración y evaporación en un equipo de película rascada es posible lograr la obtención de bases queseras y pre-quesos en polvo.
- ✓ **Separación de caseinatos ácidos:** El proceso involucra una acidificación hidrolítica de la leche hasta alcanzar valores de pH cercanos a 4,9, y una recirculación de la misma en un sistema de electrodiálisis que separa los caseinatos ácidos a temperaturas por debajo de los 10 °C, para evitar problemas microbiológicos (Bazinet, 2005).
- ✓ **Eliminación de antibióticos en la leche:** Contaminantes tales como la sulfametazina pueden ser eliminados de la leche por medio de un proceso combinado de microfiltración y diafiltración con recirculado, empleando membranas de polisulfona de fibra hueca con un corte de 10000 daltons y temperaturas de 50 °C.
- ✓ **Concentración de inmunoglobulinas y separación de anticuerpos:** Generalmente se logra por técnicas de ultrafiltración y microfiltración.
- ✓ **Concentración de salmueras para el salado de quesos:** A pesar de que no es un proceso aplicado directamente a la leche, la concentración de salmueras por medio de nanofiltración y ósmosis inversa, es una importante aplicación de las técnicas de membranas dirigida a mantener una adecuada concentración de sal y a generar agua purificada (Twiford, 2004).
- ✓ **Tratamiento de aguas residuales:** Muchos procesos de membranas han sido sugeridos para el tratamiento y re-uso de aguas residuales de lecherías e industrias lácteas, especialmente la nanofiltración, la ultrafiltración o la ósmosis inversa, ya sea

como operaciones individuales o combinadas (Balannec y col., 2005; Cassano y col., 2015).

1.5. Objetivos del trabajo de Tesis Doctoral

Objetivos Generales:

- Desarrollar quesos con propiedades funcionales empleando metodologías adecuadas que impliquen una innovación tecnológica en la industria láctea.
- Emplear la tecnología de membranas para realizar separaciones, concentraciones y purificaciones que permitan obtener productos de alto valor agregado.
- Desarrollar posibles aplicaciones del principal subproducto, el lactosuero con la finalidad de aumentar la rentabilidad del proceso.
- Propender a la interacción del trabajo propuesto con el sector productivo regional.

Objetivos Específicos

1. Emplear la tecnología de membranas: microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF) para procesar las diversas disoluciones con el fin de lograr separar y concentrar las macromoléculas de interés.

La tecnología de membranas se aplicará para los siguientes propósitos:

- Obtener leche reducida en tenor graso.
 - Concentrar y separar proteínas de soja
 - Separar y purificar fracciones de fructanos de agave
 - Recuperar y concentrar las proteínas del lactosuero
2. Optimizar las condiciones operativas: velocidad de flujo de la alimentación, temperatura, factor de concentración, presión de transmembra aplicada, en los diferentes procesos con membranas utilizados con el propósito de minimizar los fenómenos de ensuciamiento de membrana.
 3. Poner a punto los protocolos de limpieza de las membranas, dependiendo de la solución de alimentación empleada, tiempos de operación y otras variables experimentales.

4. Optimizar el secado de los concentrados obtenidos de la permeación por liofilización como método de preservación de alimentos y sustancias en general, por descenso de la actividad del agua.
5. Sistematizar las etapas correspondientes a la elaboración de queso, contemplando diferentes características en la formulación:
 - a) Matriz de queso con la incorporación de fructooligosacáridos: inulina y fructanos de agave.
 - b) Matriz de queso con la incorporación de concentrados de soja
6. Caracterizar las materias primas empleadas en este trabajo, leche, suero, ingredientes funcionales y fracciones de los procesos con membranas en función de propiedades funcionales y físico-químicas de acuerdo a las normas vigentes
7. Estudiar la reología, la textura y microestructura de los productos desarrollados en forma comparativa con patrones de referencia. Analizar la correlación de estas determinaciones con la composición y propiedades de los quesos.
8. Desarrollar las metodologías apropiadas para efectuar el análisis sensorial de los productos obtenidos, con una adecuada aplicación del tratamiento estadístico de los datos.
9. Desarrollar un aderezo enriquecido en proteínas a partir del principal subproducto obtenido, en el proceso de producción de queso, el lactosuero.
10. Caracterizar el aderezo empleando las metodologías establecidas para este producto y de acuerdo a lo establecido en el CAA.

1.6. Descripción General del presente Trabajo de Tesis Doctoral

A partir de los Objetivos Generales y Específicos propuestos, el trabajo de tesis Doctoral, se ha estructurado en 7 Capítulos, con los siguientes contenidos:

Capítulo 1 Introducción donde se desarrollan conceptos vinculados a quesos, definición y procesos de elaboración, descripción de tipos y clasificación. Luego se presentan las diferentes materias primas empleadas en su preparación, especialmente aspectos vinculados a la leche y su composición; se describen datos relacionados con la producción de queso tanto de leche de vaca como de cabra. Se destaca el valor nutricional del queso; se definen los alimentos funcionales, y los diferentes tipos; se introduce el tema

de tecnología de membrana como una herramienta útil para realizar separaciones a temperatura ambiente, sin cambio de fase, siendo muy adecuada para las matrices estudiadas en este trabajo. Se describen además los Objetivos de la Tesis

En el *Capítulo 2*, se detallan las determinaciones y equipos empleados en la recolección de datos experimentales.

El *Capítulo 3*, describe la tecnología de membrana aplicada, las experiencias y los resultados obtenidos en los diferentes procesos empleados, como reducción del contenido graso de leche por microfiltración (MF), la concentración de proteínas de soja por ultrafiltración (UF) o la concentración y purificación de proteínas del lactosuero por MF y UF.

El *Capítulo 4*, muestra los desarrollos realizados en las formulaciones de quesos funcionales con la incorporación de fructooligosacáridos, inulina y fructanos de agave, la metodología de elaboración, la caracterización físico-química de los productos y las determinaciones realizadas como estudios de microscopía SEM, análisis sensorial, entre otros.

En el *Capítulo 5* se presentan los experimentos realizados incorporando un concentrado proteico de soja en el queso, estudios de vida útil, con las determinaciones microbiológicas, caracterización físico química y reología de los quesos desarrollados.

El *Capítulo 6* muestra el desarrollo de un aderezo proteico a partir de la recuperación de proteínas de suero de queso de cabra, de un establecimiento ubicado en las afueras de la ciudad de San Luis, su completa caracterización de acuerdo a las normas vigentes y análisis sensorial.

El *Capítulo 7*, resume las conclusiones a las que se arribó después del análisis e interpretación de todos los resultados obtenidos.

Financiamiento y concreción del Plan de Trabajo propuesto

La concreción del plan de trabajo propuesto se hizo posible gracias a las Becas del CONICET tipo I, (período 2012-2015) y Posgrado, (período 2015- 2017) y del Proyecto de Ciencia y Técnica 22-Q411 de la UNSL: “Membranas Procesos y Aplicaciones en Biotecnología, Alimentos y Medioambiente”, el Proyecto PICT 2012-0155: “Desarrollo de

productos alimenticios de alto valor agregado a partir de proteínas de origen animal y vegetal”, financiado por la Agencia de Promoción Científica y Técnica (período 2013-2016). Productores locales que facilitaron la materia prima, la leche y el suero. También el Instituto Nacional de Tecnología Industrial, en el Centro de Investigaciones de Tecnología Láctea, INTI Lácteos, Área de Desarrollo de Aplicaciones, en el cual la ing. Palatnik, realizó dos pasantías donde profundizó aspectos vinculados con determinaciones de textura y análisis sensorial en quesos. La colaboración con un grupo de Tepic, México con quienes realizamos trabajos en forma conjunta con los fructanos de agave. Muy especialmente, la colaboración inestimable de la Co-Directora de este trabajo, Dra. Noemí Zaritzky por su continua guía y revisión de trabajos y escritos, así como el equipamiento del CIDCA para las determinaciones de reología. Asimismo, se mencionan los aportes de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la UNSL y del Instituto de Investigaciones en Tecnología Química (INTEQUI-CCT- San Luis).

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Diana Palatnik



CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

En este Capítulo se describen métodos de análisis generales empleados en las distintas materias primas empleadas como en los diferentes productos obtenidos. Aquellos análisis o determinaciones de carácter más específico se detallan en el apartado correspondiente.

2.1. Determinaciones de la Composición Centesimal

Se realizaron determinaciones de composición centesimal tanto en la materia prima (leche cruda o lactosuero) utilizada en la producción de las muestras elaboradas en el marco de esta tesis, así como también en los quesos (con inulina, fructanos de agave y proteínas de soja), concentrados proteicos y aderezos. En los apartados subsiguientes se detallan cada una de estas determinaciones, las cuales, en todos los casos, se hicieron por triplicado.

Se emplearon metodologías estándares según (Association of Official Analytical Chemists, AOAC (2006).

2.1.1. Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas es un análisis muy importante a aplicar en diferentes matrices alimentarias ya que el dato obtenido a partir de este ensayo informa acerca del aspecto nutricional. En este caso, se realizó este análisis en leche, muestras de queso elaboradas y en los concentrados proteicos obtenidos (de soja y de lactosuero).

El contenido de proteínas totales se analizó por el método de Kjeldhal. El factor de conversión usado para la expresión de los resultados fue el correspondiente para productos lácteos que es de 6,38 (AOAC 978.04-968.01).

- **Fundamento teórico**

El método involucra la conversión del nitrógeno proteico presente a ion amonio, por oxidación con ácido sulfúrico, en una etapa que se denomina mineralización. Posteriormente se descompone el sulfato de amonio por alcalinización con hidróxido de sodio y se destila el amoníaco liberado captándolo en solución ácida. Finalmente se valora el amoníaco. Esta

determinación incluye todo el nitrógeno reducido presente en la muestra proveniente no sólo de proteínas, sino que se suman los grupos aminos, compuestos amoniacales, urea, aminoácidos, etc. Sin embargo, la presencia de estas últimas sustancias en nuestras muestras es generalmente pequeña.

Normalmente los resultados se expresan en g% de proteínas, para ello el valor obtenido de nitrógeno (N%) se multiplica por un factor de conversión. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

- **Instrumental**

- Bloques Digestores de 6 Plazas (Selecta S.A, España)
- Destilador Kjeldahl Semiautomático (Selecta S.A, España)

El equipamiento empleado se muestra en la Figura 2.1.

- **Reactivos**

- Sulfato de potasio K_2SO_4 (Merck): aumenta el punto de ebullición del ácido sulfúrico, el ataque se hace más drástico.
- Sulfato de cobre pentahidratado $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Merck): catalizador de la oxidación y acorta el tiempo de digestión de la muestra. Puede usarse Se o Hg.
- Ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4 (δ :1.84) (Merck)
- Solución de ácido bórico H_3BO_3 al 4% (Mallinckrodt).
- Hidróxido de sodio NaOH 40 % N (Anedra).
- Solución de ácido sulfúrico 0.1 N valorada (Merck).
- Reactivo de Tashiro (5 partes de solución alcohólica al 2% de verde de bromocresol y 1 parte de solución alcohólica al 2% de rojo de metilo): este reactivo es un indicador combinado que acorta el tiempo de viraje del punto final.

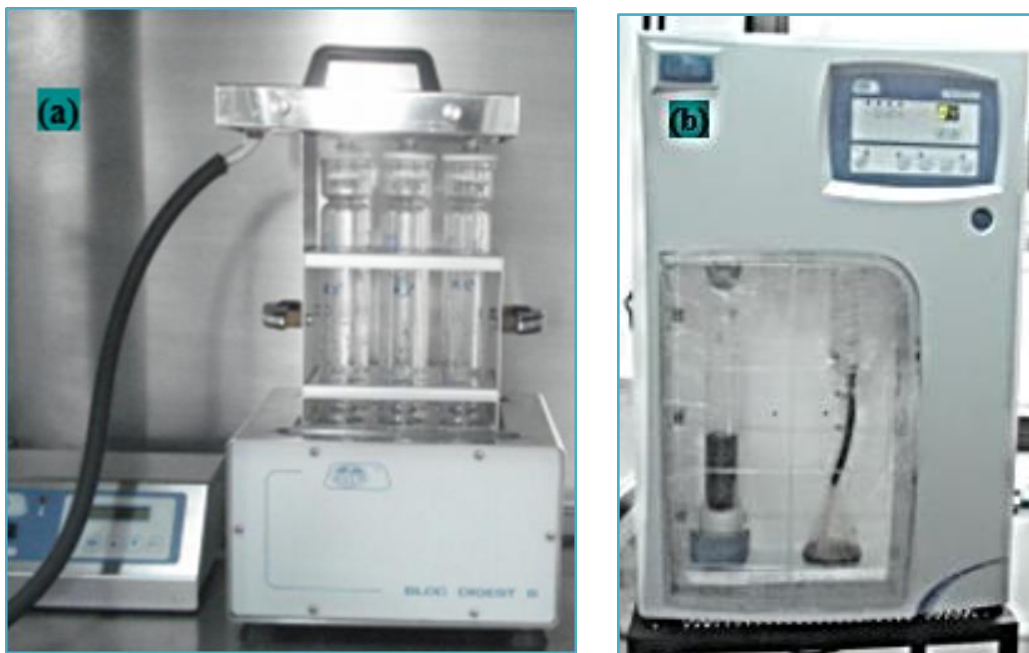


Figura 2.1: (a) Bloques digestores de 6 plazas; (b) Destilador Kjeldahl Semiautomático

- **Procedimiento**

- **Mineralización**

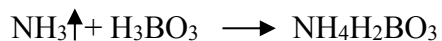
En la etapa de mineralización (o digestión) se produce la descomposición del nitrógeno que contienen las muestras orgánicas utilizando una solución de ácido concentrado.

En tubos de mineralización se coloca 1g de muestra, se agrega 1g de mezcla de K_2SO_4 - $CuSO_4$ (1:1) y 10 ml de H_2SO_4 (δ :1.84), se calienta y se lleva a ebullición suave en el digestor hasta la eliminación de agua, luego se aumenta el calentamiento hasta que la solución hierva suavemente. Una vez que el equipo entró en régimen, el tiempo de mineralización para la muestra fue de 90 min. Se considera que la muestra ha sido mineralizada cuando la misma adquiere un color verde claro translúcido. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente. El producto final en esta etapa es $(NH_4)_2SO_4$.

- **Destilación**

Luego de la mineralización se procede a la destilación. Para ello se miden 40 ml de solución de ácido bórico al 4% en un erlenmeyer de 250 ml que se coloca bajo el tubo de salida del refrigerante correspondiente al equipo destilador, agregando previamente seis gotas de reactivo de Tashiro. De esta manera, la solución se torna de color rojo ladrillo. Cuidadosamente se adicionan 50 ml de H_2O destilada a los tubos de mineralización antes de

que el contenido solidifique. Luego, se agregan 60 ml de NaOH 40 % neutralizando el líquido de la digestión. Comienza la destilación al caer la primera gota de amoníaco que vira de rojo a azul, este proceso dura 5 minutos.

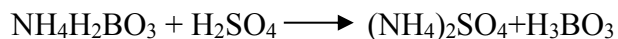


Rojo ladrillo

Azul

- Valoración

Se realiza con H₂SO₄ 0,1 N, y el punto final se visualiza por el indicador de azul al rojo ladrillo.



Azul

Rojo ladrillo

- Cálculos

Los resultados se expresan como porcentaje de proteínas totales, teniendo en cuenta el factor de conversión para productos lácteos que es 6,38.

$$\%N = \frac{\text{meq } N_2 \times (V_1 - V_0) \times N \times 100}{P} \quad (2.1)$$

y

$$\text{meq } N_2 = \frac{P_{at} N_2}{1000}$$

donde V₀: es el volumen gastado de H₂SO₄ con el blanco; V₁ es el volumen gastado de H₂SO₄ con la muestra; N la normalidad de H₂SO₄; P el peso de la muestra.

2.1.2. Determinación del contenido de ceniza

Se realizó la determinación de contenido de cenizas de la leche, en los quesos elaborados y de los productos liofilizados (concentrados proteicos) por triplicado (AOAC 930.15).

- **Fundamento**

La determinación de cenizas totales involucra la diferencia entre la oxidación de toda la materia orgánica presente en una cantidad exactamente pesada de la muestra homogénea y la pesada posterior de las cenizas blancas resultantes.

- **Instrumental**

- Horno mufla (Indef modelo 132, Argentina) con programador automático de temperatura.
- Estufa (ELIBET, Argentina)
- Balanza analítica (Kern 770, USA)

- **Procedimiento**

Se trabaja con cápsula de porcelana, previamente lavada con detergente y agua destilada, se coloca en mufla a 500 °C durante 60 min, se deja enfriar en desecador y se pesa. Este procedimiento se repite hasta lograr peso constante.

Sobre las cápsulas se colocan 3 g para las muestras sólidas o 5 g para las muestras líquidas. Posteriormente se colocan las muestras en una estufa, donde primero se oxida la muestra calentando a 70 °C durante 20 hs hasta caramelizarse para evitar pérdidas por proyección. Se continúa en una mufla a 500-520 °C, hasta obtener cenizas blancas de peso constante (se realiza registro de datos luego de enfriar la muestra en un desecador).

- **Cálculo y expresión de resultados**

El porcentaje del contenido de cenizas se determinó por diferencia de peso entre el peso inicial y el final de las muestras:

$$Ceniza = \frac{P_f}{P_i} \times 100 \quad (2.2)$$

2.1.3. Determinación de humedad

- **Fundamento teórico**

Se entiende por humedad la pérdida de masa durante el proceso de desecación determinado por el método descrito a continuación. La masa residual de la muestra se determina tras desecación a presión atmosférica en una estufa a $85^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ hasta obtención de una masa constante. La pérdida de masa se calcula en porcentaje de la masa de muestra. Esta determinación se realizó en la leche utilizada en la elaboración de quesos, en las muestras de quesos, en los concentrados proteicos tanto de soja como de lactosuero y también en las muestras de aderezo.

- **Procedimiento**

Para realizar esta determinación, se toma un gramo de muestra y se la coloca en una cápsula de porcelana previamente tarada, a la que se pesa para luego llevarla a horno a 85°C durante 24 hs. Transcurrido ese tiempo, se sacan las cápsulas del horno y se las coloca en un desecador hasta enfriar. Finalmente se pesan y por diferencia de pesos entre la cápsula con la muestra húmeda y seca, se determina el contenido de humedad

2.1.4. Determinación de contenido graso

- **Fundamento teórico**

Para la determinación de grasas se utilizó un método gravimétrico, basado en la extracción de la grasa por disolución en solventes orgánicos adecuados, evaporación del mismo y pesada de la grasa. El método universalmente adoptado es el método de Rosse Gottlieb (AOAC 15029).

- **Instrumental**

- Vasos de precipitado
- Tubos de Mojonier

- Pipetas
- Estufa (Elibet, Argentina)
- Balanza analítica (Kern 770, USA)

En la Figura 2.2 se observa el tubo Mojonnier durante una determinación de grasas.

- **Reactivos**

- NH_4OH concentrado: Rompe la emulsión disgregando las proteínas, los ácidos grasos libres reaccionan con el NH_4OH y quedan en la fase acuosa, de manera que no son extraídos posteriormente con el éter.



Figura 2.2: (a) Tubos de Mojonnier; (b) Tubo de Mojonnier durante determinación de grasas por Rosse Gottlieb

- Alcohol etílico: Sirve para romper la emulsión y la combinación grasa-proteínas, favoreciendo la precipitación de las proteínas y facilitando el ataque y disolución de las mismas por el NH_4OH . Además, como el alcohol etílico es miscible en agua y parcialmente miscible en éter etílico, favorece el íntimo contacto del éter con la materia grasa de la fase acuosa, facilitando su extracción posterior.

- **Ácido clorhídrico:** Cuando se calienta la muestra en baño de agua hirviendo con ácido clorhídrico, éste rompe las proteínas y separa las grasas como una capa que flota sobre el líquido ácido. De este modo, las proteínas se disuelven en ácido y la grasa que se separa puede ser extraída con éter.
- **Éter etílico:** Extrae las grasas pero solubiliza también algunas sustancias no grasas como la lactosa.
- **Éter de petróleo:** Extrae solamente materia grasa. Si sólo se usase éter de petróleo, al ser éste más hidrófobo, no extraería bien las grasas de la fase acuosa y el error sería por defecto

- **Procedimiento**

Para determinar el contenido graso de los quesos se realizó un experimento basado en el método de Rosse Gottlieb para leche. Para esto se tomó una muestra de un gramo de la matriz del queso, se lo cortó en trozos bien pequeños, se los colocó en un vaso de precipitados y se agregaron 1 ml de NH_4OH y 9 ml de alcohol etílico y se lo llevó a calentamiento hasta ebullición. Apenas comenzó a hervir, se agregaron 10 ml de HCl y trozos de porcelana y se tapó el vaso con vidrio de reloj. Se dejó en ebullición durante 5 minutos, se sacó del calor y se dejó enfriar. Luego se colocó la muestra digerida en un tubo Mojonnier y se le agregaron 10 ml de alcohol etílico, se agitó y se dejó enfriar nuevamente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregaron 25 ml de éter etílico y se agitó durante 1 minuto, luego se agregaron 25 ml de éter de petróleo y se agitó durante 30 segundos más. Se dejó reposar hasta que las fases estuvieran bien separadas y luego se transfirió el extracto etéreo a un vaso de precipitados previamente tarado. Este proceso se volvió a realizar para asegurar la extracción de toda la fracción grasa de la muestra. Se llevó el vaso a calentamiento para permitir la evaporación del éter, se dejó enfriar y se pesó. Para conocer el porcentaje de grasas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{Vg-V}{gm} \times 100 \quad (2.3)$$

donde V_g es el peso del vaso más grasas; V es el peso del vaso solo y g_m es el peso de la muestra.

2.1.5. Determinación de azúcares disueltos por refractometría

Este método se utilizó exclusivamente para determinar la cantidad de fructanos retenida en las muestras de queso adicionados con fructanos de agave.

- **Fundamento teórico**

Se denomina refractometría, al método óptico que determina la velocidad de propagación de la luz en un medio/compuesto/substancia/cuerpo, la cual se relaciona directamente con la densidad de este medio/compuesto/substancia/cuerpo. Para emplear este principio se utiliza la refracción de la luz, (la cual es una propiedad física fundamental de cualquier sustancia), y la escala de medición de este principio se llama índice de refracción. Los refractómetros son los instrumentos que emplean este principio de refracción ya sea el de refracción, (empleando varios prismas), o el de ángulo crítico, (empleando sólo un prisma), y su escala primaria de medición es el índice de refracción, a partir de la cual se construyen las diferentes escalas específicas, Brix (azúcar), densidad específica, porcentaje de sal, etc.

- **Instrumental**

- Refractómetro de rango 0-32°Brix (Arcano, China)

- **Procedimiento**

La medición de azúcares se realizó sobre el suero, subproducto de la elaboración de los quesos. Se tomó una pequeña gota de suero, se la colocó en el refractómetro de rango y se leyó a contraluz la cantidad de grados Brix correspondientes a la muestra.

2.1.6. Determinación de contenido de inulina por HPLC

Este análisis se utilizó para determinar inulina en quesos blandos y en quesos crema con inulina (Capítulo 4) y los sueros obtenidos durante su elaboración.

- **Fundamento teórico**

La determinación de inulina se realizó por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con columna de intercambio iónica con detector de índice de refracción, dado que la inulina no puede determinarse por el método clásico de análisis de fibra dietética, método AOAC International 985.29 143 (método enzimático-gravimétrico), debido a que precipita parcialmente en la etapa de tratamiento con alcohol

- **Instrumental**

- Columna Nucleogel Sugar 810 Ca
- Cromatógrafo Waters con detector IR Waters R401
- Molinillo de café
- Centrífuga

- **Reactivos**

- Etanol
- Agua desionizada

- **Procedimiento**

Los métodos clásicos analíticos para medir fibra dietaria no son efectivos para medir inulina. Por ello, se determinó la misma por el método propuesto por Zuleta y Sambucetti, 2001. Se trata de un método cromatográfico por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performance) por intercambio iónico. El cromatógrafo utiliza una columna Nucleogel Sugar 810 Ca y un detector de índice de refracción. Se empleó agua deionizada a 85° como fase móvil y un caudal de flujo de 0,6 ml/min.

Antes de la corrida se procedió a una desproteinización de las muestras. Para esto se picaron pedacitos de queso en un molinillo de café, se pesaron 2 g y se los colocaron en tubos

de plástico. Luego se agregaron 20 ml de alcohol al 80%, se colocó los tubos en un vaso de precipitados con un poco de agua y se llevó a calentador a una temperatura de 85°C durante 30 minutos con agitación constante usando un imán. Transcurridos los 30 minutos se llevaron los tubos a centrífuga para separar correctamente las fases. Paralelamente se preparó un estándar de inulina al 1% (0,25g en 25 ml de agua ultrapura) para comparación.

En el caso de la determinación en sueros de quesería, previo a la corrida cromatográfica, se filtraron utilizando filtros de 0,20 μ l (Chromafil Xtra RC 20/25).

2.2. Determinaciones fisico-químicas

Se realizaron determinaciones fisicoquímicas en las muestras de quesos (con inulina y con concentrados proteicos de soja) y en las muestras de aderezo.

2.2.1. Determinación de pH

- **Fundamento teórico**

Cuando se elaboran alimentos, es muy importante controlar el pH. Su valor debe estar dentro de un rango permitido y reglamentado lo cual dependerá del tipo de alimento ya que es una herramienta de conservación de alimentos y de control de procesos de transformación. Además, el valor del pH es un indicador de las buenas (o malas) condiciones de trabajo durante la elaboración

- **Instrumental**

- Peachímetro digital (Testo 206-pH2)

- **Procedimiento**

En cada una de las muestras de queso elaboradas se midió el pH controlando que estuviera dentro de los valores necesarios para evitar crecimiento de microorganismos patógenos. Además, se midió el pH de la leche con la que se elaboraron las muestras.

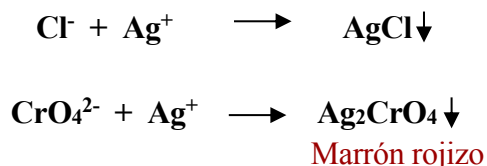
2.2.2. Determinación de ión cloruro por Método de Mohr

Este análisis se utilizó para determinar cloruros en muestras de aderezo (Capítulo 6).

• Fundamento teórico

El **método de Mohr**, es utilizado en valoraciones químicas de cloruros, con plata y con cromato potásico como indicador. La determinación de la sal NaCl, supone en general la determinación de los cloruros y su posterior transformación estequiométrica. El punto final de la valoración se reconoce por la formación de un precipitado marrón rojizo de cromato de plata ante un pequeño exceso de iones plata. Tiene una especial importancia el que la valoración sólo se pueda llevar a cabo a valores de pH entre 6,5 y 10,5, debido a que por encima de pH 10, el ion plata precipita como hidróxido de plata y por debajo de pH 6,5 el cromato de plata se solubiliza al protonarse los iones cromato, dificultando el indicativo del punto final.

Los iones cloruro precipitan durante la valoración con una solución patrón de nitrato de plata en presencia de cromato de potasio como indicador:



• Instrumental

- Bureta, pipeta
- Vaso de precipitado
- Erlenmeyer de 250 ml

• Reactivos

- Cromato de potasio K_2CrO_4 al 5-10%
- Nitrato de plata AgNO_3 0,1 N
- Hidróxido de sodio NaOH 0,1 N

- **Procedimiento**

Se prepara una muestra de 2,5 g de aderezo en 20 ml de agua hervida (libre de CO₂), se mide el pH y se sube con NaOH 0,1 N para trabajar en el rango que permite este método. La determinación de cloruros se realiza a través de una titulación directa en solución de AgNO₃ 0,1 N, utilizando de 3 a 5 gotas de CrO₄K₂ al 5-10% como indicador.

Cálculo de % de cloruros:

$$\%Cl = \{V \times N \times meq\} / gM \} \times 100 \quad (2.4)$$

donde:

V = volumen gastado de AgNO₃

N = normalidad de AgNO₃

PE = peso equivalente de Cl = peso molecular (35,5 g)

meq = PE/1000

gM = gramos de muestra

2.2.3. Determinaciones de parámetros reológicos

- **Fundamento teórico**

La textura, junto con el sabor y el aspecto, definen la calidad de un alimento, siendo ésta un aspecto importante en un producto ya que condiciona su aceptabilidad (Ibáñez y col., 1998). La importancia de la textura en la aceptabilidad general de los alimentos varía extensamente, dependiendo del tipo de alimento. En algunos casos, como en carnes o papas fritas, la textura es crítica. En otros, como en frutas, vegetales o quesos, la textura es importante, pero no llega a ser crítica; y existen alimentos en los que la importancia de la textura es menor, como en la mayoría de las bebidas o sopas (Bourne, 2002).

La reología es una ciencia interdisciplinaria que estudia el flujo de los fluidos y la deformación de los sólidos cuando se someten a la acción de fuerzas externas. Esta ciencia pretende relacionar los esfuerzos con la deformación, la velocidad de deformación y el tiempo.

Los parámetros viscoelásticos que se estudiaron en este trabajo fueron:

✓ G' (Pa): Módulo dinámico elástico o módulo de almacenamiento está asociado con la energía almacenada en el material.

✓ G'' (Pa): Módulo dinámico viscoso o de pérdida es asociado con la energía disipada por el material.

✓ $\tan \delta$: es la medida de la capacidad de amortiguación (damping) del material y se obtiene aplicando la ecuación:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2.5)$$

Conocer las propiedades reológicas de los alimentos es importante para un proyecto y el cálculo de equipamientos, para el control de calidad del producto, tanto en las etapas intermedias de fabricación como en el producto final y para conocer la vida media del producto.

- **Instrumental**

- Reómetro oscilatorio Haake RS800 (con un sensor de temperatura) (Fig. 2.3. (a))
- Viscosímetro rotatorio Haake equipado con un sensor de control de temperatura (Figura 2.3(b))



Figura 2.3 (a): Reómetro oscilatorio Haake RS 800



Figura 2.3 (b): Viscosímetro rotatorio Haake

- **Procedimiento**

El comportamiento viscoelástico de las muestras se determinó con tests oscilatorios evaluando el módulo G' y el módulo viscoso G'' (Kealy, 2006). También se evaluó el ángulo del desplazamiento de fase ($\tan \delta = G''/G'$). Todas las medidas se realizaron por duplicado a 20°C en un reómetro oscilatorio equipado con un sensor de control de temperatura usando platos paralelos de 35 mm (PP 35/S) con una separación de platos de 1,5 mm. Se utilizaron

platos con las superficies dentadas tanto por arriba como por debajo para evitar la posibilidad de un deslizamiento.

Primero se realizaron pruebas de barrido de esfuerzo (0,01 – 1000 Pa) para determinar el rango viscoelástico lineal a frecuencia constante (1Hz-628 rad/seg); estas pruebas se llevaron a cabo usando las muestras de queso control y con el queso de mayor contenido de concentrado de proteínas de soja agregado para seleccionar el máximo esfuerzo correspondiente al rango viscoelástico lineal. El valor obtenido de 20 Pa se mantuvo en el barrido de frecuencias que se llevó a cabo en el rango de 0,1 – 600 rad/seg para todas las muestras testeadas. Además, se midió la viscosidad lineal con el viscosímetro rotatorio (con un rotor 2) el cual tiene una velocidad de cizalla de 3750 s^{-1} a $15 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

2.2.4. Análisis de textura

- **Fundamento**

La textura puede definirse como el conjunto de los atributos mecánicos, geométricos y de superficie de un producto que son perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles, visuales y auditivos (Rosenthal, 2001).

La textura juega un papel importante en la apreciación de una amplia gama de alimentos. La textura es una experiencia esencialmente humana que surge de la interacción con el alimento al momento de manipular o comer. Dicha percepción a menudo constituye un criterio para controlar la calidad y frecuentemente es un factor importante de selección o rechazo de un alimento (Lara y Lescano, 2004).

La corriente actual de normalización y estandarización internacional ha concordado en definir a la textura relacionada a “todos los atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto, perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles y, si es apropiado, visuales y auditivos”. Con base a esta definición, es factible medir de forma instrumental las características mecánicas primarias (dureza, cohesividad, viscosidad, elasticidad y adhesividad) y secundarias (fragilidad, masticabilidad y gomosidad).

Para la medición instrumental, se estima que la textura percibida del alimento, por las condiciones de procesado en la boca, podría estar directamente relacionada con la

deformación o cambio de las propiedades físicas del producto por efecto de la compresión mecánica o esfuerzo cortante.

En esta Tesis se utilizaron dos tipos de ensayo de textura: ensayo de penetración para quesos crema con inulina (Capítulo 4) y ensayo de compresión TPA para quesos con concentrado de soja (Capítulo 5).

2.2.4.1. Ensayo de penetración de la muestra

Una curva típica de un ensayo de penetración se muestra en la Figura 2.4 donde los parámetros estudiados en este ensayo fueron:

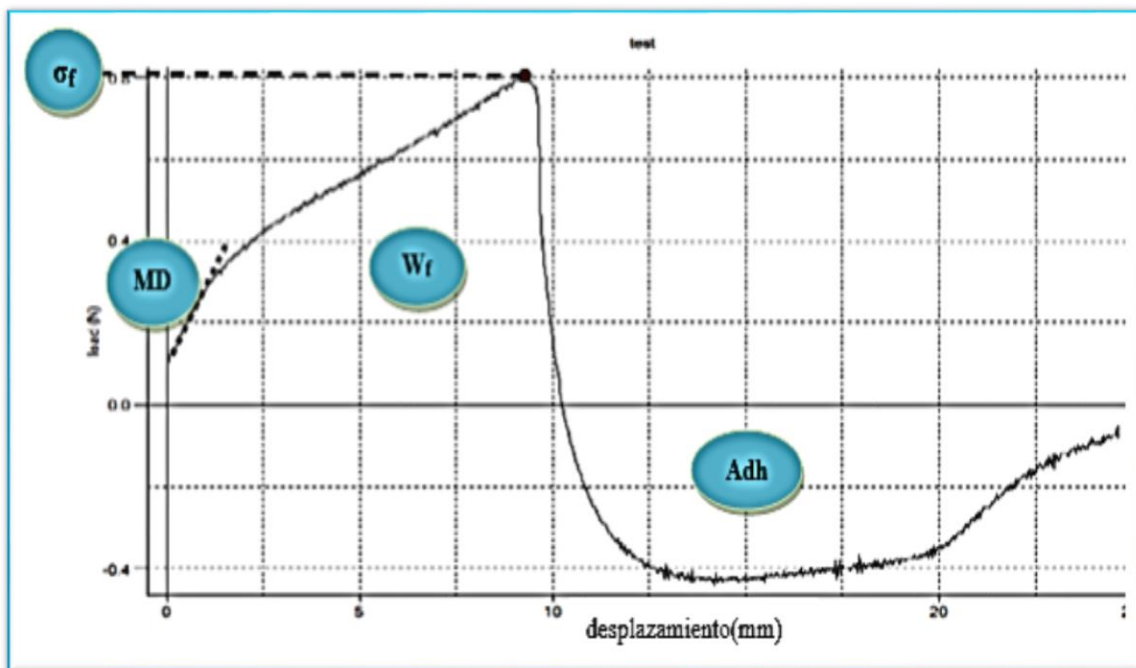


Figura 2.4: Curva obtenida a partir del análisis instrumental de textura

- ✓ *Módulo de deformabilidad* o (MD): Se calcula midiendo la pendiente de la parte lineal de la curva.
- ✓ *Esfuerzo máximo* (σ_f): Es el pico máximo de la curva y representa la fuerza alcanzada al final de la penetración. Su unidad de medida es el N.
- ✓ *Trabajo de penetración* (W_f): Es el área por debajo de la curva y representa el trabajo necesario para realizar la penetración. Se mide en N.seg ó N.mm.

- ✓ *Trabajo de Adhesión* (Adh): Es la fuerza que resiste la separación de dos cuerpos que están en contacto, en este caso, la fuerza que resiste la separación entre la probeta y la muestra de queso, está representada por el área negativa que se observa en el gráfico (N.seg ó N.mm).

- **Instrumental**

- Texturómetro TMS-PRO (Food Technology Corporation, USA)



Figura 2.5: Texturómetro TMS-PRO

En la Figura 2.5 se muestra una fotografía del equipo de textura utilizado. De acuerdo al tipo de ensayo, se utilizaron diferentes probetas y/o diferentes celdas de carga como así también diferentes condiciones de operación las cuales se fijan en el software del equipo.

- **Procedimiento**

Dado que el tipo de ensayo de textura elegido y los parámetros analizados dependieron de la muestra, el procedimiento específico se detalla en los capítulos correspondientes.

2.2.4.2. Ensayo TPA

Con la idea de correlacionar más las medidas instrumentales al comprimir una muestra con la propia masticación, se introdujo en los años 60 el perfil de textura instrumental (TPA, Texture Profile Analysis) que consiste en comprimir (alrededor de un 20%) dos veces consecutivas (sin llegar a romper) una muestra pequeña, simulando dos mordidas, y registrar una curva de la fuerza empleada en función del tiempo, o la distancia, ya que se suele comprimir a velocidad constante. En la Figura 2.6 se muestra una curva típica de un ensayo de TPA y algunos de los parámetros que se pueden obtener a partir de ella (Stable Micro Systems, 1996):

- ✓ *Fuerza máxima (H1)*: Máxima fuerza durante el primer ciclo de compresión. También se la conoce como “firmeza”. H2 es la máxima fuerza obtenida en el segundo ciclo de compresión.
- ✓ *Springiness o elasticidad (Sp)*: La altura que el alimento recupera durante el tiempo que transcurre entre el final del primer ciclo y el comienzo del segundo ciclo.
- ✓ *Adhesividad (Ad)*: es la máxima fuerza negativa del primer ciclo de compresión
- ✓ *Cohesividad*: Este parámetro se calcula a partir de las áreas del primer y segundo ciclo, A y B, como:

$$\text{Cohesividad} = \frac{\text{Área B}}{\text{Área A}} \quad (2.6)$$

- ✓ *Resiliencia*: Se calcula dividiendo la energía ascendente de la primera compresión por la energía descendente de la primera compresión.

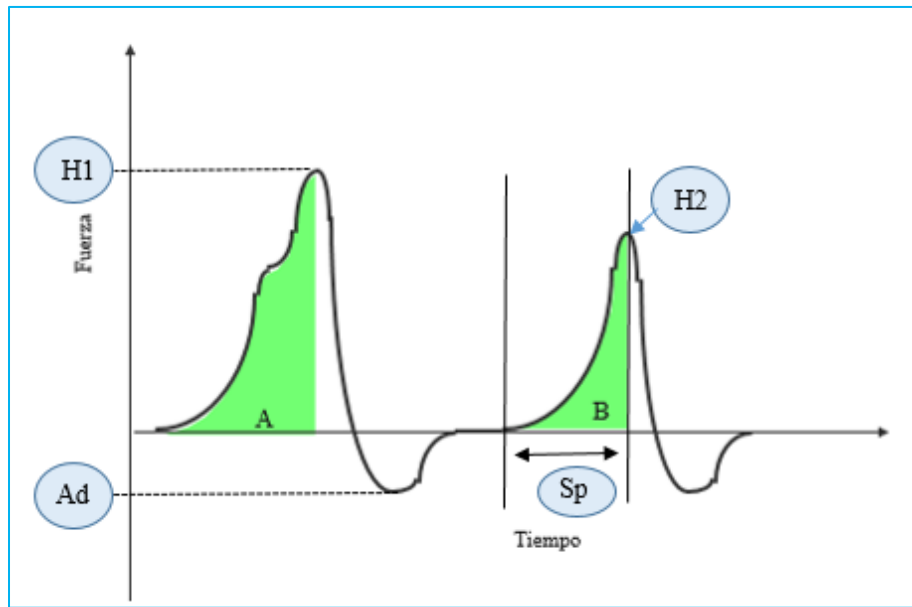


Figura 2.6.: Curva de TPA y parámetros de textura calculados a partir de ella.

2.2.5. Análisis instrumental de color

Este análisis se realizó en las muestras de queso elaboradas y también en muestras comerciales para comparación.

- **Fundamento**

La percepción del color está basada en referencias personales, por lo que es difícil comunicar objetivamente un color sin tener una norma que permita una comparación con precisión. Por esta razón es necesario el uso de instrumentos de medición que identifiquen un color y se le asigne un valor numérico. Dentro de los diferentes equipos empleados están los colorímetros espectrofotómetros que usan una fuente de luz para iluminar la muestra a medir. Estos dispositivos miden entonces la luz reflejada o transmitida por el objeto. Cada color tiene su propia apariencia basada en tres elementos: matiz, valor y croma. Al describir un color usando estos tres atributos se identifica con precisión un color específico y se distingue de cualquier otro.

En 1976, CIE (Comisión Internacional de la iluminación) especificó los espacios de color como se muestra en la Figura 2.7 al que se conoce como espacio de color CIE 1976

($L^*a^*b^*$) o CIELAB. El espacio CIELAB permite especificar estímulos de color en un espacio tridimensional donde:

- El eje L^* representa la luminosidad, donde cero es negro y cien es blanco.
- El eje a^* representa variación entre rojizo y verdoso y en él los valores positivos son rojos, los valores negativos verdes y el cero es neutral.
- El eje b^* representa el azul – amarillo y aquí los valores positivos son amarillos, los negativos son azules y el cero es el neutro.

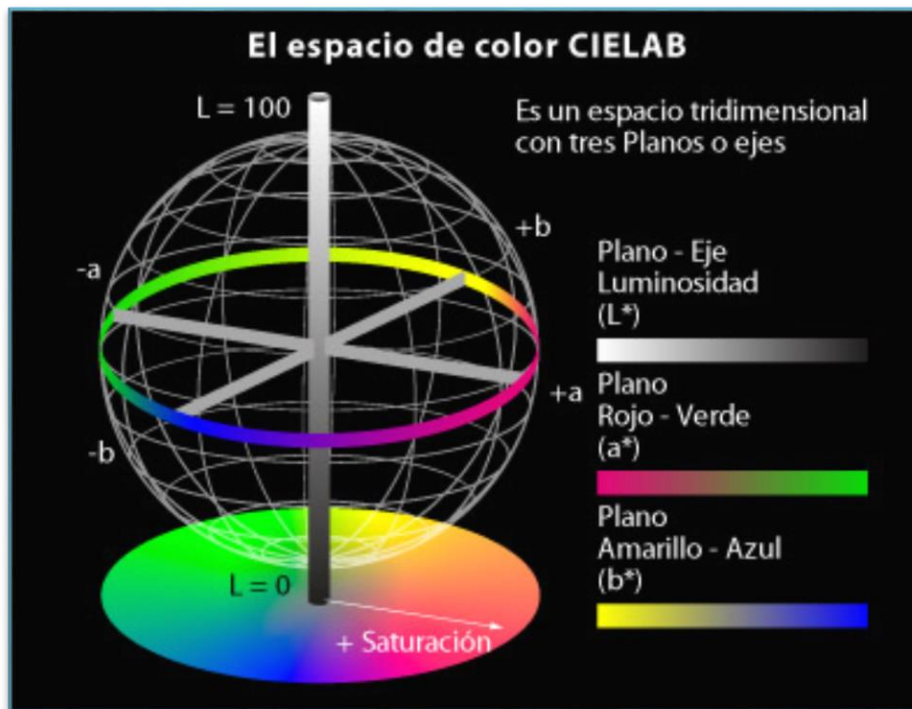


Figura 2.7: Gráfica de color Espacio CIELAB

Aquellos casos en los que $a^* = b^* = 0$ son acromáticos; por eso el eje L^* representa la escala acromática de grises que va de blanco a negro (<http://www.metas.com.mx/guiamet/la-Guia-MetAs-09-07-Medicion-de-color.pdf>, <http://www.hunterlab.com/pdf/color-s.pdf>).

- **Instrumental**

- Espectrofotómetro digital MiniScan EZ (Hunterlab, USA) que mide la luz reflectada

En la Figura 2.8 se muestra el colorímetro durante un ensayo de color sobre muestras de queso.



Figura 2.8: Colorímetro de superficies digital MiniScan EZ

- **Procedimiento**

El colorímetro se calibra con los colores blanco y negro estándares. Se realizan tres medidas en diferentes zonas superficiales de cada muestra y se promedian. El valor promedio es el que después se presenta en los resultados.

2.2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

- **Fundamento**

La microscopía electrónica de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope) se basa en el principio de la microscopía óptica en la que sustituye el haz de luz por un haz de electrones para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. El proceso consiste en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra.

Los microscopios electrónicos de barrido tienen una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución.

- **Instrumental**

- Microscopio electrónico de barrido LEO1450VP (Zeiss, Alemania).



Figura 2.9: Microscopio electrónico de barrido LEO1450VP

En la Figura 2.9 se presenta el equipo utilizado perteneciente al Laboratorio de microscopía electrónica y microanálisis (LABMEN-UNSL)

- **Procedimiento**

La microestructura de las muestras de queso con y sin inulina se analizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras de queso fueron montadas en cinta de carbono de doble cara adhesiva sobre un soporte de aluminio.

Las micrografías se obtuvieron en elevado vacío a 10 KeV. Las micrografías se determinaron bajo el modo presión variable (PV). El modo de bajo vacío de SEM es una forma especial, en donde una abertura a través de la columna y fija entre la cámara de SEM, permite que la cámara se mantenga (en donde se colocan las muestras) a bajo vacío a 70 Pa, mientras que la columna se mantiene en alto niveles de vacío. De esta manera es posible ver muestras sensibles, contenido biológico o de agua, sin la deshidratación de la muestra y metalizar (Sammons y Marquis, 1997).

2.3. Análisis microbiológicos

Los conteos microbiológicos se realizaron en los quesos con concentrados de soja, durante el almacenamiento. Se determinaron las poblaciones de coliformes sobre Agar-violeta cristal rojo neutro bilis (BRVA); las placas fueron incubados por 24 horas a 32°C (Christen y col., 1993). Los mohos y levaduras se desarrollaron sobre agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGCA) a 25°C por 5 días (Frank y col., 1993).

2.4. Análisis Sensorial

El análisis sensorial es una disciplina que surge durante la Segunda Guerra Mundial. El gran auge se produce cuando la industria alimenticia comienza a preparar las raciones alimentarias para los soldados, y se ve la necesidad de que estas sean apetecibles. Es en ese momento cuando se desarrollan distintas técnicas y se avanza sobre la normalización y el conocimiento de la percepción humana.

- **Fundamento**

El análisis sensorial se ha definido como una disciplina científica usada para medir, analizar e interpretar las reacciones percibidas por los sentidos de las personas hacia ciertas características de un alimento como son su sabor, olor, color y textura, por lo que el resultado de este complejo de sensaciones captadas e interpretadas son usadas para medir la calidad de los alimentos.

Dentro de las principales características sensoriales de los alimentos destacan: el olor, que es ocasionado por las sustancias volátiles liberadas del producto, las cuales son captadas por el olfato; el color es uno de los atributos visuales más importantes en los alimentos y es la luz reflejada en la superficie de los mismos, la cual es reconocida por la vista; la textura que es una de las características primarias que conforman la calidad sensorial, su definición no es sencilla porque es el resultado de la acción de estímulos de distinta naturaleza.

Analizar sensorialmente un alimento implica el uso de técnicas específicas perfectamente estandarizadas, con el objeto de disminuir la subjetividad en las respuestas. Las empresas lo usan para el control de calidad de sus productos, ya sea durante la etapa del desarrollo o durante el proceso de rutina. Por ejemplo, si cambian un insumo es necesario verificar si esto afecta las características sensoriales del producto y por ende su calidad. Ese es un buen momento para hacer un análisis y cotejar entre el producto anterior y el nuevo (<http://www.biblioteca.org.ar/libros/210470.pdf>).

2.4.1. Tipos de análisis

Existen diferentes tipos de análisis sensorial. Se mencionan tres grandes grupos: descriptivo, discriminativo y del consumidor. La elección de cada uno va a depender del tipo de producto o de las conclusiones a las cuales se quiera llegar.

- Análisis descriptivo

Consiste en la descripción de las propiedades sensoriales (parte cualitativa) y su medición (parte cuantitativa). Se entrena a los evaluadores durante seis a ocho sesiones en el que se intenta elaborar un conjunto de diez a quince adjetivos y nombres con los que se denominan a las sensaciones. Se suelen emplear unas diez personas por evaluación.

- Análisis discriminativo

Es utilizado para comprobar si hay diferencias entre productos, y la consulta al panel es cuánto difiere de un control o producto típico, pero no sus propiedades o atributos. Se hace un juicio global. Por ejemplo, ante una muestra A y una B, se pregunta cuál es la más dulce, o ante A, B y C, donde dos son iguales y una tercera es diferente, cuál es distinta.

- **Análisis del consumidor**

Se suele denominar también prueba hedónica y se trata de evaluar si el producto agrada o no, en este caso trata de evaluadores no entrenados, las pruebas deben ser lo más espontáneas posibles. El consumidor debe actuar como tal. Lo que sí se requiere, según la circunstancia, es que sea consumidor habitual del producto que está en evaluación. Para obtener una respuesta estadística aceptable se hace una consulta entre medio centenar, pudiendo llegar a la centena.

El análisis sensorial ha demostrado ser un instrumento de suma eficacia para el control de calidad y aceptabilidad de un alimento, ya que cuando ese alimento se quiere comercializar, debe cumplir los requisitos mínimos de higiene, inocuidad y calidad del producto, para que éste sea aceptado por el consumidor, más aun cuando se desea ser protegido por una denominación de origen los requisitos son mayores, ya que debe poseer los atributos característicos que justifican su calificación como producto protegido, es decir, que debe tener las características de identidad que le hacen ser reconocido por su nombre.

- **Procedimiento**

Se realizaron diferentes tipos de análisis sensorial de acuerdo a la muestra o a los datos que se buscaban. Cada procedimiento utilizado para las diferentes muestras está detallado en el capítulo correspondiente (Capítulo 4 para quesos con inulina, Capítulo 5 para quesos con concentrados proteicos de soja, Capítulo 6 para aderezos con proteínas de lactosuero).

2.5. Proceso de liofilización

Se utilizó el proceso de liofilización en la obtención de concentrados proteicos de soja y concentrados proteicos de lactosuero que luego se emplearon para la elaboración de quesos crema con agregado de proteínas de soja (Capítulo 5) y en la obtención de un aderezo (Capítulo 6).

- **Fundamento teórico**

Los concentrados proteicos obtenidos a partir del tratamiento con membranas se encuentran en solución acuosa. Es conocido que las proteínas en soluciones acuosas son estables por cortos periodos con limitados tiempos de vida media, debido principalmente a su complejidad química y conformacional. Un producto o ingrediente alimenticio debe tener una adecuada estabilidad durante periodos de almacenamiento de varios meses. Esto puede conseguirse a partir de la remoción del agua de las dispersiones proteicas obteniendo un sólido con una estabilidad de almacenamiento mejorada. Existen diferentes técnicas de secado de soluciones proteicas, entre ellas la liofilización. La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y luego se introduce en una cámara de vacío para separar el agua por sublimación. De esta manera el agua se elimina desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua contenida en el producto original pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada. Se utiliza principalmente para conservación de alimentos en la industria alimenticia y también en la industria farmacéutica para conservar medicamentos, entre otros. Se ha demostrado que la liofilización genera productos en donde las reacciones químicas de hidrólisis y desaminación inducidas por variaciones en el pH y temperatura son reducidas cuando las proteínas se encuentran en estado sólido (Ohtake y col., 2011).

- **Instrumental**

- Freezer de -40°C (PeetLab, Argentina)
- Liofilizador (Rificor S.A., Argentina)
- Bandejas de acero inoxidable

En la Figura 2.10 se muestra el equipo de liofilización utilizado para la obtención de concentrados proteicos. En la figura se puede observar que el equipo consta de un gabinete compacto y la cámara de acrílico donde se colocan las bandejas de acero inoxidable con el material a tratar.

- **Procedimiento**

Pretratamiento: la liofilización es una operación costosa, por lo que es importante reducir al mínimo el tiempo de secado. En este sentido, en el caso de los productos líquidos se realiza una pre-concentración.

Congelamiento: esta etapa del proceso consiste en congelar el producto a procesar por debajo de su temperatura eutéctica (temperatura más baja a la cual es posible que un sólido funda), de esta manera se asegura que se produzca una sublimación en vez de la fusión en las siguientes etapas del proceso. Las muestras se colocan sobre bandejas de acero inoxidable y se congelan en freezer a -40°C .

Una vez congeladas las muestras se liofilizan en liofilizador a 1 bar de presión por 48 horas. La temperatura de las muestras se controla con un sensor de temperatura.

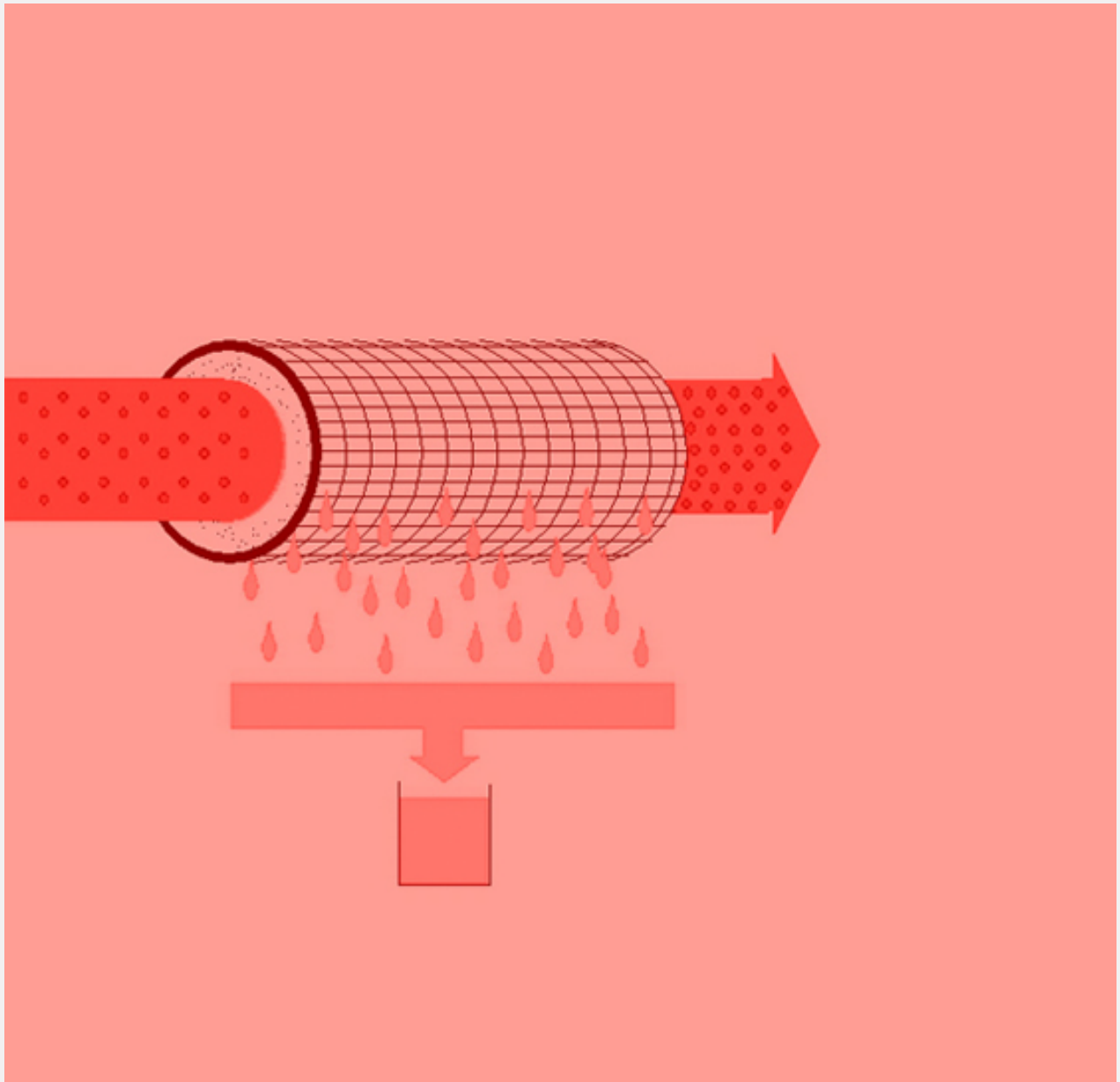


Figura 2.10: Equipo de liofilización

Capítulo 3

Tecnología de membranas. Definiciones y aplicaciones

Diana Palatnik



CAPÍTULO 3: TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS. DEFINICIONES Y APLICACIONES

En el Capítulo 1, Apartado 1.4., se destacaron las ventajas que tiene el uso de la Tecnología de Membranas para el procesamiento de productos lácteos. En el presente capítulo se desarrollan con detalle definiciones y aspectos generales de la tecnología, así como resultados y discusión de las siguientes aplicaciones realizadas en la presente Tesis:

- Reducción del contenido graso de leche destinada a la producción de queso.
- Obtención de fracciones de fructanos de distinto grado de polimerización.
- Obtención de concentrados proteicos de soja.
- Obtención de concentrado proteico de lactosuero de queso.

3.1. Introducción

Es importante establecer las diferencias existentes entre la filtración convencional y la filtración con membranas. Una filtración clásica puede separar uno o más componentes de una corriente de fluido, estos componentes son sólidos insolubles en la corriente fluida (líquido o gas), mientras que una filtración con membranas extiende esta definición a la separación de solutos disueltos en forma molecular o de mezclas gaseosas, de ahí la importancia de los fenómenos físicos-químicos frente a los meramente mecánicos de la filtración clásica (Applegate Lym, 1989 y Shelley, 1997).

Los procesos de membranas constituyen una serie de operaciones separativas que consisten en emplear un potencial de separación como fuerza impulsora o un gradiente de separación, ya sea de concentración, presión o electrostático, para forzar el paso de componentes de una disolución a través de una membrana porosa semipermeable, y obtener una separación selectiva. En esencia, la membrana actúa como una barrera selectiva dejando pasar unos componentes y reteniendo otros de una mezcla o disolución, obteniendo la separación selectiva deseada sobre la base del tamaño molecular, concentración o carga (Cheryan, 1986).

Esta operación tiene sus antecedentes desde que Graham (1805-1869) demostrara la capacidad de las membranas como medio de separación, propiciando su utilización para la producción de gases enriquecidos en oxígeno. Aproximadamente en esta época el físico alemán, Traube (1826-1894) fabricó las primeras membranas artificiales, precipitando ferrocianuro de cobre sobre una lámina cerámica. En el año 1855 el médico letón, Fick, fabricó la primera membrana orgánica, depositando sobre un soporte cerámico una disolución de nitrocelulosa en éter y con ello realizó sus conocidos estudios sobre difusión molecular.

A pesar de ello, el mayor avance en cuanto a las posibilidades de aplicación de estas técnicas fue en el año 1960 cuando Loeb y Sourirajan, dos investigadores de la Universidad de California, en Los Angeles, describieron el proceso de fabricación de las primeras membranas asimétricas, membranas con una piel muy fina (0,1 a 0,5 micras), soportadas sobre una estructura de mayor espesor (100 a 200 micras) y porosidad que da resistencia mecánica al conjunto. A partir de este descubrimiento se aumentó en forma considerable las densidades de flujo de permeado a través de las membranas, así como también se mantuvo o incluso se aumentó el rechazo de sales por parte de las mismas.

En los últimos años, las membranas y los procesos de separación con membranas han pasado de ser una simple herramienta de laboratorio a convertirse en procesos industriales con un considerable impacto técnico y económico.

En la actualidad las membranas se emplean en gran escala para producir agua potable a partir de agua de mar, para tratar efluentes industriales y recuperar constituyentes valiosos, para fraccionar soluciones de macromoléculas en la industria alimenticia y farmacéutica, etc. (Porter, 1990; Noble y col., 1995, Brans y col., 2004; Casano y col., 2015).

Para definir el proceso adecuado se debe plantear una secuencia completa de separación lo que implica tener en cuenta los parámetros de calidad del producto a obtener (utilización, fiabilidad, estabilidad, ausencia de toxicidad, etc.).

Aunque los procesos con membranas pueden ser muy diferentes en su modo de operación, en la estructura de las membranas y en los potenciales y fuerza impulsoras empleados para el transporte de los diferentes componentes químicos, tiene varios aspectos comunes que los hacen atractivos como herramienta de separación (Goh y col., 2016).

Este conjunto de operaciones permite también separaciones a temperaturas próximas a la temperatura ambiente y sin que haya cambio de fases por lo que se utilizan como operaciones alternativas o complementarias a las convencionales tales como destilación, cristalización, extracción con solventes, intercambio iónico, etc.

Los equipos utilizados para éstas técnicas de separación son compactos de poco volumen y en sistema modular lo que permite fácilmente ampliar la capacidad de tratamiento.

Otro aspecto importante es que no altera la calidad del producto (por ejemplo no hay desnaturalización de las proteínas por temperaturas elevadas) y se pueden incluir en el grupo de las denominadas “tecnologías limpias”.

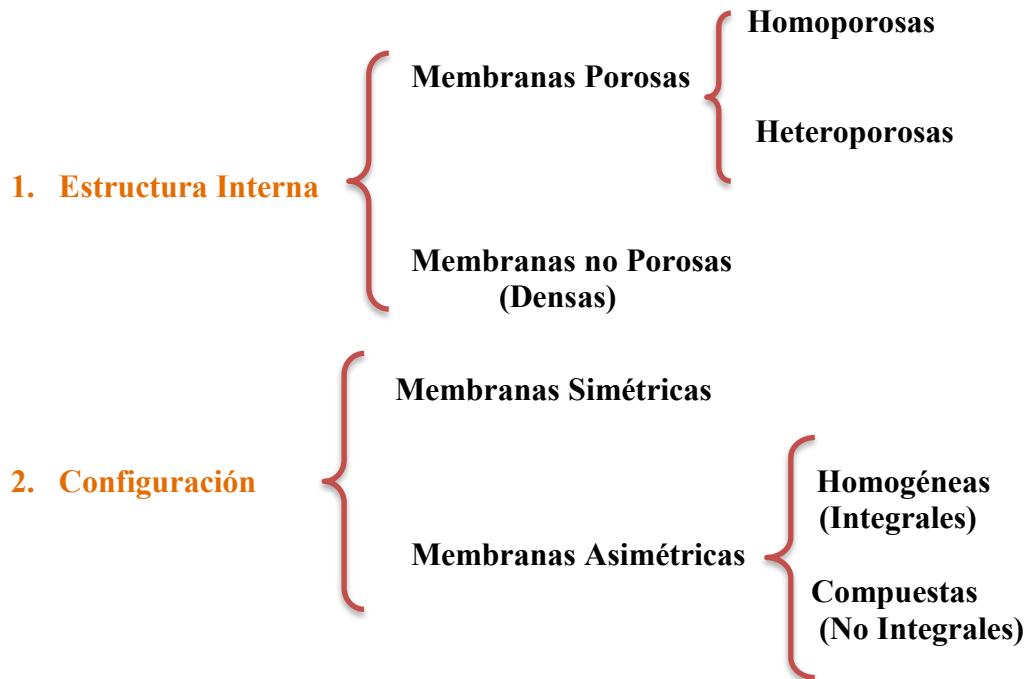
3.2. Definiciones de conceptos básicos de membrana

Una definición precisa y completa de una membrana que abarque todos sus aspectos resulta bastante difícil. En el sentido más general, una membrana puede definirse como una región que actúa como barrera permitiendo el paso exclusivo y/o de forma de una o más especies a través de ella. En esencia, la membrana actúa como una barrera selectiva dejando pasar a su través unos componentes y reteniendo otros de una mezcla o disolución.

3.2.1. Diferentes estructuras de las membranas

Se sabe, que la estructura de la membrana depende del procedimiento de obtención; a su vez, la estructura fijará el mecanismo de transporte de materia a través de la misma y su funcionalidad como barrera. La clasificación propuesta se basa en aspectos estructurales utilizando como criterio el poder de resolución de la microscopía electrónica (Culfaz y col., 2011; Carpintero Tepole y col., 2017; Fridman-Bishop y col 2017; Burganos, 2017).

Esta técnica instrumental permite diferenciar las membranas sintéticas de acuerdo a su estructura interna y a su configuración, tal como aparece en el esquema siguiente:



Como el poder de resolución de los microscopios electrónicos más potentes se encuentra alrededor de los 20 Å, se toma este valor como umbral para realizar la primera diferenciación:

Membranas no Porosas o Densas: son aquellas que no presentan poros observables por microscopía electrónica.

Membranas Porosas: son aquellas que presentan poros de diámetro superior a los 20 Å; pueden ser obtenidas, a su vez, en configuración **simétrica** o **asimétrica**.

Membranas Homoporosas: poseen una distribución de poros con un diámetro muy uniforme.

Membranas Heteroporosas: poseen una distribución amplia de tamaños de poros.

Membranas Simétricas: poseen una matriz sólida, homogénea, atravesada por poros de forma y tamaños regulares, normales a las superficies. Las membranas porosas simétricas son medios isotrópicos.

Membranas Asimétricas: están constituidas por una delgada capa (piel) donde reside la capacidad selectiva, sobre un sustrato grueso muy poroso (soporte). Presentan morfología anisotrópica.

Membranas Asimétricas Homogéneas: son aquellas que están constituidas por el mismo material en toda su estructura, reciben también el nombre de “estructura asimétrica integral”.

Membranas Asimétricas no Homogéneas: son las que presentan la capa selectiva (piel) y el sustrato de distinta naturaleza química, se dice entonces, de “estructura asimétrica no integrales o compuestas”

3.3.2. Proceso de Separación: Diferentes corrientes intervinientes

En una operación con membranas hay tres corrientes: alimentación, permeado y rechazo o concentrado. La alimentación es la dispersión a tratar y se divide en las otras dos.

Según sea la dirección del flujo de la disolución con respecto a la superficie de la membrana, se habla de un proceso tangencial o de uno frontal (Figura 3.1).

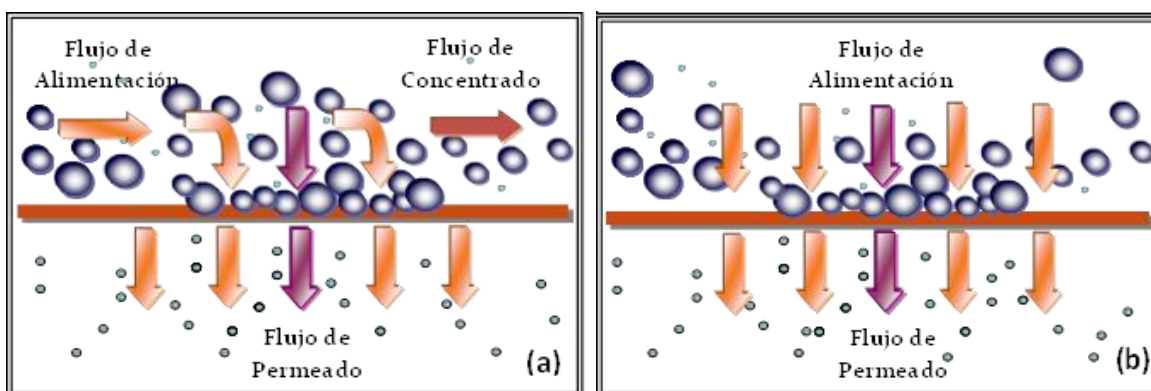


Figura 3.1. Principio básico de los procesos de membranas.
(a) Proceso tangencial; (b) Proceso frontal.

El permeado está formado por las especies que han atravesado la membrana, mientras que el rechazo o concentrado es la corriente que no ha pasado a través de la membrana.

Generalmente en la industria alimenticia se utilizan procesos tangenciales de membranas donde el permeado se recolecta y el concentrado por lo general sufre varios ciclos de recirculación en función del producto final deseado.

Existen dos formas en que los diferentes componentes de la dispersión ó disolución en contacto con la membrana pueden pasar a través de ella: 1) mediante disolución en una cara de la membrana y posterior liberación en la otra, con la consiguiente disolución en la

correspondiente fase externa, 2) pasando a través de los poros, que forman parte de la estructura interna de la membrana. El proceso está gobernado por las propiedades tanto de la membrana como de las disoluciones ó dispersiones en contacto con ella. Algunas de las propiedades de la membrana que más influyen en este proceso de transporte son la solubilidad de las especies en la membrana, la carga eléctrica sobre la superficie de la membrana, entre otros.

3.3. Procesos de membranas que emplean la presión como fuerza impulsora

Para que la separación por membranas se pueda llevar a cabo, es necesaria la acción de una fuerza impulsora, es decir, tiene que existir una diferencia de magnitud física o química entre ambos lados de la membrana capaz de originar un flujo de los componentes.

Los procesos con membranas empleados en la industria alimentaria emplean mayoritariamente un gradiente de presión como fuerza impulsora. La presión requerida para forzar el paso a través de una membrana suele ser proporcional al tamaño de los poros, siendo necesario incrementar sustancialmente su magnitud a medida que el tamaño de estos decrece. Entre ambos lados de la membrana se establece un diferencial de presión denominado “presión de transmembrana” y se lo utiliza como un parámetro importante asociado al rendimiento del proceso de membranas.

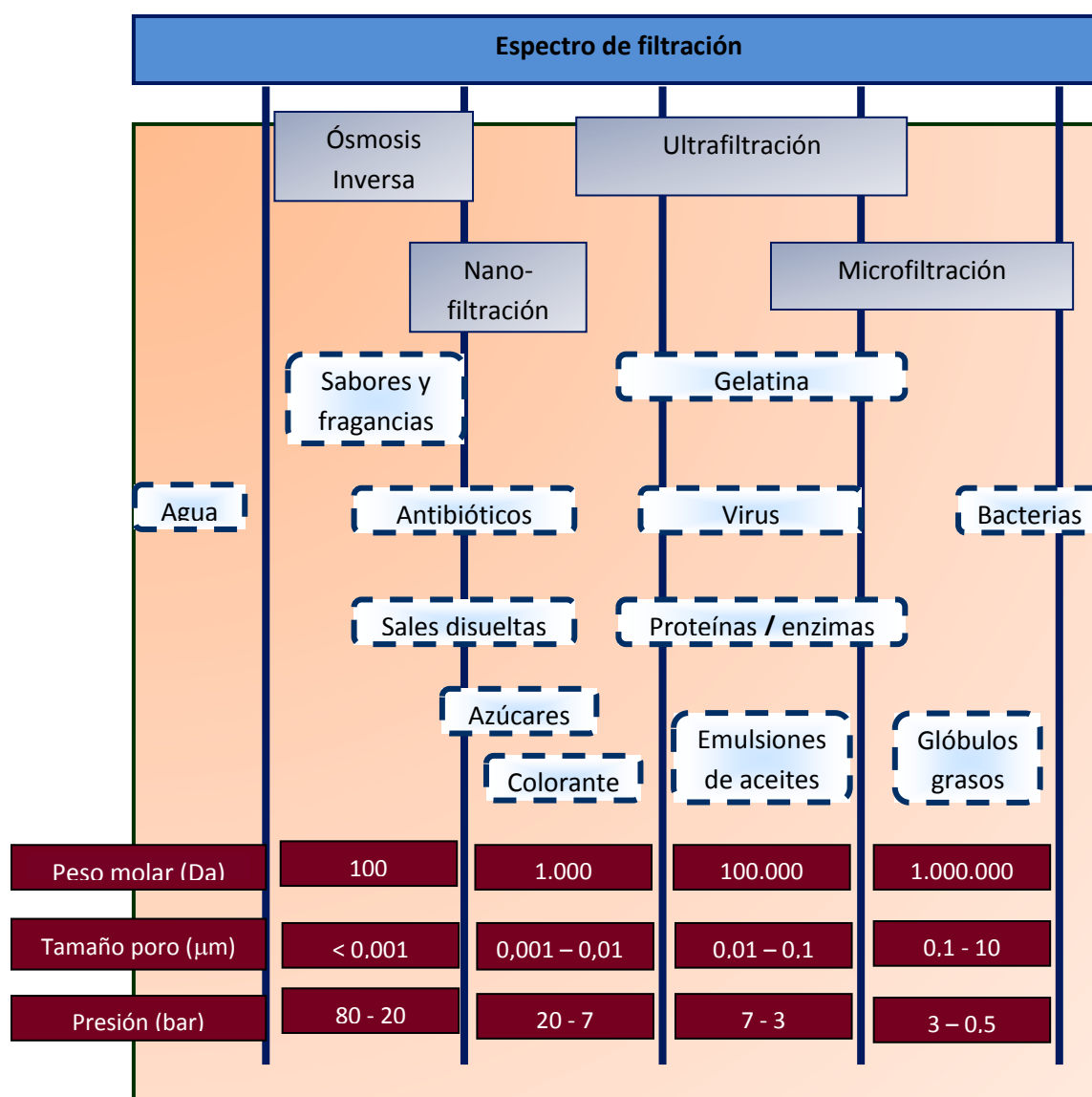
La permeabilidad de una membrana es adecuada cuando se registra una relación lineal entre el flujo de agua y la presión de transmembrana. El rendimiento de la membrana en términos de cantidad de permeado obtenido, no solo depende de esta presión de transmembrana sino también de la velocidad de flujo de alimentación, de la temperatura, la concentración del fluido y de las características fisicoquímicas de la membrana.

Cuando el potencial impulsor es una diferencia de presión (ΔP), encontramos diferentes tecnologías de membranas: ósmosis inversa (OI), nanofiltración (NF), ultrafiltración (UF) y microfiltración (MF). Estos cuatro procesos se caracterizan por el tamaño de las partículas o moléculas que son capaces de separar, lo que se encuentra íntimamente relacionado con el tamaño de poro y la estructura de las membranas como se muestra en la Tabla 3.1.

Como se desprende de la Tabla 3.1, las membranas tienen una magnitud característica relacionada con el diámetro de sus poros, que se denomina “umbral de corte de la membrana” (MWCO: molecular weight cut off) medida en Daltons (Da) y se define como el 95% de retención de moléculas lineales de dextrano de un peso molecular ensayado a 20 °C y 100 kPa de presión.

La combinación de efectos entre tamaño de partícula, tamaño de poro y presión aplicada, determina el campo de aplicación de un determinado proceso de membrana y también la posibilidad de realizar separaciones, como se ejemplifica también en la Figura 3.2.

Tabla 3.1: Características de tamaño de poro y presión de operación para diferentes procesos impulsados por presión.



Otros factores pueden afectar la retención de los solutos por la membrana, la forma de la molécula, la distribución del poro en la membrana, naturaleza química de la membrana, la variabilidad lote a lote durante la fabricación, la configuración de la membrana, la concentración del soluto retenido, la adsorción de solutos por la membrana, el pH y la fuerza iónica (Cheryan, 1986).

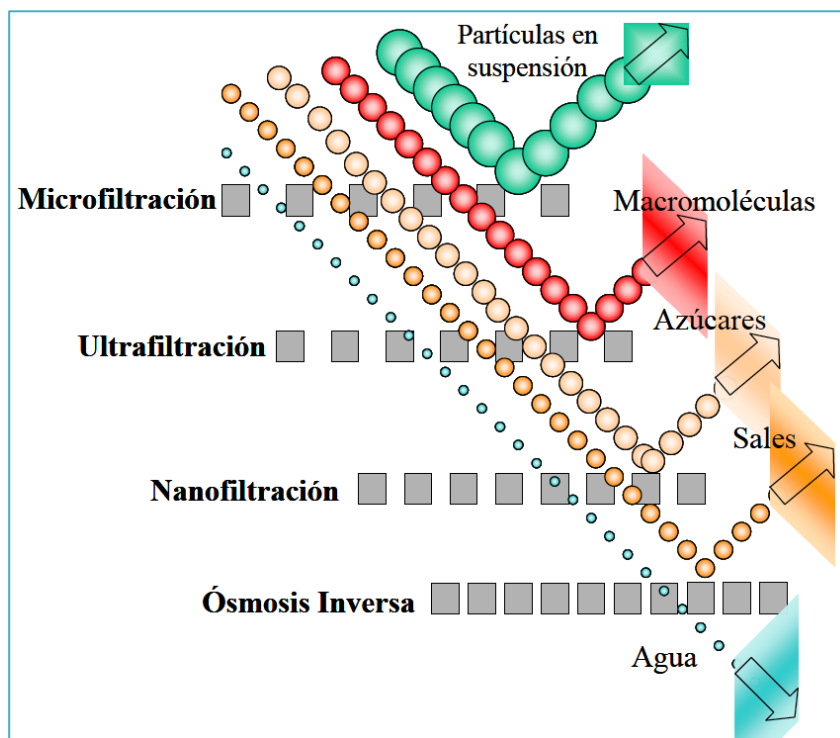


Figura 3.2: Campo de aplicación de cada proceso de membrana según tamaño de partícula, tamaño de poro y presión aplicada

Algunas características y aplicaciones generales de estos procesos se presentan a continuación (Noble y col., 1995; Firman y col., 2013; Goh y col., 2016; Abid y col., 2017):

- ✓ **Ósmosis inversa (OI):** los rangos de tamaño de poro de la membrana son pequeños, de allí que la presión requerida es elevada. Por medio de la aplicación de presión es posible lograr que el agua pase desde el lado de la membrana de mayor concentración de sales al de menor concentración produciendo el efecto opuesto de la ósmosis. Dentro de sus usos

industriales encontramos la producción de agua desmineralizada donde se eliminan la mayor parte de las sales del agua de mar.

- ✓ **Nanofiltración (NF):** la presión transmembrana requerida es inferior que la utilizada para la OI, reduciendo significativamente los costos de operación. La nanofiltración es cada vez más utilizada en aplicaciones de procesamiento de alimentos tales como la desmineralización de productos lácteos.
- ✓ **Ultrafiltración (UF):** este proceso de separación se utiliza en la industria y en la investigación para purificar y concentrar soluciones macromoleculares, especialmente soluciones de proteínas, donde se retienen los componentes de elevada masa molar, mientras que las moléculas de reducida masa molar y el disolvente permean. Entre los compuestos que habitualmente retiene la UF se incluyen azúcares, biomoléculas, polímeros y partículas coloidales. Algunas aplicaciones industriales son: la clarificación de jugos, concentración de la leche para la fabricación de yogur y quesos, fraccionamiento de suero, etc.
- ✓ **Microfiltración (MF):** este tipo de filtración trabaja a baja presión para separar partículas de alto peso molecular, coloides en suspensión o sólidos disueltos. Encontramos diferentes aplicaciones en la industria alimenticia, tales como: esterilización por frío de bebidas y productos farmacéuticos ya que retiene la totalidad de las bacterias; clarificación de jugos de frutas, vinos y cerveza; separación de bacterias del agua (tratamiento biológico de aguas residuales).

Como se mencionó anteriormente, la presión aplicada se conoce como presión de transmembrana (ΔP) está dado por la siguiente expresión:

$$\Delta P = \frac{P_{(ent.)} + P_{(sal.)}}{2} - P_{(perm.)} \quad (3.1)$$

donde $P_{(ent)}$ presión de entrada, $P_{(sal)}$ presión de salida y $P_{(perm)}$ presión de permeado que generalmente se considera igual a cero ya que es aproximadamente la presión atmosférica que se toma como base para la medida de la presión manométrica de entrada y salida de la alimentación (Cheryan, 1986).

El coeficiente de retención (σ^*) en cualquier punto del proceso, se define como el grado de separación de un componente del sistema por medio de la membrana, bajo condiciones definidas. El coeficiente de retención (σ^*) determina la calidad del permeado y su expresión matemática es:

$$\sigma^* = 1 - \frac{C_P}{C_R} \quad (3.2)$$

donde C_P es la concentración de soluto en el permeado y C_R en el retenido.

Los datos de UF se representan como relaciones de volúmenes-concentrado o peso (VCR).

$$\text{VCR} = \frac{\text{Volumen inicial de alimentación}}{\text{Volumen del retenido}} \quad (3.3)$$

VCR, es llamado “factor de concentración de volumen”. Algunas veces se utilizan los términos “reducción de volumen porcentual” o “porcentaje de agua eliminada”.

$$\text{Reducción del Vol. \%} = \frac{V_0 - V_R}{V_0} \times 100 \quad (3.4a)$$

$$\text{Reducción del Vol. \%} = (1 - 1/\text{VCR}) \times 100 \quad (3.4b)$$

El valor de la concentración de un soluto (C) en cualquier momento o etapa del proceso de UF, puede calcularse a partir de una expresión que relaciona la reducción de volumen y la probabilidad (P) que tiene el componente de la solución de atravesar la membrana:

$$C = C_0 (\text{VCR})^{1-P} \quad (3.5)$$

donde C_0 es la concentración del soluto al comienzo del proceso de UF cuando $\text{VCR} = 1$.

La probabilidad P , indica el grado de dificultad para permear la membrana; si el componente atraviesa la membrana sin resistencia alguna ($P=1$) y si es rechazado completamente ($P=0$). El grado de retención (σ^*), puede expresarse en función de la probabilidad como:

$$\sigma^* = 1 - P \quad (3.6)$$

donde R está dado por la ec. (3.6); reemplazando en la ec. (3.5) tenemos:

$$C = C_0(\text{VCR})^{\sigma^*} \quad (3.7)$$

3.4. Ensuciamiento de membranas de micro y ultrafiltración

En los procesos de UF y MF, el ensuciamiento de la membrana es un factor crítico que afecta el desempeño y eficiencia de los procesos de membrana (Maruyama y col., 2001; Jiang y col., 2017; Abid y col., 2017). El ensuciamiento por soluciones macromoleculares, se define como la acumulación de algunos componentes del flujo de alimentación sobre la superficie de la membrana o dentro de los poros de la misma (Figura 3.3). Este fenómeno ha sido estudiado ampliamente ya que produce una disminución del flujo de permeado a medida que transcurre el tiempo reduciendo la eficiencia de separación y limita la reutilización de la membrana (Caric y col., 2000; Jiang y col., 2017; Prádanos y col., 1996). Diferentes estudios han mostrado que el ensuciamiento proteico consiste en dos fenómenos: uno es la absorción de las proteínas dentro de los poros y adsorción sobre la superficie de la membrana, el cual corresponde a una interacción específica entre la proteína y la membrana, este ensuciamiento es irreversible. El otro es un depósito de proteínas agregadas y desnaturalizadas sobre la superficie de la membrana, formando una capa de polarización la cual ofrece una resistencia hidráulica que se suma a la resistencia ejercida por la membrana en sí, como se muestra en la Figura 3.3 (Marshall y col., 1993; Prádanos y col., 1996; Steinhauer y col., 2015; Palatnik y col. 2015).

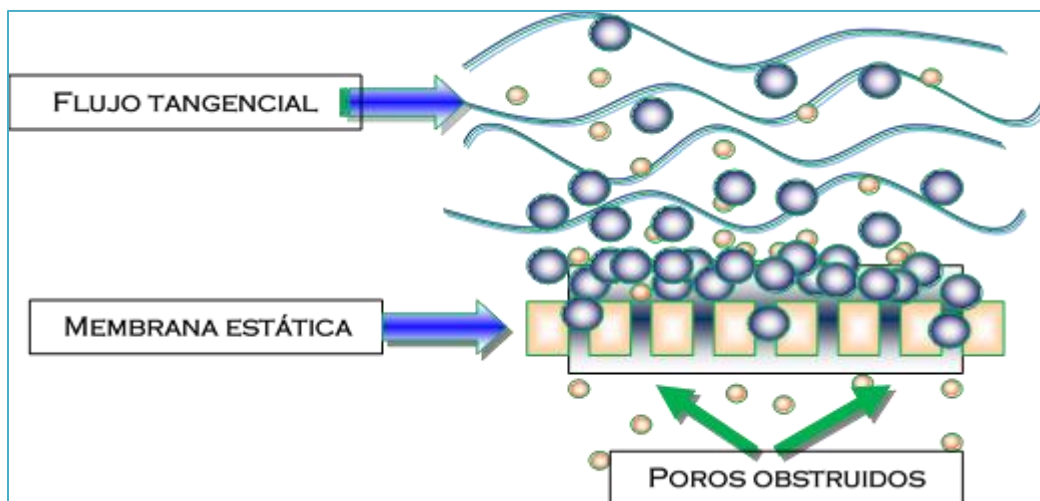


Figura 3.3. Ensuciamiento de la membrana sobre la superficie y dentro de los poros de la membrana.

Los fenómenos antes descritos constituyen el factor limitante de todos los procesos de membranas aplicados en la industria de alimentos. El ensuciamiento suele provocar una acentuada disminución inicial del flujo de permeado, el cual paulatinamente alcanza un estado estacionario, lo cual genera caudales significativamente menores al inicial. Además a causa de este hecho la membrana pierde selectividad, como se observa en la Fig. 3.4.

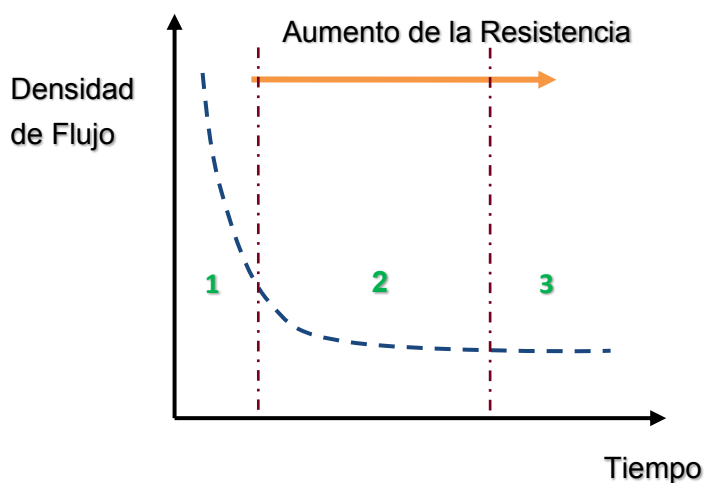


Figura 3.4. Comportamiento del flujo de permeado en función del tiempo para una membrana de UF. Zona 1: Absorción de las partículas en la superficie y en el interior de los poros de la membrana formando una monocapa. Zona 2: Deposición convectiva de partículas, formación de la capa de polarización. Zona 3: Consolidación de la capa de ensuciamiento.

3.4.1. Fenómeno de polarización por concentración

La eficiencia de las operaciones con membranas se ve disminuida como mencionamos anteriormente, por el fenómeno de polarización por concentración, aunque la extensión en la que puede ocurrir dicho fenómeno difiere considerablemente de una operación a otra (Cheryan, 1986; Huisman y col., 2000; Fernández de Labastida y col., 2016).

En un proceso de membranas, el soluto se transporta hacia la superficie de las membranas por flujo convectivo generado por el disolvente. Éste atraviesa la membrana en mayor grado, de forma que la concentración de solutos aumenta acercándose a la superficie de la membrana. En el seno de la disolución, el soluto se homogeniza debido al flujo turbulento producido por la mezcla, mientras que en la superficie de la membrana la velocidad es laminar. Como consecuencia, se origina un flujo difusivo del soluto contrario al convectivo impulsada por el gradiente de concentración.

En condiciones estacionarias, el flujo convectivo y difusivo se igualan formándose una capa límite de espesor δ , región en la cual se produce un incremento de la concentración desde el seno de la disolución C_a , hasta alcanzar un valor máximo en la superficie de la membrana, C_m (Figura 3.5).

A este fenómeno de aumento de la concentración en la superficie de la capa límite se lo conoce como polarización por concentración. La siguiente ecuación muestra la expresión diferencial que rige este fenómeno (Cheryan, 1986; Fernández de Labastida y col., 2016).

$$J_v \cdot C - D \cdot \frac{dC}{dx} = J_v \cdot C_p \quad (3.8)$$

En la Figura 3.5, se muestra el perfil de concentración que se establece en la capa límite.

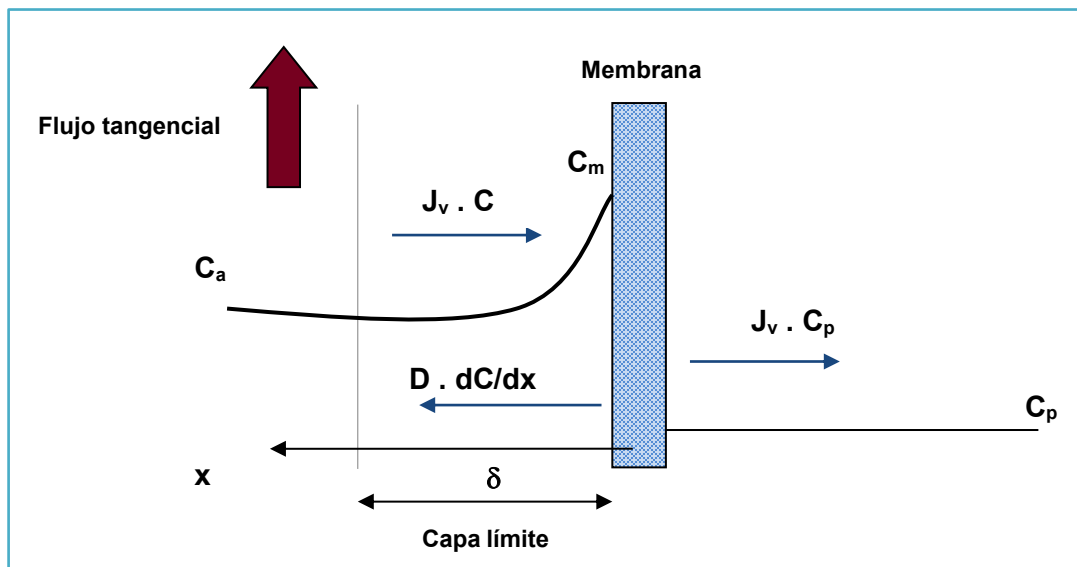


Figura 3.5: Fenómeno de polarización por concentración

Las principales características de la polarización por concentración en UF se pueden resumir del siguiente modo:

- Produce un cambio en las propiedades físico-químicas de la disolución en las interfases (principalmente viscosidad, densidad, y difusividad) respecto de sus valores en la disolución global.
- Altera las propiedades de la membrana por su interacción con el soluto (adsorción y bloqueo de poros).
- Aumenta la presión osmótica con disminución del potencial eficaz de transporte.
- Genera una capa de gel si la polarización por concentración es elevada.

La polarización por concentración es un fenómeno que no se puede evitar; provoca la disminución del flujo de permeado, pero es reversible.

Se puede concluir diciendo que el fenómeno de polarización por concentración es el desarrollo de un gradiente de concentración de los componentes del retenido cerca de la membrana; en función de las condiciones hidrodinámicas del sistema y es independiente de las propiedades físicas de las membranas. Es posible minimizar su efecto con una buena selección de las condiciones de operación y un acertado diseño de los modelos. En ciertos casos es posible la utilización de accesorios que reduzcan la polarización, de forma importante.

Las condiciones básicas para disminuir la polarización por concentración son:

- Mantener valores reducidos de la densidad de flujo de permeado disminuyendo así el flujo convectivo de soluto hacia la membrana.
- Minimizar la diferencia de concentración entre la superficie de la membrana y la disolución global.
- Utilizar una concentración reducida de soluto en la alimentación.
- Potenciar la difusión del soluto acumulado en las proximidades de la membrana hacia la disolución y disminuir el espesor de la capa límite (menor resistencia al flujo). Se trata en conjunto, de magnificar el valor del coeficiente global de transporte de materia.

Numerosos esfuerzos se han realizado para prevenir el ensuciamiento de la membrana, y optimizar los parámetros operacionales, tales como presión, velocidad de flujo, temperatura, pH, concentración y pretratamiento de la alimentación, los cuales se establecen empíricamente de modo de disminuir el ensuciamiento durante la separación por medio de procesos con membranas. Por ello se hace necesaria la determinación del mecanismo o modelado del ensuciamiento de la membrana con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de trabajo para obtener el menor ensuciamiento o mayor eficiencia del proceso (Maruyama y col., 2001; Rinaldoni y col., 2009a; Rodríguez Furlán y col., 2015).

3.5. Equipos y Configuraciones empleadas en Procesos de Membranas impulsados por presión

Las membranas poseen una gran diversidad tanto en forma como en materiales. En términos de material de fabricación, se clasifican en dos grandes grupos orgánicas e inorgánicas. Las membranas orgánicas pueden estar hechas de acetato de celulosa (celulósicas), de polímeros orgánicos (polisulfonas, teflón, propilenos, poliamidas, polisulfuros, polipropilenos), las inorgánicas están compuestas por sales inorgánicas (ZrO_2 , Al_2O_3 , TiO_2) depositadas sobre matrices porosas de cerámica, entre otros materiales. Más recientemente, se desarrollaron membranas de matriz mixta como la compuesta de TiO_2 y polietersulfona (PES) y polietersulfona sulfonado (SPES), (Bae y col., 2006) o policarbonato sulfonado (SPC) y fluoruro de polivinilideno (PVDF), (Masuelli y col., 2009)

para el tratamiento de efluentes. Las membranas celulósicas tienden a ser más sensibles a la temperatura (50 °C máximo), al deterioro químico (resisten pHs entre 3 y 8), y biológico; por otro lado las poliméricas si bien es cierto que resisten mejor los factores anteriores (resisten pH entre 2-12 y temperaturas < 80 °C), no soportan muy bien la compactación y los agentes clorados, a diferencia de las inorgánicas que se muestran como las más resistentes a todos los factores antes mencionados (en todo el rango de pH, temperatura <300 °C, presiones < 1MPa), (Chacón Villalobos, 2006). Dependiendo del proceso y del sistema a tratar se deberá procurar que las membranas sean capaces de resistir la presión transmembrana y la temperatura a la que sean sometidas, así como también las características químicas de la solución a filtrar y la acción de diferentes agentes sanitizantes y de limpieza con que sean tratadas posteriormente a su uso.

Un módulo es una unidad básica en un dispositivo de filtración y se construye con un recipiente adecuado para soportar presiones, que contiene a las membranas con sus soportes, así como las conducciones necesarias para el flujo.

La elección de la membrana y del tipo correspondiente de módulo depende de muchos criterios que incluyen:

- Garantizar el suficiente caudal para las necesidades de la instalación; evitando el estancamiento dentro del módulo al no recibir el líquido a tratar en forma homogénea.
- Que sea lo más compacto posible (que incluya la mayor superficie de membrana por unidad de volumen).
- Facilidad de montaje y desmontaje del módulo para la inspección, reparación o sustitución de membranas (limpieza y en algunos casos para su esterilización).
- Velocidad tangencial del fluido elevada y buena compatibilidad química con los fluidos a tratar.
- Aspectos relacionados con el rendimiento y calidad del producto, elevada relación superficie/volumen, instalación y tiempo de residencia de las especies.
- Tipo de proceso: continuo o discontinuo.
- Consumo de energía: depende de la velocidad de circulación y de la presión a través de la membrana.

En resumen, los módulos están diseñados según criterios de estabilidad mecánica, consideraciones hidrodinámicas y económicas. De acuerdo con lo anterior existe una serie

de configuraciones modulares disponibles en el mercado, cada una con sus ventajas dependiendo de la operación a realizar.

La Figura 3.6 muestra las configuraciones más importantes.

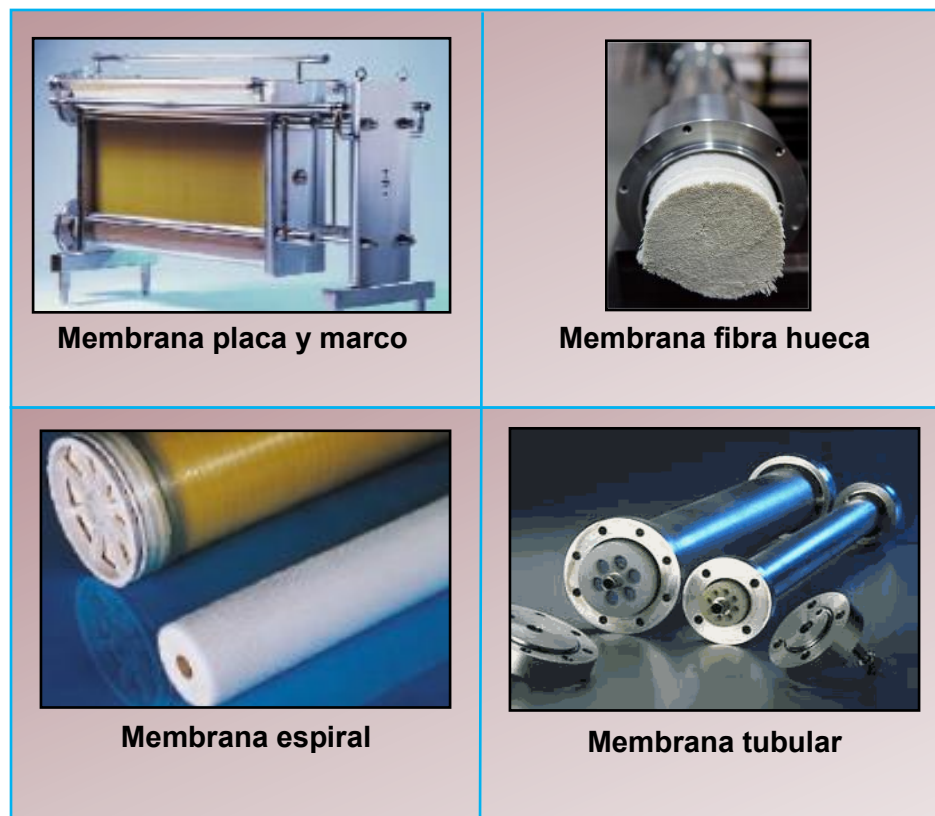


Figura 3.6. Configuración de módulos de membrana.

- ✓ **Filtro de placa y marco:** Existe amplia variedad de diseños que van desde el montaje en cartuchos, fluyendo la disolución en paralelo a lo largo de las placas, los módulos con placas cubiertas por membranas por ambos lados que conservan su individualidad y que pueden montarse en serie o en paralelo. Se presentan en diseño vertical u horizontal. Los canales de circulación son de pequeño espesor y el régimen hidrodinámico es laminar. Los módulos de placa tienen la ventaja de ser suficientemente compactos, con facilidad para acceder a la sustitución y limpieza de cualquier membrana, resultando su reemplazo económico. Su diseño de canal abierto permite que se lo utilice para productos con muy alta viscosidad, adecuado especialmente para aplicaciones con alto contenido de sólidos

en la industria farmacéutica y alimenticia. Sin embargo, preferentemente se hace necesario el prefiltrado de las soluciones de alimentación.

- ✓ **Fibra hueca:** la membrana se fabrica en forma tubular y se sitúa en el interior de un tubo poroso que actúa como soporte. El conjunto está introducido, a su vez, en un tubo resistente a la presión (generalmente metálico), en el que se encuentran orificios que permiten la salida del permeado. Las fibras se disponen en paquetes constituidos por un número variable de ellas (de algunas decenas a varios millares, dependiendo de su diámetro y del tamaño del cartucho que las contiene). Una ventaja de este diseño, es la facilidad de su limpieza, ya que no es necesario desmontar el dispositivo. Sus principales inconvenientes son su elevado costo y que no resisten presiones muy elevadas.
- ✓ **Espiral:** es uno de los diseños más baratos y más compactos. Para su fabricación se parte de dos láminas de membrana que se colocan paralelas situando sus caras activas hacia el exterior y separadas por una malla. Otra malla del espesor adecuado, se coloca para servir de separador del flujo de alimentación y el conjunto se enrolla en espiral alrededor del tubo central. Son hojas planas colocadas paralelamente formando un estrecho canal por el que circula el permeado, mientras que por el exterior circula el flujo de alimentación. Esto representa la ventaja de poder empaquetar más superficie de membrana. Un inconveniente del dispositivo es la creación de espacios muertos en la corriente de alimentación justo detrás de la malla de separación, lo que puede originar problemas de limpieza, por lo que se debe evitar las partículas en suspensión en la alimentación. Otras desventajas con estas membranas y su contenedor es que deben reemplazarse una vez que han sido contaminadas, tiene dificultades cuando se trabaja con materiales viscosos o aquellos que tengan alta concentración de sólidos.
- ✓ **Tubular:** Los sistemas tubulares presentan ventajas importantes en lo que respecta al control de la concentración por polarización, como al ensuciamiento de la membrana, ya que permite limpiar con facilidad sin necesidad de desmantelar el equipo. Los módulos tubulares suelen estar formados por una serie de canales internos relativamente anchos (con diámetros entre 0,5 y 2,5 cm) y longitudes entre 0,60 y 6 m emplazados en el interior de contenedores de PVC o acero inoxidable, con flujo paralelo. Debido a que los diámetros de los canales son relativamente grandes, el sistema tolera elevadas concentraciones de la disolución de alimentación. También, a causa de su tamaño, es

posible operar en condiciones de régimen turbulento, controlando así la polarización por concentración. Un inconveniente es que presenta una relación de superficie de membrana por volumen del módulo de sólo 25-50 m²/m³ la más baja de entre todos los diversos módulos, lo que representa exigencias de mayor tamaño para la instalación del equipo. También, aunque su costo depende mucho del tipo de membrana usada (acetato de celulosa, polisulfona, compuestas o inorgánicas), tanto por la inversión inicial como sobre todo el tipo de operación, los gastos resultan ser relativamente elevados.

3.6. Proceso de Ensuciamiento- Protocolos de limpieza

Los fenómenos de ensuciamiento de membranas condicionan la operación y el mantenimiento de los sistemas de filtración y limitan la vida media de las membranas. El ensuciamiento de las membranas se debe al depósito y adsorción de partículas y diferentes tipos de moléculas en la membrana, bloqueando sus poros o reduciendo su tamaño, lo que provoca como consecuencia una disminución en la permeabilidad de ésta. Las propiedades de la membrana, como hidrofobicidad, topografía superficial, carga eléctrica y tamaño de poros, propiedades de soluto, tales como solubilidad, hidrofobicidad, carga eléctrica, grupos funcionales y estructura molecular, y los parámetros de proceso, tales como temperatura, velocidad de flujo, presión, concentración, etc., inciden en el ensuciamiento de la membrana (Jiang y col., 2017).

El ensuciamiento reduce el tamaño aparente de los poros y, por lo tanto, la selectividad aumenta con el tiempo, mientras que disminuye la velocidad de filtración. Sin embargo, la estructura de los poros que caracteriza a una membrana sucia depende tanto de la dimensión inicial de dichos poros como del tamaño de la molécula o partícula responsable del ensuciamiento. Bajo estas condiciones resulta difícil predecir el comportamiento de una membrana a largo plazo en término de selectividad.

Para disminuir el ensuciamiento de la membrana, es necesario un pre- tratamiento de la alimentación. La extensión, y por tanto el costo de éste depende de diversos factores, entre los que incluyen el tipo de módulo y la composición de la alimentación (Rinaldoni, 2009a; Rodriguez Furlán y col., 2010).

3.6.1. Métodos de limpieza de membranas poliméricas

Se deben distinguir cuatro métodos principales para la limpieza de las membranas: limpieza hidráulica, limpieza mecánica, limpieza química y limpieza eléctrica. La elección del método de limpieza depende fundamentalmente de la configuración del módulo, la resistencia química de la membrana y del tipo de contaminante encontrado (Noble y Stern, 1995; Abdelrasoul y col., 2013).

En la Tabla 3.2 se presentan las características principales de los diferentes métodos de limpieza mencionados.

En las operaciones de ultrafiltración de soluciones proteicas se aplican estrategias combinadas de limpieza hidráulica y química, como: regulación del tipo de flujo y de su velocidad, como de la presión aplicada. Las tecnologías de membranas con flujos tangenciales presentan una primera solución al problema del ensuciamiento, pues al existir un flujo que circula paralelamente a la superficie, el mismo actúa como un barrido tangencial que reduce la formación de colmatados. La presión transmembrana es un factor muy importante, ya que si se aplica una presión muy elevada puede producirse un efecto de compresión de la torta formada, originando un incremento de la resistencia hidráulica de la capa colmatante y, como se mencionó previamente, una disminución en la selectividad de la membrana.

La limpieza química de las membranas, es imprescindible para remover la capa colmatante al final de las operaciones de filtración. El proceso consiste en una reacción entre el agente químico y la capa colmatante, dirigida a remover los depósitos proteicos sobre la superficie de la membrana y dentro de los poros de la misma y devolver a la membrana todas sus características iniciales, sin que el tratamiento pueda producir un deterioro a la membrana. Por lo general un ciclo típico de limpieza incluye la remoción del producto, la limpieza química propiamente dicha y la recirculación del agua para remover los agentes químicos y una desinfección final.

Tabla 3.2: Métodos de limpieza de membranas.

Tipo de limpieza	Características
Hidráulica	Incluye el lavado con permeado a presión y retroalimentación, que sólo es aplicable a membranas de MF y UF. Se utiliza normalmente durante las paradas de un proceso, para reducir el retorno de solvente debido al fenómeno de ósmosis natural, desplazar totalmente la solución a tratar del interior de las tuberías y de los módulos del sistema, impidiendo así la corrosión de las partes metálicas y la precipitación de sales y desplazar reactivos cuando se ha sometido a una limpieza química. Son limpieza hidráulica también la presurización y despresurización, y el cambio en la dirección del flujo con una frecuencia dada.
Mecánica	Sólo se puede aplicar a sistemas tubulares, donde se utiliza un cepillo o una esponja para retirar la suciedad de las membranas. También haciendo circular bolas de esponja, como con los condensadores de las centrales térmicas. Esta limpieza mecánica no es posible en los módulos espirales ni de fibra hueca, por no tener acceso a su superficie activa. Pero debido a lo delicado de la superficie activa no se recomienda este método de limpieza, en general.
Eléctrica	Es un método que aplica pulsos de campos eléctricos que promueve el movimiento de partículas cargadas de la membrana. Este método se realiza sin interrumpir el proceso (Tarazaga y col., 2006). La superficie de todas las membranas tiene una carga eléctrica o electroforética que es consecuencia de los elementos químicos que intervienen en su fabricación. Estas cargas retienen la materia orgánica y los coloides del agua, así como los radicales de los productos químicos del pre tratamiento (Moreno, 2011).
Química	Es el método más importante para reducir el ensuciamiento, con diversos químicos separados o en combinación, que se hacen recircular por los módulos para disolver las precipitaciones o remover depósitos de las membranas. Los pasos a seguir son: a) Identificación del problema, b) Selección del sistema de limpieza, c) Formulación para el tipo de ensuciamiento.

3.7. Resultados y Discusión de las aplicaciones de la tecnología de membrana al procesamiento de quesos funcionales y utilización de sub productos.

3.7.1. Proceso de reducción del contenido graso en leche destinada a la producción de quesos

Como se ha mencionado anteriormente, la demanda del mercado actual exige alimentos más saludables con menores riesgos para la salud (Cardarelli y col., 2008; Juan y col., 2013). De allí que se espera que en un queso con propiedades funcionales, su contenido graso sea reducido. Para la elaboración de las muestras de quesos estudiadas en este trabajo de tesis, se utilizó leche de vaca cruda a la que se le redujo el contenido graso utilizando tecnología de membranas. Para este proceso en el laboratorio se utilizó un módulo de flujo frontal de polietileno (Pall Corporation) de 5 μm (Figura 3.7).

La experiencia consistió en pasar la leche cruda (30 litros por tanda de quesos) por la membrana, recolectando el permeado en un recipiente adecuadamente desinfectado. La operación se realizó en tres etapas, tomando muestra en cada una de ellas, a fin de determinar el grado de descremado de la leche en cada paso para lo cual se determinó el contenido de grasas según el método de Rosse Gottlieb (Apartado 2.1.4 de Capítulo 2).



Figura 3.7: Equipo de microfiltración frontal, empleado en el descremado de leche cruda.

En la Tabla 3.3 se observan los resultados obtenidos. Teniendo en cuenta que el contenido graso de la leche cruda con la que se trabajó fue de 6,8% (p/v), se observa que en la primera etapa de microfiltración se logró una disminución de grasas del 76% (p/v). Puede observarse también que, en los ciclos siguientes, el contenido graso fue aumentando, esto puede deberse a los efectos del ensuciamiento de la membrana. Por lo tanto, el método de descremado seleccionado fue el de MF en una sola etapa.

La operación convencional para realizar la separación de los glóbulos grasos de la leche es la centrifugación. La decantación y coalescencia espontánea de los glóbulos grasos en la superficie de la leche es lenta, por esto es necesario acelerarla por medio de separadores centrífugos en los que la fuerza de separación es mucho mayor que la de gravedad y actúa en el sentido de alejarse del eje de rotación en vez de estar dirigida hacia la superficie terrestre. Los principales tipos de separadores centrífugos son las centrífugas tubulares y las centrífugas de disco. Sin embargo, esta técnica presenta dificultades durante la separación de la fase grasa, y requiere la aplicación de una fuerza mecánica elevada. En el caso del uso de la MF, las grasas quedan retenidas en la membrana. Así, la tecnología de la filtración constituye un modo eficaz de lograr una calidad y seguridad superiores, sin mermar las características sensoriales fundamentales del producto. Elimina los ingredientes no deseados, como microorganismos o sedimentos, que tienen un efecto negativo en la calidad, mejorando la textura del producto final e incrementando su duración. Por otro lado, puede acortar las etapas de producción y aumentar el rendimiento, permite un elevado grado de selectividad, mejora el control del proceso de producción y sus costos energéticos son reducidos.

Tabla 3.3: Resultados del descremado leche cruda por microfiltración (T= 25±1°C)

Etapas	Grasas (%p/v)
1	1,61
2	3,4
3	4,4

En la Figura 3.8 se muestran las imágenes obtenidas al observar a través de microscopio óptico la leche cruda y la leche tratada por microfiltración. Al analizar estas imágenes se desprende que en la leche cruda se observa mayor cantidad de glóbulos grasos con mayor heterogeneidad de tamaño que para el caso de la leche microfiltrada.

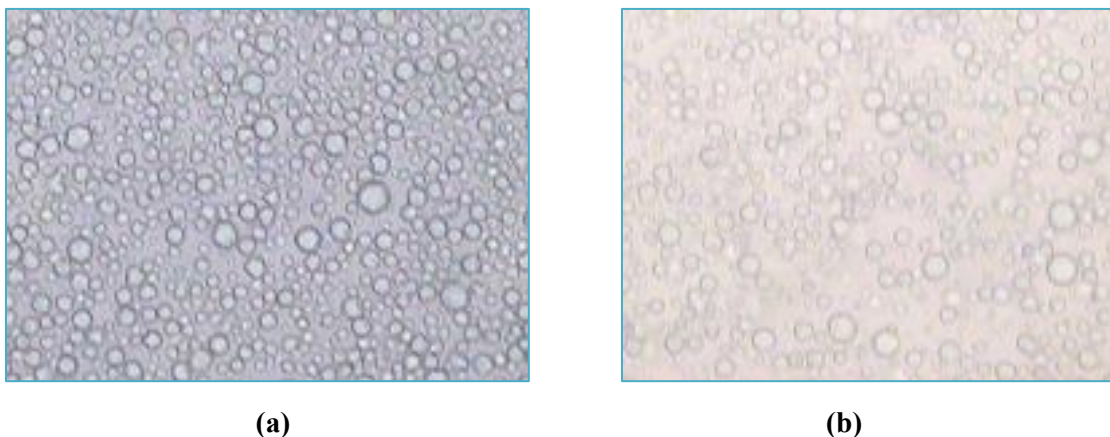


Figura 3.8: (a) Leche cruda (b) Leche microfiltrada (aumento: 400x)

3.7.2. Obtención de fracciones de fructanos de distinto grado de polimerización

Diferentes estudios demostraron que los fructanos con mayor grado de polimerización (GP) son más adecuados como sustitutos de grasa que otros sacáridos y además, la modificación de textura que producen en productos lácteos depende no solo de la concentración sino también del grado de polimerización de los mismos (Meyer y col., 2011; Salvatore y col., 2014). Van den Ende y col. (2006) informaron que varias aplicaciones requieren fructanos con un GP diferente y González-Tomás y col. (2009) reportaron cómo la viscoelasticidad del sistema lácteo a base de almidón de inulina estaba influenciada por la longitud promedio de la cadena de inulina.

Con el fin de obtener fracciones de fructanos con diferentes grados de polimerización, se aplicaron procesos con membranas sobre fructanos nativos provenientes de la planta *Agave tequilana* donados por la Compañía Agaviótica (Monterrey, México) al grupo de trabajo del Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit México, lugar donde se realizó el proceso de concentración de fructanos que se describe a continuación.

Se obtuvieron fructanos de alto rendimiento (FAAR) y fructanos de alto grado de polimerización (FAGP) a partir de la ultrafiltración de una solución de fructanos nativos a 20°Brix utilizando módulos de membranas comerciales (Pellicon-2 de Millipore, MA, USA) con un corte de peso molecular (MWCO) de 1 y 10 kDa respectivamente. Las condiciones operacionales fueron 20 °C, 3 bar de presión y una velocidad de flujo de 4 l.min⁻¹).

Luego de la separación, las fracciones de fructanos retenidas en cada membrana fueron secadas por spray en un equipo Modelo LPG5 (CIMA Industries Inc., China) (temperatura de entrada/salida: 100/80 °C, velocidad del atomizador: 30000 rpm y flujo de entrada: 17.5 ml.min⁻¹) (Aldrete-Herrera, 2013; Espinosa-Castrejón, 2012).

Tanto los fructanos nativos (FAN) de partida, como las dos fracciones de fructanos de mayor grado de polimerización obtenidas a partir de procesos de membrana, FAGP y FAAR, fueron usados como aditivos en la elaboración de quesos. De esta manera, las experiencias realizadas contribuyeron a investigar distintas aplicaciones de los fructanos presentes en una planta tan abundante como el Agave, y que no requiere ninguna condición especial para su cultivo.

Las características fisicoquímicas establecidas en el Instituto Tecnológico de Tepic fueron completadas con los aspectos morfológicos de los tres fructanos determinadas en nuestro laboratorio y los resultados se presentan en la Tabla 3.4.

3.7.3. Obtención del concentrado proteico de soja

El concentrado de proteínas de soja se obtuvo empleando un proceso combinado de microfiltración y ultrafiltración a partir de alimento comercial de soja (*Ades*). En este caso se procuró desarrollar una aplicación de concentrados de proteínas de soja, siendo nuestro país un gran productor de este vegetal y con las cualidades nutricionales que ya fueron descriptas en el Capítulo 1.

Para este propósito, se empleó una etapa de microfiltración con un filtro frontal de polietileno con un tamaño de poro de 5 a 10 mm (Pall Corporation, USA). Para la etapa de ultrafiltración se usó un módulo Millipore (USA), el cual consta de dos cassettes de membranas de polysulfona modificadas, con un corte de peso molecular de 10 kDa, con un

total de superficie filtrante de 1 m² (Rinaldoni y col., 2012). Los dispositivos experimentales empleados se muestran en la Figura 3.9.

El proceso se llevó a cabo en proceso discontinuo o batch, removiendo la corriente de permeado de forma continua, a 25±2°C y con una presión 325 kPa. La temperatura, la tasa de recirculación, la presión transmembrana, el pH y el flujo de permeado fueron registrados continuamente. El contenido de sólidos se midió en la corriente de concentrado y el proceso se detuvo al alcanzar la concentración de sólidos deseada.

La relación de concentración de volumen (VCR) fue de 2,3 y se determinó de acuerdo a lo reportado por Cheryan (1986) como la relación entre el volumen de alimentación inicial y el volumen de concentrado obtenido. Luego de cada filtración se limpió la membrana en línea siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. La recuperación de la permeabilidad hidráulica de la membrana fue siempre testada para verificar que el proceso de limpieza se haya llevado a cabo correctamente.

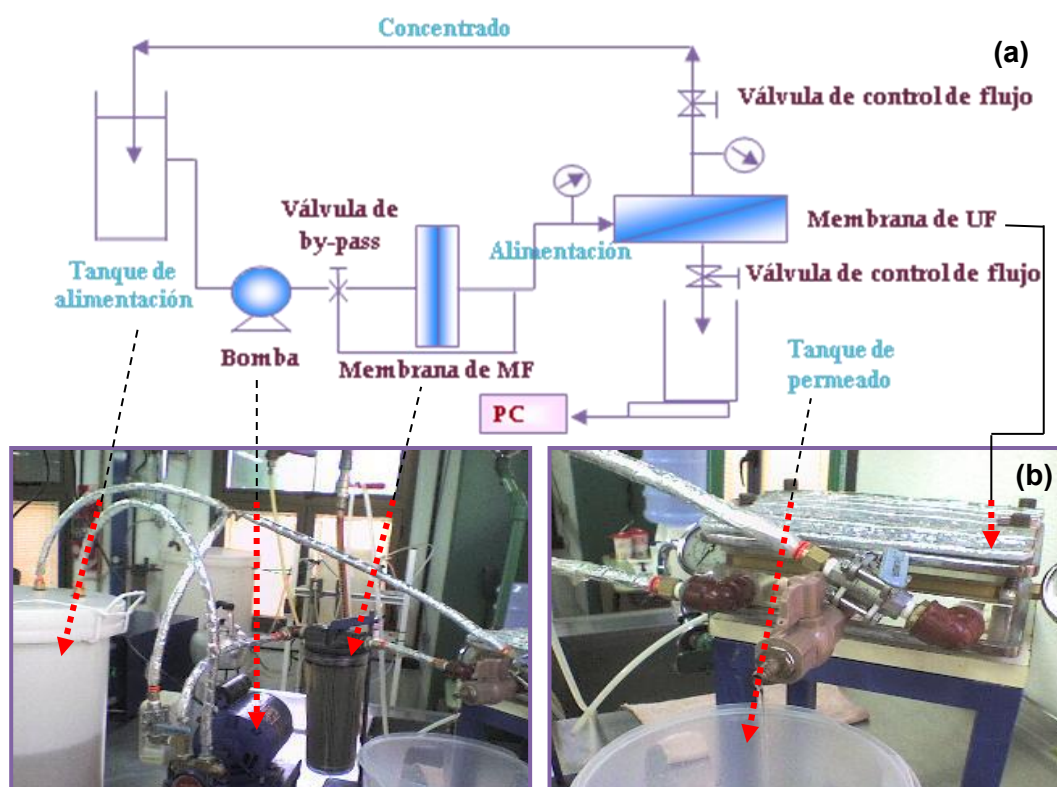
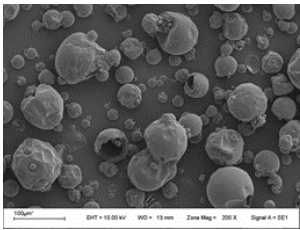
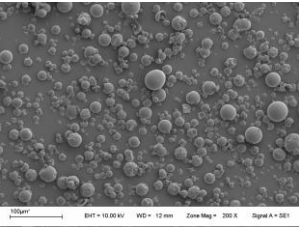
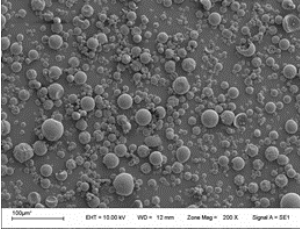


Figura 3.9: (a) Esquema y (b) imagen del equipo de MF- UF utilizado en el laboratorio.

Luego se colocaron los concentrados de proteínas soja (CPS) sobre bandejas de acero inoxidable para su congelación en un freezer a -40 ± 2 °C y posterior liofilización a 1 bar de presión por 48 h usando un sensor de temperatura para controlar la temperatura de las muestras (Apartado 2.5.2., Capítulo 2). Este procedimiento simplifica la manipulación aséptica y mejora la estabilidad del polvo seco, sin un calentamiento excesivo del producto (Fellows, 1994). La composición de la materia prima y del concentrado obtenido se presenta en la Tabla 3.5, la Figura 3.10, muestra el aspecto del concentrado de soja liofilizado.

Tabla 3.4: Resultados de la caracterización morfológica y físico química de fructanos de *agave tequilana* ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)

Característica ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	FAN	FAAR	FAGP
Morfología SEM 200X			
Humedad	$4,62 \pm 0,20$	$3,01 \pm 0,03$	$2,52 \pm 0,23$
Carbohidratos totales	$97,5 \pm 1,70$	$98,20 \pm 0,70$	$98,60 \pm 0,50$
Azúcares Reductores	$13,60 \pm 0,50$	$0,80 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,04$
Fructanos	$83,90 \pm 0,30$	$97,40 \pm 0,50$	$98,20 \pm 0,30$
Cenizas	$0,10 \pm 0,020$	$0,15 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,05$
GP	-	4 - 80	24 - 80
a_w	$0,41 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,001$	$0,30 \pm 0,003$

(*) FAN: Fructano Nativo; FAAR: Fructano de Alto Rendimiento; FAGP: Fructanos de Alto Grado de Polimerización; GP: Grado de Polimerización.

En las imágenes SEM y demás información que aparece en la Tabla 3.4, se observa que las fracciones de fructanos FAAR Y FAGP, presentan una distribución de tamaño más

homogénea y además, el tamaño de las partículas es notablemente menor que la correspondiente fracción de FAN. Este hecho puede correlacionarse con los datos que se presentan en la Figura 4.8, del Capítulo 4 donde se observa que la distribución para FAAR y FAGP se concentra en diámetros entre 2-9 μm con ausencia de diámetros mayores a 40 μm , mientras que el FAN tiene una distribución más heterogénea.



Figura 3.10: Concentrado proteico de soja obtenido por MF-UF y liofilización

Tabla 3.5: Composición química y pH de las materias primas y del concentrado obtenido por MF-UF (media \pm SD).

Materia prima	pH	Proteínas (g/100 g)	Grasas (g/100 g)	Azúcares (g/100g)	Sólidos totales (g/100 g)	Cenizas (g/100 g)
Leche de vaca	6,88 \pm 0,02	3,50 \pm 0,08	2,00 \pm 0,18	50,00 \pm 0,30	10,30 \pm 0,10	0,70 \pm 0,05
Leche de soja	7,02 \pm 0,05	3,20 \pm 0,05	1,00 \pm 0,12	30,00 \pm 0,70	8,90 \pm 0.10	0,60 \pm 0,08
CPS*	8,82 \pm 0,03	43,00 \pm 0,10	17,5 0 \pm 0,20	30,00 \pm 0,90	97,78 \pm 0,15	7,10 \pm 0,10

*CPS: Concentrado de proteínas de soja.

En la Tabla 3.5, se presenta la leche de vaca como comparativo de composición respecto a la leche de soja. El concentrado obtenido por membranas muestra claramente los componentes que fueron retenidos en el proceso y por lo tanto concentrados. Así resulta

aumentado el contenido de proteínas y grasas que contienen también algo de las cenizas concentradas, mientras que los azúcares no son retenidos por las membranas por lo que su contenido sigue siendo aproximadamente igual.

3.7.4. Obtención de un concentrado proteico de lactosuero de queso de cabra

El lactosuero de queso de cabra, rico en proteínas, es habitualmente descartado en las producciones artesanales o locales, frecuentes en las cercanías de la ciudad de San Luis. Esta materia prima se escogió para realizar el estudio de aprovechamiento del contenido de proteínas de lactosuero mediante la tecnología de membranas, siendo la corriente de alimentación en el proceso separativo por membranas.

A continuación, se describen el origen de la misma y su correspondiente pretratamiento para estar apto para su procesado en los equipos con membranas.

El suero de leche caprino fue provisto de una granja ubicada en las cercanías de la ciudad de San Luis productora de queso. El suero de queso caprino se obtuvo en el establecimiento, de un queso cuajado coagulado que se había producido a partir de leche entera pasteurizada (65 °C-15 min). La leche pasteurizada se enfrió gradualmente mientras se agregaban las levaduras termófilas y mesófilas y el cloruro de calcio. Al alcanzar los 36 °C, se incorporó el cuajo, finalmente se añadió cloruro de sodio y la cuajada se moldeó y prensó. Después de 24 h, el molde se retiró y los quesos se salaron por inmersión. El proceso de maduración comenzó a 8 °C.

Después de la recolección, y ya en nuestro laboratorio, el suero se pasó a través de una tela quesera para eliminar las impurezas macroscópicas y se pasteurizó a 63 ± 1 °C durante 30 minutos.

El primer paso para obtener el concentrado proteico, fue la etapa de MF-UF. Para esto se impulsaron, con una bomba centrífuga, 22 litros de suero de queso caprino, que como se mencionó, constituyó la corriente de alimentación, primero a través de un filtro de flujo frontal de acero inoxidable, con un tamaño de poro de 80 μm (Gora, Argentina). Es interesante tener en cuenta que la MF reduce la carga de bacterias y esporas, actuando como una pasteurización fría. De hecho, este paso protege a la membrana de UF del ensuciamiento. Para la UF se utilizó un módulo Pellicon (Millipore, Bedford, MA, USA), el cual está

constituido por dos cassettes de membranas de polietersulfona modificada con un corte de peso molecular (MWCO) de 10 kDa y un área de membrana de 1 m² (Figura 3.9).

La forma de operación fue la que se describe a continuación: la concentración de proteínas por UF se llevó a cabo removiendo continuamente la corriente de permeado hasta alcanzar la concentración deseada. Las condiciones de operación fueron las siguientes: presión de transmembrana (ΔP) 4,2 bar y temperatura de $11 \pm 0,5^\circ\text{C}$. La limpieza de la membrana se realizó aplicando el procedimiento “Limpieza en el lugar” (Apartado 3.6.1.1.).

3.7.4.1. Concentración de la proteína de suero caprino por MF-UF y liofilización

Los perfiles de flujo obtenidos en UF muestran un descenso característico en los primeros 10 minutos seguidos de una tendencia hacia el estado estacionario, como se observa en la Figura 3.11. Estudios previos han demostrado la presencia de una serie de fenómenos de ensuciamiento actuando simultáneamente los cuales provocan que el flujo de permeado decaiga (Atra y col., 2005; Rinaldoni y col., 2009b). Este hecho produce una retención de proteína debido al aumento de la capa de polarización lo cual es una ventaja en las aplicaciones de UF donde lo que se requiere es una alta retención de proteínas, como en nuestro trabajo. Además, la combinación de MF y UF produjo menos ensuciamiento de la membrana de UF, reduciendo los tiempos de limpieza y aumentando el tiempo de vida útil de la membrana polimérica. El proceso se detuvo a un VCR = 2,79, el cual logró una adecuada concentración de proteínas en el concentrado.

Para el cálculo del VCR se tuvieron en cuenta los siguientes volúmenes:

- ✓ Volumen inicial = 21,800 l
- ✓ Volumen permeado = 14 l
- ✓ Volumen concentrado = 7,8 l

$$VCR = \frac{\text{Volumen inicial}}{\text{Volumen concentrado}} = \frac{21,8 \text{ l}}{7,8 \text{ l}} = 2,795 \quad (3.9)$$

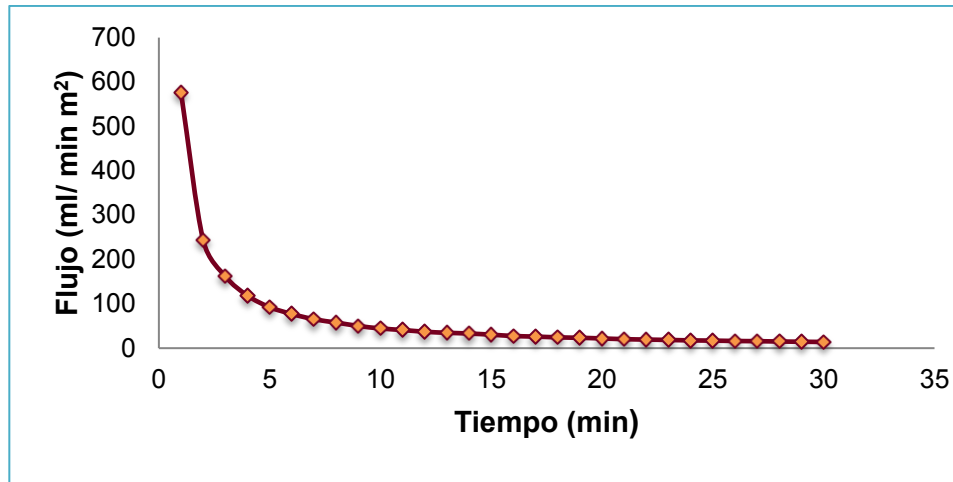


Figura 3.11: Perfil de flujo obtenido en la UF del suero de queso de cabra ($T= 11 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; $\Delta P= 4,2\text{bar}$).



Figura 3.12: Permeado (P) y concentrado (C) obtenido al finalizar el proceso de UF. Concentrado de UF, liofilizado (CL).

La Figura 3.12 muestra una fotografía de las dos corrientes obtenidas. Se aprecia el permeado (P) de color amarillento característico, por la presencia de lactoferrina entre otros compuestos y un concentrado blanco (C) de las proteínas del lactosuero.

El concentrado de proteína se liofilizó, como metodología de preservación por reducción de la actividad de agua, facilidad para transporte y almacenamiento. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el valor nutritivo y las características organolépticas son menos afectados que con otros métodos de secado (Fellows, 1994). Este aspecto es importante para el desarrollo de aplicaciones de alimentos.

Con el procedimiento descrito se obtuvo un polvo blanquecino, blando y poroso. En la Figura 3.12 se presenta una fotografía del concentrado proteico liofilizado (CL) en polvo.

En la Tabla 3.6 se muestran los resultados obtenidos para la caracterización fisicoquímica de la alimentación, el permeado, el concentrado y el concentrado en polvo. Luego de la ultrafiltración se observó que efectivamente las proteínas son concentradas 11 veces mientras que las grasas se concentraron 6 veces respecto al permeado.

Tabla 3.6: Caracterización fisicoquímica de la alimentación, el permeado, el concentrado y el concentrado en polvo.

Muestra	pH	%Humedad (p/v)	% Proteína (p/v)	% Grasa (p/v)	% Ceniza (p/v)	%Lactosa (p/v)
Alimentación (suero)	5,95±0,07	92,97±0,10	1,28±0,00	0,17 ±0,01	0,55±0,05	5,03±0,00
Permeado	6,15±0,21	95,29±0,20	0,23±0,04	0,43±0,08	0,41±0,04	3,64±0,00
Concentrado	5,90±0,00	89,71±0,10	2,68±0,04	2,81±0,35	0,51±0,04	4,29±0,00
CP (*) (p/p)	6,10±0,00	3,52±0,07	23,73±0,03	18,94±0,37	5,99±0,03	47,82±0,00

(*)CP: Concentrado proteico. Concentrado ultrafiltrado liofilizado.

Se determinó el grado de enriquecimiento en el componente de interés: la proteína sérica y se calculó el coeficiente de retención (σ^*), de acuerdo a la ec. 3.2. Este coeficiente

en cualquier punto del proceso, se define como el grado de separación de un componente del sistema por medio de la membrana, bajo condiciones definidas.

El valor del coeficiente de retención que se obtuvo a partir de la ecuación (3.2) es $\sigma^* = 0,91$, lo que equivale a una muy buena recuperación de las proteínas (91,4%).

3.8. Procedimiento de limpieza de la membrana de UF empleado en las experiencias realizadas con las diferentes matrices de alimentación.

Para la limpieza de la membrana de UF se emplea el procedimiento "Cleaning in Place" (CIP) que se realiza in situ de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Sin embargo, es necesario ajustar algunas variables en función de la composición de nuestra solución de alimentación.

En la Tabla 3.7 puede observarse el protocolo de limpieza empleado en nuestras experiencias. El mismo, implicó la realización de diferentes pasos en los cuales al finalizar cada corrida, se aplicaron ciclos de agua/álcali (NaOH, pH=12,5±0,5)/enjuague (agua), combinando tiempo, temperatura, presión ($\Delta P = 1$ bar) para lograr una limpieza por barrido superficial y luego una limpieza más profunda a través de los poros, ya que el ensuciamiento se produce principalmente sobre la superficie de la membrana. Finalmente se realiza una limpieza utilizando NaClO (grado comercial) 300 ppm que completa la limpieza y desinfección de la membrana.

La medida de la permeabilidad normalizada de agua (NWP) se determinó para verificar la recuperación del flujo a través de la membrana (Marshall y col., 1993). La limpieza química de la membrana permitió el re-establecimiento de su permeabilidad y selectividad manteniendo un óptimo desempeño durante el proceso de separación.

Tabla 3.7: Protocolo de limpieza de la membrana de ultrafiltración de polietersulfona

Etapa	Agente	Tiempo (min)	Temp. (°C)	Características
Primera etapa de lavado	Agua	60	45	Combinado de etapas con y sin flujo de permeado (sin aplicación de presión), que permite una limpieza externa e interna de la membrana (limpieza por pulso). Sin recirculación del flujo de concentrado.
		30		
Segunda etapa de limpieza	NaOH 0,1 N	90	45	Recirculación del flujo de concentrado, combinando etapas con y sin flujo de permeado.
		60		
Enjuague	Agua	15	45	Sin recirculación del concentrado.
	Agua	15		
Limpieza y desinfección	NaClO 0,1 N	-	22-25	Sin recirculación, hasta obtención del pH del agua destilada
		-		
Limpieza y desinfección	NaClO 0,1 N	60	45	Con y sin recirculación del flujo de concentrado. Combinando etapas con y sin flujo de permeado.
		45		
Enjuague	Agua	-	22-25	Sin recirculación, con flujo de permeado, hasta obtención de pH del agua.
		-		
Control del flujo de permeado				Si el flujo de permeado se recupera se finaliza la limpieza, de lo contrario se repite el proceso desde la etapa de limpieza con NaOH

3.9. Conclusiones

Las soluciones de alimentación tratadas a través de diferentes procesos con membrana contienen componentes de diferente tamaño molecular. Por esta razón, la aplicación de la tecnología de membranas permitió separar selectivamente componentes de interés sin cambios de fase y a temperatura ambiente. Estas dos últimas condiciones resultan muy favorables para el tratamiento de la leche y derivados dado que contribuyen a su mejor preservación.

Se estudió el descremado de la leche cruda con el objeto de lograr productos con mejores características desde el punto de vista nutricional. Se encontró que utilizando la tecnología de microfiltración se lograba un descremado del 76 %, en una sola pasada por un filtro frontal, obteniendo ventajas adicionales en cuanto a la higiene y calidad de la leche.

A partir de la aplicación ultrafiltración a los fructanos nativos de agave, se pudieron separar fracciones de mayor grado de polimerización, obteniéndose así fructanos de alto rendimiento (FAAR) y fructanos de alto grado de polimerización (FAGP), permitiendo utilizar estos carbohidratos en diferentes aplicaciones.

El concentrado de proteínas a partir de un desecho de la elaboración de queso de cabra se obtuvo utilizando tecnología de membranas. El procedimiento empleado permitió una retención del 91,4% del contenido proteico del suero de partida (alimentación). Este concentrado se liofilizó obteniendo un polvo estable.

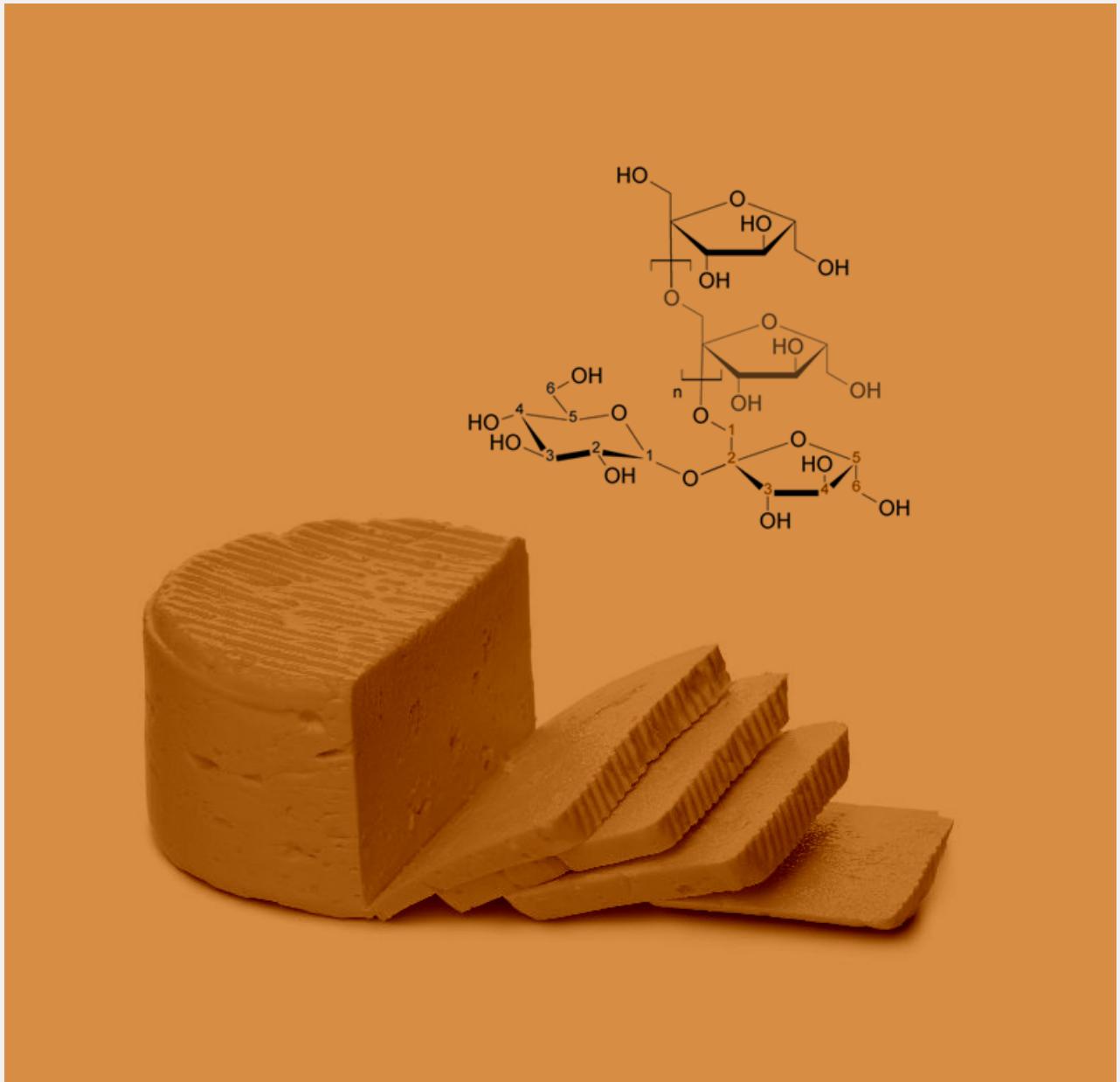
Utilizando una combinación de microfiltración y ultrafiltración se pudieron concentrar las proteínas provenientes de la leche de soja. Luego del proceso de liofilización se obtuvo un polvo con una concentración de proteínas del 43%.

Respecto al método de limpieza utilizado en el equipo de membranas, podemos concluir que es un método adecuado ya que finalizada su aplicación, se recuperó el caudal de flujo inicial, indicando una óptima limpieza de la membrana.

Capítulo 4

Desarrollo de quesos funcionales con fructanos

Diana Palatnik



CAPÍTULO 4: DESARROLLO DE QUESOS FUNCIONALES CON FRUCTANOS

4.1. Introducción

En el Capítulo 1 se describió el valor nutricional de los quesos, alimento de elevada demanda en el mercado que sobresale entre otros productos ya que posee proteínas de alto valor biológico con perfil de aminoácidos muy favorables y de buena digestibilidad. Sin embargo, el queso tiene restricciones a su consumo por su alto contenido de calorías y grasas saturadas y por ello con potencial riesgo para la salud. En efecto, una de las tendencias del mercado es la elaboración de quesos con contenido graso reducido para minimizar dichos efectos negativos. Con el propósito de compensar texturalmente el producto, en este trabajo de tesis se estudió el agregado de fructanos: inulina y fructanos de agave, a diferentes variedades de quesos blandos: fresco y queso untable reducidos en grasa, con el fin de obtener productos con propiedades benéficas para la salud aprovechando las características de estos carbohidratos las cuales fueron descritas en el Capítulo 1. Además, los quesos, como la mayoría de los productos lácteos no contienen fibras por lo que los fructanos se están utilizando de manera creciente en el procesado de este tipo de alimentos, ya que como no son digeridos en el intestino y se comportan como fibra alimentaria lo que les imparte otra característica saludable a los quesos.

Se utilizaron diferentes fracciones de fructanos (FAN, FAAR y FAGP) obtenidas por tecnología de membrana descrita en el Capítulo 3 e inulina nativa (GR) e inulina de alto rendimiento (HP) (Orafti). Éstas se diferencian por el grado de polimerización que es de 12 y 25, respectivamente. Además, presentan diferente poder endulzante respecto de la sacarosa, siendo del 10% para la nativa y del 0% para su forma de alto rendimiento (Roberfroid y Slavin, 2000). Respecto a su solubilidad, en el caso de la inulina GR, es de 120 g/l a 25°C - 350 g/l a 90°C, mientras que para la HP es de menos de 5 g/l a 25°C (Hoja de seguridad Orafti).

La tecnología básica de fabricación de un queso es similar para casi todas las variedades, pero es importante mencionar que cambios relativamente pequeños en las condiciones de elaboración dan lugar a importantes diferencias en el producto final. En

general estas diferencias residen en la utilización de distintos tipos de fermentos, en variaciones en las temperaturas de cocción, corte de la cuajada, tamaño del grano de queso, tiempos de salmuera y maduración, y otras condiciones tecnológicas.

4.2. Desarrollo de quesos blandos

La elaboración de cada una de las muestras de queso estudiadas se realizó a partir de 2500 ml de leche cruda proveniente de un tambo de la provincia de San Luis. Antes de comenzar con el proceso de elaboración se realizó una reducción de grasas de la materia prima con el fin de obtener un producto bajo en materia grasa y por lo tanto, más saludable. Para el descremado se utilizó tecnología de membranas, más precisamente la tecnología de microfiltración como se ha explicado en el Apartado 3.7.1. del Capítulo 3 del presente trabajo de tesis. Una vez descremada, se le realizó un análisis fisicoquímico y se comenzó con el proceso de elaboración de los quesos.

4.2.1. Etapas de elaboración de quesos blandos

Las diferentes etapas de elaboración de quesos blandos se describen a continuación:

- ✓ **Descremado de la leche:** Como se dijo previamente, el descremado de la leche se realizó por microfiltración (Capítulo 3).
- ✓ **Pasteurización:** La pasteurización es una operación que se realiza para destruir la flora patógena y disminuir la flora banal o alteradora. En el proceso de pasteurización se combinan tiempo y temperatura de modo tal de asegurar la destrucción de agentes patógenos tales como *Mycobacterium, tuberculosis*, Brucella, Salmonella, etc. y alterando en lo mínimo posible la estructura física y química de la leche y las sustancias con actividad biológica tales como enzimas y vitaminas (http://www.portalechero.com/innovaportal/v/725/1/innova.front/proceso_de_pasteurizacion_.html).

Con este fin se calentó la leche a 65°C y se la mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se enfrió rápidamente usando un baño de hielo.

- ✓ **Agregado de fermento:** Los fermentos, como se describió con más detalle en el Capítulo 1, Apartado 1.1.4.2., están constituidos por bacterias lácticas que permiten la acidificación y la coagulación de la leche y el desuerado, inhibiendo, además, el desarrollo de otros microorganismos no deseados. Existen diferentes tipos de fermentos y el elegido depende del tipo de queso que se quiere elaborar. En este trabajo se utilizó un fermento mesófilo homofermentativo, liofilizado de inoculación directa compuesto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CHR HANSEN R-704). Si bien este fermento es de inoculación directa, se sugiere dejar pre-madurar durante 30 minutos en leche a temperatura óptima de $34\pm 2^{\circ}\text{C}$ antes de agregarlo al proceso (Ortiz, 2015).

La temperatura de trabajo también se mantuvo entre $32\text{-}37^{\circ}\text{C}$ durante gran parte de la elaboración para permitir la acción del fermento (Bain, 2015).

- ✓ **Agregado del Cloruro de Calcio:** Una vez transcurrido el tiempo para la fermentación, se agrega el CaCl_2 que, como se explicó en el Capítulo 1, tiene la función de ayudar a la formación de una cuajada más firme, entre otras funciones. Se pesó 1 g de cloruro de calcio (BDH Chemicals Laboratory Reagents) y se lo disolvió en agua destilada descarbonatada.
- ✓ **Cuajado:** En el Capítulo 1, se explicó en detalle el proceso de cuajado. Para que se produzca la coagulación de las caseínas, se agregó el cuajo (0,2 g, CHY-MAX EXTRA de CHR HANSEN, coagulante en polvo) y se dejó actuar durante 40 minutos. Para asegurarse que la coagulación ha llegado a su fin, se introduce un cuchillo en la masa y se comprueba que salga seco, sin restos de cuajada, lo que indica que ésta ya se ha formado.
- ✓ **Corte de la cuajada:** el corte de la cuajada permite que se produzca el desuerado. Si se pretende que el queso tenga poca humedad, como en el caso de los quesos duros, se harán cortes más pequeños. En cambio, si lo que se busca es un producto final con mayor humedad, se harán cortes más grandes. En el caso de los quesos elaborados en el laboratorio, se realizaron cortes de 2×2 cm aproximadamente.
- ✓ **Desuerado:** La principal causa de la sinéresis o desuerado es el re-acomodamiento de la red proteica continua que forman las micelas de para-caseína. El proceso se inicia cuando, después que la acción del cuajo ha generado la firmeza adecuada en

el gel, éste se corta, creando así superficie libre a través de la cual puede ocurrir la expulsión de líquido. Por eso, generalmente el tamaño del corte es proporcional al contenido de humedad deseado en el queso. Una vez cortada la cuajada, los granos quedan en suspensión y se calienta la masa 2°C por encima de la temperatura de coagulación ($32\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), se agita suavemente (evitando romper los cubos de cuajada) y se deja en reposo durante 10 minutos. Este proceso facilita la expulsión del suero del grano de la masa. Una vez transcurridos los 10 minutos, se vuelca todo en una tela quesera y se realiza un pre prensado apretando la masa dentro de la tela facilitando la expulsión del líquido.

- ✓ **Moldeo:** Los moldes queseros pueden ser plásticos o metálicos y de diferentes formas y para quesos de diferentes pesos. Además, tienen perforaciones pequeñas para el drenaje del suero, que junto con el proceso de prensado, ayuda a que los granos de cuajada se transformen en una masa continua. En el caso de los quesos elaborados durante esta tesis, el envasado se realizó en moldes queseros plásticos de 250 g como los que se muestran en la Figura 4.1.



Figura 4.1: Moldes queseros de plástico de 250g

- ✓ **Prensado:** Se colocaron los moldes apilados en una prensa quesera artesanal construida en la Facultad (Figura 4.2) y se ajustó para ejercer presión sobre los moldes permitiendo el drenado de suero. Esta etapa permite la expulsión de suero excedente y el tiempo de prensado fue variando entre los diferentes lotes de acuerdo a la disminución del pH hasta el valor deseado: $5,4 \pm 0,1$.

- ✓ **Salado:** el papel fundamental del salado es extraer un poco más de suero, regular el desarrollo de microorganismos, incorporar sal para realzar sabores y contribuir a la formación de la corteza del producto. El día anterior a la elaboración de las muestras, se preparó una salmuera a una concentración de 21°Baumé (°Be), que es la concentración recomendada para quesos de pasta blanda (Castañeda y col., 2005).



Figura 4.2. Prensa artesanal utilizada en el laboratorio

Teniendo en cuenta que 1 °Be equivale a 1 kg de sal en 100 l de agua, se pesó la sal y se agregó a un recipiente con 10 l de agua. Se calentó y se dejó hervir por 30 min. Se dejó enfriar y se llevó a heladera a $6\pm 1^{\circ}\text{C}$, temperatura óptima para el salado de quesos blandos (entre $5\text{-}8^{\circ}\text{C}$). Se calculó el tiempo de permanencia en la salmuera de acuerdo al peso de los quesos, teniendo en cuenta que para 1kg de queso se requieren 60 minutos de salado (Castañeda y col., 2005).

- ✓ **Almacenamiento:** Luego del salado, las muestras se almacenaron en heladera a temperatura controlada.

En la Figura 4.3 se presenta el diagrama de flujo general que se siguió en la elaboración de quesos blandos.

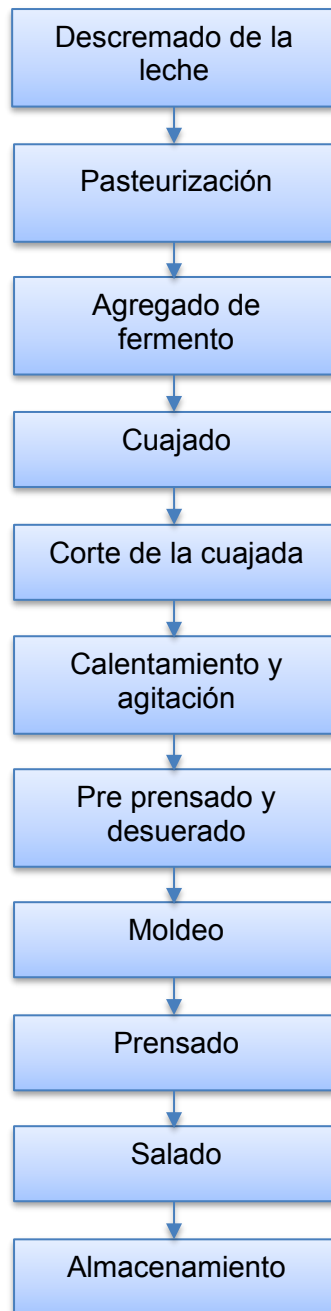


Figura 4.3: Diagrama de flujo general utilizado en la elaboración de quesos blandos

Al final de cada etapa se midieron tanto pH como temperatura asegurándose que estuvieran dentro de los parámetros aceptables.

4.2.1.1. Desarrollo de quesos blandos con inulina

Para la obtención de quesos blandos con inulina, se agregó inulina HP (alto renimiento), en polvo o en gel, en diferentes etapas del proceso general descrito en la Figura 4.3, como se muestra en la Figura 4.4.

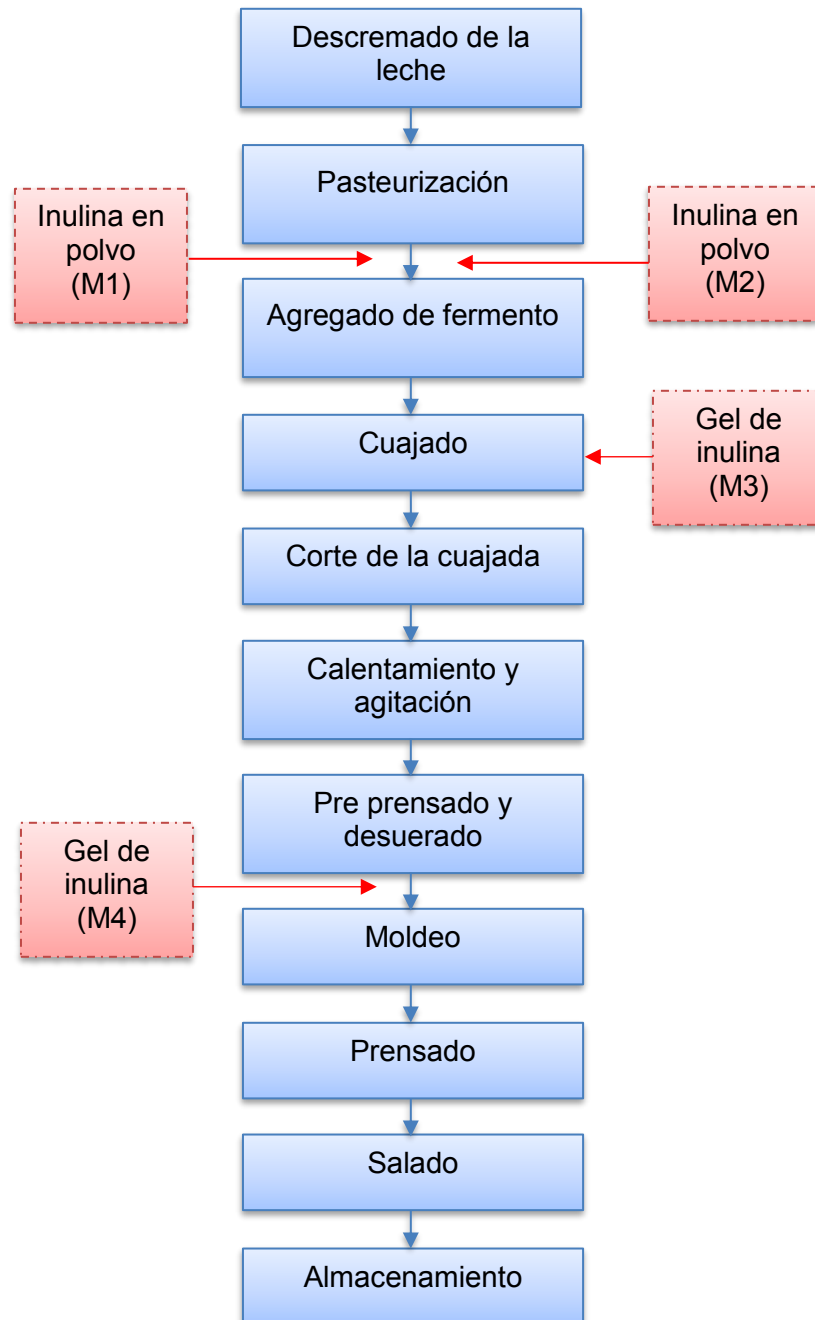


Figura 4.4: Etapas de agregado de inulina en polvo en el diagrama de flujo general de elaboración de quesos blandos

Se realizaron diferentes pruebas en el agregado de inulina, debido a sus características de solubilidad, buscando la manera de que ésta quedara retenida en un mayor porcentaje dentro de la matriz quesera y así poder obtener un alimento enriquecido en fibras.

a) **Elaboración de muestras con agregado de inulina en polvo**

Todas las muestras se elaboraron por duplicado. Una vez pasteurizada la leche, ésta se enfrió en baño de hielo controlando la temperatura hasta alcanzar los $36 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura a la cual se agregó la inulina en polvo (HP) previamente pesada de acuerdo al porcentaje final deseado. La adición se hizo de manera suave y pausada revolviendo continuamente para evitar la formación de grumos. Una vez realizada la adición del carbohidrato, la elaboración se continuó de acuerdo a los pasos descritos en la Figura 4.3.

Las muestras obtenidas mediante este proceso se etiquetaron como M1 y M2 (Figura 4.4), donde:

- **M1:** muestra con 125g de inulina en polvo (5%p/v)
- **M2:** muestra con 37,5g de inulina en polvo (1,5%p/v)

Además de las muestras con agregado de inulina al 1,5 y 5%, se hicieron pruebas con otras concentraciones (0,5%, 1%, 3%) y se elaboraron dos muestras control, sin inulina, una a partir de leche entera, sin descremar, queso entero control (QEC) y otra a partir de leche descremada por MF, queso descremado control (QDC).

Caracterización fisicoquímica de los quesos con inulina agregada en polvo

En la Tabla 4.1 se presenta la composición fisicoquímica en las muestras de queso con inulina adicionada al 1,5% y 5% (p/v) y se comparan con los datos obtenidos las muestras control, QEC y QDC.

Cada una de estas determinaciones se realizó por duplicado siguiendo la metodología planteada en el Capítulo 2. El porcentaje de hidratos de carbono totales se obtuvo por diferencia.

Tabla 4.1: Composición fisicoquímica de quesos blandos con agregado de inulina (media \pm SD)

Muestra	Humedad (%p/p)	Proteínas (%p/p)	Grasas (%p/p)	Cenizas (%p/p)	Hidratos de carbono (%p/p)
QEC	46,05 \pm 2,5	23,06 \pm 1,5	24,07 \pm 3,45	3,8 \pm 0,32	3,02 \pm 1,05
QDC	48,95 \pm 4,35	26,18 \pm 1,01	15,83 \pm 1,17	4,05 \pm 0,35	4,99 \pm 1,15
M1 (5%)	49,09 \pm 1,35	25,52 \pm 1,02	13,98 \pm 0,40	3,89 \pm 0,44	7,52 \pm 0,50
M2 (1,5%)	49,01 \pm 1,46	26,37 \pm 2,17	14,16 \pm 2,69	4,27 \pm 0,47	6,144 \pm 2,46

Los resultados confirman que el descremado de la leche por microfiltración fue efectivo para obtener muestras con menor cantidad de materia grasa. En efecto, el contenido graso, en el caso de las tres muestras obtenidas a partir de leche microfiltrada (M1, M2, QDC) permitió que se clasificaran como quesos magros, mientras que el queso entero, como se esperaba, se clasificó como queso semi-magro. Respecto al contenido de humedad, según el Artículo 605 del Capítulo VIII del CAA, las muestras obtenidas, con y sin inulina, se clasificaron como quesos de alta humedad.

Determinación de inulina por HPLC

Para poder determinar si la cantidad de inulina retenida en cada muestra elaborada era la deseada, se realizó la determinación de fructanos por HPLC. La determinación se realizó en la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, a través la pasantía realizada con la Dra. Ángela Zuleta.

Este análisis se realizó tanto en las muestras de queso como en sus respectivos sueros siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 2.1.6. del Capítulo 2. Los resultados del porcentaje de inulina retenida en los quesos se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Porcentaje de inulina retenida en muestras de quesos blandos. (media \pm SD).

Muestra	Inulina (%p/p)
M1	1,04 \pm 0,11
M2	0,65 \pm 0,09

Los resultados demostraron que la cantidad de inulina retenida, fue muy pobre comparándola con la cantidad agregada: de los 125g agregados a M1, sólo se retuvieron 26 g aproximadamente; de los 37,5g adicionados a M2, 16,25g se encontraron en el producto final. Como ya se mencionó la alta solubilidad de la inulina, produce que ésta se pierda con el suero.

Los quesos obtenidos fueron estudiados a través de SEM, con el propósito de analizar y procurar correlacionar la microestructura con la composición de las muestras. Las imágenes se muestran en la Figura 4.5.

Las imágenes de SEM mostraron glóbulos grasos integrados a la matriz proteica. En la imagen (b), correspondiente a la muestra M1 con 5% de inulina, pueden observarse puntos blancos que indicarían la presencia del fructo-oligosacárido. Estos puntos se observan en menor cantidad y tamaño en la imagen (c), correspondiente a la muestra con 1,5% de inulina (M2) (Salvatore y col., 2014; Meyer y col., 2011). Las imágenes observadas están en concordancia con los resultados presentados en la Tabla 4.2.

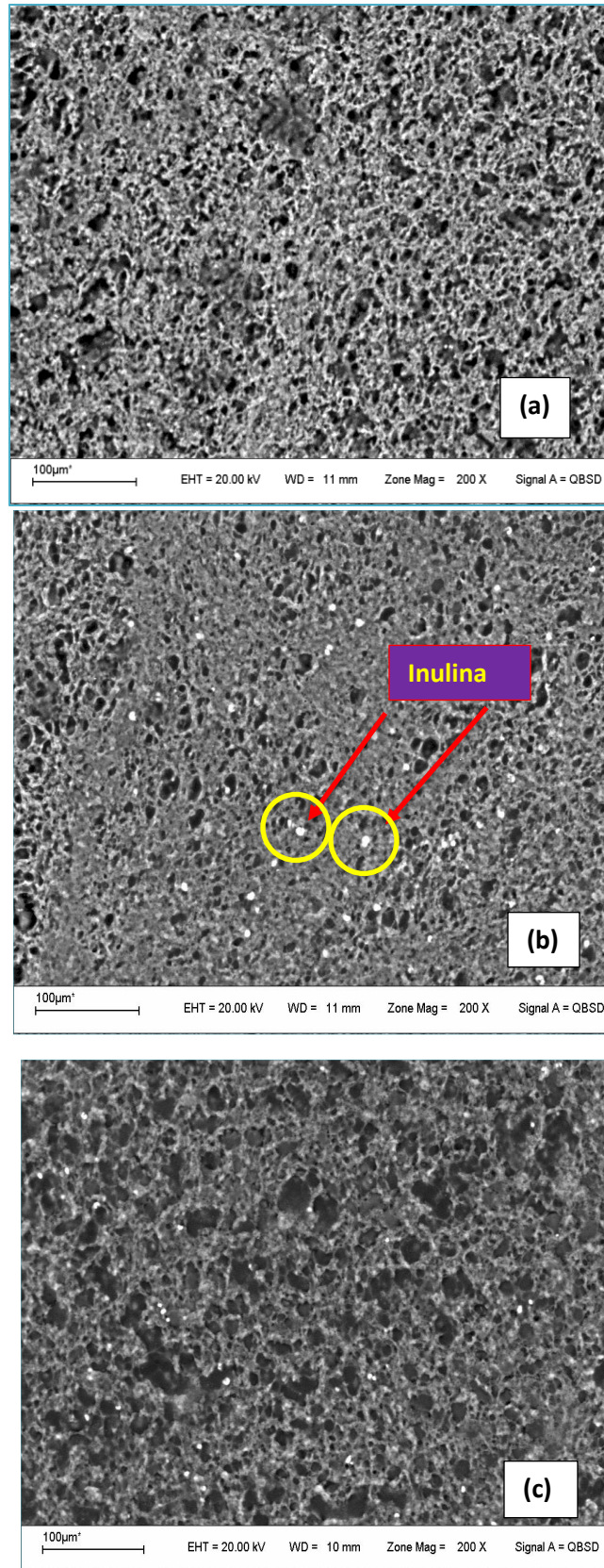


Figura 4.5: Imágenes SEM 200X de a) QEC; b) M1; c) M2

b) Elaboración de muestras con agregado de inulina en gel

Teniendo en cuenta los bajos porcentajes de retención de las muestras con inulina agregada en polvo (Tabla 4.2), se investigaron otras formas de adición, como el agregado del carbohidrato previa formación de un gel (Kim y col., 2001; Glibowski, 2009). Además, se realizaron variaciones en la etapa o momento de adición durante la elaboración de las muestras (Figura 4.4).

Se puede definir a un gel como una forma semirígida de una dispersión sólida en un líquido (Kim y col., 2001). El gel de inulina es una red tridimensional de partículas submicrónicas insolubles con gran cantidad de agua inmovilizada, la cual asegura la estabilidad física. La inulina muestra propiedades gelificantes de alto nivel (para inulina de achicoria estándar >25% y para la inulina de cadena larga >15%) y genera una estructura de gelificación después del cizallamiento. Cuando la inulina está totalmente disuelta en agua u otro medio acuoso, la utilización de un instrumento de corte como un mezclador u homogeneizador da como resultado la formación de una estructura de color blanco cremoso que se puede añadir fácilmente en los alimentos como un sustituto de grasa hasta en un 100%. La propiedad de gelificación de la inulina está fuertemente influenciada por la concentración, la cantidad total de materia seca, factores de cizallamiento (por ejemplo, temperatura, tiempo, velocidad o presión) y por el tipo de instrumento de corte utilizado. Sin embargo, no se ve afectada por el pH (pH entre 4 y 9). Además, la crio-microscopía electrónica reveló que los geles de inulina están compuestos por una estructura tridimensional de fragmentos submicrónicos insolubles en agua (Zimeri y Kokini, 2002). Chiavaro y Vittadini (2007) estudiaron la capacidad de inulinas comerciales, principalmente sacáridos de cadena larga (SCL), en el rango de 20 a 40% p/p en solución con diferente composición (perfil oligo-polisacáridos) para formar gel a 25 y 50°C. La inulina constituida principalmente por oligosacáridos gelifica a concentraciones de 30 a 60% p/p y la inulina constituida por SCL gelifica en el rango de 20 a 40% p/p. Las propiedades de textura y las propiedades térmicas de los geles fueron evaluadas durante el almacenamiento a 4°C. Los geles de inulina predominante en SCL (en fresco y durante el almacenamiento) mostraron ser más duros y más adhesivos (Castellanos y col., 2016).

Elaboración de geles de inulina: Se elaboraron distintos geles variando concentración de inulina y tiempo de calentamiento del gel. Para esto se prepararon soluciones al 20% y

30% (p/v) de inulina y cada una de estas soluciones fue sometida a diferentes tiempos de calentamiento manteniendo una temperatura de 90°C: 5', 10' y 20' siempre con agitación constante. Teniendo en cuenta que en el caso de geles proteicos, al aumentar la concentración de proteínas el tiempo de gelificación disminuye, se probaron diferentes tiempos para encontrar el óptimo para los geles de inulina a diferentes concentraciones (Yamul, 2008).

Se analizó la consistencia de los geles utilizando un viscosímetro Brookfield DV III. Para el rango de medición del equipo, no pudieron medirse los de baja concentración de proteínas debido a la baja consistencia que presentaban, apreciable a simple vista. Sin embargo, el gel al 30% si pudo analizarse presentando buena consistencia por lo que se consideró el más indicado para trabajar. Respecto a los geles elaborados, se encontró que el gel al 30% de inulina con un tiempo de calentamiento de 20' fue el que presentó mejor consistencia.

De este modo se desarrollaron las muestras de queso con inulina incorporada como gel (formado al 30% p/v) en diferentes etapas de la elaboración:

- **M3:** Adición luego de la incorporación del cuajo y antes de formada la cuajada
- **M4:** Incorporación del gel luego de la etapa de sinéresis, mezclando y moldeando

Las muestras M3 y M4 también fueron analizadas por HPLC, para determinar el contenido de inulina en los quesos producidos y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Porcentaje de inulina retenida en muestras de quesos blandos (media ±SD)

Muestra	Inulina (%p/p)
M3	1,8±0,11
M4	1,3±0,17

Se puede observar comparando los resultados de las formas de incorporación de inulina mostradas en las Tablas 4.2 y 4.3 que la muestra que retuvo mayor cantidad de inulina

fue la muestra con inulina agregada en forma de gel al 30% antes de formada la cuajada (M3), ($p < 0,5$). Sin embargo, esta cantidad no resulta suficiente para clasificar la muestra como producto adicionados con fibra, según la reglamentación vigente, por lo que se buscaron otros procedimientos para lograr ese objetivo.

Teniendo en cuenta estos resultados, se estudiaron otras alternativas para introducir en la matriz quesera un fruto oligosacárido.

Una de ellas fue el estudio del agregado de agave, cuya principal característica distintiva, como se describió anteriormente es que presenta estructuras ramificadas. Asimismo se probó desarrollar quesos diferentes como los quesos crema, de tipo untable, donde la inulina tiene mayor probabilidad de ser retenida adecuadamente.

Estas experiencias se describen a continuación.

4.2.1.2. Desarrollo de quesos blandos con fructanos de agave

En el Apartado 1.3.4.2. del Capítulo 1, se habló de las características y propiedades de los fructanos de agave, mientras que en el Apartado 3.7.2. del Capítulo 3 fue detallado el proceso de obtención de diferentes fracciones de fructanos de agave obtenidas mediante el uso de tecnología de membrana y su caracterización.

A continuación se describe el desarrollo de quesos (Figura 4.6) reducidos en grasa, con la incorporación de diferentes tipos o fracciones de fructanos de agave con el propósito de lograr una muestra con suficiente prebiótico retenido para ser considerado como un alimento funcional y que además represente una aplicación alternativa de este producto obtenido de un vegetal abundante en América Latina, principalmente en México.

La elaboración de los quesos blandos con diferentes concentraciones de fructanos de agave, se realizó siguiendo el proceso general de elaboración de este tipo de quesos.

En este procedimiento se empleó el mismo equipamiento y condiciones similares a las descritas en la elaboración de quesos blandos con inulina. El agregado de los fructanos en forma de polvo se realizó luego de la pasteurización, como se observa en la Figura 4.6. Se ensayaron distintas concentraciones de fructanos a fin de seleccionar la óptima, así se desarrollaron quesos con concentraciones de 0,5 y 5% (p/v) de los tres tipos de fructanos: fructanos de agave nativos (FAN), fructanos de agave de alto grado de polimerización (FAGP) y fructanos de agave de alto rendimiento (FAAR).



Figura 4.6: Proceso de elaboración de quesos blandos con fructanos

Análisis de la composición de los quesos blandos con fructanos de agave

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de los quesos se muestran en la Tabla 4.4. Se analizaron también muestras control, una obtenida a partir de leche entera (QEC) y otra obtenida con la leche descremada por MF, la cual se denomina QDC.

Se determinó el contenido de humedad, grasa, proteínas, cenizas, pH y contenido de fructanos a través de un análisis refractométrico (Palatnik y col., 2016) desarrollado en el Capítulo 2.

Como se esperaba, las mayores diferencias estadísticamente significativas se observaron en el contenido de grasas del queso entero control y el resto de las muestras

($p < 0,05$). En efecto, como se establece en el Capítulo VIII del Código Alimentario Argentino para quesos, el QEC corresponde a un queso semigraso de contenido graso medio (25-44,9% p/p de grasa), y el resto de las muestras se clasifican dentro de los quesos magros (10-24,9% p/p).

Tabla 4.4: Caracterización fisicoquímica de las muestras (media \pm SD)

Muestra	pH	Humedad (%p/p)	Grasas (%p/p)*	Proteínas (%p/p)	Fructanos (%p/v)	Cenizas (%p/p)
QEC	5,07 \pm 0,03	48,65 \pm 1,98	27,07 \pm 2,50 ^a	24,60 \pm 0,06	--	3,80 \pm 0,24
QDC	5,50 \pm 0,04	45,92 \pm 4,35	15,83 \pm 0,16 ^b	26,17 \pm 1,01	--	4,05 \pm 0,35
FAAR 0,5	5,51 \pm 0,01	47,45 \pm 1,36	15,84 \pm 4,54 ^b	26,19 \pm 0,91	2,30	4,06 \pm 0,06
FAAR 5	5,47 \pm 0,01	48,55 \pm 2,43	10,08 \pm 3,48 ^b	27,09 \pm 0,34	3,90	3,80 \pm 0,21
FAGP 0,5	5,48 \pm 0,03	49,13 \pm 2,25	10,74 \pm 4,56 ^b	25,43 \pm 0,56	1,40	3,97 \pm 0,25
FAGP 5	5,52 \pm 0,02	45,89 \pm 1,88	12,56 \pm 1,52 ^b	27,72 \pm 0,81	3,35	3,89 \pm 0,16
FAN 0,5	5,49 \pm 0,01	48,14 \pm 1,67	11,98 \pm 0,55 ^b	28,45 \pm 0,76	0,00	4,05 \pm 0,19
FAN 5	5,50 \pm 0,00	45,46 \pm 1,90	14,52 \pm 0,14 ^b	30,58 \pm 0,54	4,12	3,67 \pm 0,13

*Los supraíndices a y b indican diferencias significativas entre los resultados dentro de la misma columna ($p < 0,05$).

QEC: queso control entero; QDC: queso descremado control; FAAR: fructanos de alto rendimiento; FAGP: fructanos de alto grado de polimerización; FAN: fructanos de agave nativos.

Como el contenido graso está disminuido, el contenido de humedad aumenta y las proteínas juegan un mayor papel en el desarrollo de la textura (Mistry, 2001). Además, de acuerdo a la legislación argentina (Código Alimentario Argentino, 2014), las muestras corresponden a quesos de alta humedad (46-54,9% p/p de contenido de humedad) y reducidos en grasas (10,0- 24,9% p/p de contenido graso).

Respecto al contenido proteico, los resultados mostraron un alto contenido de proteínas para el tipo de queso estudiado, comparado con otros datos reportados en la bibliografía (Franolino y col., 2010; Milesi y col., 2007; Salvatore y col., 2014). Además, la cantidad de fructanos restante en los quesos desarrollados contribuyeron a equilibrar la composición y textura de las muestras. Se observó que al aumentar el contenido de fructanos

agregados a la formulación, la cantidad retenida en el queso también aumentó, con un porcentaje de retención del 1% y 4,12% para las muestras con 0,5% y 5% de fructanos agregados respectivamente. En este sentido, Salvatore y col. (2012) informaron una alta retención de fructanos de cadena larga en queso fresco de leche de cabra con un 22% de sólidos totales.

El pH se mantuvo similar en todas las muestras, en el rango de 5,07- 5,22 el cual fue óptimo para las consideraciones del sabor (Bachmann, 2001).

Cálculo de rendimiento

Se calculó el rendimiento alcanzado (R) en la producción de cada muestra con la siguiente ecuación (4.1):

$$R = \frac{\text{peso del producto}}{\text{peso de la leche}} \times 100 \quad (4.1)$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.5

Tabla 4.5: Rendimiento de los quesos con y sin fructanos agregados (media \pm SD)

Muestra	Rendimiento
QCE	8,76 \pm 1,51
QCD	8,68 \pm 1,91
FAAR 0,5	8,20 \pm 2,30
FAAR 5	8,28 \pm 1,71
FAGP 0,5	8,12 \pm 2,52
FAGP 5	8,36 \pm 2,31
FAN 0,5	8,22 \pm 2,70
FAN 5	8,26 \pm 2,00

QEC: queso control entero; **QDC:** queso descremado control; **FAAR:** fructanos de alto rendimiento; **FAGP:** fructanos de alto grado de polimerización; **FAN:** fructanos de agave nativos.

En la Tabla 4.5 se puede observar que los quesos con fructanos agregados presentaron un rendimiento muy similar al de los quesos control, reforzando el concepto de composición estructural de las muestras por el agregado del fructano y la adecuada retención de agua en la matriz del queso. Este resultado tiene importancia económica en la producción quesera.

Estudio de la microestructura

Se realizó un estudio de la microestructura de las muestras por SEM según lo descrito en el Capítulo 2. En la Figura 4.7 se muestran las imágenes obtenidas para las muestras control y los quesos con fructanos.

Las micrografías electrónicas se tomaron con el fin de establecer relaciones entre la microestructura de los quesos y su composición.

En todas las muestras se observaron matrices de proteínas con pequeños glóbulos de grasa dispersados, similar a lo previamente reportado por Karaman y Akalin (2013). Este tipo de estructura es común para los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada. En efecto, según Morales-Celaya y col. (2012), estos quesos tienen una estructura más estratificada que los obtenidos a partir de productos de leche cruda.

Comparando ambas muestras control, la muestra de queso entero y la muestra descremada, se pudo observar que el queso entero presentó un mayor cribado debido a su mayor contenido de grasas, con huecos de menor tamaño en la estructura del queso. El menor tamaño de los glóbulos de grasa parece estar relacionado a una menor incidencia de la coalescencia. En este sentido, Michalski y col. (2003) obtuvieron imágenes similares para quesos Camembert con pequeños glóbulos de grasa. Ellos demostraron que los pequeños glóbulos de grasa quedaban mejor atrapados en la matriz de caseína, teniendo una mayor área superficial y cadenas de caseína más finas debido a la distancia interglobular más pequeña. Este resultado fue consistente con la composición del queso que tiene un alto contenido de proteínas y de humedad.

La presencia de fructanos parece determinar una matriz de proteínas más intrincada, particularmente para las formulaciones con una mayor concentración de oligosacáridos; esto es FAAR, FAGP y FAN al 5% p/v, en los cuales la estructura tiende a parecerse a la estructura de la muestra de queso entero. Este resultado sugiere que la presencia de fructanos efectivamente actúa como agente texturizante, reemplazando parcialmente la grasa del queso.

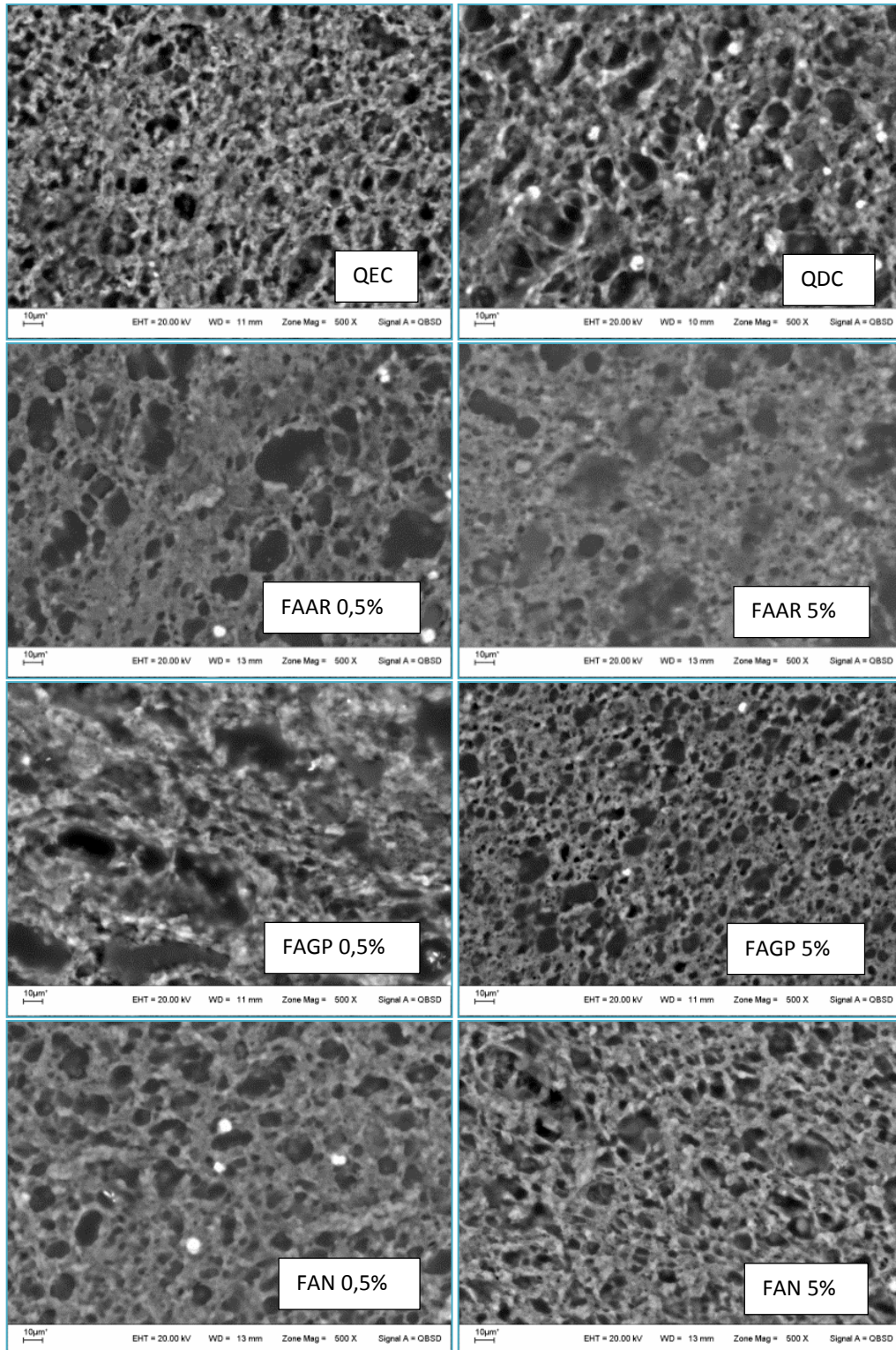


Figura 4.7: Micrografías electrónicas para las diferentes muestras, con y sin adición de fructanos (500X).

Adicionalmente, se observó que las muestras control presentaron una estructura de “panal de abeja” en la matriz proteica. Esta estructura se observa en las muestras con FAGP al 5% y más clara en las que tenían FAN a esa misma concentración. Las micrografías publicadas por Henelly y col. (2006) mostraron resultados similares para quesos conteniendo inulina los cuales fueron más lisos y uniformes respecto del control, sugiriendo que el oligosacárido agregado ligó el agua libre previniendo así la formación de las estructuras de “panal de abeja” durante la preparación de la muestra. Además, Picone y col. (2011) reportaron que la presencia de inulina en los geles de caseína a concentraciones de 0-6% (p/p) resultaron en una red de poros más cerrados. La deformabilidad del gel aumentó a medida que se incrementó la concentración de caseinato de sodio alcanzando un máximo de 0,60 a 5,58% (p/p), pero esto no fue afectado por la concentración de inulina.

A modo de esclarecer el comportamiento de los diferentes fructanos de agave en la matriz quesera, en la Figura 4.8 se presenta una evaluación del tamaño de partículas referido a la estructura o morfología de los diferentes fructanos agregados en la matriz de queso. Los tamaños de partículas se midieron a partir de imágenes tomadas del microscopio usando un micrómetro estándar.

Se encontró que las muestras FAN, FAGP y FAAR mostraron un diámetro medio de $19,55 \pm 2,74 \mu\text{m}$, $11,01 \pm 0,73 \mu\text{m}$ y $10,00 \pm 0,74 \mu\text{m}$, respectivamente. Además, mientras FAGP y FAAR mostraron una menor dispersión del diámetro, el FAN presentó partículas de tamaño pequeño, hasta $120 \mu\text{m}$. Este resultado puede sugerir que este aumento de heterogeneidad consigue una mayor integración en la matriz quesera y por lo tanto retiene más proteína, como se muestra en la Tabla 4.4. También actuaron mejor como reemplazantes de grasas ya que con menos grasa se logra una mejor imitación del queso entero a medida que se retiene una mayor cantidad de fructanos nativos, componentes con características prebióticas.

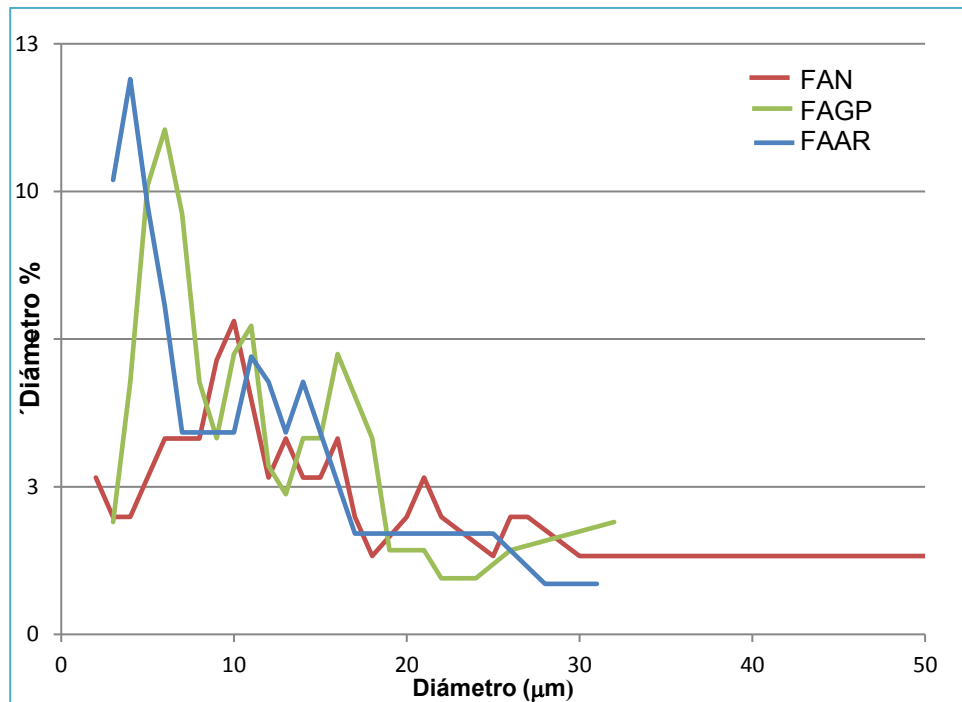


Figura 4.8.: Distribución el tamaño de partículas de los diferentes fructanos

Determinación del color de los quesos blandos con y sin fructanos de agave

Los resultados de las medidas de color en los quesos, se realizaron siguiendo el método detallado en el Apartado 2.2.4., Capítulo 2. Los resultados obtenidos sobre las muestras de quesos con fructanos se muestran en la Tabla 4.6.

Las muestras control y los quesos con fructanos, mostraron alto valor de L^* (alrededor de 85) lo cual refleja el grado de luminosidad, este parámetro tiene un mayor impacto sobre la apariencia percibida del producto. Los valores fueron similares a otros quesos blandos reportados en bibliografía (Juric y col., 2003). Los valores de a^* fueron positivos cercanos a cero sin presentar diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$), con la excepción de la muestra control entera, la cual tuvo el mayor valor de a^* ($p < 0,05$). El valor positivo de b^* indicó el grado de tonalidad amarilla. Estos valores son adecuados teniendo en cuenta que en el queso bajo en grasa, la eliminación de la grasa imparte un aspecto translúcido. En efecto, los parámetros colorimétricos obtenidos, estuvieron en el orden de aquellos reportados por Wadhvani y McMahon (2012), para quesos bajos en grasa sin colorante. Michalski y col. (2003) también obtuvieron quesos Camembert menos amarillos para las muestras con glóbulos de grasa pequeños.

De los resultados, se identificó que la presencia de fructanos no afectó significativamente el color de las muestras con respecto al queso control.

Tabla 4.6: Color de la superficie de los quesos blandos con y sin fructanos de agave (media \pm SD)

Muestra	L*	a*	b*
QEC	85,30 \pm 2,14	1,20 \pm 0,11	18,37 \pm 2,43
QDC	86,11 \pm 3,41	0,19 \pm 0,16	14,89 \pm 2,57
FAAR 0,5	85,78 \pm 1,64	0,18 \pm 0,16	14,92 \pm 2,24
FAAR 5	84,72 \pm 0,23	0,41 \pm 0,16	15,14 \pm 1,64
FAGP 0,5	85,92 \pm 1,71	0,22 \pm 0,15	14,00 \pm 1,55
FAGP 5	86,59 \pm 1,29	0,32 \pm 0,18	13,38 \pm 1,05
FAN 0,5	81,50 \pm 1,01	0,48 \pm 0,18	16,32 \pm 1,13
FAN 5	89,60 \pm 1,14	0,34 \pm 0,09	16,66 \pm 0,45

Análisis sensorial de quesos blandos con y sin fructanos de agave

Como se expresó anteriormente, el análisis sensorial en el desarrollo de alimentos es fundamental para establecer el grado de aceptación de los mismos por parte de los consumidores.

En este caso se aplicó el test de discriminación, es decir, un juicio global comparando una muestra control (QDC) y una muestra con fructano. Se realizaron pruebas con todas las muestras con fructanos, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las pruebas, por lo que se promediaron los resultados y se presentan en la Figura 4.9 comparados con el queso control. Intervinieron en el análisis 50 personas semientrenadas entre docentes y alumnos de la Facultad.

Los datos obtenidos a partir del análisis de los quesos elaborados, se analizaron estadísticamente usando el programa “GraphPadInStat”. Los datos fueron evaluados con el test de comparación múltiple Tukey-Kramer en los casos donde se consideraron dos o más

comparaciones. Por otro lado, se usó el T-test asumiendo un $p < 0.05$ como estadísticamente significativo (SAS, 1989).

El test de discriminación aplicado entre el queso control y las muestras con fructanos no mostraron diferencias marcadas con respecto a los atributos considerados.

Los quesos con fructanos tuvieron una adecuada aceptación global asemejándose a la muestra control en particular en los parámetros de color y dulzor, presentando menor aceptación en los parámetros de acidez, textura y flavor.

Una conclusión similar fue encontrada por Juan y col. (2013), empleando inulina como reemplazante de grasas en quesos frescos reducidos en grasa.

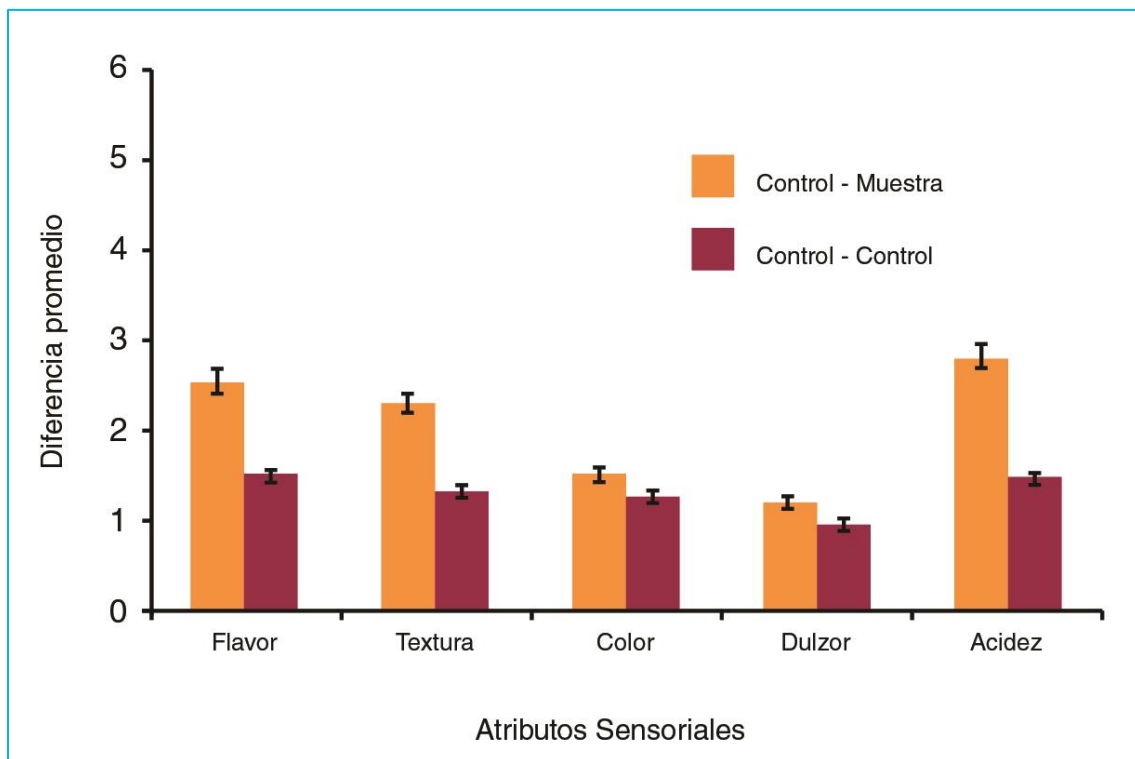


Figura 4.9: Resultados del análisis sensorial para las muestras de quesos con fructanos comparados con la muestra control (QDC)

4.3. Quesos crema (tipo unttable) con agregado de inulina

Se estudió el agregado de inulina nativa o de cadena corta (GR) e inulina de alto rendimiento (HP) en quesos crema. Estas muestras fueron elaboradas en el Instituto Nacional

de Tecnología Industrial (INTI de Argentina), en el marco de una pasantía de investigación en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo bajo la supervisión de la Ing. Laura Castells.

En la Figura 4.10 se presenta el diagrama de flujo general para la elaboración de quesos crema.

Todas las muestras se elaboraron utilizando leche cruda Mastellone. El proceso de elaboración fue en batch y para cada tanda de muestras se utilizaron 20 l de leche.

Una vez recibida la leche, se le realizó un filtrado para eliminar impurezas y se le realizó una determinación fisicoquímica rápida utilizando un analizador de leche por ultrasonido (Lactoscan SP, Bulgaria). Para esto se tomó una muestra de 50 ml de leche cruda en un envase esterilizado (por duplicado) y se llevó a baño termostático a 40°C durante 20' para luego tomar unos ml de la muestra preparada y llevarla al equipo que realiza el análisis automáticamente.

Luego, la materia prima fue tratada térmicamente, realizando una pasteurización a 85°C durante 30 minutos para garantizar un producto final salubre. Al igual que en los quesos blandos con inulina, luego de la pasteurización, la leche fue enfriada rápidamente en un baño de hielo hasta alcanzar los 33°C, temperatura óptima para el agregado de fermento y demás aditivos. En este caso se adicionó: 0,042g/l de fermento (Sacco M032), 0,13 g/l de CaCl₂ (78% de pureza) y 0,5 ml/l de cuajo Chy Max M200 (dilución 1/100) y se dejó incubando hasta llegar a pH 5,4. Se reservó una muestra control sin inulina, y al resto se incorporó el polisacárido en diferentes porcentajes. Se empleó inulina de cadena corta GR en concentraciones de 3 y 5% (p/p) y de cadena larga HP al 5% (p/v). La cantidad de inulina agregada se definió teniendo en cuenta las condiciones que fija el Código Alimentario Argentino (CAA), Cap.17 para alimentos adicionados con fibras y su cuantificación se realizó, como se indicó en las muestras anteriores, por HPLC con detector de índice de refracción.

Una vez formada la cuajada, se realizaron cortes de 4x4 cm con una lira y se llevó a desuerar en cámara de frío hasta llegar a un pH de 4,8; para esto se utilizó una tela quesera como la utilizada en la elaboración de los quesos blandos. Se dejó desuerando toda la noche y luego se llegó a la etapa de amasado o texturización. Esta se realizó en una amasadora de tipo planetaria (KitchenAid Professional) mostrada en el Figura 4.11 (a).

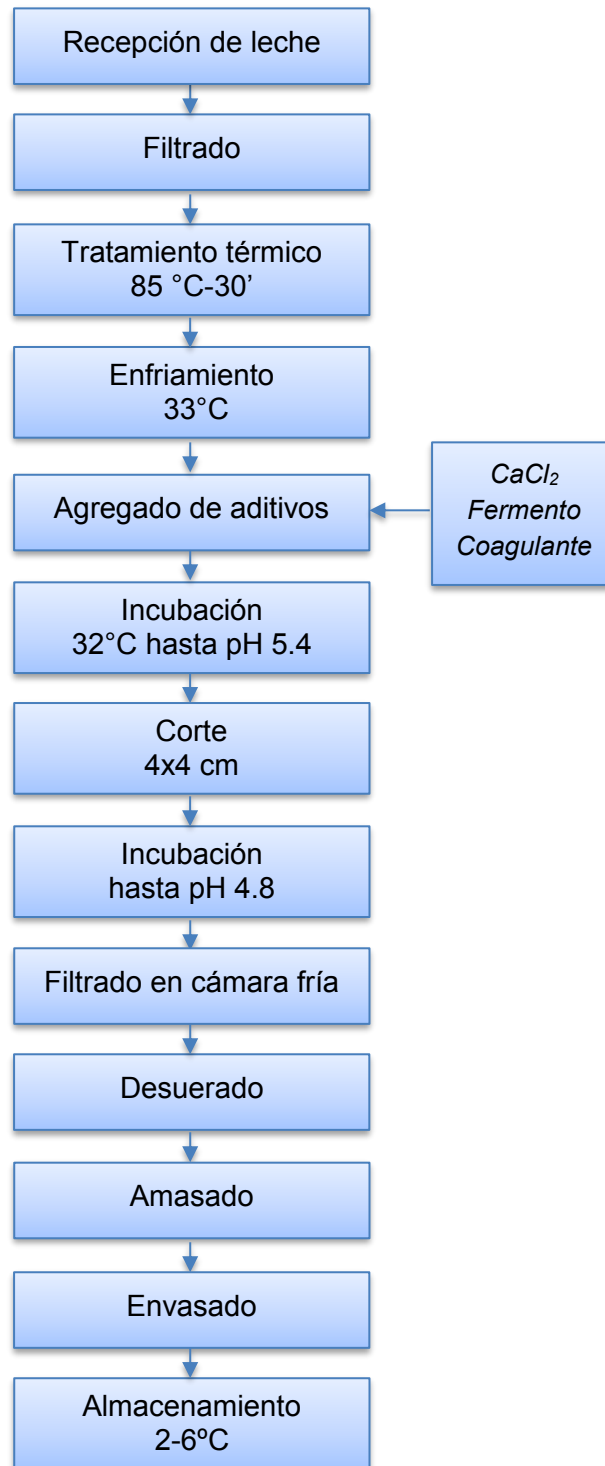


Figura 4.10: Diagrama de flujo general para un queso crema

El amasado consistió en 30 segundos de amasado a la velocidad 1 (recomendada por el fabricante para mezclado de los ingredientes) y luego 1 minuto 30 segundos a velocidad 2 (recomendada por el fabricante para amasado), con la particularidad del agregado de inulina

durante esta etapa. Luego del amasado, se realizó el envasado en pots plásticos para ser llevados a la cámara de frío donde fueron almacenados por 24 horas antes de realizar las determinaciones fisicoquímicas (Figura 4.11 (b)).

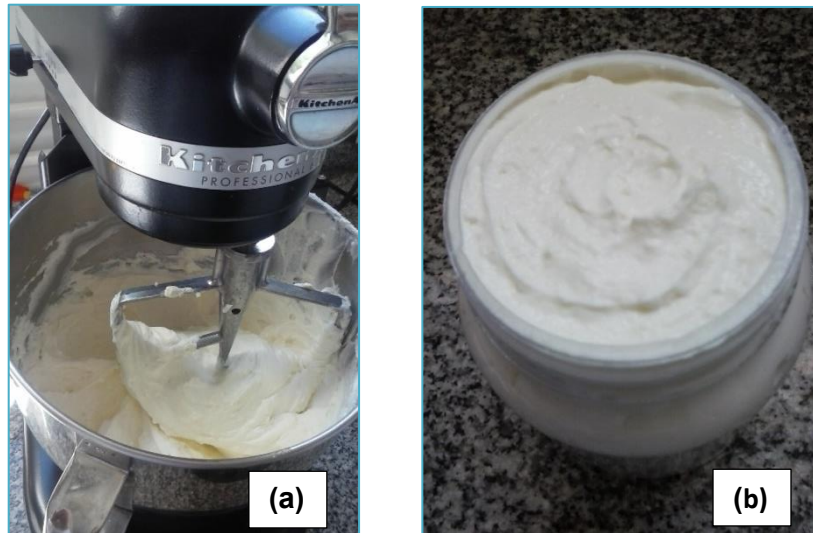


Figura 4.11: (a) Amasadora utilizada en la elaboración de quesos crema y (b) queso crema envasado.

4.3.1. Desarrollo de queso crema con inulina GR

Como se mencionó previamente, el queso crema con inulina GR (inulina nativa o de cadena corta) fue elaborado siguiendo el diagrama de flujo general de un queso crema común (Figura 4.10), pero con la variación del agregado de inulina en la etapa de texturización o amasado. La etapa de agregado de inulina se muestra en detalle en la Figura 4.12.

La inulina se agregó de dos formas:

- **Inulina previamente disuelta en suero** proveniente de la elaboración de la muestra. Para las muestras al 3% se pesaron 28,5 g y para las muestras al 5%, 47,25g de inulina y en cada uno de los casos se disolvió en el doble de su peso en suero con agitación constante usando un agitador mecánico (Fisatom 713D). Se obtuvieron las muestras GRD.

- **Inulina en polvo.** En este caso, la inulina se pesó y se agregó a la masa sin disolución previa obteniéndose las muestras al 3% (p/p) (28,35g de inulina), GR3 y al 5% (47,25g de inulina), GR5.

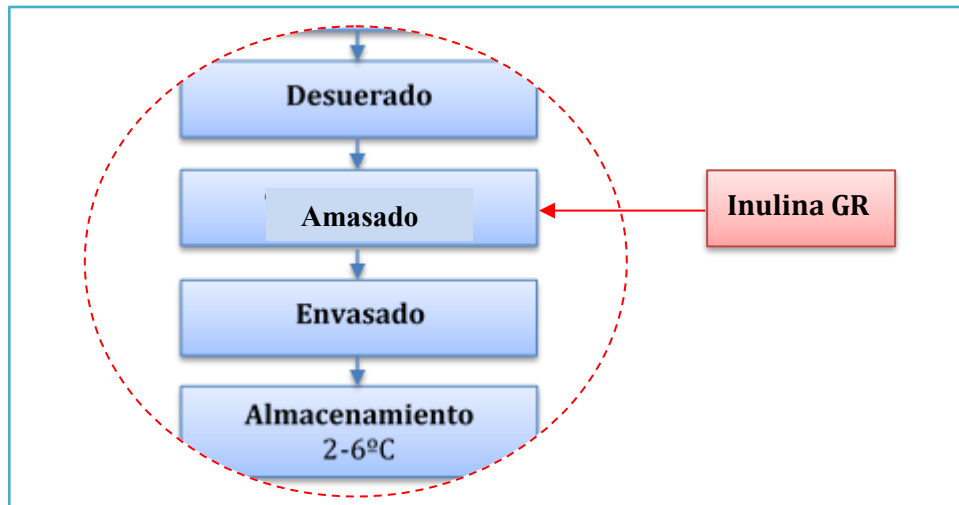


Figura 4.12: Etapa de adición de inulina GR en el diagrama de flujo general de elaboración de queso crema.

4.3.2. Desarrollo de quesos crema con inulina HP

Para la elaboración de quesos crema con inulina de alto grado de polimerización HP, se siguió el diagrama de flujo general para quesos crema, Figura 4.10.

Teniendo en cuenta el grado de solubilidad de este tipo de fructano, se realizaron pruebas con 5% de concentración, sin hacer la prueba con porcentajes más bajos y adicionándolo en la etapa de pasteurización (Figura 4.13).

Las muestras obtenidas fueron analizadas por Espectrofotometría IR (Milkoscan, Dinamarca) para conocer su composición fisicoquímica. Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Físicoquímica del Centro INTI-Lácteos. En la Tabla 4.7 se presentan los datos obtenidos.

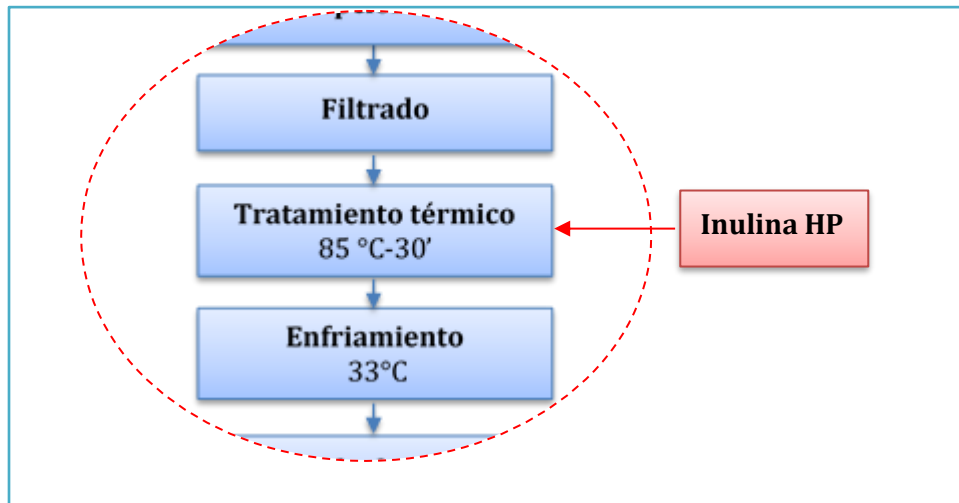


Figura 4.13: Etapa de agregado de inulina HP

Tabla 4.7: Composición fisicoquímica de las muestras con inulina GR y HP. (media ± SD)

Muestra	Humedad (%p/p)	Grasas (%p/p)	Proteínas (%p/p)	Hidratos de carbono (%p/p)	Cenizas (%p/p)
C	74,06±0,88	10,90±0,14	10,79±1,28	3,61±0,57	0,65±0,02
GR3	73,54±3,31	10,23±1,91	10,21±1,75	6,52±0,46	0,61±0,03
GR5	73,56±2,59	9,50±1,41	8,57±1,58	7,76±0,42	0,63±0,00
HP	74,78±1,20	10,80±1,33	9,48±0,99	5,16±0,40	0,68±0,00

Los resultados muestran que en efecto son quesos de elevada humedad (> 70% p/p de contenido de humedad) y bajos en grasas (<11 % p/p de contenido graso), de acuerdo a lo establecido. En cuanto al contenido de carbohidratos, sugieren que la inulina agregada fue eficazmente retenida en la matriz quesera, ya que los incrementos encontrados, se corresponden con las cantidades adicionadas, exceptuando la inulina HP agregada al 5%. En este caso, presenta una retención menor, lo que se corroboró luego por HPLC (Tabla 4.8)

Para cuantificar la inulina efectivamente retenida en las muestras, se realizó la determinación por HPLC. El ensayo se realizó siguiendo los pasos descriptos en el Capítulo 2. Los resultados que se obtuvieron se presentan en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8: Porcentaje de inulina retenida en las muestras de queso crema, determinado por HPLC. (media ± SD)

Muestra	Inulina (%p/p)*
C	0±0,00
GR3	2,91±0,13
GR5	2,84±0,19
HP	0±0,00
Suero HP	5,29±0,01

*límite de detección: 0,01 g / 100 g

Los resultados muestran que los quesos elaborados con inulina GR al 3% y al 5% presentaron una retención de casi el 100% y el 50% del carbohidrato, respectivamente. Sin embargo, en las muestras con inulina HP, ésta no fue retenida en la matriz del queso perdiéndose en su totalidad en el suero como se muestra en la Tabla 4.8.

El CAA, en su artículo 1386 del Capítulo XVII, establece que “Se entiende por alimentos modificados en fibra a aquellos productos a los que se les han agregado fibras contempladas en el presente código y las que en el futuro incorpore la Autoridad Sanitaria Nacional”. Deberán tener como mínimo 3g/100 g en el caso de alimentos sólidos y 1g/100 ml de alimentos líquidos.

Los productos modificados en fibra que naturalmente no la contuvieren en su composición se denominarán “X adicionado con...” (donde X significa denominación específica del alimento debiendo llenarse el espacio en blanco con la/las fibras/s que se adicione/n.)

La recomendación nutricional de fructanos, inulina y oligofruktosa posee diferencias en la actualidad. En EEUU el consumo diario recomendado es de 1 a 4g/día mientras que en Europa se sugiere un consumo de 3 a 11g/día (Olagnero y col., 2007).

Teniendo en cuenta los resultados, podemos decir que el contenido de inulina es alto respecto a las cantidades recomendadas y que los quesos fueron enriquecidos en fibras.

4.3.3. Análisis Sensorial de queso crema

El análisis sensorial fue llevado a cabo por un panel integrado por 10 personas no videntes y disminuidos visuales pertenecientes al INTI-Lácteos, el cual fue seleccionado y entrenado según las Normas IRAM 20001/20002/20004/20005 y 20006.

Los perfiles son procedimientos utilizados para evaluar, de manera reproducible, las propiedades de una muestra y cuantificar su intensidad con escalas. Se pueden utilizar para evaluar el olor, el sabor, el aspecto y la textura, separadamente o en forma conjunta.

Para la determinación de los perfiles de textura y flavor se utilizó la técnica QDA (Análisis Descriptivo Cuantitativo) contemplada en las Normas IRAM 20012 y 20013.

4.3.3.1. Análisis del perfil de textura de quesos crema

Para el análisis del perfil de textura se utilizaron las definiciones y procedimientos indicados en las técnicas armonizadas propuestas por el grupo de análisis sensorial del Programa FLAIR (COST 902) y AIR-CT 94-2039 de la Unión Europea según la “*Guide D’Evaluation Sensorielle de la Texture des fromages a pâte dure ou semidure*”, INRA, 1994.

Un perfil de textura es la descripción de la textura de un alimento (o de otro producto) en función de sus características mecánicas, geométricas, de las relacionadas con su contenido en grasa y en humedad, de la intensidad de cada una de ellas y del orden en que se perciben desde el primer bocado (en el caso de productos sólidos o semisólidos); o desde el primer trago (en el caso de líquidos), hasta el final de la masticación o de la deglución.

Se determinaron los siguientes descriptores:

- ✓ *Adherencia*: trabajo que es necesario realizar con la lengua para despegar un producto pegado en el paladar y los dientes.
- ✓ *Solubilidad*: sensación que se pone de relieve cuando la muestra funde muy rápidamente en la saliva luego de masticarla 4 veces con las muelas.
- ✓ *Impresión de humedad*: percepción del contenido de humedad de un alimento por medio de los receptores táctiles en la boca. La propiedad de textura de superficie describe la percepción del agua absorbida o liberada de un producto.
- ✓ *Cremosidad*: Es una combinación de propiedades como la viscosidad, tamaño de las partículas y la lubricación.

- ✓ *Microestructura*: Está relacionada con propiedades geométricas: tamaño de partículas, forma y disposición de las partículas.
(<http://www.innova-uy.info/docs/presentaciones/20111013/AmparoTarrega.pdf>)

4.3.3.2. Análisis del perfil de flavor de quesos crema

Para el análisis del *perfil de flavor* se utilizaron las definiciones y procedimientos indicados en las técnicas armonizadas propuestas por el grupo de responsables del análisis sensorial en el marco del Programa AIR-CT 94-2039 según la “*Guía para la Evaluación olfato-gustativa de los quesos de pasta dura y semidura*” (INRA, 1996).

Se evaluaron los siguientes descriptores:

- ✓ *Gusto salado*: es el gusto básico producido por soluciones acuosas diluidas de varias sustancias como el cloruro de sodio.
- ✓ *Gusto dulce*: es el gusto básico producido por soluciones acuosas diluidas de sustancias naturales o artificiales como la sacarosa.
- ✓ *Gusto ácido*: es el gusto básico producido por soluciones acuosas diluidas de la mayoría de las sustancias ácidas (por ejemplo, ácidos cítrico y tartárico).
- ✓ *Gusto amargo*: es el gusto básico producido por soluciones acuosas diluidas de varias sustancias como la quinina o la cafeína.
- ✓ *Persistencia global*: relativo a la respuesta a un estímulo asociado con un periodo medible de tiempo (IRAM 20001).

Se emplearon escalas continuas crecientes de 1 a 7 para expresar la intensidad percibida en cada descriptor, utilizando las referencias indicadas en cada guía mencionada.

Los panelistas trabajaron en forma individual en cabinas como la mostrada en la Figura 4.12 (b), analizando por triplicado un número de 2 muestras por sesión. Antes de realizar el análisis, las muestras fueron estabilizadas durante 1 hora a $10 \pm 2^\circ\text{C}$ y fueron presentadas dentro de vasos de vidrio esterilizados, mostrados en la Figura 4.14 (a).



Figura 4.14: (a) Muestras preparadas para análisis sensorial y (b) cabina de análisis sensorial

Los resultados obtenidos en la evaluación sensorial de los quesos untables: muestra control y muestras con la incorporación de inulina, realizada por el panel entrenado del INTI-Lácteos, se presentan en la Tabla 4.9.

Los resultados del análisis sensorial indicaron diferencias significativas en el atributo de flavor sabor dulce y en los atributos de textura cremosidad y microestructura. El resto de los parámetros analizados no mostraron diferencias significativas. Respecto al sabor dulce, la diferencia encontrada entre la muestra control (C) y la muestra con 5% de inulina GR (GR5), puede deberse al poder edulcorante de la inulina que, si bien es mucho menor que el de la sacarosa, se considera un endulzante natural (Palacio-Vásquez y col., 2017) y al aumentar la concentración pareciera que comienza a notarse. Las diferencias encontradas en la cremosidad y la microestructura, pueden deberse a las condiciones de amasado, como es sabido este tratamiento mecánico influye de manera significativa la expresión de los mencionados parámetros.

Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico de cajas y bigote o box plots para los diferentes atributos. En la Figura 4.15 se presenta el gráfico obtenido para el sabor dulce

donde se puede ver con mayor claridad la diferencia significativa que se presenta entre la muestra control y la muestra con inulina GR5.

Tabla 4.9: Resultados de análisis sensorial de quesos crema con inulina GR y HP (media \pm SD)

Muestra*	Dulce	Salado	Ácido	Amargo	Persistencia	Adherencia	Cremosidad	Impresión de humedad	Microestructura	Solubilidad
C	2,06 ^a $\pm 0,78$	2,38 $\pm 0,99$	4,19 $\pm 0,75$	2,63 $\pm 0,86$	3,75 $\pm 0,83$	3,13 $\pm 1,83$	5,13 ^a $\pm 1,36$	3,25 $\pm 1,48$	2,06 ^a $\pm 1,18$	5,63 $\pm 0,92$
MC	2,50 ^{a,b} $\pm 0,93$	2,63 $\pm 1,11$	4,56 $\pm 1,11$	3,44 $\pm 0,46$	4,00 $\pm 1,41$	3,75 $\pm 2,22$	3,81 ^{a,b} $\pm 0,86$	3,56 $\pm 1,26$	2,75 ^{a,c} $\pm 1,09$	5,50 $\pm 1,31$
GR3	2,50 ^{a,b} $\pm 1,31$	2,06 $\pm 0,95$	4,00 $\pm 0,87$	3,31 $\pm 0,66$	3,69 $\pm 1,48$	1,94 $\pm 1,13$	3,06 ^b $\pm 1,33$	4,13 $\pm 1,62$	5,25 ^b $\pm 0,97$	5,25 $\pm 1,58$
GR5	3,63 ^b $\pm 1,22$	2,19 $\pm 0,61$	4,00 $\pm 0,87$	2,56 $\pm 0,68$	3,25 $\pm 0,97$	3,06 $\pm 2,01$	5,00 ^a $\pm 1,22$	3,81 $\pm 1,27$	1,94 ^a $\pm 0,81$	5,38 $\pm 1,19$
HP	2,25 ^{a,b} $\pm 0,86$	2,5 $\pm 0,85$	4,38 $\pm 1,24$	3,13 $\pm 0,91$	3,63 $\pm 1,22$	3,29 $\pm 1,78$	4,94 ^a $\pm 1,21$	3,60 $\pm 1,31$	3,69 ^c $\pm 0,94$	5,19 $\pm 1,22$

***C**: Muestra control; **MC**: Muestra comercial; **GR3**: Muestra con 3% de inulina GR; **GR5**: Muestra con 5% de inulina GR; **HP**: Muestra con 5% de inulina HP

Los supraíndices a,b y c indican diferencias significativas entre los resultados en una misma columna ($p < 0,05$)

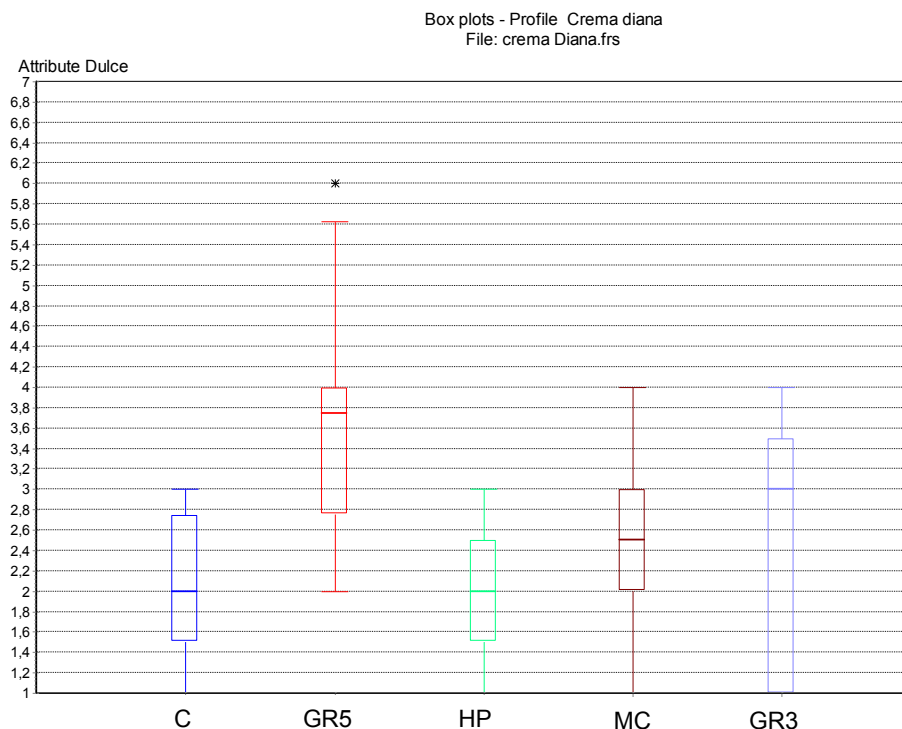


Figura 4.15: Box Plots para el atributo “sabor dulce” de los quesos untables: control sin inulina (C), control comercial (MC), muestra con 3% de inulina GR (GR3), muestra con 5% de inulina GR (GR5) y muestra con 5% de inulina HP (HP)

En la Figura 4.16 a y b, se presentan los perfiles de textura y flavor respectivamente obtenidos para las diferentes muestras.

4.3.3.3. Determinación instrumental de textura de queso crema

Se determinó textura instrumental utilizando el analizador TAXT Stable Microsystems (Londres, Reino Unido). Se realizó un ensayo de compresión, utilizando una probeta cilíndrica de 5mm y con los siguientes parámetros de ensayo:

- ✓ Velocidad de pre-test: 2 mm/seg
- ✓ Velocidad de test: 1 mm/seg
- ✓ Distancia: 10 mm
- ✓ Trigger: 3g

Este ensayo se realizó por triplicado sobre las muestras dentro de sus envases como se muestra en la Figura 4.17 y a una temperatura de $10 \pm 2^\circ\text{C}$.

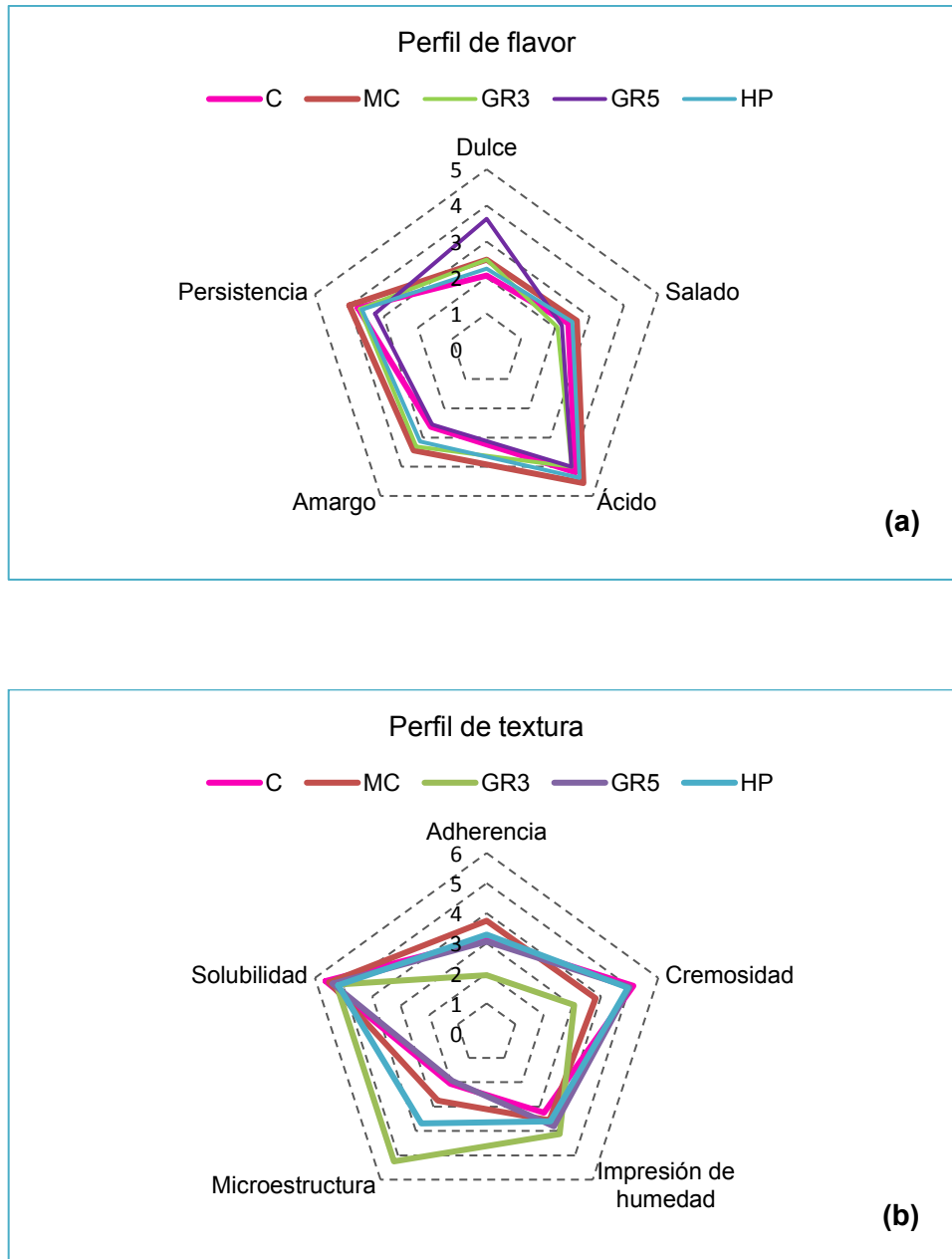


Figura 4.16: Resultado de Análisis sensorial de quesos crema con inulina.
(a) perfil de flavor; (b) perfil de textura

En la Figura 4.16 (a) puede observarse que la muestra GR3, presentó gran similitud con la muestra comercial en todos los descriptores de flavor analizados, lo que nos permite decir que el uso de inulina afecta positivamente los parámetros sensoriales, acercando las características estudiadas a las de un queso que se encuentra distribuido en los centros comerciales y aceptado por los consumidores. Sin embargo, en la Figura 4.16 (b) se puede

observar que la presencia de inulina afectaría la microestructura de la muestra, esto puede deberse a algunas diferencias durante el amasado.



Figura 4.17: Determinación de textura instrumental de quesos crema con inulina

En la Tabla 4.10 se presentan los datos obtenidos para textura. Este análisis se realizó por triplicado.

Tabla 4.10: Textura instrumental de quesos crema con y sin inulina (media±SD)

Muestra	Adh (N.seg)	σ_f (N)	Elasticidad	W_f (N.seg)
C	0,87±0,06	0,20±0,01 ^b	9,96±0,06	1,48±0,10 ^b
GR3	0,84±0,03	0,15±0,01 ^a	9,96±0,02	1,12±0,05 ^a
HP	0,82±0,08	0,16±0,01 ^a	9,97±0,03	1,17±0,07 ^a

La fuerza máxima de la curva se corresponde con la fuerza de compresión, el trabajo máximo con la rigidez, la fuerza negativa máxima o adherencia con la viscosidad (Salvatore y col., 2014).

Se encontraron diferencias significativas en los valores de trabajo máximo entre las muestras de queso con inulina y la muestra control. En este sentido, la inulina en general modifica la dureza de los alimentos, incrementándola según la dosis en la que se aplique, como fue demostrado por García y col. (2006).

Sin embargo, en los resultados de dureza de las muestras analizadas, muestran una disminución en dicho parámetro. Esto puede deberse a que la presencia de proteínas de suero perturba la fina estructura que se forma entre los cristales de inulina por enlaces Van der Waals permitiendo la formación del gel generando una disminución en la dureza (Glibowski, 2009)

4.4. Conclusiones

En este Capítulo se realizaron numerosas experiencias de incorporación de fructanos en matrices queseras procurando obtener un queso reducido en grasas y aditivado con compuestos que se comportan como probióticos y actúan como fibra alimentaria. Esta búsqueda condujo a probar la incorporación de inulinas de distinta procedencia y grado de polimerización, así como fructanos de agave, ampliamente encontrados en muchas zonas de América, pero especialmente empleados en México. Este trabajo también fue de interés de INTI lácteos, ya que una empresa les solicitó a ellos el desarrollo de quesos con estas características. Dado el conocimiento previo de ambos grupos de investigación en lácteos, se generó el trabajo conjunto descripto.

De la frondosa experimentación realizada se pudo concluir lo siguiente:

En el desarrollo de quesos blandos con inulina, en todos los casos las muestras presentaron un contenido de grasa reducido y elevada humedad. La textura y las micrografías mostraron adecuada similitud con los quesos control sin el agregado de inulina. Sin embargo, la retención de inulina fue insuficiente para contar con un alimento con las características funcionales buscadas.

En el caso de quesos con fructanos de agave se mostró una mayor retención del oligosacárido, dado que presenta una estructura más ramificada que probablemente contribuye a una mejor retención a través de la matriz de proteína, como revelaron las micrografías. Por otra parte las determinaciones de color, textura y el análisis sensorial no mostraron diferencias significativas por el agregado del fructano. Esta conclusión es importante ya que abre la posibilidad de diversificar los usos de esta planta de rápido y extendido crecimiento en América.

Por último, las experiencias realizadas con quesos cremosos, tipo untables en el INTI, indicaron que la composición centesimal de estas muestras nuevamente respondió a un elevado contenido de humedad y bajo contenido de grasas, donde las proteínas y los carbohidratos compensaron adecuadamente la textura de las muestras. Pero en este caso se logró determinar que la inulina GR (inulina nativa o de cadena corta) fue retenida en un 100% en la matriz quesera, logrando obtener un producto con las características funcionales deseadas. Los perfiles sensoriales y de textura adicionalmente demostraron que son quesos similares a las muestras control con adecuados parámetros que hacen del producto obtenido un queso untable con características funcionales acordes a las necesidades del mercado.

Capítulo 5

Desarrollo de quesos conteniendo concentrados de proteínas de soja.

Diana Palatnik



CAPÍTULO 5: DESARROLLO DE QUESOS CONTENIENDO CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DE SOJA

En el apartado 1.3.5. del Capítulo 1 se realizó una introducción sobre las propiedades nutritivas de la soja y de los concentrados proteicos obtenidos a partir de leche de soja sometida a diferentes procesos de membranas. En el Capítulo 3 se presentó el proceso de obtención de los concentrados proteicos de soja (CPS) y su caracterización fisicoquímica. En este Capítulo se muestra el proceso de elaboración de quesos crema con el agregado de los CPS en diferentes concentraciones, su caracterización y los resultados obtenidos.

5.1. Proceso de elaboración de queso crema con CPS

Las muestras de queso se prepararon en batch de acuerdo al diagrama de flujo presentado en la Figura 5.1. Cada muestra se elaboró por duplicado en un recipiente de 5l utilizando un volumen de leche por cada muestra de 2,5l. Una de las muestras fue reservada como control sin incorporarle CPS. Al resto se les agregaron diferentes cantidades del concentrado liofilizado. La adición del polvo se llevó a cabo lentamente, de este modo la fase de agregación es más lenta respecto a la desnaturalización por lo que las cadenas proteicas parcialmente desplegadas logran orientarse más fácilmente. En efecto, este procedimiento favorece la formación de un gel ordenado y homogéneo, de consistencia suave, fuertemente expandido, muy elástico, transparente, y más estable ante la sinéresis (Cheftel y col., 1989). Las cantidades de concentrado de proteína de soja agregados a la leche fueron: 5, 10, y 15g/l. La mezcla se calentó a 85 ± 5 °C y próximo a un $\text{pH} = 5 \pm 0,5$ (cerca del punto isoeléctrico tanto de las proteínas de la soja como de la leche) se agregó ácido cítrico (40g/100ml) (Parafarm) para producir la acidificación y el agregado de las proteínas. Además, se agregó 1 g de CaCl_2 (BDH Chemicals Laboratory Reagents) que contribuye, como se mencionó anteriormente, a obtener un flóculo adecuado. Se mantuvieron las muestras a 65–75 °C durante 60 min aproximadamente. En este momento se observó la aparición de “nubes blancas” sobre el suero amarillo indicando el proceso de agregación (Figura 5.2 (a)). Se volcó el flóculo en un tamiz cubierto con una tela quesera para permitir el drenaje del suero que se fue recogiendo en un cilindro graduado para luego realizar el cálculo de rendimiento

(Apartado 5.3.). La cuajada se pesó y se le agregó NaCl directamente a la masa. En esta etapa, se fraccionaron las muestras, una porción se dejó a un lado sin agregarle conservantes, mientras que en las otras fracciones se adicionó sorbato de potasio (210 ± 20 mg dependiendo del peso de la muestra, siendo siempre < 1000 mg/kg de producto). Luego se homogenizaron las muestras con un mixer hasta quedar cremosas y se transfirieron a envases plásticos sanitizados de 100g, se pesaron y se almacenaron hasta ser analizadas en cámara frigorífica (Stesa, Argentina) con temperatura y humedad controladas. En la Figura 5.2 (b) se presenta el queso crema en su envase.

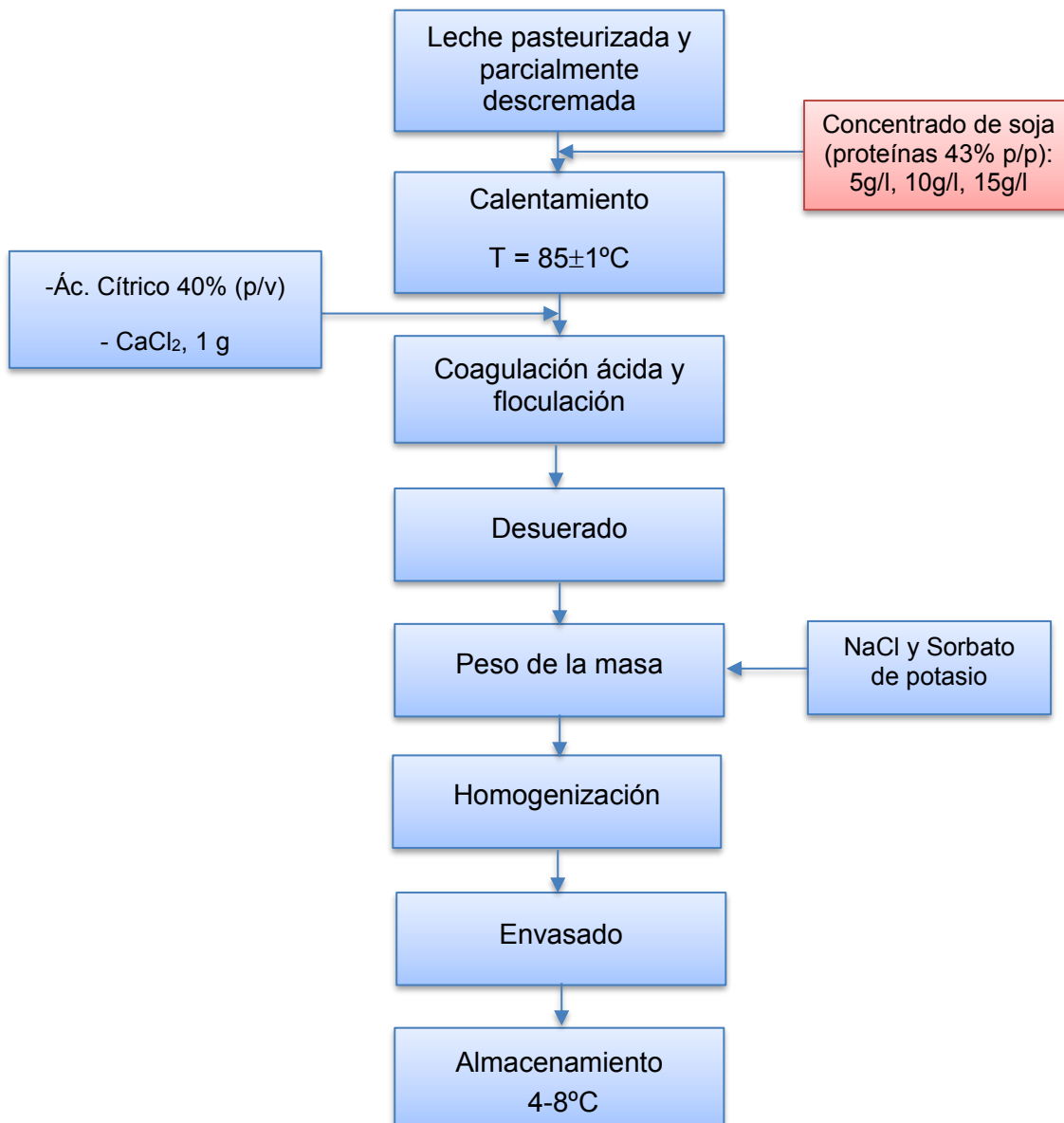


Figura 5.1: Diagrama de flujo utilizado en el desarrollo de quesos untables con CPS

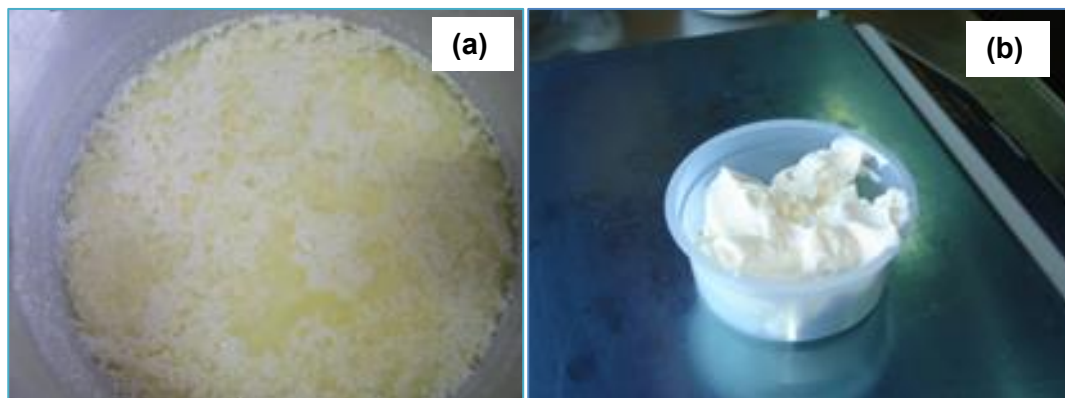


Figura 5.2: (a) flóculos de caseína; (b) queso crema con CPS.

5.2. Caracterización de los quesos

Una vez elaboradas las muestras de queso con y sin agregado de CPS, fueron sometidas a análisis fisicoquímicos.

Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 5.1. De acuerdo al Código Alimentario Argentino, el “queso blanco de pasta blanda reducido en grasas” debe presentar un contenido máximo de humedad de 77 (g/100 g) y un contenido de grasas entre 10 y 19,9 (g/100g). Los valores obtenidos indican que todas las muestras pertenecen a esta categoría.

Los datos de humedad se incrementaron levemente ($p < 0,05$) al aumentar el contenido de CPS; esto puede deberse a la naturaleza hidrofílica de estas proteínas (Rani y Verma, 1995). En cuanto al contenido proteico, como es de esperar, aumentó ($p < 0,05$) al aumentar la cantidad de concentrado proteico agregado a la formulación incrementándose en el rango de 6.8%–17% de proteína en los quesos.

Francolino y col. (2010) obtuvieron resultados similares empleando un concentrado de proteína de leche para estandarizar el contenido de leche en un queso Mozzarella, mientras que El-Neshawy y col. (1988) también obtuvieron resultados similares, usando diferentes fuentes de proteínas en la producción de queso procesado. Además, el aumento del rendimiento puede estar favorecido con la alta capacidad de retención de agua de las proteínas de soja (Cheftel y col., 1989; Rodríguez Furlán y col., 2011).

Tabla 5.1: Caracterización de quesos crema control y con CPS (media \pm SD)

Muestras (% CPS*)	Humedad (%p/p)	Cenizas (%p/p)	Grasas (%p/p)	Proteínas (%p/p)
0	68,07 \pm 0,20	1,80 \pm 0,90	10,00 \pm 1,20	16,68 \pm 0,08
5	69,54 \pm 0,10	1,70 \pm 0,27	12,25 \pm 1,96	17,50 \pm 0,05
10	69,77 \pm 0,20	1,50 \pm 0,18	12,91 \pm 1,71	18,75 \pm 0,10
15	70,75 \pm 0,70	1,45 \pm 0,68	13,26 \pm 0,53	19,06 \pm 0,12

* CPS (concentrado de proteínas de soja)

Respecto a las grasas, se observó la tendencia a aumentar su concentración al incorporar CPS, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este resultado sugiere que las grasas incorporadas en la preparación son, en efecto, retenidas en la matriz del flóculo. Aquí es importante considerar que el tratamiento con membranas empleado para la concentración de la leche de soja permitió concentrar las proteínas y las grasas mediante la eliminación de los componentes anti nutrientes de los granos de soja en la corriente de permeado (Ali y col., 2010; Rinaldoni y col., 2012).

Estos resultados demuestran que los quesos obtenidos se pueden identificar como alimentos funcionales, ya que tanto las proteínas como las grasas incorporadas tienen origen vegetal y presentan beneficios para la salud (Moon y col., 2011). En efecto, las proteínas de los granos de soja tienen un alto valor biológico similar a las de la carne, pescado o huevo y también son capaces de disminuir los triglicéridos y el colesterol (colesterol total, LDL y VLDL) (Bachmann, 2001; Genovese y Lajolo, 2002; Mattos y col., 2009). Con respecto a las grasas, la leche de soja básicamente contiene ácidos grasos esenciales poli insaturados,

principalmente linoleico, linolénico y araquidónico (Messina y col., 2002). Además, el contenido de proteínas en los quesos elaborados fue más alto que el obtenido por Che Man y Yee (1996) para un producto untable de grano de soja y similar al valor obtenido por Milesi y col. (2007) para un queso de leche liviano mientras que el contenido de grasas fue menor. El contenido de cenizas (Tabla 5.1) presentó una ligera disminución, aunque no fue estadísticamente significativa ($p > 0,5$). Los valores de pH y acidez fueron en promedio para las cuatro muestras de $5,77 \pm 0,08$ y $0,99 \pm 0,16$ respectivamente, sin mostrar diferencias significativas.

5.3. Estudio de rendimiento de los quesos desarrollados

El rendimiento real (R) alcanzado en la elaboración de las muestras fue calculado a partir de la ecuación (4.1), Capítulo 4.

Para eliminar diferencias asociadas con la composición de la leche (grasas, proteínas) o por el contenido de humedad, el rendimiento también se calculó como Rgp y $Rhgp$ usando las fórmulas propuestas por Guinee y col. (2006), las que se muestran a continuación:

Rgp es el rendimiento por cada 100 kg de queso normalizado en referencia o control del nivel de grasa y proteínas y se calculó de la siguiente manera:

$$Rgp = \frac{R \times (Gmr + Pmr)}{(Gmc + Pmc)} \quad (5.1)$$

donde Gmr y Pmr corresponden a los porcentajes de grasa y proteínas en la muestra referencia o control respectivamente.

Gmc y Pmc son el contenido de grasas y de proteínas de las muestras con CPS respectivamente.

$Rhgp$ es el rendimiento del queso ajustado por la humedad por 100 kg de queso ajustado a los niveles de referencia de grasas y proteínas y representa la relación entre el peso del queso con un valor de humedad de referencia ($68.07 \pm 0.2\%$) y 100 kg de queso de leche normalizada. Este parámetro se calculó como:

$$Rhgp = \frac{Rgp \times (100-H)}{(100-HR)} \quad (5.2)$$

donde H y HR corresponden al valor real y al valor de referencia de humedad, respectivamente.

Los resultados obtenidos a partir de los cálculos realizados con las diferentes ecuaciones se muestran en la Tabla 5.2.

El rendimiento obtenido para este tipo de quesos generalmente es mayor que en otros quesos debido al alto contenido de humedad (Nair y col., 2000). Además, se comprobó que el rendimiento aumentó con el aumento de contenido de proteínas de soja, lo que confirmó una mayor retención de agua por la hidrofiliabilidad de las proteínas de soja, como fue descrito.

Tabla 5.2: Rendimiento de quesos crema control y con CPS (media \pm SD)

Muestras CPS (g/l)	Rendimiento (R)	Rendimiento normalizado (Rgp)	Rendimiento normalizado por humedad (Rhgp)
0	19,00 \pm 1,90 ^a	19,00 \pm 2,50 ^a	19,00 \pm 3,20 ^a
5	19,50 \pm 2,30 ^a	21,99 \pm 2,70 ^{a,b}	20,93 \pm 2,90 ^{a,b}
10	20,10 \pm 2,50 ^a	24,121 \pm 2,20 ^{b,c}	22,78 \pm 3,00 ^{a,b}
15	22,50 \pm 2,00 ^a	27,65 \pm 2,10 ^c	25,27 \pm 3,50 ^b

^{a-c} las medias con diferentes superíndices en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Observando los valores de los rendimientos normalizados que eliminan las diferencias asociadas con la composición de la leche (grasas, proteínas) y con la humedad del queso, podemos decir que fueron significativamente mayores ($p < 0.01$) para los quesos

con CPS que para los quesos control, y esto confirma que la adición de concentrado de proteínas de soja mejora el rendimiento quesero.

5.4. Determinación de parámetros reológicos en los quesos con y sin CPS

Se realizó una determinación de los parámetros reológicos de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 2, Apartado 2.5.2.

Los datos obtenidos a través de este tipo de mediciones dinámicas (u oscilatorias) son las contribuciones a la estructura interna de la muestra a partir de las componentes elásticas y viscosas de flujo, G' y G'' (Pa), respectivamente. Las medidas en la región viscoelástica lineal involucran un sondeo de la estructura de la muestra de una manera no destructiva (Kealy, 2006). Los resultados se muestran en la Figura 5.3.

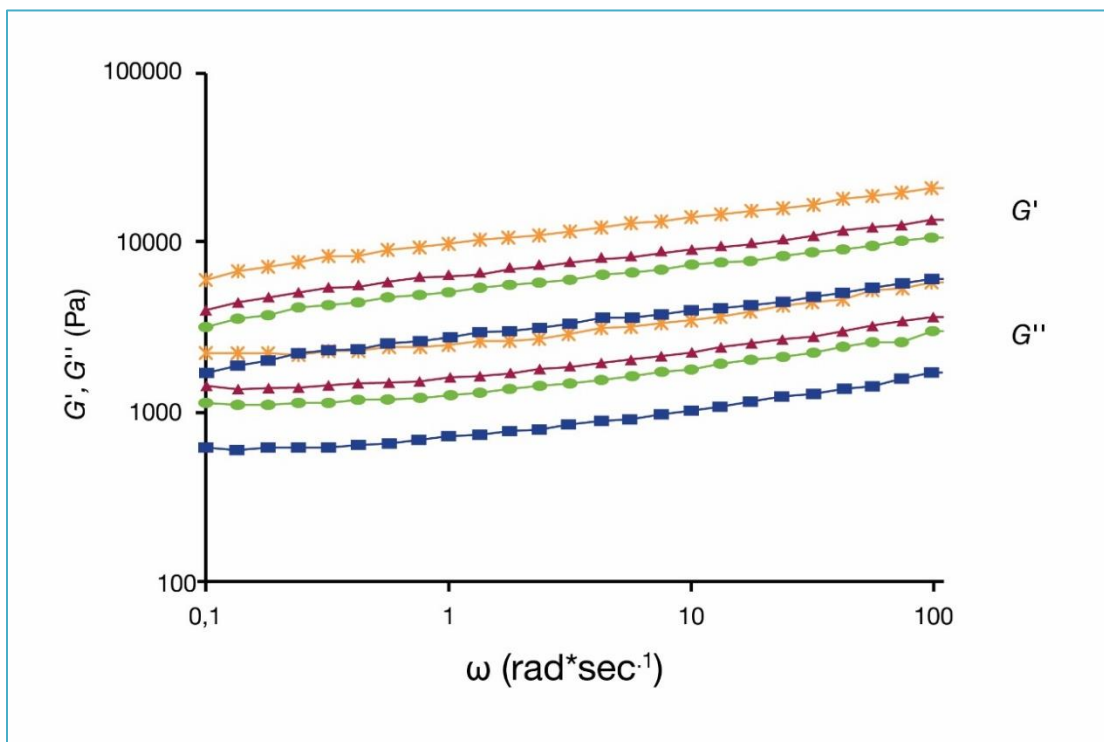


Figura 5.3: Módulo viscoelástico para el queso control y los quesos con CPS, medido a 12 ± 1 °C (\star) 0 g/l, (\blacktriangle) 5 g/l, (\bullet) 10 g/l, (\blacksquare) 15 g/l

Para todas las muestras testeadas se encontró que el valor de G' estuvo por encima del G'' ($p < 0,01$). Esto significa que, en la respuesta de las muestras, predomina la

componente elástica. Además, la diferencia significativa entre ambos módulos y la leve variación con la frecuencia a través de todo el rango de frecuencias estudiado, sugiere una fuerte estructura del gel (González-Tomás y col., 2008). Este resultado puede estar relacionado con la baja sinéresis de las muestras, aún durante el almacenamiento como se muestra en la Tabla 5.5.

Los valores de $\tan(\delta)$ fueron: 0,27 para 0 g/l CPS, 0,26 para 5 g/l CPS, 0,26 para 10 g/l CPS y 0,27 para 15 g/l CPS. Estos valores no mostraron diferencias significativas y fueron menores que 1, lo que indica que la naturaleza elástica de las muestras dominó por encima de su contraparte viscosa. Pereira y col. (2011) reportaron resultados similares para quesos elaborados de varias fuentes de leche.

Los valores de la viscosidad aparente disminuyeron significativamente desde 130000 ± 5 mPas para el queso control hasta 20000 ± 5 mPas (a $15 \pm 0,5$ °C) para la muestra con la mayor cantidad de CPS agregado (15 g/l), esto se puede explicar considerando la alta capacidad de retención de agua de las proteínas de soja (Cheftel y col., 1989).

5.5. Análisis del perfil de textura

En el caso de los quesos enriquecidos con proteínas de soja, el ensayo realizado fue un TPA. En el Apartado 2.5.3.2. del Capítulo 2 se explicó este ensayo y se presentó una curva típica y algunos de los parámetros que se pueden calcular a partir de ella.

Este ensayo se realizó utilizando un texturómetro TAXT2i (Stable Micro Systems) (CIDCA, UNLP) usando una celda de carga de 25 kg y una probeta con forma de disco de 45 mm de diámetro. Previo a llevar a cabo esta determinación, las muestras fueron templadas a una temperatura de 12 ± 1 °C. El ensayo consistió en dos compresiones consecutivas realizadas automáticamente con una velocidad de test de $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ y una compresión de 30%. El tiempo de espera entre un ciclo y otro se fijó en 5 s. Se obtuvieron curvas de fuerza vs. tiempo como las que se muestran en la Figura 2.6 (Cap. 2) a partir de las cuales se determinaron las siguientes propiedades mecánicas (Kealy, 2006; Stable Micro Systems, 1996): dureza (N), adhesividad (N), elasticidad, cohesividad y resiliencia.

Los datos de las medidas realizadas en el analizador de textura se presentan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Resultados del análisis de TPA de quesos crema control y con CPS (media \pm SD)

CPS (g/l)	Dureza (N)	Cohesividad	Elasticidad	Adhesividad (N)	Resiliencia
0	18,83 \pm 1,05 ^a	0,48 \pm 0,02 ^a	0,92 \pm 0,10 ^a	-7,14 \pm 1,12 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a
5	12,55 \pm 1,09 ^b	0,52 \pm 0,06 ^{b,a}	0,80 \pm 0,12 ^a	-5,02 \pm 1,30 ^b	0,10 \pm 0,02 ^a
10	8,48 \pm 1,22 ^c	0,57 \pm 0,05 ^{b,c}	0,91 \pm 0,09 ^a	-4,11 \pm 0,24 ^{b,c}	0,09 \pm 0,01 ^a
15	5,21 \pm 0,30 ^d	0,63 \pm 0,04 ^c	0,88 \pm 0,01 ^a	-2,40 \pm 0,18 ^c	0,08 \pm 0,01 ^a

^{a-d} las medias con diferentes superíndices en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La aplicación del análisis de la varianza no reveló diferencias significativas entre las muestras testeadas para los parámetros de elasticidad y resiliencia. Sin embargo, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para cohesividad, adhesividad y dureza, siendo este último parámetro el que mostró la mayor diferencia entre las muestras. La dureza de las muestras aumentó al disminuir la concentración de CPS. Este resultado debe relacionarse con el módulo elástico G' (Figura 5.3), ya que a mayor G' , mayor es la energía para deformarlo, lo que sugiere que más duro es el material. Así, el queso control (sin CPS), el cual tuvo la mayor dureza, también fue el que mayor G' presentó. Respecto a la cohesividad y la adhesividad, las mayores diferencias se encontraron entre la muestra control y las muestras con CPS.

Con respecto a la elasticidad (propiedad definida como la capacidad que las muestras tienen para recuperar su configuración original luego de ser removida la fuerza responsable de la deformación), la Tabla 5.3 muestra que las cuatro muestras estudiadas tienen valores de elasticidad similares.

5.6. Análisis Sensorial

En el Capítulo 2 se presentaron de manera general los diferentes tipos de análisis sensorial. En el caso de las muestras descritas en este Capítulo, las características sensoriales, se estudiaron usando una escala hedónica de 5 puntos (1: me disgusta mucho, 3: no me gusta ni me disgusta, 5: me gusta mucho). Los atributos analizados fueron sabor, color y untabilidad. En la Figura 5.4 se muestra el set de elementos utilizados durante el análisis sensorial y la forma de presentación de las muestras.

Luego de probar una muestra, el juez/consumidor debía comer una galleta de marca comercial para limpiar el paladar. En la Figura 5.5 se presentan los resultados.

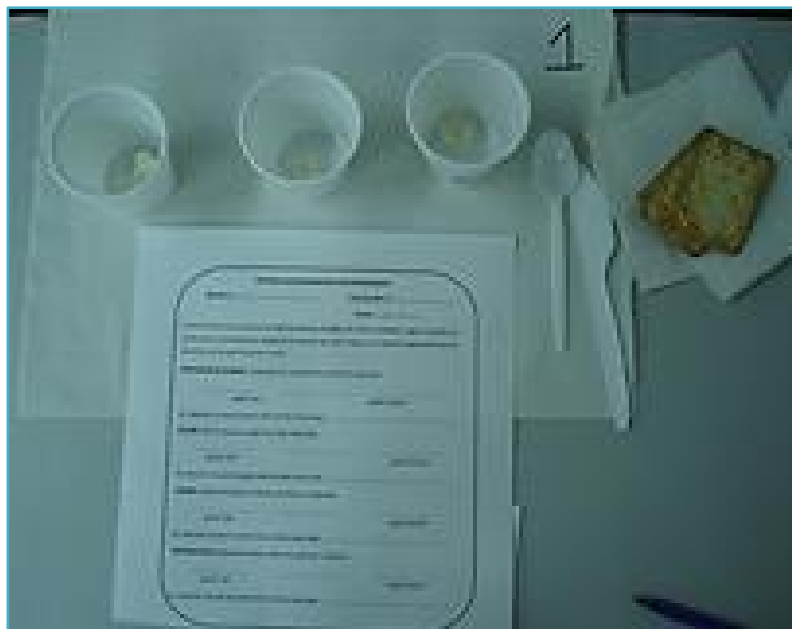


Figura 5.4: Presentación del análisis sensorial de muestras de quesos con CPS

De acuerdo a lo observado en la Figura 5.5, la muestra que fue más aceptada en términos de sabor y color fue la correspondiente a un queso con un agregado de 5g/l de proteína de soja, aunque en el color las diferencias fueron mínimas. Con respecto a la untabilidad, atributo importante para este tipo de producto, se encontró que el orden de aceptación fue: 10 g/> 15 g/> 5g/l.

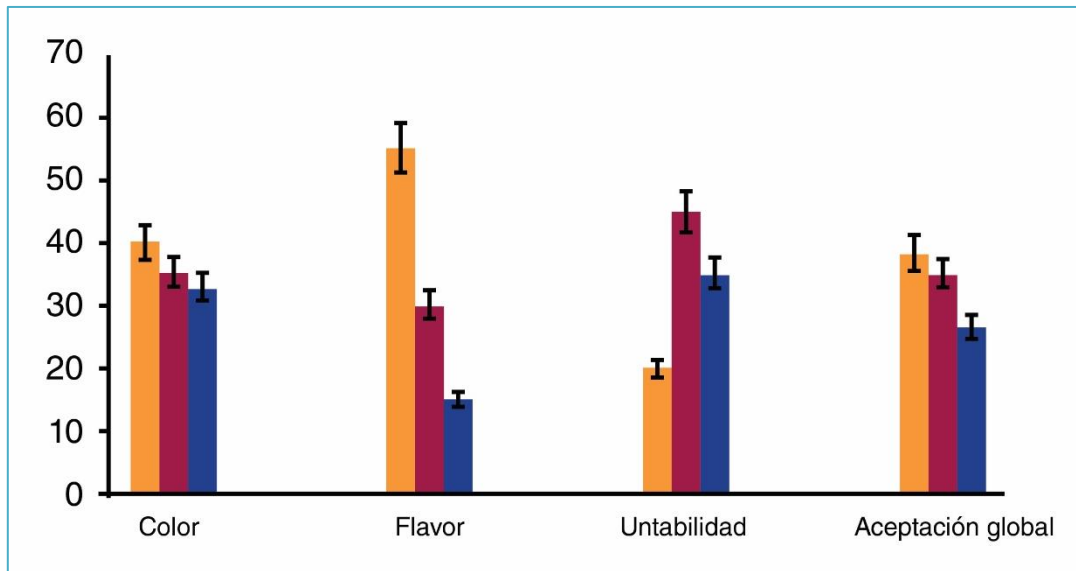


Figura 5.5: Análisis sensorial de los quesos con CPS (■) 5 g/l; (■) 10g/l; (■)15 g/l.

El atributo sabor es muy importante dado que determina la preferencia del consumidor, los resultados muestran que el contenido de soja es percibido como un sabor extraño debido a la falta de hábito en su consumo, a pesar que en los últimos años se han incorporados muchos productos de soja en el mercado debido a las propiedades nutricionales y funcionales que presenta esta leguminosa. Estudios posteriores podrían determinar qué ingredientes permitirían mejorar el atributo sabor, como por ejemplo el uso de algunas hierbas aromáticas.

5.7. Análisis instrumental de color

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo detallado en el Apartado 2.2.4. del Capítulo 2. Los resultados de las medidas de color en los quesos elaborados se muestran en la Tabla 5.4. El queso control y las muestras enriquecidas con concentrado de proteína de soja mostraron un valor de L^* alto (aproximadamente de 82,5) el cual refleja el grado de luminosidad. El queso control y la muestra con 5% de CPS mostraron el color más claro ($p < 0,05$). Como se esperaba, los valores están más cercanos al queso blanco fresco que a los productos procesados sólo con granos de soja (Che Man y Yee, 1996 y Juric y col., 2003). El valor de a^* mostró un leve grado de coloración verdosa sin diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,5$). El valor positivo de b^* indicó el grado de amarillo. Estos valores fueron

adecuados considerando que en los quesos bajos en grasa, la eliminación de grasa imparte una apariencia traslúcida. En efecto, los valores de b^* y a^* obtenidos fueron similares a aquellos reportados por Wadhvani y McMahon (2012), para quesos bajos en grasa sin el colorante natural annato. Un resultado similar se obtuvo en los quesos con fructanos de esta tesis (Capítulo 4).

Además, y dado que combinando a^* y b^* da una mayor indicación de color que sus valores individuales, se calcularon el ángulo de matiz (h°) y el índice de saturación (croma, C) utilizando las siguientes ecuaciones (Wadhvani y McMahon, 2012):

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \quad (5.3)$$

$$C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (5.4)$$

Tabla 5.4: Medidas del color de los quesos control y las muestras con diferentes concentraciones de CPS (media \pm SD).

CPS (g/l)	L	a^*	b^*
0	84,99 \pm 0,28 ^a	-0,17 \pm 0,23	12,90 \pm 0,14
5	83,17 \pm 0,53 ^a	-0,22 \pm 0,19	13,05 \pm 0,20
10	80,80 \pm 0,25 ^b	-0,15 \pm 0,04	13,53 \pm 0,23
15	81,15 \pm 0,38 ^b	-0,08 \pm 0,06	13,41 \pm 0,16

^{a-b} las medias con diferentes superíndices en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos revelaron que la tonalidad o matiz (h°) obtuvo un promedio de $90,67 \pm 0,28$ sin diferencias significativas entre las muestras, indicando tonalidad amarilla, el valor del ángulo de tonalidad está dentro de los valores esperados de 40 a 90,

transición del naranja al amarillo (Wadhvani y McMahon, 2012). El C fue de $12,90 \pm 0,14$ para la muestra control, mientras que para los quesos con CPS se obtuvo un promedio de $13,3 \pm 0,2$. De estos resultados se verificó que la presencia de CPS no afectó significativamente el color de los quesos respecto de la muestra control.

5.8. Análisis de la microestructura

Las micrografías electrónicas (SEM) se realizaron con el fin de establecer relaciones entre la microestructura de las muestras y su composición. En la Figura 5.6 se muestran las imágenes obtenidas para los quesos control y las muestras enriquecidas con CPS.

Se observaron matrices compactas de proteínas con un pequeño número de glóbulos de grasa dispersados de forma desigual, similar a lo reportado por Karaman y Akalin (2013) para sus quesos control. Este tipo de estructura es común para los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada y acidificada. En efecto, de acuerdo a Morales-Celaya y col. (2012), estos quesos tienen una estructura más estratificada que la disposición de las cadenas de caseína presentes en los productos elaborados a partir de leche cruda. El menor tamaño de los glóbulos de grasa de la leche sugiere estar relacionado a una menor coalescencia. La presencia de concentrado de proteína de soja parece determinar una matriz de proteína más intrincada envolviendo al glóbulo de grasa. Este resultado se puede explicar considerando la buena capacidad de las proteínas de soja como espesante (Cheftel y col., 1989; Kumar y col., 2002). También, la humedad presente originalmente dentro de los canales de la grasa del suero debe ser absorbida en la matriz proteica, resultando en una proteína bien hidratada (Morales-Celaya y col., 2012). Este resultado fue consistente con la composición de los quesos con contenidos altos de proteína y humedad. Para la muestra con 10 g/l de CPS, se puede observar mayor uniformidad; este hecho debe ser asociado con la mejor untabilidad encontrada en el análisis sensorial.

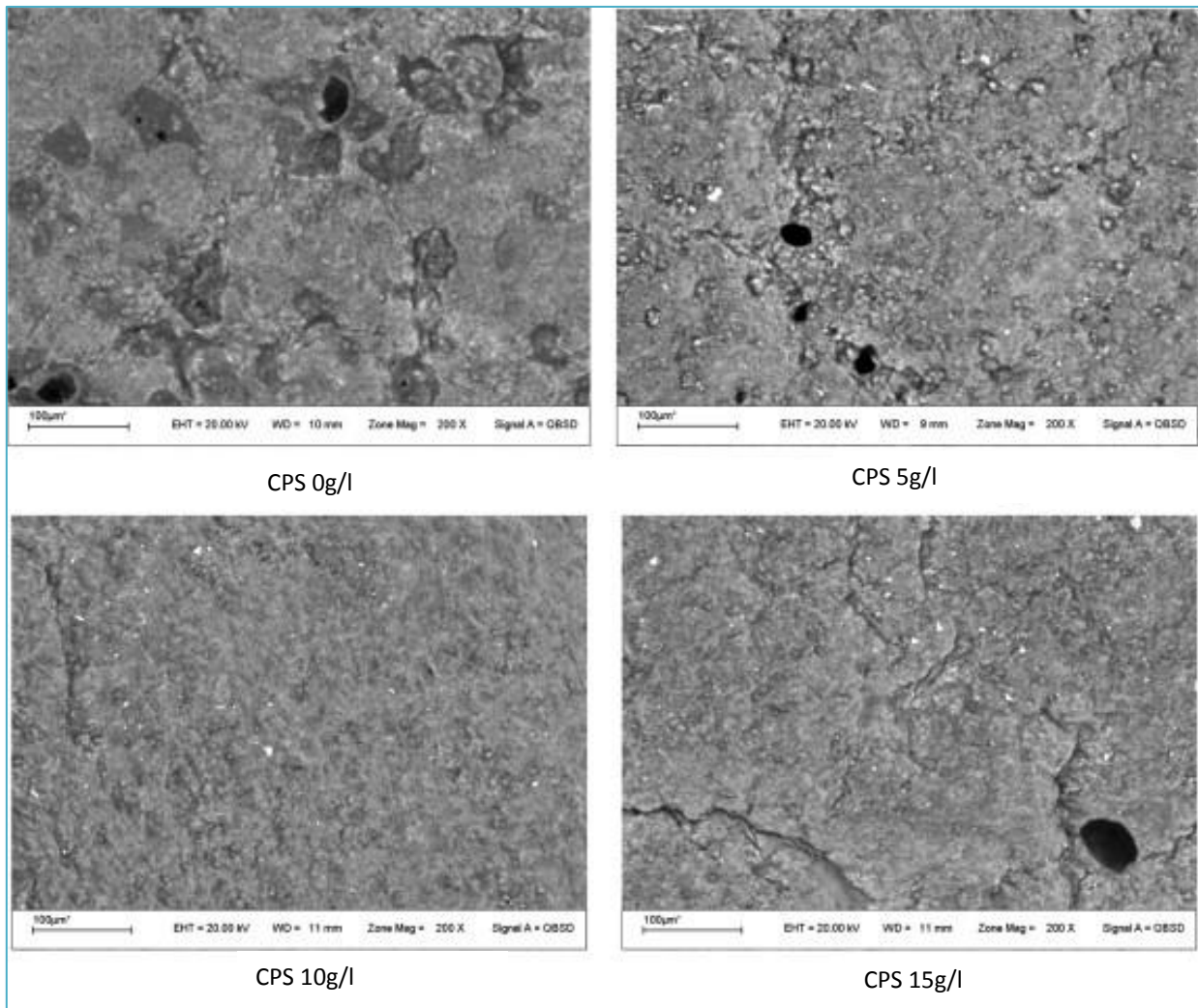


Figura 5.6: Imágenes SEM de los quesos control y las muestras con CPS (Aumento de 200X).

5.9. Estudio de la vida útil

Los estudios de vida útil para definir la duración de los alimentos son necesarios para dimensionar correctamente el tiempo que realmente dura el producto. La vida útil de un alimento comprende el tiempo transcurrido entre la fabricación y el momento en que se presentan cambios significativos en él, que pueden generar rechazo en el consumidor final. Puede variar según el proceso de producción, la naturaleza del producto y el tiempo de almacenamiento, obteniéndose cambios a nivel microbiológico, sensorial y/o físico-químico (Valencia García y col., 2008).

Se estudió el almacenamiento de los quesos elaborados con un contenido proteico de soja de 5g/l ya que el análisis sensorial realizado arrojó que esta muestra fue la de mayor aceptación en cuanto al sabor (Figura 5.5).

Se analizaron dos tipos de muestras, sin conservante y con sorbato de potasio (1000 mg/ kg de queso) como conservante.

Se utilizó un diseño básico, donde los quesos blandos enriquecidos con 5g/l de proteínas de soja con y sin conservantes, se almacenaron en una cámara frigorífica Stesa a T= 4-8°C y con una humedad controlada de 86%. Los muestreos se realizaron cada 15 días, determinando: pH, sinéresis, grasas, acidez y análisis sensorial (olor, sabor y color) como indicadores de estabilidad (Giménez y col., 2012).

El pH es un factor básico en la preservación de alimentos, afectando la conformación de las proteínas, el cambio de síntesis enzimática y los productos finales del metabolismo. El crecimiento y la supervivencia de los microorganismos están fuertemente influenciados por el pH y el contenido de ácidos orgánicos del alimento. Éstos determinan, de acuerdo a su valor, floras contaminantes diferentes y de distinta resistencia a los factores de conservación.

Las bacterias, en general, requieren un rango de pH entre 4 y 9 para poder crecer, mientras que los hongos y las levaduras exhiben mayor tolerancia, pudiendo desarrollarse en los rangos de pH 1.5–11 y de 1.5–8, respectivamente (Alzamora, 1997).

Durante el almacenamiento de los quesos se puede producir la lipólisis o hidrólisis de las grasas que afecta a una pequeña proporción de éstas. Sin embargo, los ácidos grasos liberados y sus productos de transformación, aunque aparecen en pequeñas cantidades, influyen decididamente en el aroma y sabor del queso.

Como se mencionó, los estudios de vida útil se reforzaron estudiando la sinéresis, acidez y pH cuyas determinaciones se describen a continuación. Simultáneamente se realizaron análisis sensoriales de sabor, color y olor, parámetros que afectan la aceptación sensorial del producto usando una escala hedónica de cinco puntos.

5.9.1. Determinaciones microbiológicas durante el almacenamiento

Este estudio fue realizado a través del servicio prestado por el laboratorio de Microbiología Industrial, Área de Tecnología Química y Biotecnología de la FQByF.

Las determinaciones se llevaron a cabo a los diez días de elaboración de queso enriquecido con 5 g/l de proteínas de soja. Se realizaron los análisis establecidos por el CAA: recuentos de *Estafilococos coagulasa positivos*, coliformes totales, coliformes fecales, hongos y levaduras y *Salmonella*.

Los resultados del análisis microbiológico se muestran en la Tabla 5.5.

Las determinaciones indicaron que el contenido de microorganismos en las muestras es aceptable, por debajo de los niveles máximos admitidos.

Los test microbiológicos realizados para la formulación de los quesos con concentrado de proteína de soja (5 g/l), con y sin conservante en función de los días de almacenamiento, se muestran en la Figura 5.7.

Tabla 5.5: Análisis Microbiológico de quesos crema con 5g/l de CPS

Ensayos	Resultados	Criterios de Aceptación
Coliformes/g (30°C) Método según FIL 73 A:1985	< 10 UFC/g	$n = 5; c = 2; m = 100;$ $M = 1000$
Coliformes/g (30°C) Método según FIL 73 A:1985	< 2 NMP	$n = 5; c = 2; m = 100;$ $M = 1000$
Coliformes/g Método según APHA 1992, CAP. 24	< 2 NMP	$n = 5; c = 2; m = 50;$ $M = 500$
Mohos y Levaduras Método según BAM, 1998, act 2001	< 10 UFC/g	$n = 5; c = 2; m = 500;$ $M = 5000$
Estafilococos coag.pos./g Método según FIL 145: 1990	< 10 UFC/g	$n = 5; c = 1; m = 10;$ $M = 100$
Salmonella ssp./25g Método según FIL 93 A: 1985	Ausencia	$n = 5, c = 0; m = 0$

n = número de unidades de muestra analizada.

c = número máximo de unidades de muestras cuyos resultados pueden estar comprendidos entre m y M.

m = nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable.

M = nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable provisionalmente.

Dado que los quesos fueron elaborados en condiciones microbiológicas controladas, el conteo de bacterias coliformes, mohos y levaduras para las muestras con sorbato fueron aceptables, esto es, por debajo del nivel máximo admisible en la legislación vigente: coliformes/g $g < 10$ UFC/g ($n = 5; c = 2; m = 500; M = 5000$) y mohos y levaduras < 10 ufc/g ($n = 5; c = 2; m = 500; M = 5000$), donde n = número de muestras examinadas de un lote; m = límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la marginalmente aceptable; M = límite microbiológico que separa la calidad marginalmente aceptable de la rechazable; c = número máximo permitido de unidades de muestra marginalmente aceptables (ANMAT).

En las muestras sin conservante se detectó un desarrollo evidente de mohos ($M > 5000$ UFC/g) después de 15 días de almacenamiento.

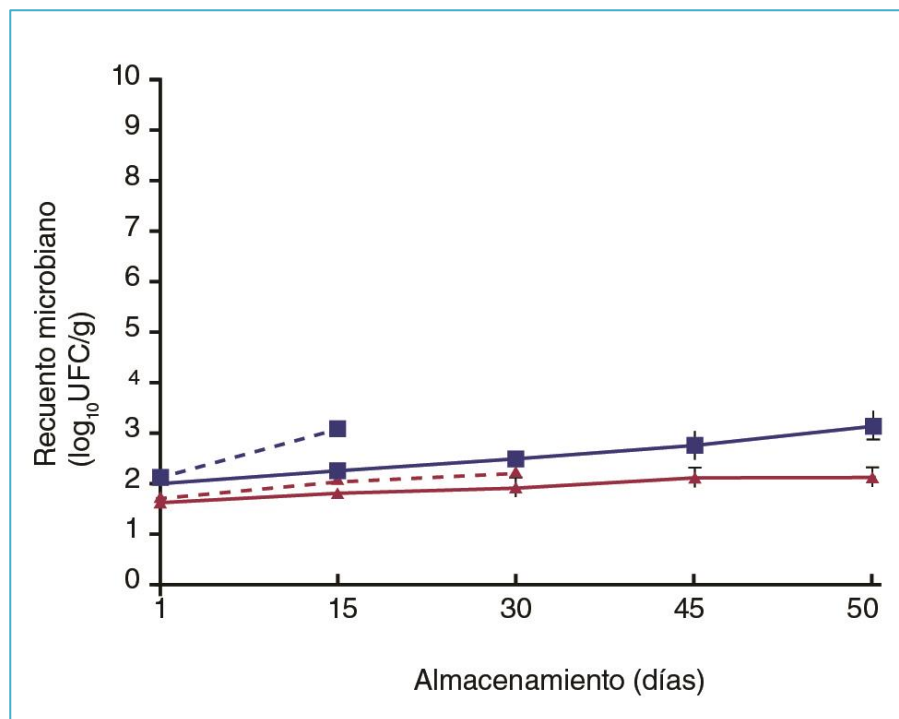


Figura 5.7: Evolución de las poblaciones microbianas durante el tiempo de almacenamiento de la muestra enriquecida con 5 g/l de CPS

(■) mohos y levaduras, (▲) bacterias coliformes, (—) con conservante, (-----) sin conservante.

5.9.2. Determinación de sinéresis

La sinéresis es un análisis que refleja la estabilidad del producto al poner de manifiesto la separación de fases en la mezcla formada. Para realizar esta determinación, se pesaron $2 \pm 0,2$ g de queso hasta peso constante en un vaso de precipitados. El análisis se realizó después de 24 horas de almacenamiento en frío a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras se agitaron durante 60 s en una plataforma de agitación y a continuación se centrifugaron durante 25 minutos a 5000 rpm en una ultracentrífuga, Beckman J2 – HS (USA) a 4°C , Figura 5.8. El porcentaje de sinéresis, $S\%$ (p/p) se calculó a partir de la siguiente ecuación, Aichinger y col. (2003):

$$S\% = \frac{m(\text{suero})}{m(\text{coágulo})} \times 100\% \quad (5.5)$$

donde, $m(\text{suero})$ es la masa de suero que se ha separado del gel debido a la centrifugación, en relación con $m(\text{coágulo})$ la masa total del gel que fue centrifugada.

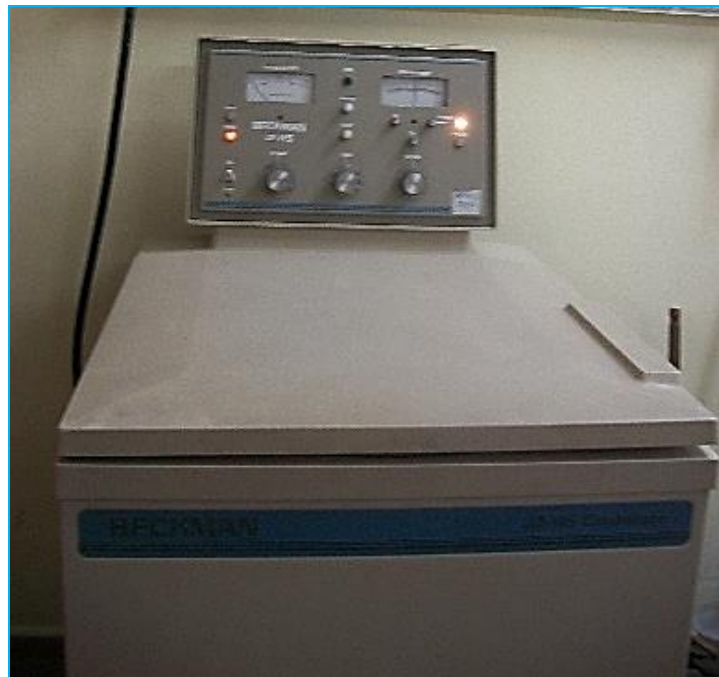


Figura 5.8: Centrífuga Beckman J2 – HS (USA)

5.9.3. Determinación de acidez expresada como Ácido Láctico

Para realizar esta determinación, se tomaron 5 g de muestra y se introdujeron en un erlenmeyer de 250 ml. Se diluyó aproximadamente dos veces su volumen con agua destilada libre de CO₂, se agregaron unas gotas de fenofaleína y se tituló con NaOH 0.1N hasta la aparición de color rosado débil persistente.

Los resultados se expresan en g de ácido láctico en 100g de muestra.

$$1\text{ml NaOH } 0,1\text{N} = 0,009 \text{ g } \acute{\text{a}}\text{c. Láctico}$$

Para obtener el porcentaje de acidez se aplica la siguiente ecuación:

$$\% \text{Acidez} = \frac{(\text{ml}_{\text{NaOH}}) \times (\text{N}_{\text{NaOH}}) \times \text{meq. Ác. láctico } 0,09}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (5.6)$$

5.9.4. Determinación de pH

Esta determinación se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el Capítulo 2.

5.9.5. Resultados obtenidos durante el estudio de vida útil

Los resultados que se obtuvieron realizando los ensayos descriptos anteriormente, se recopilan en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6: Efecto de la incorporación de un conservante sobre parámetros fisicoquímicos y sensoriales de los quesos con el agregado de CPS (5g/l) durante el almacenamiento ($T=4\pm 1^{\circ}\text{C}$) (media \pm SD)

Días de almacenamiento	Determinaciones	Queso 5g/l SC	Queso 5g/l CC
1	pH	5,70 \pm 0,03	5,70 \pm 0,01
	Acidez (%)	0,94 \pm 0,30	0,92 \pm 0,10
	Sinéresis (%)	4,64 \pm 0,30	4,70 \pm 0,50
	Grasas (%)	12,33 \pm 0,03	12,27 \pm 0,05
	Olor	4,02 \pm 0,23	4,01 \pm 0,18
	Sabor	3,01 \pm 0,52	3,00 \pm 0,29
	Color	3,12 \pm 0,39	3,20 \pm 1,26
15	pH	5,67 \pm 0,02	5,68 \pm 0,03
	Acidez (%)	0,98 \pm 0,10	0,97 \pm 0,20
	Sinéresis (%)	5,69 \pm 0,20	4,70 \pm 0,30
	Grasas (%)	12,42 \pm 0,03	12,44 \pm 0,02
	Olor	4,02 \pm 0,19	4,00 \pm 0,12
	Sabor	3,00 \pm 0,37	3,73 \pm 0,21
	Color	3,42 \pm 1,42	3,30 \pm 0,90
30	pH	Desarrollo de MO	5,61 \pm 0,01
	Acidez (%)		1,01 \pm 0,20
	Sinéresis (%)		5,70 \pm 0,30
	Grasas (%)		14,7 \pm 0,07
	Olor		4,10 \pm 0,62
	Sabor		4,01 \pm 0,28
	Color		3,25 \pm 1,05
45	pH		5,55 \pm 0,05
	Acidez (%)		1,15 \pm 0,10
	Sinéresis (%)		11,30 \pm 0,50
	Grasas (%)		11,5 \pm 0,06
	Olor		4,03 \pm 0,59
	Sabor		4,05 \pm 0,15
	Color		3,12 \pm 0,75
60	pH		5,55 \pm 0,05
	Acidez (%)		1,15 \pm 0,10
	Sinéresis (%)		11,30 \pm 0,50
	Grasas (%)		11,50 \pm 0,06
	Olor		4,00 \pm 1,10
	Sabor		4,00 \pm 1,52
	Color		3,15 \pm 1,21
70			Desarrollo de MO

Como regla general, la estabilidad de los alimentos es un parámetro que define el valor comercial del producto. Los resultados obtenidos indicaron que las muestras de quesos sin adición de conservante presentan una duración inferior a los 30 días, evidenciándose su deterioro por el desarrollo de microorganismos. Por el contrario, las muestras con agregado de sorbato como conservante, presentaron una adecuada estabilidad, con una vida media más larga (mayor a 30 días). Por lo tanto, este aditivo actuó como se esperaba, comportándose como un conservante efectivo contra hongos y levaduras, con efectividad sobre bacterias en concordancia con lo reportado por Brocklenhurst y Lund (1985) y altamente efectivo sobre la producción de micotoxinas. Además, la actividad del conservante está directamente relacionada con los cambios en el pH, que presentó cambios leves durante el almacenamiento. Como se describió en el Capítulo 2, el pH es un factor básico en la preservación de alimentos ya que el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos están fuertemente influenciados por este valor, así como por el contenido de ácidos orgánicos del alimento.

Con respecto a las determinaciones de acidez, se observó una ligera disminución con el transcurso de los días. En efecto, las variaciones en el pH y en la acidez pueden estar relacionadas con los aminoácidos y ácidos grasos libres que se producen durante la proteólisis y la lipólisis en el almacenamiento, respectivamente (Cheftel y col., 1989). Esto está asociado al comportamiento detectado en el contenido graso, el cual aumentó hasta 45 días y luego disminuyó. El aumento del contenido graso evidencia cambios químicos (El-Neshawy, 1988) aunque estas variaciones en la mayoría de los casos no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados están en concordancia con las tendencias encontradas por Valencia García y col. (2008), quienes estudiaron la vida útil de queso crema bajo en calorías.

El resultado del estudio de la sinéresis reflejó que ésta aumentó a partir de los 30 días, sin embargo, aún el valor más alto alcanzado ($11,30 \pm 0,5$ g/100g), es aceptable para este tipo de producto. Los bajos valores de sinéresis obtenidos pueden relacionarse con el proceso de elaboración de los quesos y con la composición de estos productos. En efecto, el breve tratamiento térmico aplicado durante la elaboración de las muestras, el pH de los productos ($\sim 5,7$) con cambios menores en el almacenamiento y el alto contenido de proteínas, generan un gel más firme con baja producción de sinéresis (Fox y Cogan, 2004). Este resultado es consistente con la caracterización reológica y las imágenes SEM, que mostraron

una estructura compacta. Además, el contenido de grasa reducido también favorece la estabilidad del gel (Mateo y col., 2009). En este sentido comparándolo con productos como yogur estos presentan valores de sinéresis entre 60-80 % (Rinaldoni y col., 2010).

A nivel sensorial, la vida útil en estantería de los alimentos depende de la aceptación, al interactuar el alimento con el consumidor. La determinación del sabor indicó que el mismo se suaviza durante el almacenamiento, resultando más agradable. Con respecto al olor y color no hubo cambios apreciables de estos atributos, indicando estos resultados que el nivel de aceptación de los productos no se altera en el tiempo de conservación estudiado.

5.10. Conclusiones

Se desarrollaron quesos untables reducidos en grasa a partir de leche de vaca parcialmente descremada con la adición de concentrados proteicos de soja (CPS) obtenidos por UF. Se encontró que las formulaciones tuvieron mayor contenido proteico al aumentar el contenido de CPS ($p < 0,05$) confirmando que parte de las proteínas de soja quedaron retenidas dentro de la matriz de caseína, también aumentó el contenido de grasas en un 22% respecto al queso control. Sin embargo, los productos se clasificaron como reducidos en grasas de acuerdo a lo establecido en el CAA. Los valores de los rendimientos normalizados, que eliminan diferencias asociadas a la composición de la leche (proteínas, grasas) y el contenido de humedad fueron significativamente más altos ($p < 0,01$) para los quesos elaborados con CPS comparándolos con los quesos control, confirmando que la adición de CPS mejora el rendimiento del queso.

Las características reológicas de las muestras revelaron que el $G' > G''$ indicando que las propiedades elásticas dominaron sobre las viscosas, mostrando un comportamiento sólido típico. El análisis de textura mostró las diferencias más significativas en los valores de dureza; el incremento en el contenido de CPS indicó una disminución en la dureza, en concordancia con los resultados de viscosidad aparente. Estos resultados podrían asociarse con el mayor contenido de humedad en las muestras con proteínas de soja.

A través de las micrografías de SEM se observaron matrices compactas de proteínas con glóbulos de grasa dispersos. La mayor homogeneidad de la muestra con CPS 10 g/l, se correlacionó con una mejor untabilidad ($p < 0,05$) encontrada en el análisis sensorial.

De las medidas de recuento microbiano, pH, sinéresis, grasas y evaluación sensorial, se observó que el tiempo de vida útil de las muestras sin la adición de sorbato de potasio en la formulación, fue de menos de 30 días. En cambio, las muestras formuladas con el conservante (en cantidades por debajo el límite establecido por la legislación vigente) exhibieron un tiempo de vida útil durante el almacenamiento mayor a 60 días.

Los productos se consideraron como funcionales ya que la fuente de proteínas fue de origen vegetal con alto valor biológico debido al alto contenido de aminoácidos y ácidos grasos esenciales. Otros parámetros fisicoquímicos tales como pH, contenido de cenizas y especialmente los atributos sensoriales no mostraron diferencias significativas en las muestras formuladas con CPS y las muestras control, indicando que la cantidad de CPS agregado es suficiente para enriquecer la matriz del queso sin afectar negativamente las propiedades fisicoquímicas, calidad sensorial y estabilidad del producto.

Capítulo 6

Aprovechamiento del subproducto lactosuero

Diana Palatnik



CAPÍTULO 6: APROVECHAMIENTO DEL SUBPRODUCTO LACTOSUERO

6.1. Introducción

Como se mencionó en el Capítulo 1, Apartado 1.2., el lactosuero es el principal subproducto en la producción de queso. Durante muchos años ha sido considerado un desecho sin embargo en la actualidad es utilizado por sus valiosos nutrientes y propiedades funcionales (Sanmartin y col., 2013; Pihlanto, 2011).

En este marco, y considerando los componentes del lactosuero descritos en el Capítulo 1 se destaca que las proteínas son indiscutiblemente el componente de mayor importancia en el suero por sus propiedades y aplicaciones de gran interés en diversas áreas. En efecto, el espectro de beneficios confirmados y otros aún en desarrollo, que presentan las proteínas del suero para la salud cubre todo el ciclo de vida, desde la nutrición infantil hasta productos para ancianos. Por ejemplo, está comprobado que las proteínas del suero son un ingrediente alimenticio dinámico, capaz de desempeñar un papel fundamental en áreas de la salud tan diversas como integridad y motilidad intestinal, funcionamiento y fortalecimiento del sistema inmunológico, cáncer, sistema cardiovascular, mejoría del desempeño cardiorrespiratorio lo que también mejora el rendimiento deportivo (Mendes da Silva, 2011; Tariq y col., 2013).

Existe un interés creciente por la industria de lácteos y de otros alimentos e incluso farmacéutica, por diseñar y formular productos que incorporen componentes bioactivos específicos de proteínas de suero de leche (Pihlanto, 2011). En este sentido, los principales componentes de la proteína de suero de leche, α -lactalbúmina y la β -lactoglobulina (α -LA y β -LG), se valoran como aditivos alimentarios, principalmente debido a sus capacidades gelificantes y espumantes, y más recientemente están encontrando aplicación en la producción de nanotubos y sistemas de encapsulación de microemulsiones (O'Neill y col., 2014).

En función de estudios previos, en este Capítulo de la Tesis nos propusimos realizar una caracterización de un lactosuero obtenido de una producción local de queso de cabra, luego realizar la concentración de proteínas por membranas (descrito en el Capítulo 3), para

finalmente emplear el concentrado proteico en el desarrollo de un aderezo. De este modo se estaría aportando valor agregado a producciones de queso de cabra de zonas periféricas de la ciudad de San Luis, de tipo artesanal y con escaso o nulo aprovechamiento del subproducto. Por otra parte, la mayoría de las aplicaciones del lactosuero están realizadas a partir de suero de queso de vaca, pero hay pocos desarrollos realizados para queso de cabra (Palatnik y col., 2015; Sanmartin y col., 2013).

Los aderezos son productos manufacturados que se usan para sazonar las comidas y darles más aroma y flavor, se utilizan con frecuencia en la industria alimentaria para mejorar el atractivo y el sabor de los productos alimenticios (Ma y col., 2013). Estos productos varían ampliamente en su composición, flavor y textura, pero tienen algo en común: son sistemas termodinámicamente inestables y su estabilización se puede obtener con emulsificantes.

Entre los emulsificantes comúnmente empleados en la industria, las proteínas séricas juegan un rol importante en productos alimenticios. Las propiedades funcionales de los concentrados de suero caprino clarificado y no clarificado, y agregados (subproductos de clarificación) han sido estudiadas por Sanmartín y col. (2013). Los resultados mostraron que estos productos podrían convertirse en candidatos adecuados para formulaciones de alimentos que requieran buenas propiedades emulsionantes, aunque los autores revelan que se necesita mayor investigación para evaluar esos derivados lácteos en mezclas complejas con otros ingredientes.

En este contexto, cabe agregar que en los últimos años, ha habido un renovado interés en los productos lácteos de caprinos ya que la leche de caprino ha sido recomendada como un buen sustituto de la leche de vaca y se ha convertido en un alimento alternativo debido a sus propiedades nutracéuticas (Maduko y Park, 2011). Las proteínas de la leche caprina son menos alergénicas y la grasa es más digerible ya que los glóbulos grasos son más pequeños que los de la leche de vaca. Otro problema asociado con el consumo de leche de vaca es la intolerancia a la lactosa. En este sentido, la leche de cabra contiene casi un 1% menos de lactosa y ésta a su vez tiene mayor digestibilidad por lo que puede ser más tolerada por aquellas personas con intolerancia a este azúcar (Boyazoglu y Morand Fehr, 2001).

6.2. Separación de Proteínas de Lactosuero por Tecnología de Membranas

De acuerdo a lo expresado precedentemente, la recuperación de los componentes sólidos del suero lácteo es importante y necesaria para reducir, la contaminación y aprovechar las propiedades funcionales y nutritivas que ofrecen.

Los componentes del lactosuero (proteínas, lípidos, carbohidratos, sales, grasas) se encuentran formando una disolución en agua, como componente mayoritario, con glóbulos grasos formando una emulsión. La utilización de microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF) es ventajosa frente a los métodos tradicionales, ya que puede realizarse en una sola etapa, con bajo consumo energético, a bajas temperaturas, sin producción de subproductos contaminantes. La separación y concentración de diferentes componentes de suero por medio de tecnología de membrana ha sido reportada anteriormente (Brans, y col., 2004; Rinaldoni, y col., 2009a; Sanmartín y col., 2012).

Los aspectos prácticos y resultados de esta etapa fueron descriptos en el Capítulo 3 donde también se presentó la caracterización fisicoquímica de los concentrados proteicos obtenidos.

6.3. Caracterización funcional de los concentrados proteicos

Las proteínas séricas presentan, además de buenas propiedades nutricionales, propiedades funcionales o tecnológicas, que las hacen muy útiles como ingredientes en la industria alimentaria.

El término “propiedad funcional” que se aplica a los ingredientes alimenticios, se define como toda propiedad no nutricional que influencia la utilidad de un ingrediente en un alimento. La mayor parte de las propiedades funcionales influyen sobre el carácter sensorial del alimento (en especial la textura) pero también pueden tener un papel decisivo en el comportamiento físico de los alimentos o de los ingredientes alimenticios durante su preparación, transformación o almacenamiento (Cheftel y col, 1989).

Los métodos utilizados en el procesamiento de las muestras proteicas pueden afectar sus propiedades. Además, dependiendo de las propiedades funcionales de las proteínas consideradas serán las aplicaciones de los concentrados proteicos en formulaciones

alimenticias y las implicancias que presenten en el procesado de alimentos, siendo necesario la realización de una caracterización. La importancia de estas propiedades varía con el tipo de producto alimenticio en el cual las proteínas serán utilizadas. En la Tabla 6.1 se muestran las propiedades funcionales que intervienen según el alimento considerado.

Tabla 6.1: Propiedades funcionales proteicas que intervienen en los diversos alimentos (Cheftel y col., 1989).

Alimento	Propiedades funcionales
Bebidas	Solubilidad a diferentes pHs, estabilidad al calor, viscosidad
Salsas	Viscosidad, emulsionante, retención de agua
Masa de panadería	Formación de una película que tenga propiedades de viscoelasticidad, cohesión, desnaturalización por calor, gelificación
Productos de panadería y de pastelería (por ej.: pan, bizcochos)	Absorción de agua, emulsionante, espumante, pardeamiento
Productos lácteos (por ej.: queso, helados, postres)	Emulsionante, retención de materia grasa, viscosidad, espumante, gelificación
Reemplazantes de huevo	Espumante, gelificación
Productos cárnicos (por ej.: salchichas, picadillo de carne)	Emulsionante, gelificación, cohesión, absorción y retención de agua y de grasa
Recubrimientos alimenticios	Cohesión, adhesión
Productos de confitería y chocolatería	Dispersabilidad, emulsionante

Las propiedades funcionales de las proteínas se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- ✓ **Propiedades de hidratación:** dependen de las interacciones de las proteínas con el agua: solubilidad, viscosidad, gelificación, dispersabilidad, absorción y retención de agua, adhesión, hinchamiento y precipitación.

- ✓ **Propiedades ligadas a las características de superficie:** capacidad emulsionante, capacidad espumante, y la adsorción en las interfaces aire-agua y aceite-agua.
- ✓ **Propiedades que no se corresponden en las dos categorías anteriores:** desnaturalización y uniones proteína-proteína, proteína-ión y proteína-ligando.

Las propiedades hidrodinámicas están más influidas por la conformación y tamaño de la proteína, mientras que las propiedades ligadas a las características de superficie se ven más afectadas por la composición, distribución aminoacídica y el modelo de plegamiento. Estas propiedades sufren variaciones durante los tratamientos físicos y/o las modificaciones químicas de las proteínas.

La determinación de las propiedades funcionales en el concentrado proteico de lactosuero, secado por liofilización, se describe a continuación.

6.3.1. Determinación y resultados de la solubilidad proteica

Los valores de solubilidad pueden variar según el proceso seguido para establecer las condiciones finales de pH, fuerza iónica, temperatura y concentración proteica. Desde un punto de vista práctico los datos sobre las características de solubilidad son muy útiles para poder determinar las condiciones óptimas de extracción y purificación de proteínas, a partir de fuerzas naturales, así como para la separación de fracciones proteicas. El grado de insolubilidad es la medida más práctica de la desnaturalización- agregación proteica y las proteínas que existen al comienzo en un estado desnaturalizado, parcialmente agregado, muestran frecuentemente un descenso de la capacidad de gelificación, emulsificante y/o de formación de espumas. La solubilidad es una característica importante a tener en cuenta con las proteínas utilizadas en las bebidas.

Como se observa en la Figura 6.1, la solubilidad de una proteína es mínima en el pH de punto isoeléctrico (pI) ya que su carga neta es igual a cero y se incrementa a medida que nos alejamos del mismo. Así mientras mayor sea la carga neta sobre la molécula proteica,

mayor serán las repulsiones electrostáticas entre las moléculas, las cuales tenderán a mantenerse en solución, evitando la formación de agregados.

Una alta solubilidad inicial facilita la difusión de la proteína en las interfaces aire/agua y aceite/agua, mejorando así su actividad superficial, y de este modo las propiedades emulsionantes y espumantes de las proteínas. Sin embargo, la solubilidad de las proteínas se reduce en forma irreversible durante el calentamiento y a través de tratamientos más suaves, como los utilizados en la extracción o purificación de proteínas, que pueden producir un cierto grado de desnaturalización y de insolubilidad.

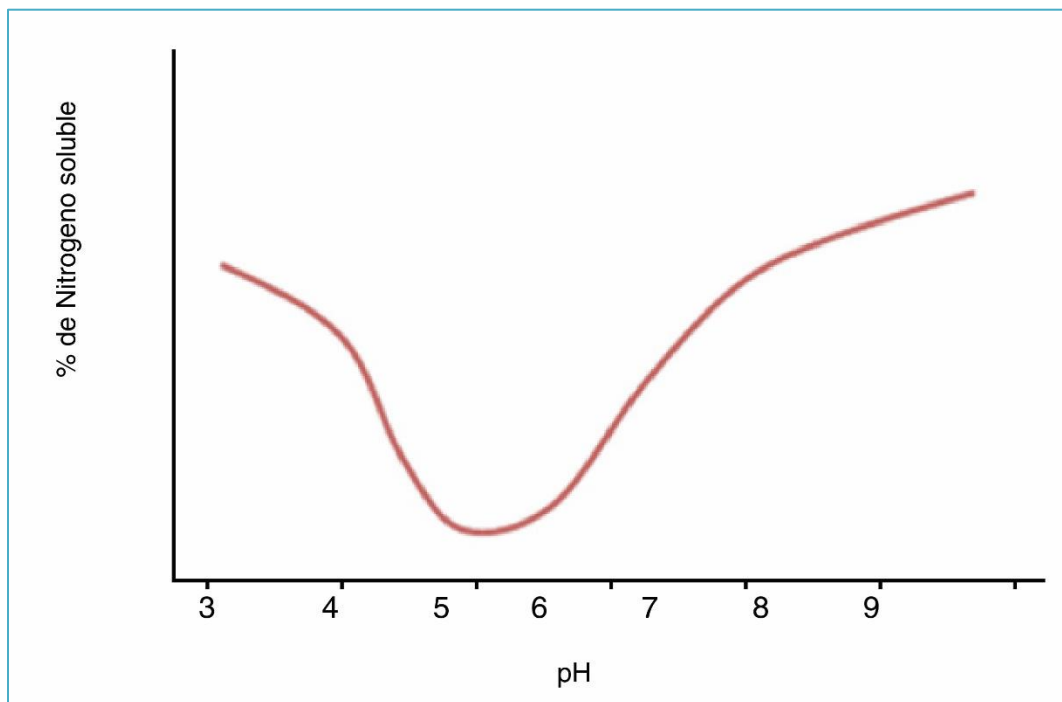


Figura 6.1: Solubilidad de proteínas globulares en agua en función del pH.

Se prepararon soluciones saturadas usando un agitador mecánico a temperatura ambiente. El pH se ajustó a $2 \pm 0,2$; $3,5 \pm 0,2$; $4,7 \pm 0,2$; $5,5 \pm 0,2$; $6 \pm 0,2$; $7 \pm 0,2$; $8 \pm 0,2$ con soluciones de NaOH 1 N y HCl 1N. Se transfirieron 6 ml de cada solución dentro de diferentes cristalizadores y se los llevaron a horno a 100°C hasta peso constante. La solubilidad del concentrado proteico se calculó como:

$$S = \frac{(P_{C+R}-P_C)}{(P_{C+S}-P_{C+R})} \times 100 = \frac{P_R}{P_A} \times 100 \quad (6.1)$$

donde P_{C+R} es el peso del cristalizador más el residuo seco; P_C es el peso del cristalizador; P_{C+S} es el peso del cristalizador más la solución; P_R es el peso del residuo seco (g proteína); P_A es el peso del solvente (g agua).

Desde un punto de vista práctico, los datos sobre las características de solubilidad son muy útiles en la determinación de las condiciones óptimas de extracción y purificación de proteínas. Bajo diferentes condiciones, la solubilidad es también un buen indicador de las potenciales aplicaciones de las proteínas y su influencia sobre otras propiedades funcionales (Cheftel y col., 1989; Yu y col., 2007).

Como muestra la Figura 6.2, las proteínas del suero fueron bastante solubles en todo el rango de pH. Este comportamiento se debe a que la superficie de las proteínas séricas contiene un número alto de grupos hidrofílicos que son hidratados creando una fuerza repulsiva suficiente para prevenir la agregación por interacciones hidrofóbicas. La α -lactolbúmina y la β -lactoglobulina son solubles, 68% y 90% respectivamente, aún a su pI (\approx pH = 5.0). A pH 4.7-5, las proteínas del suero presentan una solubilidad más baja debido a que predominan las fuerzas de atracción resultando en una pérdida de solubilidad. Resultados similares fueron observados por otros investigadores (Cheftel y col., 1989; Sanmartín y col., 2013; Casper y col., 1999).

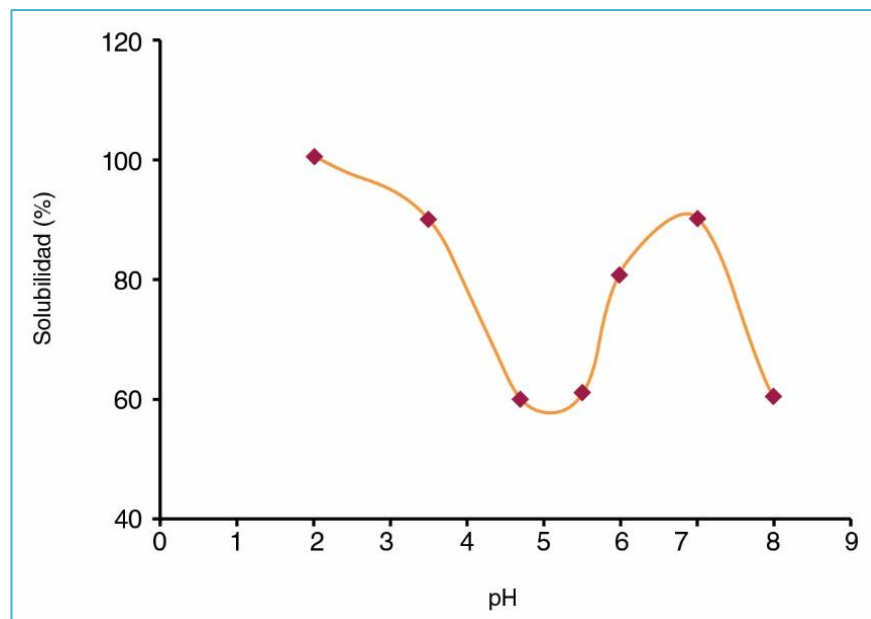


Figura 6.2: Solubilidad del concentrado proteico de lactosuero caprino a diferentes pH (T=22±1°C)

6.3.2. Capacidad de retención de agua

En la mayoría de los sistemas alimenticios el agua es un ingrediente universal, y cuando es agregada en exceso parte de ella interactúa con los sólidos. Es decir, una porción del agua añadida no aparecerá como agua libre. En un sentido práctico, se reconoce que parte del agua es “absorbida” o “ligada” al sistema alimenticio y es opuesta al agua “libre” la cual está disponible para una interacción ulterior. De esta forma, se puede decir que la capacidad de retención de agua representa la cantidad de agua que un material proteico puede retener bajo la acción de una fuerza centrífuga, dependiendo de las condiciones de centrifugación, tiempo de centrifugado y temperatura.

La capacidad de retención de agua (*CRA*) se midió mezclando un gramo de concentrado proteico en un tubo de centrifuga de 15 ml previamente pesado con 10 ml de agua destilada. El pH se ajustó a $2 \pm 0,2$; $3,5 \pm 0,2$; $4,7 \pm 0,2$; $5,5 \pm 0,2$ y $6 \pm 0,2$ con soluciones de NaOH 1N y HCl 1N. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 min y después se centrifugaron a 20.000 rpm durante 30 min en una centrífuga. Se decantó el sobrenadante y el sedimento fue pesado (p_2) y secado en horno (Elibet, Argentina) por 30 minutos a 100°C hasta peso constante, registrando el peso del residuo (p_1) (Yu y col., 2007).

La *CRA* (gramos de agua por gramo de proteínas) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$CRA = \frac{(p_2 - p_1)}{p_0} \quad (6.2)$$

La *CRA* juega un papel importante sobre la calidad de la textura en varios alimentos, por ejemplo sopas, carne molida, aderezos, salsas, productos de panificación. La absorción de agua sin la disolución de las proteínas, conduce a una hinchazón que provee propiedades como consistencia, espesamiento, viscosidad y adherencia (Yu y col., 2007). Los resultados indicaron que para un pH de 3,5; 4,7 y 6, la *CRA* fue de: $1,09 \pm 0,05$; $1,38 \pm 0,02$ y $4,3 \pm 0,03$ (ml de agua/g de producto) respectivamente. Este último valor es mayor que el reportado para concentrados de proteínas de leche y de soja (Rodríguez Furlán y col., 2011).

6.3.3. Capacidad de retención de grasas

En el mismo sentido que la *CRA*, la capacidad de ligamiento de grasas se considera como la cantidad de grasa que un material proteico puede retener bajo la acción de una fuerza centrífuga.

La capacidad de retención de grasas (*CRG*) se determinó utilizando el método de Chakraborty (1986), con algunas modificaciones. Para esto se pesó un gramo de concentrado proteico (p_0) en un tubo de centrifuga de 15 ml previamente pesado y se mezcló con 10 ml de aceite vegetal (V_1). La mezcla se dejó reposar y luego de 30 minutos las mezclas se centrifugaron a 20000 rpm por 25 minutos. Inmediatamente después de la centrifugación, se vertió el sobrenadante cuidadosamente en un cilindro graduado de 10 ml y se registró el volumen (V_2) (Rodríguez Furlán y col., 2011).

La *CRG* (mililitros de aceite por gramo de producto) se calculó como:

$$CRG = \frac{(V_1 - V_2)}{p_0} \quad (6.3)$$

La *CRG* de las proteínas es significativa en la formulación de productos fritos y para la conformación del sabor, además disminuye el desarrollo de enranciamiento oxidativo aumentando la estabilidad durante el almacenamiento. El resultado obtenido en este estudio fue 2,54 ml de aceite/g de producto. Este dato estuvo de acuerdo con lo obtenido previamente para otros concentrados proteicos (Rodríguez Furlán y col., 2011).

6.3.4. Preparación de geles y medidas reológicas de acuerdo al pH

Las proteínas de lactosuero en condiciones adecuadas forman por calentamiento redes tridimensionales irreversibles llamadas geles. En el proceso de gelificación térmica de proteínas globulares el paso de desnaturalización es de importancia crítica. La formación de un gel depende de varios factores tales como la concentración de proteínas, pH, fuerza iónica y la presencia de otros componentes del alimento. La formación de geles puede darse por agregación o por gelificación. Este último, implica la formación de una estructura ordenada o gel y ocurre cuando las proteínas se encuentran cargadas positiva o negativamente. Esto se

puede lograr modificando la acidez del medio durante el procesamiento para estar lejos del pH isoelectrico (Yamul, 2008).

Se prepararon suspensiones de proteínas conteniendo 5% (p/v) de concentrado proteico. El pH se ajustó a 3,5; 4,7; 6,1 con NaOH 1N o HCl 1N. Las muestras se calentaron a 90°C en un baño de agua con agitación durante 30 minutos y luego se enfriaron a temperatura ambiente sin agitación.

La fuerza del gel o capacidad de formar geles se determinó de acuerdo al método descrito por Chakraborty (1986); Yu y col. (2007); Rodríguez Furlán y col. (2010).

Las viscosidades aparentes de estas suspensiones proteicas se midieron con un viscosímetro programable DV-III (Brookfield, USA). La viscosidad del gel se determinó usando un viscosímetro a diferentes velocidades de cizallamiento ($10s^{-1}$ a $70s^{-1}$) a temperatura ambiente (21 ± 0.5 °C). Las determinaciones se realizaron, en todos los casos, 24 horas después de preparadas las muestras de suero para que todas tengan el mismo tiempo de maduración. Las Tablas 6.2 a 6.6 y Figuras 6.3 a 6.7 muestran los resultados obtenidos.

La Figura 6.8 muestra los resultados obtenidos para el concentrado de proteínas de suero lácteo, al 5% y para diferentes pH. Los aderezos formulados exhibieron un comportamiento pseudoplástico, siendo sensibles a la acidez del medio. La formación de los geles ocurrió en dos casos: (i) cuando la proteína está a altas concentraciones y (ii) como consecuencia de la transformación sol-gel, debido a la desnaturalización de la proteína usualmente causada por un tratamiento térmico. Por lo tanto, la formación del gel se lleva a cabo a causa de una agregación controlada de las moléculas de proteína después de un enfriamiento, formando una matriz tridimensional que confina al líquido (de Man, 1999; Yu y col., 2007).

Tabla 6.2: Muestra 1: Concentración = 5%_(p/v); pH=3,5; Spindle=18

Rpm	Esfuerzo de corte (τ)	Gradiente de velocidad (γ)	Viscosidad aparente (mPa.seg)	Torque%
5	0,44	6,6	67,2	11,2
10	0,68	13,2	51,9	17,3
25	1,20	33,0	36,2	30,2
40	1,62	52,8	30,7	41,0
55	2,00	72,6	27,5	50,0
70	2,33	92,4	25,2	58,9
85	2,62	112,0	23,4	66,2
100	2,89	132,0	21,9	73,1
110	3,05	145,0	21,0	77,1
120	3,20	158,0	20,2	80,7

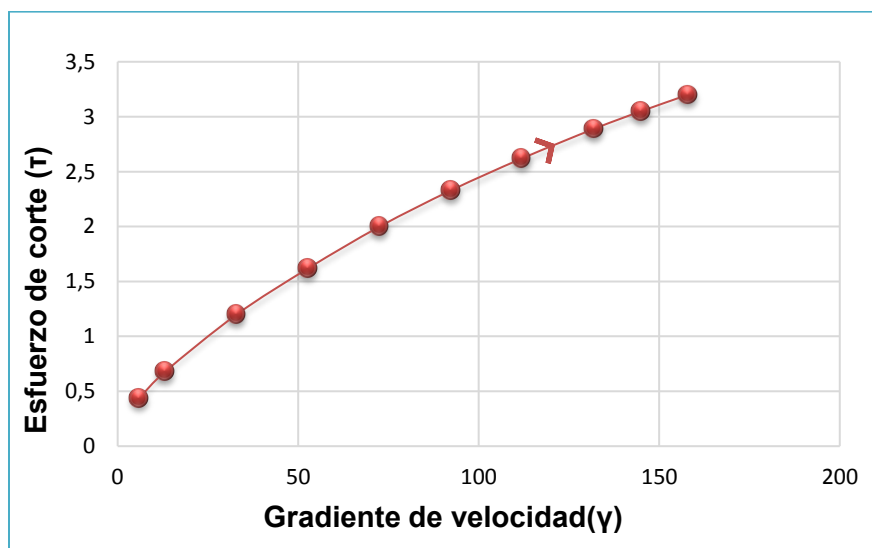


Figura 6.3: Muestra 1: Concentración = 5%_(p/v); pH=3,5; Spindle=18

Tabla 6.3: Muestra 2: Concentración = 5%_(p/v); pH=4,7; SPDL=18

rpm	Esfuerzo de corte (τ)	Gradiente de velocidad (γ)	Viscosidad aparente (mPa.seg)	Torque %
5	0,57	6,6	86,4	14,4
10	0,91	13,2	69,3	23,1
25	1,64	33	49,5	41,3
40	2,25	52,8	42,6	56,8
55	2,81	72,6	38,7	71
70	3,25	92,4	35,2	82,2
80	3,51	106	33,2	88,6
70	3,14	92,4	33,9	79,2
55	2,63	72,6	36,2	66,4
40	2,08	52,8	39,4	52,5
25	1,51	33	45,7	38,1
10	0,79	13,2	59,7	19,9
5	0,48	6,6	73,2	12,2

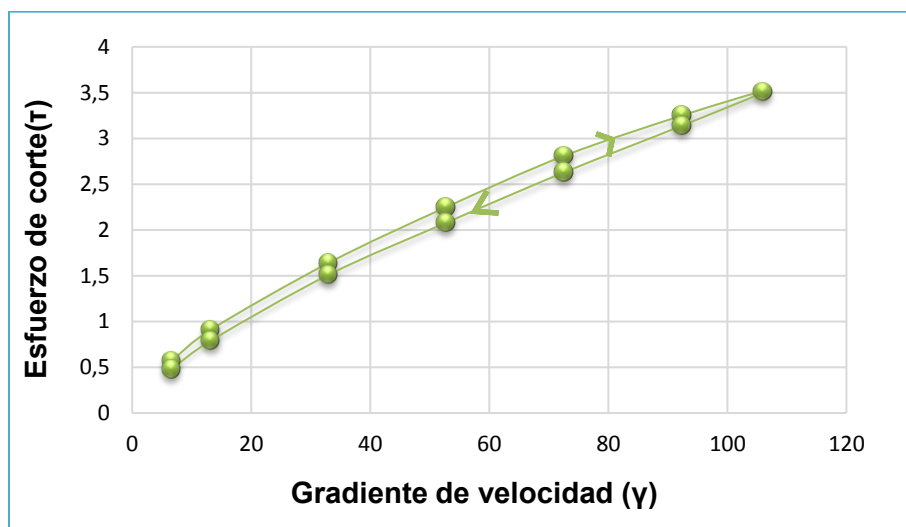


Figura 6.4: Muestra 2: Concentración = 5%_(p/v); pH=4,7; Spindle=18

Tabla 6.4: Muestra 3: Concentración = 5%_(p/v); pH=6,1; Spindle=34

rpm	Esfuerzo de corte (τ)	Gradiente de velocidad (γ)
5	1,8	1,4
10	2,65	2,8
25	3,32	7
40	4,53	11,2
55	5,09	15,4
70	6,38	19,6
85	7,39	25,2
100	7,74	28
110	8,99	33,6
100	8,69	28
85	8,21	25,2
70	7,03	19,6
55	5,92	15,4
40	4,76	11,2
25	3,42	7
10	2,35	2,8
5	1,81	1,4

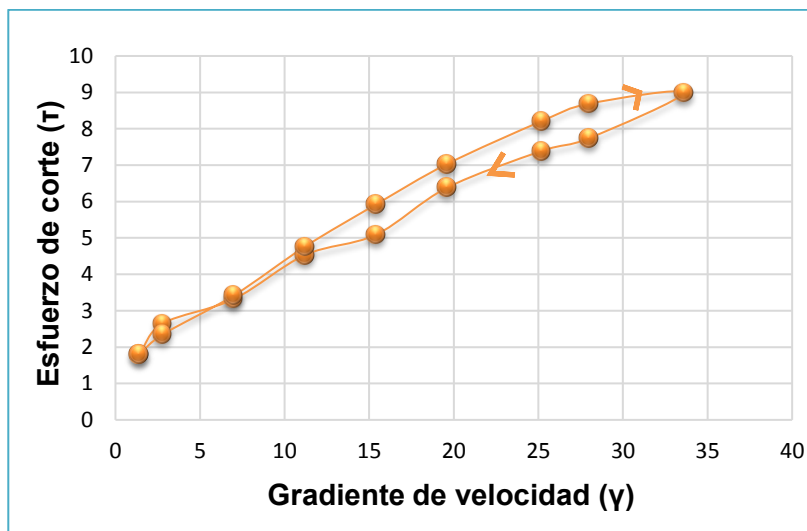


Figura 6.5: Muestra 3: Concentración = 5%_(p/v); pH=6,1; Spindle=34

Tabla 6.6: Muestra 4: Concentración = 2,5%_(p/v); pH=6,1; Spindle=18

rpm	Esfuerzo de corte (τ)	Gradiente de velocidad (γ)	Viscosidad aparente (mPa.seg)	Torque %
5	0,78	6,6	118	19,7
10	1,27	13,2	96,3	32,1
25	1,69	33	51,2	42,7
40	1,92	52,8	36,4	48,5
55	2,19	72,6	30,2	55,4
70	2,42	92,4	26,2	61,1
80	2,54	106	24,1	64,2
100	2,85	132	21,6	72
80	2,45	106	23,2	61,9
70	2,24	92,4	24,3	56,7
55	1,95	72,6	26,9	49,3
40	1,61	52,8	30,4	40,6
25	1,28	33	38,8	32,3
10	0,93	13,2	70,5	23,5
5	0,67	6,6	101	16,9

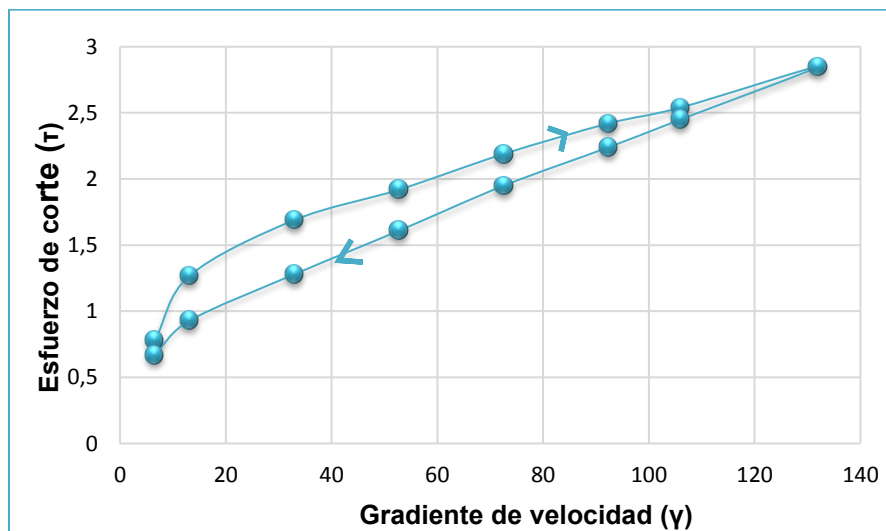


Figura 6.6: Muestra 4: Concentración = 2,5%_(p/v); pH=6,1; Spindle=18

Tabla 6.7: Muestra 5: Concentración = 2,5%_(p/v); pH=4,7; Spindle=18

rpm	Esfuerzo de corte (τ)	Gradiente de velocidad (γ)	Viscosidad aparente (mPa.seg)	Torque %
5	1,45	6,6	220	36,6
10	1,85	13,2	140	46,7
15	2,09	19,8	106	52,9
25	2,49	33	75,3	62,8
35	2,78	46,2	60,2	70,3
40	2,89	52,8	54,7	72,9
50	3,13	66	47,4	79
40	2,79	52,8	52,8	70,4
35	2,58	46,2	55,9	65,2
25	2,22	33	67,3	56,1
15	1,79	19,8	90,4	45,2
10	1,49	13,2	113	37,6
5	1,11	6,6	168	28

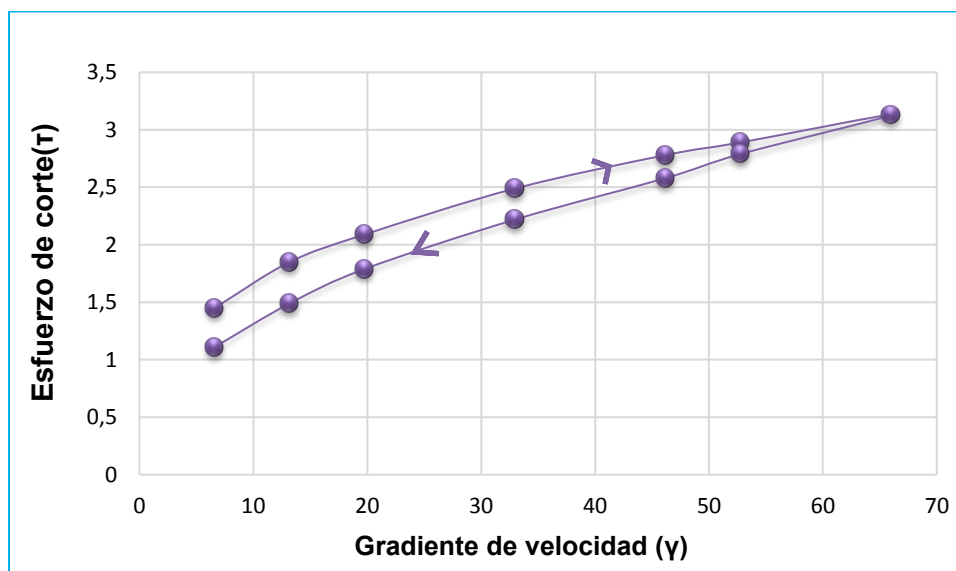


Figura 6.7: Muestra 5: Concentración = 2,5%_(p/v); pH=4,7; Spindle=18

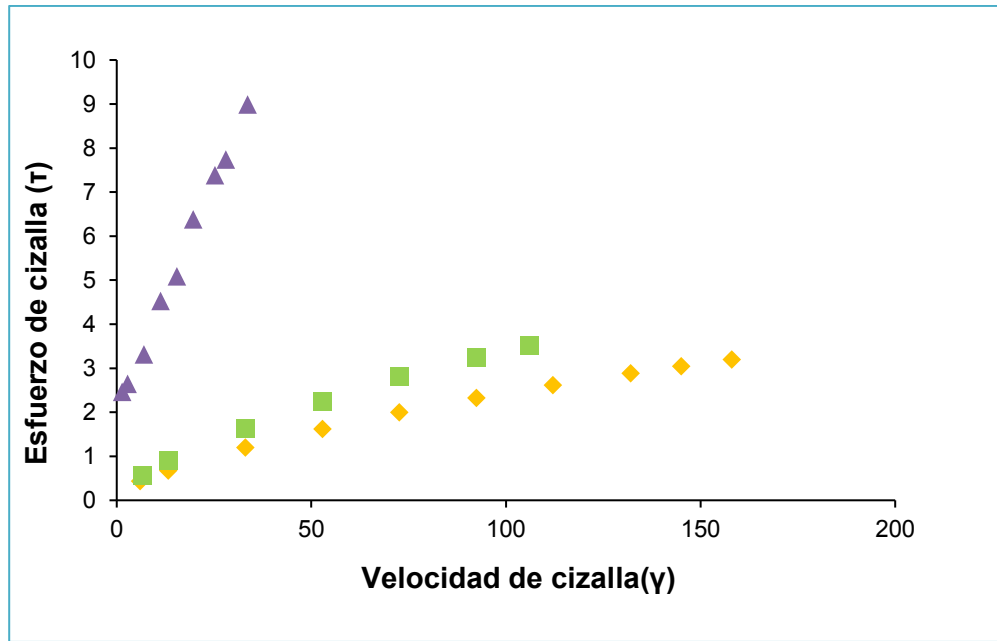


Figura 6.8: Comportamiento reológico del concentrado de proteínas de suero lácteo. Curva obtenida para un gel elaborado a base de concentrado de proteínas de lactosuero.

▲ pH 6,1 ■ pH 4,7 ◆ pH 3,5

El comportamiento no newtoniano de carácter pseudoplástico que presentaron las muestras, se puede describir con la ecuación de la ley de la potencia (Ostwald-de-Waele):

$$\tau = K\gamma^n \quad (6.4)$$

donde: K es el índice de consistencia [kg/(m.s)]; n es el índice de flujo (o índice de comportamiento hidrodinámico o de deslizamiento), es una constante adimensional menor que 1 para fluidos pseudoplásticos (cuando $n = 1$ se obtiene el modelo para un fluido Newtoniano) (Cheftel y col, 1989). En los fluidos pseudoplásticos la viscosidad aparente disminuye con el gradiente de velocidad de deformación.

La consistencia y los índices de flujo son de valor práctico (afectan el sabor de la comida y su textura) y sirven en la ingeniería de diseño para la manipulación mecánica de materiales fluidos. Ambos índices pueden ser usados para determinaciones de requisitos de potencia (Wei y col., 2001).

Las muestras elaboradas presentaron un comportamiento reológico pseudoplástico, con un cierto grado de tixotropía. Algunas de las razones del comportamiento pseudoplástico

son: a) debido a la presencia de compuestos de elevado peso molecular o partículas alargadas a concentraciones bajas; b) a la alta interacción entre partículas causando su agregación o asociación a enlaces secundarios y c) a la variación de la forma y tamaño de las partículas permitiendo su apilamiento, entre otras (Ramirez, 2008).

Los fluidos tixotrópicos muestran una disminución de la viscosidad a lo largo del tiempo a una velocidad de corte constante. Al mantener la cizalla constante, se destruye la estructura y disminuye la resistencia. Al someter el fluido a cizalla, se produce la transición de gel (alta viscosidad) a sol (menor viscosidad).

Los datos experimentales fueron ajustados con el modelo previamente mencionado (Ostwald-de-Waele). Los resultados se observan en la Tabla 6.7.

Se observa que en todos los casos $n < 1$ por lo que se verifica el comportamiento pseudoplástico de las muestras analizadas y que el modelo evaluado ajusta satisfactoriamente los datos experimentales obtenidos con todas las muestras.

La viscosidad aparente de la mayoría de los fluidos proteicos aumenta exponencialmente con la concentración proteica a causa de las interacciones proteína-proteína. Las variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica pueden modificar profundamente la viscosidad de las soluciones o de las dispersiones proteicas.

Las muestras presentaron tixotropía ya que la viscosidad aparente no estuvo relacionada exclusivamente con la velocidad de deformación sino también con el tiempo, como puede apreciarse en las curvas de ascenso y descenso del gradiente de velocidad de las Figuras 6.4 a 6.7. Este fenómeno se denomina histéresis. Los resultados de tixotropía se presentan en la Tabla 6.8.

La muestra a pH= 6,1 fue la que mejor nivel de gelificación presentó. Al aumentar la concentración proteica se incrementó la fuerza del gel. De hecho, la concentración de proteínas es uno de los factores más importantes involucrados en la gelificación. Si la concentración de éstas es muy baja la gelificación no ocurrirá, pero una vez alcanzada la concentración mínima de proteínas requerida, la fuerza del gel aumenta y el tiempo de gelificación disminuye a medida que la concentración proteica aumenta. La concentración de proteínas está directamente relacionada con la firmeza de los geles (Yamul, 2008).

Tabla 6.7: Valores obtenidos para el índice de consistencia e índice de flujo para los geles de proteína láctea

		Ley de la Potencia
M: 5% pH = 3,5	n	0,6158
	K (kg/(m s))	0,142
	R ²	0,9995
M: 5% pH = 4,7	n	0,6573
	K (kg/(m s))	0,16
	R ²	0,9998
M: 5% pH = 6,1	n	0,499
	K (kg/(m s))	1,44
	R ²	0,9893
M: 2,5% pH = 4,7	n	0,3430
	K (kg/(m s))	0,74
	R ²	0,9898
M: 2,5% pH = 6,1	n	0,3979
	K (kg/(m s))	0,405
	R ²	0,9802

En general, la firmeza de geles de proteínas séricas aumenta con el pH, por lo que a valores de pH entre 6-7,5 se favorece la formación de una estructura proteica más ordenada mediante uniones a través de puentes disulfuro, proteína-calcio y otros mecanismos, formándose geles más firmes y translúcidos. Esta mayor firmeza de los geles caprinos a pH próximo a 7 nos da una idea de que existen suficientes fuerzas de atracción que compensan las fuerzas de repulsión electrostática, que son consecuencia de la alta carga neta de las proteínas a pHs alejados del pI. En cambio, a valores de pH próximos al punto isoeléctrico, la carga neta de las proteínas se aproxima a cero, de forma que su carga está neutralizada. La falta de fuerzas de repulsión puede conducir a una agregación rápida y al azar, formándose como consecuencia un gel más débil (Sanmartín Estrada, 2010).

Tabla 6.8: Área de tixotropía de las curvas de fluidez de los geles de proteína láctea

Muestra	Área (mPa.s ⁻¹)
5% pH = 3,5	-
5% pH = 4,7	13,222
5% pH = 6,1	17,486
2,5% pH = 4,7	11,722
2,5% pH = 6,1	28,647

La formación de una estructura ordenada o gel, se produce cuando las proteínas, en este caso de lactosuero, se encuentran cargadas positiva o negativamente, lo que puede lograrse modificando la acidez del medio durante el procesamiento, de manera de estar relativamente lejos del pH isoeléctrico (PI). En el PI la carga neta es cero y las proteínas tienden a agregarse por no haber repulsión entre moléculas por lo tanto en ese caso el grado de gelificación es mucho menor.

6.3.5. Capacidad emulsionante y estabilidad

Las proteínas debido a su naturaleza anfifílica, tienen acción tensioactiva, y por su tendencia a difundir a la interfase, desnaturalizarse y agregarse, forman películas de rigidez y elasticidad variable, motivos por los cuales son buenos agentes emulsionantes. La capacidad emulsionante se define como la cantidad de aceite que puede emulsionar una solución de proteína a una determinada concentración al momento en que se produce la inversión de la emulsión. La inversión de fases ocurre cuando una emulsión agua/aceite se transforma en una aceite/agua, o a la inversa o cuando se produce la ruptura visible de la emulsión. El método consiste en adicionar aceite a una dispersión de una proteína con agitación continua hasta que ocurre la ruptura de la emulsión.

La capacidad emulsionante (CE) se determinó a partir la técnica descrita por Yu y col. (2007) con mínimas modificaciones. 0,5 g de muestra de proteína se agitó en 100 ml de agua destilada por 2 minutos usando un agitador de alta velocidad. Se varió el pH entre 3,4 y 7 usando NaOH 1 N o HCl 1 N. Posteriormente se añadió lentamente aceite vegetal con agitación constante. La agitación se detuvo cada 2 minutos para verificar el estado de la emulsión. En cuanto se observó un claro rompimiento de la emulsión, se registró el volumen total de aceite agregado que es el volumen que se usó para la CE (volumen (ml) de aceite emulsificado por gramo de muestra de proteína).

Para determinar la estabilidad de la emulsión se prepararon emulsiones mezclando 0,5 g de concentrado proteico con 100 ml de agua destilada bajo agitación constante durante 2 minutos. El pH se varió en el rango entre 3,5 y 7 con NaOH 1N o HCl 1N. Se agregaron 102,5 ml de aceite vegetal bajo agitación constante. Para prevenir contaminación microbiana se agregaron 0,05 gramos de azida sódica. Las muestras se analizaron con un microscopio óptico (Arcano XSZ1008N, China) con un aumento de 40x. Las emulsiones se fotografiaron durante 24 días. Las emulsiones también se examinaron diariamente de manera visual para determinar signos de cremado, separación de aceite o algún otro atributo físico que pudiera indicar separación.

Se midió la altura de la capa de separación (*SL*, spacer layer) de aceite en relación a la altura total de la emulsión o fase cremada (*E*) como un indicador de la estabilidad de la emulsión (Figura 6.9).

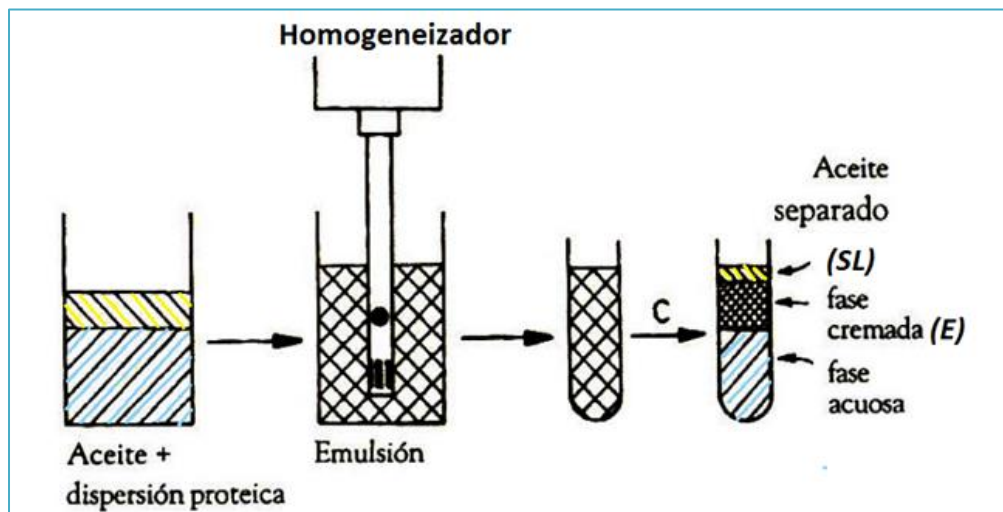


Figura 6.9: Medida de la resistencia a la coalescencia de una emulsión.

La estabilidad de la emulsión se calculó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$ES_i = \frac{E_i}{SL_i} \quad (6.5a)$$

$$ES = \frac{ES_i}{ES_0} \times 100 \quad (6.5b)$$

donde ES_0 es la estabilidad de la emulsión al tiempo 0 y ES_i representa la estabilidad de la emulsión a cualquier tiempo i .

La Tabla 6.9 muestra los resultados de la capacidad emulsionante del concentrado proteico de suero. La mayor capacidad de emulsificar es a pH $4,7 \pm 0,1$, por debajo y por arriba de este pH esta propiedad disminuye considerablemente. Si bien la solubilidad a pH 4,7 fue mínima (Figura 6.2), ésta presentó un valor alto, lo que explicaría que las proteínas de lactosuero sean buenos emulsificantes aún cerca de su punto isoeléctrico.

Tabla 6.9: Capacidad emulsionante del suero (CE)

pH	EC
	(ml de aceite vegetal/g de producto)
2,0 ± 0,1	150 ± 10
3,5 ± 0,1	150 ± 7
4,7 ± 0,1	445 ± 15
6,0 ± 0,1	210 ± 5
7,0 ± 0,1	150 ± 5

Las proteínas del suero tienen buena capacidad emulsificante y buena estabilidad porque son proteínas globulares con dominios en las estructuras lo suficientemente flexibles,

por eso son capaces de orientar y desplegarse en la interfase disminuyendo la tensión superficial y la energía libre del sistema, que imparte la estabilidad cinética deseada a las dispersiones (emulsiones o espuma) (de Man, 1999; Rodríguez Patino y col., 2008).

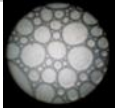
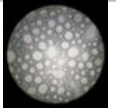
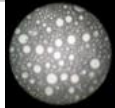
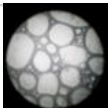
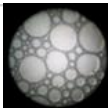
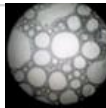
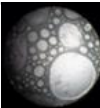
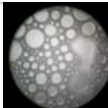

La formación y la estabilidad de la emulsión son muy importantes en sistemas alimenticios como aderezos, helados, confitería o productos cárnicos, etc. (Yu y col., 2007; Rodríguez Patino y col., 2008). Cerca al punto isoeléctrico de las proteínas del suero (pH 4-5) la capacidad emulsionante puede mejorar debido al aumento de los enlaces hidrofóbicos entre lípidos y proteínas (Sanmartín, 2010).

La estabilidad de la emulsión (ES) refleja la capacidad de las proteínas de impartir fuerza a la emulsión para resistir las tensiones (Liu y col., 2008).

Al final del registro, la ES fue mayor a pH 6, este resultado fue verificado a través de las imágenes obtenidas, en efecto, en la Tabla 6.10 se presentan las imágenes de las emulsiones de concentrado de proteína de suero en función del tiempo y del pH. También, como se esperaba, el tamaño de las gotas aumentó con el tiempo, provocando una emulsión más inestable.

Los resultados de la ES, calculados con las ecuaciones (6.5a) y (6.5b) durante 17 días se muestran en la Tabla 6.10, junto con las imágenes tomadas en función del tiempo y a diferentes pH. Las proteínas del suero de leche de cabra presentan una alta estabilidad de la emulsión porque tienen una alta actividad superficial y la capacidad de ser rápidamente absorbidas en la interfase.

Tabla 6.10: Estabilidad de la emulsión (ES)

Día	pH 3,5	pH 6	pH 7
	ES (%)	ES (%)	ES (%)
1	100±0,02	100±0,02	100±0,02
			
2	76,20 ± 0,02	25,56 ± 0,34	22,74 ± 0,07
3	10,75 ± 0,90	1,28 ± 0,25	1,45 ± 0,34
4	2,22 ± 0,35	0,92 ± 0,25	0,96 ± 0,32
5	2,22 ± 0,30	0,85 ± 0,30	0,83 ± 0,34
6	1,42 ± 0,30	0,78 ± 0,09	0,71 ± 0,09
7	1,42 ± 0,02	0,72 ± 0,36	0,60 ± 0,35
8	1,36 ± 0,32	0,65 ± 0,25	0,60 ± 0,34
9	0,96 ± 0,28	0,51 ± 0,30	0,54 ± 0,30
			
16	0,62 ± 0,30	0,51 ± 0,25	0,53 ± 0,30
			
17	0,48 ± 0,24	0,49 ± 0,28	0,37 ± 0,30

6.3.6. Determinación de la capacidad de formación de espuma y su estabilidad

Las espumas alimenticias son dispersiones de burbujas de gas en una fase continua líquida o semisólida que contienen un surfactante soluble. En numerosos casos, el gas es el aire (eventualmente carbónico) y la fase continua es una solución o una suspensión acuosa que contiene proteínas. La formación de espumas implica la difusión de proteínas solubles hacia la interfase aire/ agua, donde deben desdoblarse, concentrarse y extenderse rápidamente para así rebajar la tensión superficial.

En las espumas hay una fase continua de capas líquidas delgadas, llamadas laminillas, que separa las burbujas de gas. Al igual que las emulsiones se necesita energía mecánica para crear esta interfase. Para mantener la interfase contra la coalescencia de las burbujas de gas se necesita la presencia de agentes con actividad superficial que disminuyan la tensión interfacial y formen una barrera protectora elástica entre las burbujas del gas atrapado. Algunas proteínas pueden desempeñar este rol y formar una película protectora que se adsorbe en la interfase gas/líquido.

Numerosos estudios señalan la importancia de una fuerte solubilidad de las proteínas para que se manifieste una buena capacidad espumante y una buena estabilidad. Además, se produce una mayor estabilidad de las espumas a mayores concentraciones proteicas, debido al aumento de la viscosidad, formándose espumas con burbujas de menor tamaño. Las sales también pueden influenciar en la solubilidad, viscosidad, desdoblamiento y agregación de las proteínas, por lo que pueden alterar las propiedades espumantes.

Existen diversos fenómenos de desestabilización de las espumas y emulsiones. A partir de este concepto es posible analizar la floculación de las gotas o burbujas y la coalescencia o fusión de éstas entre sí, donde se produce al aumento progresivo de su tamaño, que conduce finalmente a la separación de las dos fases en dos capas separadas por una interfase. La capacidad espumante (CE) de las muestras de proteínas se investigó de acuerdo a la técnica descrita en diferentes trabajos (Chove y col., 2007; Rodríguez Furlán, 2012). Se prepararon dispersiones al 1% (p/v) en agua destilada usando el mismo equipo que se utilizó para preparar las emulsiones. Se mezclaron 100 ml (V_I) de la suspensión de concentrado proteico durante 3 minutos (1000 rpm), se vertieron en un cilindro graduado e inmediatamente se registró el volumen de espuma (V_E). La técnica empleada se esquematiza en la Figura 6.10.

La capacidad espumante (CE) se calculó como:

$$CE_s = \frac{V_E}{V_I} \quad (6.6)$$

Esta capacidad espumante se la considera como la capacidad espumante inicial ($t = 0$); (CE_{St}).

La estabilidad espumante (EE_S) se calculó como el porcentaje de la relación entre los volúmenes de espuma producida inicialmente ($t=0$, CE_{SI}) y cada 10 min (CE_{SF}) durante un período de 1 hora:

$$EE_S = \frac{CE_{SF}}{CE_{SI}} \quad (6.7)$$

donde $CE_S = \frac{V_{Ei}}{V_L}$

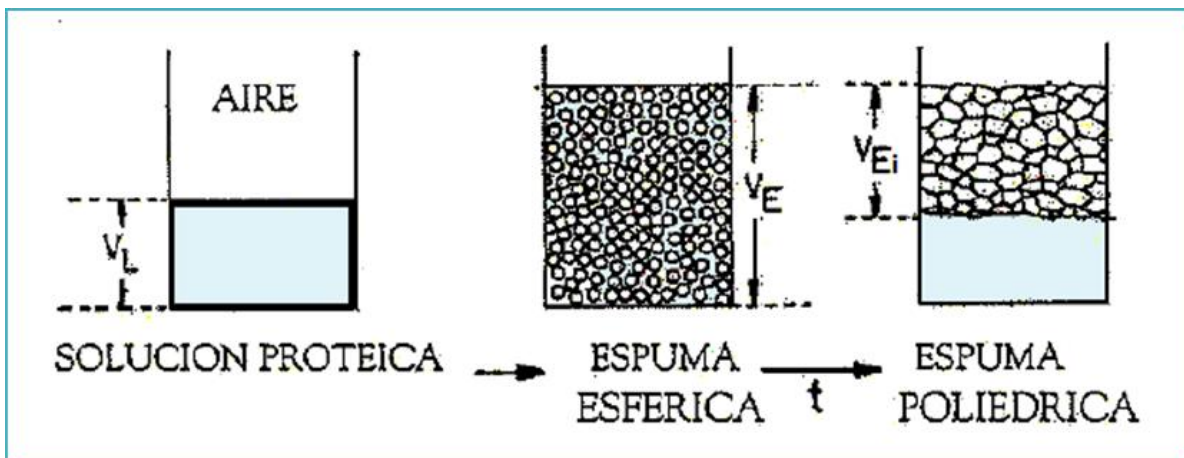


Figura 6.10: Representación esquemática de la formación de una espuma y su estabilidad en el tiempo.

Con respecto a la capacidad espumante, el concentrado de suero no produjo espuma en las condiciones ensayadas. Esto puede ser explicado considerando que la grasa también se concentra durante el proceso de UF. Se sabe que pequeñas concentraciones de lípidos alteran fuertemente las propiedades espumantes, ya que los tensioactivos y lípidos polares se oponen a una conformación favorable de las películas de proteína adsorbida en la interfaz aire-agua (Cheftel y col., 1989).

Nuestros resultados están de acuerdo con aquellos reportados por Kim y col. (1987) donde no se observaron propiedades espumantes cuando a la precipitación termocálcica le siguió una centrifugación en WPC bovino y también están en concordancia con Sanmartín y col. (2013) para concentrados de proteínas de suero obtenido de suero de queso clarificado.

6.4. Caracterización proteica por electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) separa las moléculas de mezclas complejas. Esta técnica analítica es útil para comparar y caracterizar proteínas.

Los poros del gel son creados por entrecruzamiento de acrilamida con bis-acrilamida que forman una red de poros. El tamaño del poro es función de la concentración del monómero de acrilamida utilizado: cuanto mayor sea la proporción de bis con respecto a la de acril menor será el tamaño de poro. El tamaño de poro a utilizar depende del peso molecular de la molécula de interés y se determina en base a la distancia que se quiere que recorra.

Este estudio se realizó con la finalidad de caracterizar cuali y cuantitativamente la composición proteica del concentrado de suero obtenido por MF-UF, y se comparan con la composición proteica de la materia prima, la leche de cabra.

Para el desarrollo de esta técnica se utilizó un buffer de corrida discontinuo SDS-PAGE. En el sistema de buffer discontinuo se emplean también diferentes geles, un gel de apilamiento donde las muestras son comprimidas dentro de una delgada banda de comienzo, de modo que todas inician desde el mismo punto de partida y un gel de corrida donde las proteínas individuales son finalmente separadas. Este sistema es utilizado para la determinación de pureza de una muestra o del peso molecular (PM) de una proteína, que incorpora el detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS) en el buffer. En este arreglo, las proteínas son desnaturizadas por calentamiento en el buffer conteniendo los agentes desnaturizantes SDS y β -Mercaptoetanol. La proteína se desnaturiza conservando únicamente su estructura primaria, es decir se obtiene una forma alargada y uniforme de carga proporcional a sus pesos moleculares. De este modo, es una técnica analítica semi preparativa que permite separar biomoléculas según su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico. Durante la corrida electroforética las proteínas con mayor peso molecular migrarán más lento que las proteínas con un menor peso molecular. De esta manera, cuando se compara la movilidad electroforética de una proteína en particular con la movilidad electroforética de proteínas de peso molecular conocido (marcadores de peso molecular), se puede estimar el peso molecular de la proteína en cuestión. Una vez finalizada la corrida

electroforética, las proteínas son visualizadas mediante la adición de un colorante como el azul de bromofenol, el cual se une específicamente a las proteínas y no al gel.

La Figura 6.11 muestra un esquema del sistema empleado.

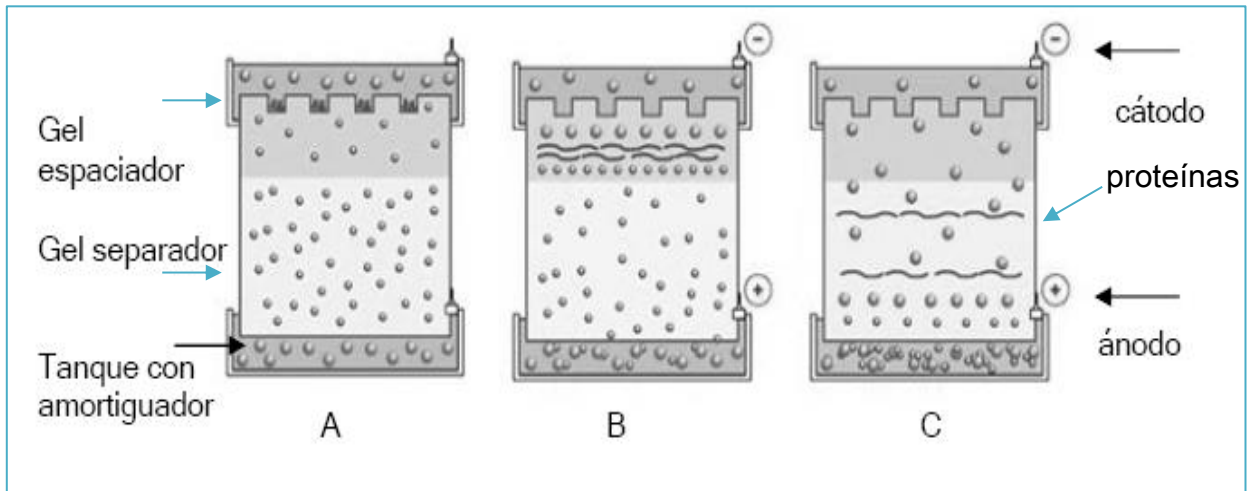


Figura 6.11: Esquema de una corrida SDS-PAGE. (A). Se trabaja con los gels de apilamiento y de corrida que poseen concentraciones de poliacrilamida diferentes. En la parte superior del gel de apilamiento se encuentran las calles donde se depositan las diferentes muestras a correr. Todo el sistema se encuentra sumergido en una solución amortiguadora; (B). Una vez que se aplica voltaje constante, las proteínas entran en el gel de apilamiento. Al llegar al borde del mismo, se acumulan para entrar al mismo tiempo en el gel de corrida; (C). Las proteínas migran de acuerdo a su peso molecular.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se empleó para caracterizar las proteínas de las corrientes de alimentación, permeado y concentrado. La misma se llevó a cabo en un sistema buffer discontinuo: gel de resolución buffer 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, gel de apilamiento buffer 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (p/v) de SDS. El buffer de la muestra usado fue 62,5 mM tris-HCl, pH 6,8, 10 % (v/v) de glicerol, 2% (p/v) de SDS, y se agregaron 0,025% (p/v) de azul de bromofenol, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol.

El gel se preparó con 4% del gel de apilamiento (espaciador) y 7% del gel de corrida. Las determinaciones se realizaron en una unidad de electroforesis vertical (Mini-Protean® 3 Cell, Bio-Rad, USA) a 75 V por 15 minutos, seguido por 100 V por la corrida del buffer [0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicina, y 0,1 % (p/v) SDS, pH 8,3] hasta que el colorante de seguimiento migra hasta el borde inferior del gel (aproximadamente 90 minutos).

Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 (0,1% p/v). Las fracciones proteicas fueron identificadas usando un marcador de peso molecular (Sigma, USA) (MW 30.000 – 200.000 Da).

Los geles se analizaron con el programa Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, L.P., USA). La cantidad relativa de proteína contenida en cada banda proteica se calculó a partir de su respectivo porcentaje de densidad óptica respecto de la densidad óptica total (Chove y col., 2007).

En la Figura 6.12 se muestran los resultados obtenidos sobre la corrida realizada empleando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón y muestras de leche de cabra y del concentrado de proteínas de lacotsuero obtenido por MF-UF.

En la imagen se observa que la mayoría de las proteínas del suero del concentrado son: β - lactoglobulina, seguida de seroalbúmina, β -lactolbúmina y α -lactoglobulina tiene pesos moleculares similares (18.4 kDa y 14.2 kDa respectivamente) por lo tanto, es difícil su separación por técnica de electroforesis y aparecen juntas en el gel. Las inmunoglobulinas, albúmina sérica y proteasas – peptonas están presentes en concentraciones menores, y son productos de la descomposición de la β - caseína por la plasmina (Park y col., 2007). Otra proteína soluble encontrada en pequeñas cantidades y con propiedades antibacteriales es la lactoferrina. Los resultados están en concordancia con los datos reportados previamente (Casper y col., 1999; Park y col., 2007), indicando que es efectiva la concentración de proteínas del suero por tecnología de membranas y que el procedimiento no afecta la composición proteica esperada.

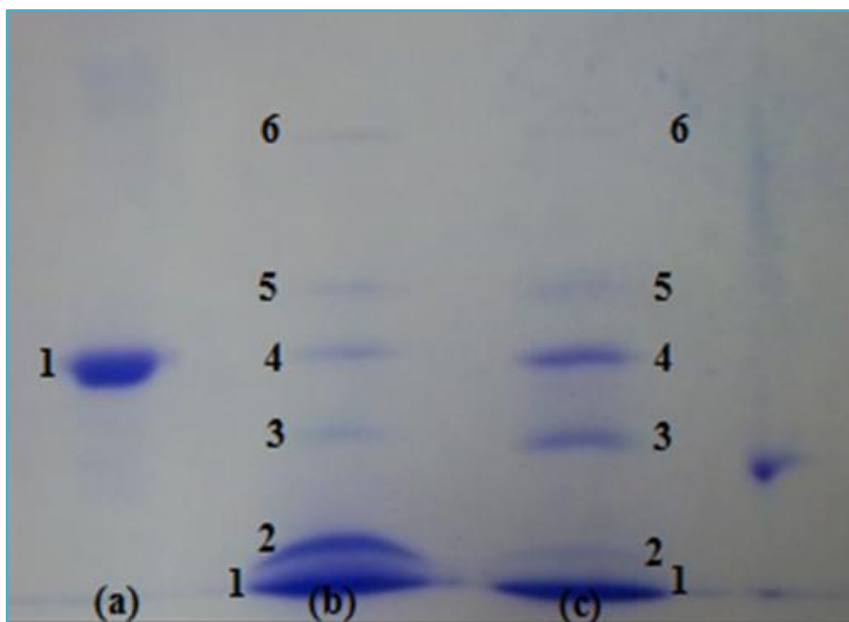


Figura 6.12: Resultados del Gel de electroforesis SDS-PAGE: **(a) Solución patrón:** 1 BSA **(b) Muestra de leche:** 1 β -lactoglobulina + α - lactoalbúmina (72.2%); 2 Caseína (23.8%); 3 Otras proteínas (0.8%); 4 BSA (1.7%); 5 Lactoferrina (0.8%); 6 Inmunoglobulinas (0.7%) **(c) Muestra de concentrado de lactosuero líquido:** 1 β -lactoglobulina + α - lactoalbúmina (80.4%); 2 Caseína (2.3%); 3 otra s proteínas (5.5%); 4 BSA (9.3%); 5 Lactoferrina (2.1%); 6 Inmunoglobulinas (0.4%)

6.5. Comparación entre diferentes concentrados proteicos liofilizados

En la Tabla 6.11 se pueden observar valores correspondientes al contenido total de proteínas, capacidad de retención de agua, capacidad de retención o ligamento de grasas, capacidad emulsionante, capacidad y estabilidad espumante y contenido de cenizas para diferentes concentrados proteicos trabajados en nuestro grupo de investigación como: concentrados proteicos liofilizados a partir de leche bovina (LB), leche de soja (LS), plasma bovino (PB), plasma bovino con adición de sacarosa (PB+S) (Rodríguez Furlán y col., 2011) y valores correspondientes al concentrado proteico de leche de cabra (LC) obtenido en el presente trabajo.

Al comparar los resultados se observa que el concentrado proteico liofilizado obtenido a partir de leche de cabra presenta propiedades similares a los otros concentrados proteicos. Es muy similar al concentrado proteico de leche de soja, aunque con menor porcentaje de proteínas totales y una mayor capacidad de retención de agua. Por último,

ninguno de los concentrados presentó formación de espuma al pH natural. Esto sugiere que las posibilidades como ingrediente en diferentes formulaciones alimentarias es amplia.

Tabla 6.11: Características de diferentes concentrados proteicos liofilizados.

Propiedad	PB	PB+S	LB	LS	LC
Proteínas totales (%p/p)	73,70±0,60	27,80±0,40	34,80±0,30	28,80±0,20	23,73±0,03
CRA(ml de agua/g de producto)	5,21±0,08	7,31±0,03	1,00±0,05	2,05±0,06	4,30±0,05
CRG (ml de aceite/g de producto)	2,20±0,20	2,40±0,10	3,90±0,11	2,30±0,08	2,54±0,40
CE (ml de aceite/g de producto)	289,00±7,80	445,00±5,00	790,00±9,00	260,00±7,00	210±5,00
CEs (ml/ml)	1,83±0,08	1,22±0,02	0	0	0
EEs (%)	21,70±1,20	50,60±0,40	-	-	-
Cenizas (%p/p)	5,20±0,10	2,50±0,15	6,70±0,10	7,50±0,10	5,99±0,03

CRA: Capacidad de retención de agua; CRG: Capacidad de retención de grasas;
CE: Capacidad emulsionante; CEs: Capacidad espumante; EEs: Estabilidad espumante.

6.6. Aplicación del concentrado proteico de lactosuero de queso caprino. Desarrollo de un aderezo.

6.6.1. Formulación y resultados de la caracterización fisicoquímica de las muestras

A partir del concentrado proteico obtenido, se desarrolló un aderezo empleando la formulación que se presenta en la Tabla 6.12 donde se enumeran los ingredientes (y sus características) utilizados en la elaboración de las muestras.

Se prepararon dos muestras por triplicado: una sin colorante y otra con la adición de cúrcuma. La Figura 6.13 muestra el diagrama de flujo utilizado en la preparación de las muestras de aderezo.

Se prepararon por separado el gel proteico a partir del concentrado proteico obtenido por liofilización y un gel a partir de almidones modificados (Mathmarch M25, Mathiesen). Se dejaron enfriar y se mezclaron en una batidora con agitador planetario. Luego se adicionó una parte de los ingredientes y se procedió a la formación de una emulsión agregando aceite con agitación vigorosa. Una vez formada la emulsión, se incorporaron el resto de los aditivos, se mezcló todo y se verificó que el pH estuviera por debajo de 4,5, requisito necesario para una buena conservación. Luego los productos fueron envasados en frascos de vidrio previamente esterilizados y se almacenaron en heladera.

Tabla 6.12: Formulación del aderezo: Ingredientes- Aditivos

Ingredientes	Cantidad (1/2 Kg de aderezo)	Función
Concentrado de lactosuero de leche de cabra	21 g	Emulsionante- Estabilizante Espesante Reemplazante de grasas
Aceite vegetal	100 g	Materia grasa Emulsionante
Agua	350 g	Disolvente Necesaria para la gelificación
Almidón modificado	30 g	Gelificante Emulsionante
Sal	2,5 g	Saborizante Conservante
Ácido cítrico	1,5 – 2 g	Acidulante Conservante- Antioxidante
Jugo de limón	17,5 g	Acidulante Saborizante
Mostaza	6g	Saborizantes
Azúcar	5 g	
Ácido ascórbico	0,25 g	Antioxidante
Di y Tri fosfato	2 g c/u	Estabilizantes
Sorbato de potasio	0,05 g	Conservante

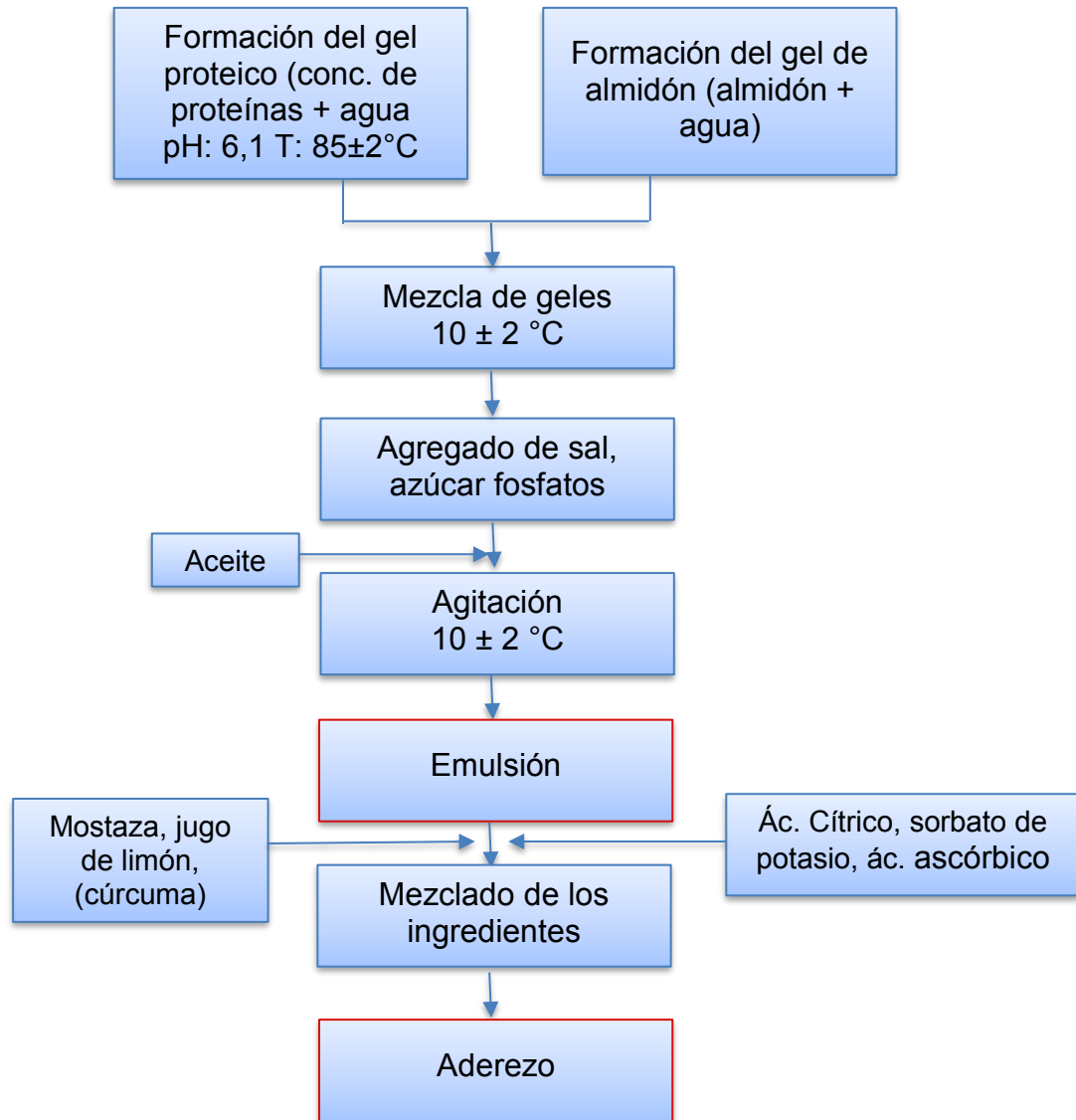


Figura 6.13: Diagrama de flujo utilizado en la elaboración de un aderezo con concentrado proteico de suero de queso de cabra

Al producto obtenido se le practicaron los análisis que a continuación se describen a fin de caracterizarlo y comparar los resultados con un producto comercial.

6.6.2. Resultados de las determinaciones de composición fisicoquímica de los aderezos

Los análisis fisicoquímicos de las muestras de aderezos se realizaron con los métodos descritos en el Capítulo 2: Materiales y Métodos.

La determinación de azúcares se llevó a cabo con un refractómetro (ARCANO, China, rango 0-32° Brix) en el que los componentes solubles se expresan en °Brix. Esta medida toma sólo unos pocos segundos y tiene buena exactitud (Van Waes y col., 1998). Además la viscosidad aparente de los aderezos, con cúrcuma, sin cúrcuma y comercial se determinó usando un viscosímetro Haake-VT02 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Los datos obtenidos a partir de las determinaciones fisicoquímicas se muestran en la Tabla 6.13.

Tabla 6.13: Determinaciones fisicoquímicas en aderezos

Muestra	Viscosidad aparente (cp)	Proteínas (%p/p)	Humedad (%p/p)	Grasas (%p/p)	Cenizas (%p/p)
Aderezo	14266,67±642,90	0,96±0,00	61,44±1,83	24,11±1,08	1,87±0,05
Aderezo (c)	14833,33±1527,50	0,98±0,23	61,83±1,27	24,29±1,20	1,79±0,02
Comercial	15000,00±353,55	0,45±0,12	70,80±0,99	14,70±1,20	2,20±0,04

(c): con colorante

El valor de viscosidad aparente obtenido para cada muestra cumple con lo establecido por el Código Alimentario Argentino en el Artículo 1282 en el cual se indica que el mismo debe ser menor a 22000cp. Además, se observa una adecuada estabilidad de este parámetro en el tiempo y similitud con el aderezo comercial.

El contenido de proteínas de los dos aderezos elaborados, con y sin colorante, fue el doble respecto al contenido proteico de la muestra comercial, siendo el principal aporte en el desarrollo del aderezo empleando las proteínas del lactosuero de leche de cabra. El contenido de grasa fue mayor en el aderezo con concentrado proteico, aunque el valor obtenido se sigue considerando como bajo de acuerdo con el CAA. Respecto al contenido de cenizas, no hubo diferencias significativas con el valor medido en el aderezo comercial. Es importante destacar que los resultados fueron similares a los reportados por Sanmartín y col. (2012), y Juárez y Ramos (1986). Sin embargo, es conocido que la composición del suero de queso varía en

relación a numerosas variables como el procedimiento de elaboración del queso y con la dieta caprina, pastoreo, estación, alimentación y condiciones medioambientales (Park y col., 2007).

El pH obtenido para cada muestra cumple con el valor establecido por el Código Alimentario Argentino en el Artículo 1282 en el cual, como se mencionó debe ser menor a 4,5. Este es en efecto, un valor seguro que inhibe el crecimiento de *Clostridium botulinum* y la formación de la toxina del botulismo en salsas y aderezos.

La cantidad de ión cloruro determinada en todas las muestras (Método de Mohr, Capítulo 2) estuvo de acuerdo con lo establecido por el Código Alimentario Argentino (CAA), <1,6%.

Para esta composición, se encontró que una porción de 12g de aderezo aporta 32 calorías. Este valor se corresponde con el declarado para la misma porción de diferentes aderezos comerciales bajos en calorías. Para el cálculo de la contribución de calorías de las muestras, se tuvieron en cuenta los datos de composición que aparecen en la Tabla 6.13 y los correspondientes aportes calóricos de proteínas, grasas y carbohidratos cuyos valores son 4 cal/g, 9 cal/g y 4 cal/g, respectivamente.

6.6.3. Análisis del perfil de textura

El análisis instrumental del perfil de textura se llevó a cabo en el analizador de textura TMS-Touch (Food Technology Corporation, USA), mostrado en el Capítulo 2. Para este estudio se empleó una celda de carga de 50 N y una sonda de acrílico cilíndrica de 25 mm de diámetro. El ensayo se practicó luego de que las muestras fueran equilibradas a una temperatura estándar de $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Se realizaron dos determinaciones, con una semana de diferencia para establecer si se producían algunos cambios en las muestras con el tiempo. Mientras tanto, las muestras fueron almacenadas en refrigerador $6 \pm 2^\circ\text{C}$. El ensayo de textura consistió en un ensayo de penetración a una velocidad de 250 mm min^{-1} y una distancia de penetración de 10 mm. De la curva fuerza versus tiempo, se determinaron las siguientes propiedades mecánicas (Kealy, 2006): dureza (σ_f), trabajo de adhesión (Adh), módulo de deformabilidad (MD) y trabajo de penetración (W_f).

En la Figura 6.14, se observa una muestra de aderezo en proceso de ensayo de textura y la probeta utilizada, mientras que en la Figura 6.15 se puede ver una de las curvas obtenidas en la determinación a modo de ejemplo ya que todas presentaron el mismo comportamiento.



Figura 6.14: Muestra de aderezo durante un ensayo de textura

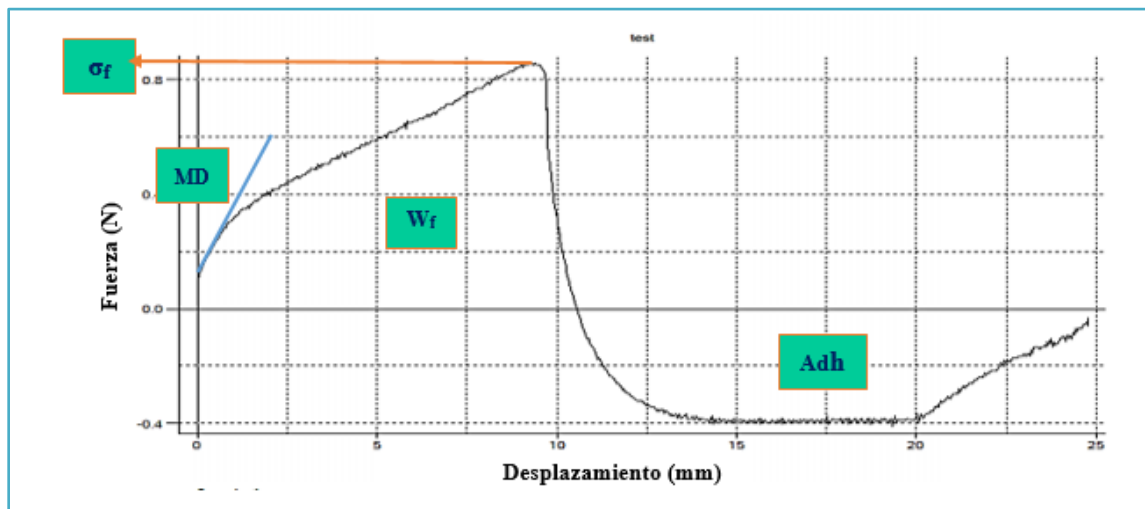


Figura 6.15: Textura del aderezo: Curva de fuerza vs. Desplazamiento.
Parámetros estudiados: σ_f : dureza, Adh: trabajo de adhesión, MD: módulo de deformabilidad y W_f :
trabajo de penetración

El ruido que se observa en las gráficas puede ser debido a la grumosidad que presentaban las muestras.

Los resultados de las mediciones con el analizador de textura se presentan en la Tabla 6.14. Los aderezos formulados presentaron parámetros de textura ligeramente inferiores a la muestra comercial, aquí es necesario señalar que los equipos empleados en la elaboración en las diferentes operaciones son distintas y también las formulaciones empleadas. Sin embargo, la dureza y trabajo de adhesión de las muestras desarrolladas son bastante similares a las informadas para aderezos preparados con almidón de patata pregelatinizado (Bortnowska y col., 2014).

Se observa que los aderezos preparados en el laboratorio, con y sin cúrcuma, mostraron valores muy similares ($p < 0,01$) para los atributos de dureza (σ_f), trabajo de adhesión (Adh) y trabajo de penetración (W_f). El ensayo de textura se repitió 7 días después y se observó la misma tendencia para los parámetros de textura estudiados. Se encontró que luego de una semana, los parámetros de textura mostraron mayor variación en la muestra comercial que en las muestras preparadas en el laboratorio.

Tabla 6.14: Datos obtenidos para los parámetros de textura del aderezo. Estudio en el tiempo.

Muestra	Día 1				Día 7			
	σ_f (N)	W_f (N.mm)	Adh (N.mm)	MD	σ_f (N)	W_f (N.mm)	Adh (N.mm)	MD
Aderezo	0,62±0,05	4,39±0,34	3,52±0,29	0,11±0,02	0,59±0,07	4,16±0,39	3,43±0,31	0,19±0,13
Aderezo (c)	0,63±0,12	4,27±0,70	3,60±0,57	0,16±0,02	0,64±0,13	4,28±0,82	3,52±0,71	0,13±0,03
Comercial	0,86±0,00	10,09±0,42	0,09±0,62	0,24±0,00	0,78±0,06	5,11±0,49	4,38±0,62	0,17±0,00

(c): con colorante

6.6.4. Análisis sensorial de aderezos

Las muestras, con y sin cúrcuma y la muestra comercial, fueron evaluadas a $12 \pm 1^\circ\text{C}$ en una sala uniformemente iluminada por 25 panelistas semi-entrenados seleccionados entre

estudiantes y miembros de la Facultad. Una hora antes de las evaluaciones, las muestras se colocaron en vasos de plástico cerrados. Las muestras se codificaron con un número de tres dígitos cada una y se presentaron en un orden aleatorio en los contenedores plásticos. Los atributos se estimaron en una escala de nueve puntos, de 1= me gusta mucho a 9= me disgusta mucho. Los atributos sensoriales evaluados fueron color, flavor, gusto y consistencia. Se proporcionaron galletitas para limpiar el paladar antes de probar cada una de las muestras. Luego se realizó un análisis estadístico mediante el test de Friedman, que determina si las sumas del total de datos para cada muestra difieren significativamente (Meilgaard y col., 2006).

En la Figura 6.15 se puede observar la presentación de las diferentes muestras durante la evaluación sensorial realizada por jueces no entrenados.

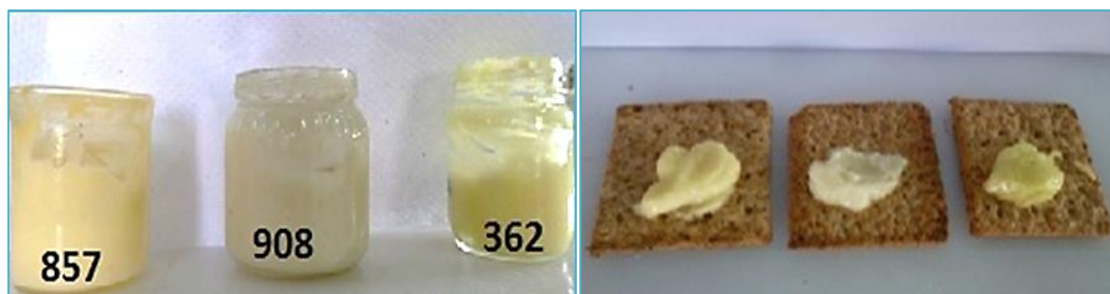


Figura 6.15: Presentación de las muestras de aderezo durante el análisis sensorial.

Los resultados obtenidos considerando los atributos de color, sabor, consistencia y aceptación global, se muestran en la Figura 6.16. Los resultados muestran que el orden de preferencia por los panelistas fue: aderezo comercial en el primer puesto, aderezo sin cúrcuma en el segundo y finalmente el aderezo con cúrcuma.

A pesar de estar en segundo lugar, el aderezo sin colorante presentó una muy buena aceptación por parte de los catadores destacando principalmente el color y el sabor como se muestra en la figura. El aderezo con cúrcuma quedó en el último lugar debido principalmente a su color.

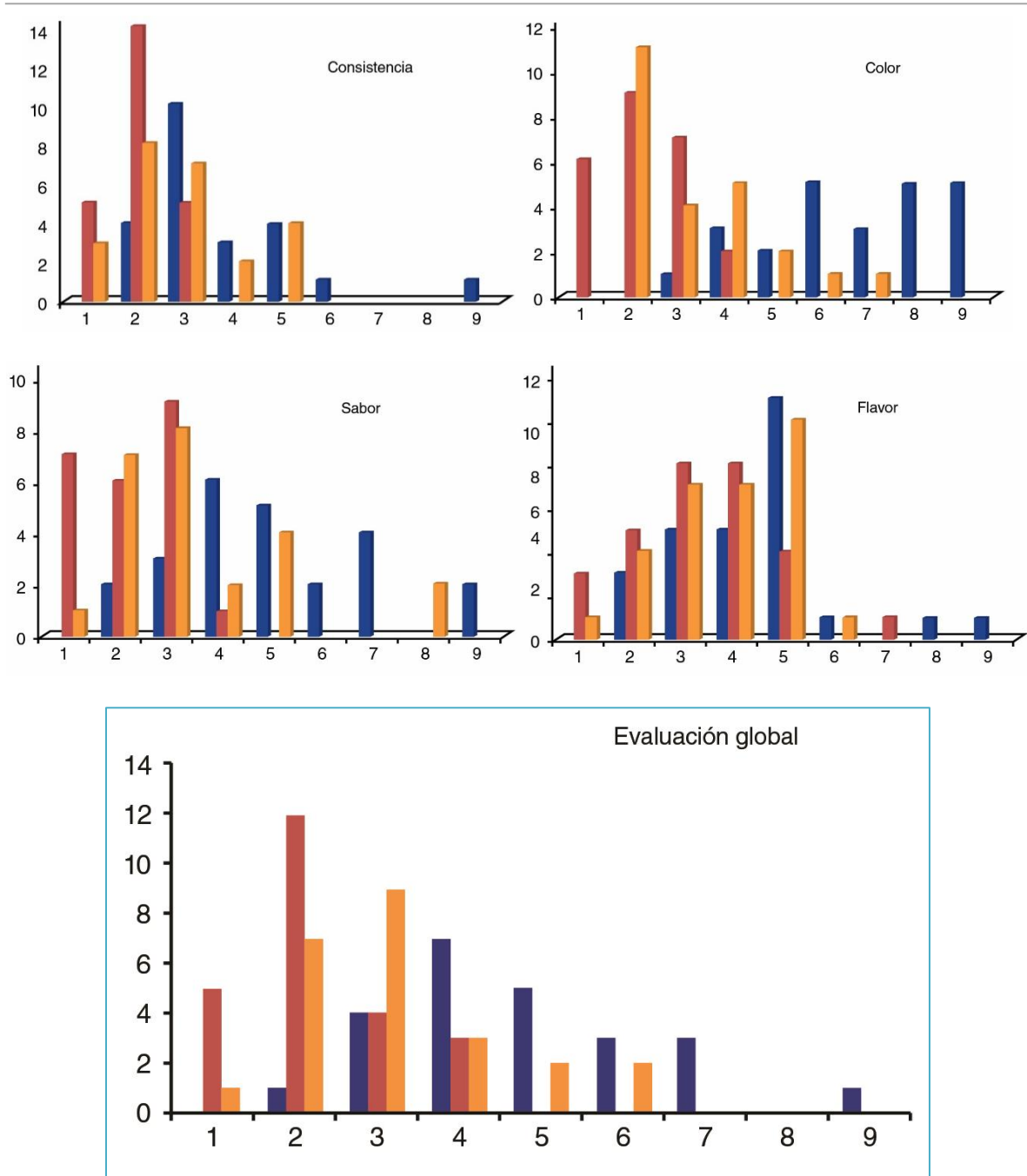


Figura 6.16: Análisis sensorial de aderezos. 1: me gusta muchísimo; 2: me gusta mucho; 3: me gusta moderadamente; 4: me gusta poco; 5: no me gusta ni me disgusta; 6: me disgusta poco; 7: me disgusta moderadamente; 8: me disgusta mucho; 9: me disgusta muchísimo.
■ Aderezo sin colorante ■ Aderezo con colorante ■ Aderezo comercial

6.6.5. Análisis del color superficial de aderezos

El color de la superficie de las muestras se midió con un espectrofotómetro Mini Scan EZ (Hunterlab, USA). El medidor de color se calibró con los estándares de blanco y negro. Los resultados reportados son promedios de tres medidas en cada muestra de aderezo usando los parámetros de CIELAB, L*, a* y b*.

Los resultados para a las medidas de color sobre las muestras de aderezo se muestran en la Tabla 6.15. El producto comercial y los aderezos enriquecidos con concentrado de proteínas de suero de queso mostraron un alto valor de L* (mayor que 80) que refleja el grado de luminosidad. El valor de a* mostró una leve desviación hacia los valores negativos. El valor positivo de b* el grado de tendencia hacia el color amarillo. El aderezo con cúrcuma exhibió valores más altos que el control y las muestras sin colorante, valores por debajo.

Tabla 6.15: Color superficial de aderezos

Muestra	L*	a*	b*
Aderezo	81,12 ± 1,16	3,46 ± 0,80	24,88 ± 1,83
Aderezo (c)	80,50 ± 0,34	-9,08 ± 0,50	52,90 ± 5,67
Comercial	84,41 ± 1,84	-3,16 ± 0,42	34,07 ± 0,95

(c): con colorante

6.7. Conclusiones

Se obtuvo un concentrado de proteína a partir de desechos de una actividad productiva tal como la elaboración de queso caprino mediante tecnología de membrana. El procedimiento empleado permitió una tasa de retención de proteínas de 91,4 g/100 g. El

concentrado de lactosuero se liofilizó y se caracterizaron las propiedades funcionales y fisicoquímicas del polvo obtenido. Los perfiles de propiedades funcionales para proteínas de suero de leche caprino fueron en general dependientes del pH, con la menor solubilidad a pH 4-6; en este rango de pH, se obtuvo la mejor capacidad y estabilidad emulsionantes.

Los resultados de las propiedades reológicas indicaron que el concentrado de suero de leche es un ingrediente adecuado para formulaciones que requieren gelación. Así, y de acuerdo con las propiedades evaluadas y el comportamiento presentado, se aplicó el concentrado de proteína caprina en la formulación de un aderezo.

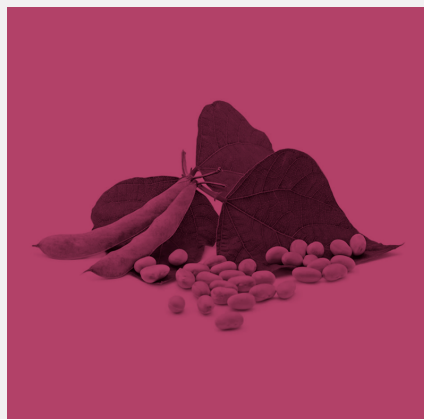
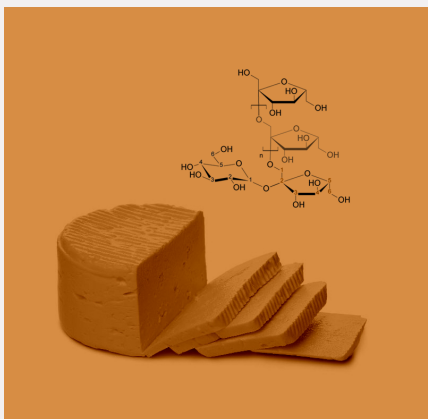
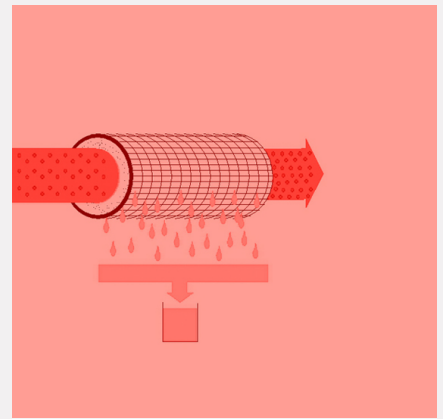
El producto desarrollado presentó características fisicoquímicas similares al aderezo comercial como pH, cenizas, viscosidad, textura y color. El análisis sensorial también mostró que el aderezo tenía una buena aceptabilidad. Sin embargo, la ventaja nutricional principal es que las muestras contenían el doble de contenido de proteína, y aunque el contenido de grasas también era más alto, el aderezo continúa correspondiendo a un producto reducido en grasas.

El principal beneficio ambiental es la utilización de los efluentes líquidos de la industria de fabricación de queso, que presentan un alto DBO, por lo que no se pueden descargar sin un tratamiento de depuración previo. A este respecto, la conversión de estos efluentes en ingredientes de valor añadido para la industria alimentaria es altamente beneficioso, en particular para las producciones regionales de quesos caprinos.

Capítulo 7

Conclusiones

Diana Palatnik



CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

Los objetivos específicos que se han planteado para esta Tesis son:

- Obtener una formación teórico-experimental sobre el proceso de producción y las metodologías aplicadas en la caracterización físico-química, morfológica y sensorial de productos lácteos, particularmente quesos.
- Aplicar la tecnología de membranas: microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF) como alternativa económica para procesar las diversas disoluciones con el fin de lograr separar y concentrar las macromoléculas de interés. Optimizar los procesos de membranas y los protocolos de limpieza de las mismas.
- Analizar metodologías tendientes a reducir el contenido graso de la leche de vaca.
- Sistematizar las etapas correspondientes a la elaboración de queso, contemplando diferentes características en la formulación.
- Emplear diferentes fructo-oligosacáridos y derivados de soja como ingredientes funcionales y texturantes.
- Desarrollar aplicaciones alimenticias de los subproductos obtenidos en el proceso de producción de queso.

En relación a estos objetivos se realizaron diferentes experimentos correspondientes al desarrollo de alimentos lácteos, empleando tecnología de membrana en distintas etapas de los procesos empleados dando un aporte innovador a los mismos.

Respecto de la materia prima empleada se trabajó con leche bovina y caprina. La obtención de quesos con características funcionales, se logró mediante la incorporación a la matriz quesera de oligosacáridos no sólo de inulina, sino también de fructanos de Agave, una fuente natural muy abundante en Latinoamérica y permitió realizar una colaboración con un grupo de investigación de México.

Adicionalmente se emplearon concentrados de soja la cual es una leguminosa de gran producción en nuestro país y de proteínas de calidad biológica. Los concentrados de soja se emplearon también para obtener quesos con características funcionales.

Los resultados obtenidos para las diferentes formulaciones de quesos desarrolladas nos permiten expresar las siguientes conclusiones generales:

a) Quesos con inulina:

Se realizaron muestras de quesos blandos y quesos crema a partir de leche de vaca, parcialmente descremada en fábrica o por procesamiento de membranas, incorporando en la formulación el polisacárido natural inulina.

- Los quesos blandos desarrollados con inulina, mostraron que el polisacárido no era eficientemente retenido en la matriz, más allá de las diferentes formas de incorporación ensayadas. Este resultado se explicó por la alta solubilidad de la inulina empleada.
- Los quesos crema, en cambio presentaron una muy buena retención de inulina que permite clasificarlos como alimento fuente de fibra y con contenido prebiótico, de acuerdo a la legislación vigente.
- Los resultados mostraron que son quesos reducidos en grasa, de acuerdo al CAA, con un valor promedio inferior al 11% p/v, con buena compensación de la textura con el agregado de la inulina.
- En cuanto al análisis sensorial las muestras obtuvieron una elevada aceptabilidad en el panel de jueces entrenado, presentando las muestras de queso perfiles sensoriales similares a las muestras control con adecuados parámetros que hacen del producto obtenido un queso untable con características funcionales acordes a las necesidades del mercado.

b) Desarrollo de quesos reducidos en grasas con el agregado de fructanos de agave

Se desarrollaron quesos blandos incorporando diferentes fracciones de fructanos, provenientes de la planta de agave, extraídos, purificados y concentrados por tecnología de membrana.

En estos quesos se pudo demostrar que:

- Los quesos obtenidos corresponden a quesos de alta humedad (46-54,9% p/p) y reducidos en grasa (10,0-24,9% p/p).
- La presencia de fructanos determina una matriz de proteínas más intrincada, particularmente para las formulaciones con una mayor concentración de

oligosacáridos, en los cuales la estructura tiende a parecerse a la estructura de la muestra de queso entero, con lo cual este resultado sugiere que la presencia de fructanos efectivamente actúa como agente texturizante, reemplazando la grasa del queso.

- La cantidad de fructano final en el producto se incrementó con el aumento de la cantidad de fructano incorporado.
- El pH final de las muestras se encontró en el rango de 5,07-5,52, óptimo para el desarrollo de flavor.
- La presencia de fructanos no afectó significativamente el color de las muestras con respecto al queso control, lo cual fue además confirmado y ampliado a través del análisis sensorial demostró que no hay diferencias notables entre los quesos con fructanos y los quesos control en los atributos considerados (flavor, textura, color, dulzor y acidez).
- Finalmente se concluyó que los quesos con fructanos añadidos mostraron un rendimiento similar al de quesos control (sin fructanos).

c) Quesos crema con proteínas de soja:

Se desarrollaron quesos crema reducidos en grasa a partir de leche de vaca parcialmente descremada con la adición de concentrados de proteínas de soja obtenidos por ultrafiltración.

En estas muestras se concluyó lo siguiente:

- Las muestras se identificaron como quesos de bajos en grasa, con un contenido graso de entre 10 y 13 (g/100g), con humedad en el rango de 68,07-70,75 (g/100g).
- Comparados al queso control, las muestras con concentrado de proteína de soja, mostraron un aumento de 6,8 a 17 (g/100g) en proteínas, confirmando que las proteínas de soja fueron retenidas en la matriz de caseína de los quesos. El contenido graso aumentó de 22 a 32 (g/100g). Además se verificó un importante aumento en el rendimiento. Considerando que tanto las proteínas como las grasas son de origen vegetal con alto valor biológico y grasas insaturadas, el desarrollo de estos quesos se consideró como un alimento funcional.

- Respecto a la textura, se encontró que estos quesos, debido a que tienen mayor contenido de humedad (por la capacidad de retención de agua de las proteínas de soja), presentan una matriz con menor dureza, la cual va disminuyendo a medida que se aumenta la concentración de concentrado proteico de soja.
- En cuanto al comportamiento viscoelástico de las muestras se determinó que predomina el componente elástico (valor de G' estaba por encima del valor para G''). Además, la diferencia entre ambos módulos y la leve variación con la frecuencia a través de todo el rango de frecuencias estudiadas, sugieren una estructura fuerte del gel.
- Las micrografías de SEM confirmaron matrices compactas con glóbulos de grasa dispersos.
- Los estudios fisicoquímicos, de sinéresis, recuentos microbianos y evaluación sensorial en el tiempo, permitieron realizar la evaluación de la vida útil del producto en el tiempo. Los resultados revelaron que la vida útil de las muestras sin adición de sorbato de potasio fue menor de 30 días, la formulación de las muestras que contienen el conservante (en cantidades por debajo de los límites establecido por la legislación) exhibieron una vida de almacenamiento superior a 60 días.
- Respecto a otros parámetros estudiados como pH, contenido de cenizas y atributos sensoriales, no mostraron diferencias significativas comparándolas con muestras control, lo que indica que la cantidad de concentrado de proteínas de soja agregado es suficiente para enriquecer la matriz sin afectar adversamente las propiedades fisicoquímicas, calidad sensorial y estabilidad del producto.

d) Desarrollo de un aderezo a partir de proteínas de lactosuero de que queso de cabra.

Esta parte de la Tesis Doctoral estuvo enfocada en el empleo del principal subproducto de la industria quesera: el suero. Se trabajó con suero de queso elaborado a partir de leche de cabra, que es mayormente derramado sin uso alguno en las producciones artesanales locales.

- La tecnología de membranas empleada: microfiltración y ultrafiltración permitió obtener concentrado de proteínas de lactosuero, con una retención de 91,4/100 g/g. Este método adicionalmente actuó como una pasteurización en frío.
- Las propiedades funcionales del concentrado de lactosuero, evaluadas para el desarrollo de una adecuada aplicación de las proteínas de suero de cabra, fueron en general, dependientes del pH, mostrando la más baja solubilidad a pH 4-6 (coincidente con el Punto Isoeléctrico). A este rango de pH se obtuvo la mejor capacidad emulsionante y la mejor estabilidad de la emulsión.
- Respecto a la propiedad de gelificación, se observó que los geles formados a partir del concentrado proteico son de carácter pseudoplástico y que presentan un comportamiento tixotrópico, según los estudios reológicos. A partir de estos resultados se pudo inferir la utilidad del concentrado proteico para formulaciones que requieren gelificación, como ocurre en un aderezo.
- Se desarrolló una formulación de aderezo, conteniendo el concentrado de proteínas de lactosuero, el cual presentó características similares a las de un aderezo comercial en cuanto a pH, contenido de cenizas, viscosidad, textura y color.
- El análisis sensorial mostró también que las muestras de aderezo elaboradas tienen una buena aceptabilidad.
- La principal ventaja del aderezo es que las muestras presentaron el doble de contenido proteico que las muestras comerciales.
- El desarrollo de este tipo de alimentos a partir de proteínas que en general suelen desecharse, presentan un beneficio medioambiental utilizando los efluentes líquidos de la industria quesera, en particular en la producción de quesos de cabra, las cuales son en general, muy artesanales.

Nomenclatura

Diana Palatnik

β

FAN

σ

HP

τ

NOMENCLATURA

Adh: Trabajo de adhesión. Parámetro de textura [N.mm ó N.seg.]

a* parámetro de color (CIELAB).

a_w: actividad de agua

b*: parámetro de color (CIELAB).

C : muestra control

C: el índice de saturación (croma), ec. 5.4

CAA: Código Alimentario Argentino

CE : capacidad emulsionante

CE_s : capacidad espumante

CLG : capacidad de ligamiento de grasas, ec. 6.3

CPS: concentrado de proteínas de soja

CRA: capacidad de retención de agua, ec. 6.2

EE_s : estabilidad espumante

ES : estabilidad emulsionante

G': módulo dinámico elástico o módulo de almacenamiento está asociado con la energía almacenada en el material [Pa]

G'': módulo dinámico viscoso o de pérdida es asociado con la energía disipada por el material [Pa]

GP: grado de polimerización (de fructanos)

GR3: inulina de cadena corta, 3%

GR5: inulina de cadena corta, 5%

h°: ángulo de matiz, ec. 5.3.

HP: inulina de alto rendimiento

FAAR: fructanos de alto rendimiento

FAGP: fructanos de alto grado de polimerización

FAN: fructanos nativos

J : densidad de flujo de permeado [m³ m⁻² h⁻¹]

K: índice de consistencia [kg/(m s)], ec.6.4

L: parámetro de color (CIELAB).

LB: leche bovina

LC: leche de cabra

LS: leche de soja

MD: Módulo de deformabilidad. Parámetro de textura.

MF : microfiltración

MWCO: umbral de corte de peso molecular de la membrana, molecular weight cut off.

n : índice de flujo o índice de comportamiento hidrodinámico o de deslizamiento

NF: nanofiltración

NWP: permeabilidad normalizada de agua

OI : ósmosis inversa

P: probabilidad, ec. 3.6

PB: plasma bovino

PB+S: plasma bovino con adición de sacarosa

pI : punto isoeléctrico

QCD: queso control descremado

QCE: queso control entero

R: rendimiento real, ec. 4.1

Rgp: es el rendimiento por cada 100 kg de queso normalizado en referencia o control del nivel de grasa y proteínas, ec. 5.1

Rhgp: rendimiento del queso ajustado por la humedad por 100 de queso, ec. 5.1

S: solubilidad, ec. 6.1

S %: porcentaje de sinéresis, ec. 5.5

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

SEM: Microscopía electrónica de barrido

$\tan \delta$: es la medida de la capacidad de amortiguación (damping) del material y se obtiene aplicando la ecuación 2.5

T : temperatura

TPA : Análisis del perfil de textura

UF : ultrafiltración

VCR : factor de concentración de volumen

W_f : Energía a la penetración. Parámetro de textura [:] N.mm ó N.sec

Letras griegas

γ : gradiente de velocidad

σ_f : Esfuerzo máximo. Parámetro de textura [:] N

σ^* : Coeficiente de retención, ec. (3.2)

ΔP : diferencia de presión de transmembrana [:] Pa

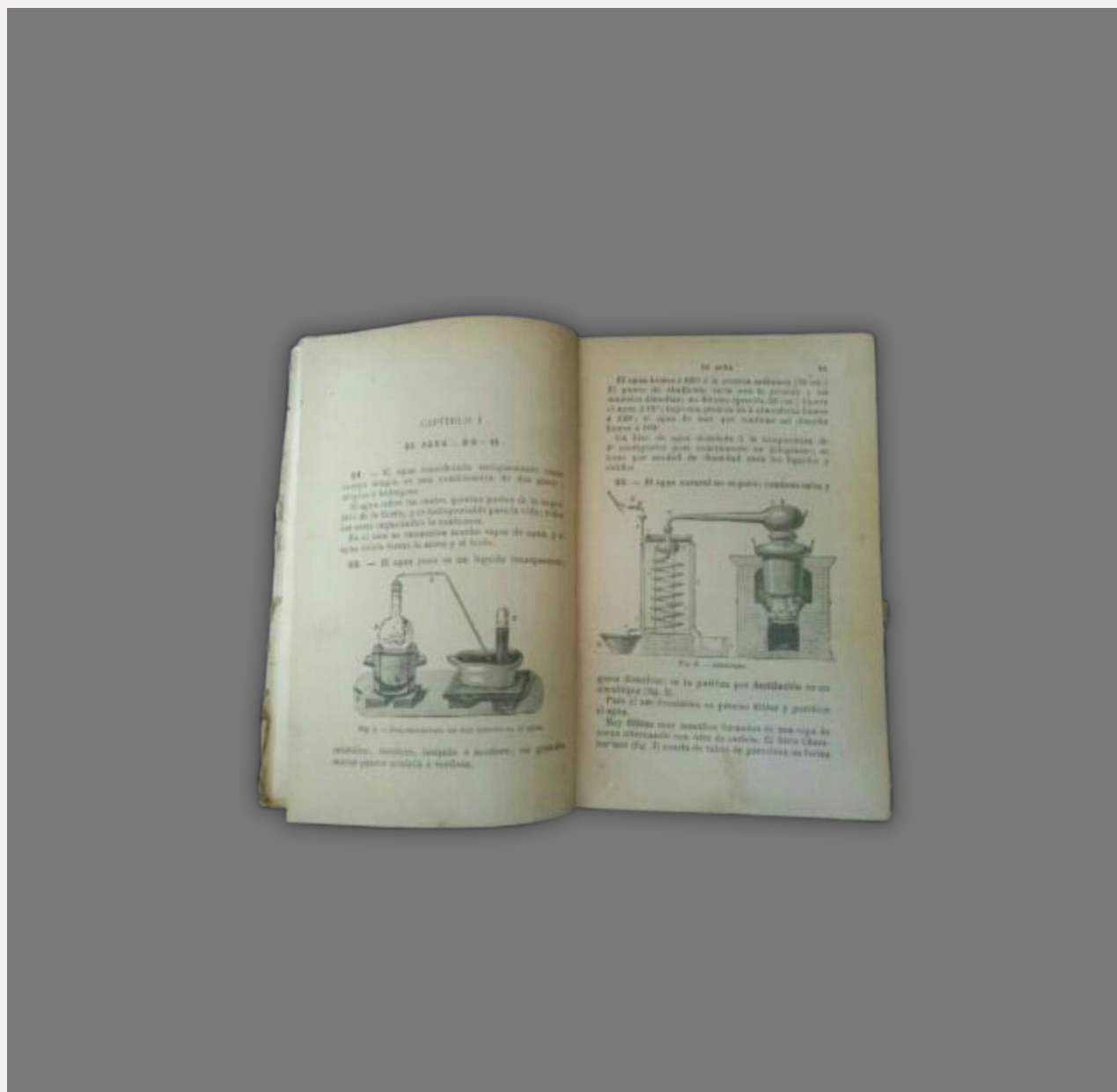
τ : esfuerzo de corte

η : viscosidad aparente del fluido [:] mPa.s

μ : viscosidad del filtrado [:] Pa.s

Referencias

Diana Palatnik



REFERENCIAS

Abdelrasoul, A., Doan, H.D., Lohi, A. (2013) Fouling in Membrane Filtration and Remediation Methods. "Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling", Publisher: InTech, Editors: Hironori Nakajima.

Abid, H.S., Johnson, D.J., Hashaikeh, R., Hilal, N. (2017) A review of efforts to reduce membrane fouling by control of feed spacer characteristics. Review article. *Desalination*, 420, 384-402.

Aichinger, P. A., Servais, M. M., Dillmann, C., Rouveet, M. L., D'Amico, M., Zink, N. (2003) Fermentation of a skim concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. *Colloids and Surface B Biointerfaces*, 31, 243-255.

Aldrete-Herrera, P.I. (2013) Separación de una fracción de fructanos de Agave tequilana Weber variedad azul, con alto GP mediante filtración tangencial, Master's Thesis, Instituto Tecnológico de Tepic. Tepic, Nayarit, México.

Ali, F., Ippersiel, D., Lamarche, F., Mondor, M. (2010) Characterization of low-phytate soy protein isolates produced by membrane technologies *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 162–168.

Alzamora, S.M. (1997) Preservación I. Alimentos conservados por factores combinados. En *Temas en Tecnología de Alimentos*. Ed. J.M. Aguilera p. 45-88. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

ANMAT. Guía de interpretación de resultados microbiológicos de alimentos

AOAC (1990) *Official Methods of Analysis*, 15thedn. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.

AOAC (2006) *Official Methods of Analysis*. 18th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgs, MD.

Applegate Lym, E. (1989) Membrane separation processes. *Chemical Engineering USA* June: 64-69.

Aranceta, J., Serra, L. (2003) *Guía de alimentos funcionales*. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria.

Atra, R., Vatai, G., Bekassy-Molnar, E., Balint, A. (2005) Investigation of ultra-and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, 67,3, 325-332.

Bachmann, H. P. (2001) Cheese analogues: a review. *International Dairy Journal*, 11, 505–515.

Bae, T. H., Kim I. C., Tak, T. M. (2006). Preparation and characterization of fouling-resistant TiO₂ self-assambled nanocomponte membranes. *Journal of Membrane Science*, 275, 1-5.

Bain, I. (2015) *Etapas de la elaboración del queso*, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA EEA Chubut (https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-etapas_del_proceso_de_elaboracin_de_quesos.pdf).

Balanec, B., Vourch, M., Rabiller-Baudry, M., Chaufer, B. (2005) Comparative study of different nanofiltration and reverse osmosis membranes for dairy effluent treatment by dead-end filtration. *Separation and Purification Technology*, 42,1, 195–200.

Bazinet, L. (2005) *Electrodialytic Phenomena and Their Applications in the Dairy Industry: A Review*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 1, 307–326.

Berk, Z. (1992) *Technology of production of edible flours and protein products from soybeans*. Technion, Israel Institute of Technology. Haifa, Israel. FAO Agricultural Services Bulletin no. 97.

Bérodier, F., Lavanchy, P., Zannoni M., Casals, J., Herrero, L., Admao, C. (1996) “Guía para la Evaluación olfato-gustativa de los quesos de pasta dura y semidura”, INRA.

-
- Bortnowska, G., Balejko, J., Schube, V., Tokarczyk, G., Krzemińska, N., Mojka, K. (2014) Stability and physicochemical properties of model salad dressings prepared with pregelatinized potato starch. *Carbohydrate Polymers*, 111, 624–632.
- Bourne, Malcolm (2002) “Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement.” 2nd Edition. Elsevier Inc.
- Boyazoglu, J., Morand-Fehr, P. (2001) Mediterranean dairy sheep and caprine products and their quality. A critical review. *Small Ruminant Research*, 40,1, 1-11.
- Brans, G., Schröen, C.G.P.H., Van Der Sman, R.G.M, Boom, R.M. (2004) Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of Membrane Science* 243: 263–272.
- Brocklehurst, T. F., Lund, B. M. (1985) Microbiological changes in cottage cheese varieties during storage at 7°C. *Food Microbiology*, 2, 207-233.
- Burganos, V.N. (2017) Modeling and Simulation of Membrane Structure and Transport Properties. *Comprehensive Membrane Science and Engineering (Second Edition)*, 1, 17-56.
- Cadaval, A., Escauriaza, B., Barrutia, U., Pérez, C. y Aranceta, J. (2005) Alimentos funcionales para una alimentación más saludable, Book. Senc., 9-52.
- Cardarelli, H. R., Aragon-Alegro, L. C., Alegre, J. H. A., de Castro, I. A., Saad, S. M. I. (2008) Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88,1318– 1324.
- Caric, M. D., Milanovic, S. D., Krstic, D. M., & Tekic, M. N. (2000) Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. *Journal Membrane Science*, 165, 83-88.

Carpintero Tepole, V., Brito-de la Fuente, E., Torrestiana-Sánchez, B. (2017) Microfiltration of oil in water (O/W) emulsions: Effect of membrane microstructure and surface properties. *Chemical Engineering Research and Design*, 126, 286-296.

Casper, J.L., Wendorff, W.L., Thomas, D.L. (1999) Functional properties of whey protein concentrates from caprine and ovine specialty cheese wheys. *Journal of Dairy Science*, 82, 265-271.

Cassano, A. Rastogi, N.K. Basile, A. (2015) Membrane technologies for water treatment and reuse in the food and beverage industries, Editor(s): A. Basile, A. Cassano, N. K. Rastogi, In *Advances in Membrane Tech. for Water Treatment*, Woodhead Publ., 551-580.

Castañeda, R., Ogara, M., Storani, E., Fiora, J., Roberts, L., Bermejo, A., González, M., Aguzin, F., Gatti, P., Speranza, J., Feilbogen, E., Glaz, D., Aguilar, L. (2005) Manual para la eficiencia productiva de la PyME Quesera. Buenos Aires.

Castellanos, L., Murillo, K., Ortega, D., Velásquez, I., Ramírez-Navas, J.S. (2016) Empleo de inulina en matrices alimentarias.

Chacón-Villalobos, A. (2006) Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía mesoamericana*, 17, 2, 243-264.

Chakraborty, P. (1986) Coconut protein isolate by ultrafiltration. In M. LeMeguer & P. Jelen (Eds.), *Food engineering and process applications* (Vol. 2, pp. 308-315). New York: Elsevier Applied Science Publishers.

Che Man, Y. B., Yee, Y. N. (1996) Development and properties of soybean spreads. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20, 347-358.

Cheftel, J. C., Cuq, J. L., Lorient, D. (1989) *Proteínas alimentarias*. Spain: Ed. Acribia S. A.

Cheryan, M. (1986) *Ultrafiltration Handbook*, Technomic Publishing Co. Inc., USA, 1986, p. 174.

-
- Chiavaro E, Vittadini E, Corradini C. (2007) Physicochemical characterization and stability of inulin gels. *European Food Research and Technology*, 25, 1, 85-94.
- Chove, B. E., Grandison, A. S., Lewis, M. J. (2007) Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration. *Food Hydrocolloids*, 21, 1379-1388.
- Christen, G.L., Davidson, P.M., McAllister, J.S., Roth, L.A. (1993) Coliform and other indicator bacteria. R.T. Marshal (Ed.), *Standard methods for the examination of dairy products*, American Public Health Association Inc, Washington, DC. pp. 247–269.
- Código Alimentario Argentino, Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica Capítulo VIII (Alimentos Lácteos). http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf.
- Código Alimentario Argentino, Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica, Capítulo XVII (Alimentos de régimen o dietéticos) http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVII.pdf
- Colombo, B., Sciarria, T.P., Reis, M., Scaglia, B., Adani, F. (2016) Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*, 218, 692-699.
- Crispín-Isidro, G., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E.J. (2015) Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt. *LWT - Food Science and Technology*. Volume 62, Issue 1, Part 2.

Çulfaz, P.Z., Wessling, M., Lammertink, R.G.H.(2011) Hollow fiber ultrafiltration membranes with microstructured inner skin *Journal of Membrane Science*, 369, 1–2 , 221-227.

Das, B, Sarkar, S, Sarkar, A, Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C. (2016) Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. *Process Safety and Environmental Protection*, 101, 27-33.

de Man, J.M. (1999) *Principles of Food Chemistry*. 3rd Edn., Aspen Publication, New York.

Diplock, A. T., Charleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J. (1998) Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80, 1, S77-S112.

Duggan, E., Noronha, N., O’Riordan, E.D., O’Sullivan, M. (2008) Effect of resistant starch on the water binding properties of imitation cheese. *Journal of Food Engineering*, 84, 108-115.

El-Nagar, G., Glowers, G., Tudorica, C. M., Kuri, V. (2002) Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 89 - 93.

El-Neshawy, A. A., Farahat, S.M., Wahbah, H.A. (1988) Production of processed cheese food enriched with vegetable and whey proteins. *Food Chemistry*, 28, 245–255.

Espinosa-Castrejón R (2012) *Separación y Caracterización Parcial de Fructanos de Alto Rendimiento de Agave tequilana Weber var. azul*. Master tesis, Instituto Tecnológico de Tepic.Tepic, Nayarit, México.

Fellows, P. (1994) *Tecnología del procesado de alimentos. Principios y prácticas* (pp. 421-432) Zaragoza, Spain. Ed. Acribia.

Fernández de Labastida, M, Licon Bernal, E., Yaroshchuk, A. (2016) Implications of inhomogeneous distribution of concentration polarization for interpretation of pressure-driven membrane measurements. *Journal of Membrane Science*, 520, 693-698.

-
- Firman, L. R., Ochoa, N.A., Marchese, J., Pagliero, C. (2013) Deacidification and solvent recovery of soybean oil by nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 431, 187-196.
- Fox, P. F., & Cogan, T. M. (2004) Factors that affect the quality of cheese. In P. F. Fox, P. L. H. Mc. Sweeney, T. M. Cogan, T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (595). London: Elsevier Academic Press.
- Francolino, S., Locci, F., Ghiglietti, R., Iezzi, R. y Mucchetti, G. (2010) Use of milk protein concentrate to standardize milk composition in Italian citric Mozzarella cheese making. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 310–314.
- Frank, J., Christen, G., Bullerman, L. (1993) Tests for groups of microorganisms. R.T. Marshal (Ed.), *Standard methods for the examination of dairy products*, American Public Health Association Inc, Washington, DC, 271–283.
- Fridman-Bishop, N., Freger, V. (2017) What makes aromatic polyamide membranes superior: New insights into ion transport and membrane structure. *Journal of Membrane Science*, 540, 120-128
- García, M., Cáceres, E., Selgas, M. (2006) Effect of inulin on the textural and sensory properties of mortadella, a Spanish cooked meat product. *International Journal of Food Science and Technology*, 41,10, 1207-1215.
- Genovese, M., Lajolo, F. (2002) Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5987-5993.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: UDPating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Review*, 17, 259-275.
- Giménez, A., Ares, F., Ares, G. (2012) Sensory shelf-life estimation: a review of current methodological approaches. *Food Research International*, 49, 311-325.

-
- Glibowski, P. (2009) Rheological properties and structure of inulin-whey protein gels. *International Dairy Journal*, 19,443-449.
- Goh, PS, Matsuura T., Ismail, A.F., Hilal, N. (2016) Recent trends in membranes and membrane processes for desalination, *Desalination*, 391 43-60.
- Gomes da Cruz, A., Alonso Buriti, F. C., Hoch Batista de Souza, C., Fonseca Faria, J.A., Isay Saad, S.M. (2009) Probiotic Cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science &Technology*, 20, 344-354.
- González-Tomás, L., Bayarri, S., Costell, E. (2009b) Inulin-enriched dairy desserts: physicochemical and sensory aspects. *Journal of Dairy Science*, 92,4188-4199.
- González-Tomás, L., Bayarri, S., Taylor, A. J., & Costell, E. (2008) Rheology, flavour release and perception of low-fat dairy desserts. *International Dairy Journal*, 18, 858-866.
- Guggisberg, D., Cubbert-Steven, J., Piccinali, P., Butikofer, U., Eberhard, P. (2009) Rheological, microstructural and sensory character and whole set yoghurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal*, 19, 107-115.
- Guinee, T. P., O’Kennedy, B. T., Kelly, P. M. (2006) Effect of milk protein standardization using different methods on the composition and yields of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 89, 468-482.
- Guven, M., Yasar, K., Karaca, O. B., Hayaloglu, A. A. (2005) The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 58,3, 180-184.
- Henelly, P.J., Dunne, P.G., O’Sullivan, M., O’Riordan, E.D. (2006) Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. *Journal of Food Engineering*, 75, 388-395.

Huisman, I.H., Prádanos, P., Hernández, A. (2000) The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 179, 79-90.

Ibáñez, F.C., Loygorri, S., Ordoñez, A., Torre, I.P. (1998) Evaluación instrumental y sensorial de la textura en quesos de oveja con denominación de origen, *Alimentaria*, 292, 49-53.

Jiang, S., Li, Y., Ladewig, B.P. (2017) A review of reverse osmosis membrane fouling and control strategies. *Review article. Science of the total Environment*, 595, 567-583

Juan, B., Zamora, A., Quintana, F., Guamis, B. y Trujilla, A. J. (2013) Effect of inulin addition on the sensorial properties of reduced-fat fresh cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 478–483.

Juarez, M., Ramos, M. (1986) Physico-chemical characteristics of caprine milk as distinct from those of cow milk. *International Dairy Federation*.

Juric, M., Bertelsen, G., Mortensen, G., Petersen, M. A. (2003) Light induced colour and aroma changes in sliced, modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 13, 239– 249.

Karaman, A. D., Akalin, A. S. (2013) Improving quality characteristics of reduced and low fat Turkish white cheeses using homogenized cream. *LWT – Food Science and Technology*, 50, 503–510.

Kealy, T. (2006) Application of liquid and solid rheological technologies to the textural characterisation of semi- solid foods. *Food Research International*, 39, 3, 265-276.

Kim, Y., Faqih, M.N., Wang, S.S. (2001) Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 46, 135-145.

Kim, Y.A., Chism, G.W., Mangino, M.E. (1987) Determination of the β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin of whey protein concentrates and their relationship to protein functionality. *Journal of Food Science*, 52, 124-127.

Kip, P., Meyer, D., Jellena, R. H. (2006) Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yogurts. *International Dairy Journal*, 16, 9, 1098-1103.

Koca, N., Metin, M. (2004) Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 365-373.

Kosikowski, F. V. y Mistry, V. V. (1997) *Cheese and fermented milk foods, Volume 1. Origins and principles*. Westport, CT: F.V. Kosikowski L L C.

Kumar, R., Choudhary, V., Mishra, S., Varma, I. K., & Mattiason, B. (2002) Adhesives and plastics based on soy protein products. *Industrial Crops and Products*, 16, 155-172.

Lara, N., Lescano, G. (2004) *Textura de alimentos. Medida instrumental y aplicaciones*. INIAP.

Lara-Fiallos, M., Julián-Ricardo, M.C., Pérez-Martínez, A., Benítez-Cortés, I., Lara-Gordillo, P. (2017) Advances on the inulin production, *Tecnología Química*, XXXVII, 2, 220-238.

Lavanchy, P., Bérodiér, F., Zannoni M., Noel, Y., Adamo, C., Squella, J., Herrero, L., (1994) *Guide d'évaluation sensorielle de la textura des fromages a pate dure ou semidure*, INRA.

Liu, C., Wang, X., Ma, H., Zhang, Z., Gao, W., Xiao, L. (2008) Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. *Food Chemistry*, 111, 29-37.

Lucas, A., Coulon, J.B., Agabriel, C., Chilliard, Y., Rock, E. (2008) Relationships between the conditions of goat's milk production and the contents of some components of nutritional interest in Rocamadour cheese. *Small Ruminant Research*, 74, 1-3, 91-106.

Ma, Z., Boye, J. I., Fortin, J., Simpson, B. K., Prasher, S.O. (2013) Rheological, physical stability, microstructural and sensory properties of salad dressings supplemented with raw and thermally treated lentil flours. *Journal of food Engineering*, 116, 4, 862-872.

Macedo, A., Duarte E., Fragoso R. (2015) Assessment of the performance of three ultrafiltration membranes for fractionation of ovine second cheese whey. *International Dairy Journal*, 48, 31-37.

Madrid Vicente, A. (1996) *Curso de Industrias Lácteas*, 1era Edición, AMV Ediciones.

Madrigal, L., Sartoris, E. (2007) La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 57, 4.

Maduko, C.O., Park, Y.W. (2011) Production of Infant Formula Analogs by Membrane Fractionation of Caprine Milk: Effect of Temperature Treatment on Membrane Performance. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 1097-1104.

Marshall, A. D., Munro, P. A., Trägårdh, G. (1993) The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review. *Desalination*, 91, 65-108.

Maruyama, T., Katoh, S., Nakajima, M., Nabetani, H., Abbott, T. P., Shono, A., Satoh, K. (2001). FT-IR analysis of BSA fouled on ultrafiltration and microfiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 192, 201-207.

Masuelli, M., Marchese, J., Ochoa, N. A. (2009) SPC/PVDF membranes for emulsified oily wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 326,2, 688-693.

Mateo, M. J., Everard, C. D., Fagan, C. C., O'Donnell, C. P., Castillo, M., Payne, F. A., et al. (2009). Effect of milk fat concentration and gel firmness on syneresis during curd stirring in cheese-making. *International Dairy Journal*, 19, 264-268.

Mattos, A. P., Ribeiro, T. C. M., Mendes, P. S. A., Valois, S. S., Mendes, C. M. C., Ribeiro, J.R. (2009) Comparison of yogurt, soybean, casein, and amino acid-based diets in children with persistent diarrhea. *Nutrition Research*, 29, 462-469.

Meilgaard, M. C., Arbor, A., Carr, T., Civille, G. V. (2006). *Sensory Evaluation Techniques*, Fourth Edition, CRC Press, New Jersey, USA.

Mendes da Silva, L. (2011) Potencial applications of whey proteins in the medical fields. En J.S. Reis. J.A. Teixeira, Engineering Aspects of Milk and Dairy Products, 221-252, Braga, Portugal: Taylor & Francis.

Mercier-Bouchard, D., Benoit, S., Doyen, A., Britten, M., Pouliot, Y. (2017) Process efficiency of casein separation from milk using polymeric spiral-wound microfiltration membranes. *J Dairy Sci.*, 100, 11, 8838-8848.

Messina, M., Messina, V., Setchel, K. D. R. (2002) In Amalevi (Ed.), Beneficios de la soja para la salud. ASGA: Asociación Argentina de Grasas y Aceites. Mza, Argentina.

Meyer, D., Bayarri S., Tárrega A., Costelli E. (2011) Inulin as texture modifier in dairy products. *Food Hydrocolloids*, 25, 1881-1890.

Michalski, M. C., Gassi, J. Y., Famelart, M. H., Leconte, N., Camier, B., Michel, F. y Briard, V. (2003) The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of camembert cheese. *Lait*, 83, 131–143.

Milesi, M. M., Candiotti, M., Hynes, E. (2007) Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 1427–1433.

Mistry, V. V. (2001) Low fat cheese technology. *International Dairy Journal* 11 413–422.

Moon, W., Balasubramanian, S.K., Rimal, A. (2011) Health claims and consumers' behavioral intentions: the case of soy-based food *Food Policy*, 36, 480–489.

Morales-Celaya, M. F., Lobatto-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J. (2012) Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a Mexican pasta filata cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 45, 132–141.

Moreno, A.R. (2011) Curso El agua. Desalación. Capítulo 3.

Morr, C.V., German, B., Kinsella, J.E., Regenstein, J.M., Van Buren, J.P., Kilara, A., Lewis, B.A., Mangino, M.E. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50, 1715-1718.

Mounsey, J.S., O' Riordan, E.D. (2001) Characteristic of imitation cheese containing native starches. *Journal of Food Science*, 66,4, 586-591.

Muthukumarappan, K., Swamy, G.J. (2017) Chapter 10 - Rheology, Microstructure, and Functionality of Cheese. *Advances in Food Rheology and Its Applications*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 245-276.

Nair, M.G., Mistry, V.V., Oommen, B.S. (2000) Yield and functionality of Cheddar cheese as influenced by homogenization of cream. *International Dairy Journal*, 10, 647–657.

Neyrinck, A., Theulier, P., Jouret, A., Taminiau, B., Daube, G., Frederick, R., Cani, P., Delzenne, N. (2015) Impact de nutriment prébiotiques de type inuline sur la glycémie: mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. *Diabetes & Metabolism*, 41, 1, A82-A83.

Niness, K.R. (1999). Inulin and oligofructose: What are they? *Journal of Nutrition*, 129, 1402-1406.

Noble, R.D., Stern, S.A. (1993) (Eds.), *Membrane Separations Technology- Principles and Applications*. Elsevier, Amsterdam.

Norma IRAM 20001:2012 ISO 5492:2008, Análisis Sensorial, Vocabulario.

Norma IRAM 20004, Análisis sensorial. Metodología. Método de investigación de la sensibilidad del gusto.

Norma IRAM 20005-1:1996, Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores.

Norma IRAM 20006:2004. Análisis sensorial. Metodología. Iniciación y entrenamiento de los evaluadores en la detección y reconocimiento de olores.

-
- Norma IRAM 20012:1997. Análisis sensorial: Métodos para determinar el perfil del flavor.
- Norma IRAM 20013: 2001. Análisis Sensorial Metodología.
- Ohtake, S., Kita, Y., Arakawa, T. (2011) Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 1053–1073.
- O’Callaghan, Y., O’Connor, T.P., O’Brien, N.M. (2017) Nutritional aspects of cheese. In *Fundamentals of Cheese Science*, 715-730.
- O’Neill, G.J., Egan, T., Jacquier, J.C., O’Sullivan, M. O’Riordan E.D. (2014) Whey microbeads as a matrix for the encapsulation and immobilisation of riboflavin and peptides. *Food Chemistry*, 160, 46-52.
- Olagnero, G., Abad, A., Endersky, S., Genevois, C., Granzella, L., Montonati, M. (2007) Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIAETA*, 25,121, 20-33.
- Ortiz, M.E. (2015) Quesos y algunos aditivos.
- Pagliarini, E., Beatrice, N. (1994) Sensory and rheological properties of low-fat filled pasta filata cheese. *Journal of Dairy Research*, 61, 299 – 304.
- Palacio -Vázquez, E., Hurtado-Ibarbo, J.H., Arroyave-Roa, J.D., Cardona-Caicedo, M., Martínez-Girón, J. (2017) Natural sweeteners used in the elaboration of chocolates. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 15 (2), 142-152.
- Palatnik, D.R., Aldrete Herrera, P., Rinaldoni, A.N., Ortiz Basurto, R.I., Campderrós, M. E., (2016) Development of functional cheeses with the addition of agave fructans. *International Journal of Dairy Technology*, 69.
- Palatnik, D.R., Ostermann Porcel, M.V., González, U., Zaritzky, N., Campderrós, M.E. (2015) Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein formulation. *LWT-Food Science and Technology*, 63, 331-338.

Panjkota Krbavcic I., Colic Baric I. (2004) Influence of deep fat frying on some nutritional parameters of novel food based on mushrooms and fresh soft cheese. *Food Chemistry*, 84, 3,417-419.

Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. (2007) Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.

Parra Huertas, R.A. (2009) Whey: Importance in the food industry. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, Volumen 62, 1, 4967-4982.

Pasephol, T., Small, D. M., Sherkat, F. (2008) Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. *Journal of Texture Studies*, 39,6, 617-634.

Peña-Alvarez A., Diaz, L., Medina, A., Labastida, C., Capella, S., Vera, L.E. (2004) Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1027, 131-136.

Pereira, C. I., Franco, M. I., Gomes, A. M. I., & Malcata, F. X. (2011) Microbiological, rheological and sensory characterization of Portuguese model cheeses manufactured from several milk sources. *LWT e Food Science and Technology*, 44, 2244-2252.

Picone, C. S., Maximo, G. J., Kuhn, K. R., Ros-Polski, V.y Cunha, R. L. (2011) An assessment of the texture of acidified sodium caseinate gels with added inulin using response surface methodology. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 353–359.

Pihlanto, A. (2011) Whey proteins and peptides. *Nutra Foods*, 10, 29-42.

Poinot P., Arvisenet G., Grua-Priol J., Fillonneau C., Le-Bail A., Prost C., (2010) Influence of inulin on bread: Kinetics and physico-chemical indicators of the formation of volatile compounds during baking. *Food Chemistry*, 119, 1474-1484.

Porter, M. C. (1990) *Handbook of industrial membrane technology*. Noyes, New Jersey.

Prádanos, P., Hernández, A., Calvo, J. I., Tejerina, F. (1996) Mechanisms of protein fouling

in cross-flow UF through an asymmetric inorganic membrane. *Journal of Membrane Science*, 114, 115- 126.

Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012) Cheese whey management: a review. *J Environ Manage*, 110,48-68.

Ramirez, M.A. (2008). Desarrollo de un aderezo elaborado con base en aceite de aguacate y estudio de sus propiedades fisicoquímicas y reológicas. Universidad de las Américas Puebla. México.

Rani, M., Verma, N.S. (1995) Changes in organoleptic quality during ripening of cheese made from cows and soya milk blends, using microbial rennet. *Food Chemistry*, 54,4, 369–375.

Rinaldoni, A.N., Campderrós, M.E., Menéndez, C., Pérez Padilla, A. (2009) Fractionation of skim-milk by an integrated membrane process for yogurt elaboration and lactose recuperation”. *International Journal of Food Engineering*, 5, Iss. 3, Article 1.

Rinaldoni, A. N., Tarazaga, C. C., Campderrós, M. E., Pérez Padilla, A. (2009a) Assessing performance of skim milk ultrafiltration by using technical parameters. *Journal of Food Engineering*, 92, 226-232.

Rinaldoni, A. N., Tarazaga, C. C., Campderrós, M. E., Pérez Padilla, A. (2009b) Assessing performance of skim milk ultrafiltration by using technical parameters. *Journal of Food Engineering*, 92,2, 226-232.

Rinaldoni, A.N., Campderrós, M., Pérez Padilla, A. (2010) Yogurt with low lactose content from concentrated milk and soybean by ultrafiltration. *Revista Ingeniería y Competitividad*, 12, 1,19-30.

Rinaldoni, A.N., Campderrós, M.E., Pérez Padilla, A. (2012) Physico-chemical and sensory properties of yogurt from ultrafiltered soy milk concentrate added with inulin. *LWT-Food Science Technology*, 45, 142-147.

Rinaldoni, A.N., Palatnik, D.R., Zaritzky, N., Campderrós, M.E. (2014) Soft cheese-like product development enriched with soy protein concentrates. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 139-147.

Roberfroid, M.B. (2007) Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, **137**, 3, 830S-837S.

Roberfroid, M., Slavin, J. (2000) Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews Food Science Nutritional*, 40, 461-480.

Rodiles-López, J.O., Jaramillo-Flores, M. E. , Gutiérrez-López, G. F., Hernández-Arana, A., Fosado-Quiroz, R.E., Barbosa-Cánovas, G.V., Hernández-Sánchez, H. (2008) Effect of high hydrostatic pressure on bovine α -lactalbumin functional properties. *Journal of Food Engineering*, 87, 363-370.

Rodríguez Furlán L., Pérez Padilla A., Campderrós M., (2010) Inulin like lyoprotectant of bovine plasma proteins concentrated by ultrafiltration. *Food Research International*, 43, 788-796.

Rodríguez Furlán L.T., Pérez Padilla A., Campderrós M., (2015) Improvement of gluten-free bread properties by the incorporation of bovine plasma proteins and different saccharides into the matrix. *Food Chemistry*, 170, 257-264.

Rodríguez Furlán, L. T. (2012) Fraccionamiento de plasma bovino con tecnología de membranas para la obtención de proteínas de alto valor agregado. Tesis Doctoral, UNSL.

Rodríguez Furlán, L.T, Rinaldoni, A.N., Pérez Padilla, A., Campderrós, M.E. (2011) Assessment of functional properties of bovine plasma proteins compared with other protein concentrates, Application in a Hamburger formulation. *American Journal of Food Technology*, 6, 717-729.

Rodríguez Furlán, L.T., Pérez Padilla, A., Campderrós, M.E. (2010) Functional and physical properties of bovine plasma proteins as a function of processing and pH, application in a food formulation. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2, 5, 256-267.

Rodríguez Patino, J. M., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Niño, M. R. (2008) Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140, 95 – 113.

Rosenthal, A.J. (2001) *Textura de los alimentos*. Editorial Acribia. ISBN: 9788420009506.

Rubel, I.A., Pérez, E.E., Genovese, D.B., Manrique, G.D. (2014) In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. *Food Research International*, 62,59-65.

Salvatore, E., Pes, M., Mazzarello, V., Pirisi, A. (2014) Replacement of fat with long-chain inulin in a fresh cheese made from caprine milk. *International Dairy Journal*, 34, 1–5.

Sammons, R., Marquis, P. (1997) Application of the low vacuum scanning electron microscope to the study of biomaterials and mammalian cells. *Biomaterials*, 18, 81–86.

Sanmartín B., Díaz O., Rodríguez-Turienzo, L., Cobos A. (2012) Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. *Small Ruminant Research*, 105, 186-192.

Sanmartín, B. (2010) Aprovechamiento de suero de quesería de origen caprino mediante la obtención de concentrados de proteínas séricas y subproductos de clarificación. Estudio de sus propiedades tecnológicas. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Santiago de Compostela, Facultad de Ciencias, Campus de Lugo.

Sanmartín, B., Díaz, O., Rodríguez -Turienzo, L., Cobos, A. (2013) Functional properties of caprine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. *Small Ruminant Research*, 110, 52-56.

SAS. (1989) *USER GUIDE: Statistic. Version*. Cary, NC, USA: SAS Inst. Inc

Shelley S. (1997) Membrane based separation, with a twist. *Chemical Engineering USA*. February, 107-112.

Sluková, M., Hinková, A., Henke, S., Smrž, Bubník, Z. (2016) Cheese whey treated by membrane separation as a valuable ingredient for barley sourdough preparation. *Journal of Food Engineering*, 172, 38-47

Stable Micro Systems (1996) *Texture Profile Analysis- A closer look at this popular way of characterising the structure of foods.*

Steinhauer, T, Marx, M. Bogendörfer, K and Kulozik, U. (2015) Membrane fouling during ultra- and microfiltration of whey and whey proteins at different environmental conditions: The role of aggregated whey proteins as fouling initiators. *Journal of Membrane Science*, 489, 20-27.

Sturniolo, H. (2010) Tesis doctoral “Utilización de fitoproteasas en la obtención de hidrolizados proteicos de queso de cabra” Universidad Nacional de San Luis.

Tarazaga, C. C., Campderrós, M. E., Pérez Padilla, A. (2006) Characterization of exponential permeate flux by technical parameters during fouling and membrane cleaning by electric field. *Journal of Membrane Science*, 283, 339-345.

Tariq. M.R., Sameen A., Khan M.I., Huma N., Yasmin, A. (2013) Nutritional and therapeutic properties of whey. *Animals Food Science and Technology*, 14,19-26.

Tárrega, A., Costell, E. (2006a) Effect of composition on the rheological behavior and sensory properties of semisolid dairy dessert. *Food Hydrocolloids*, 20, 914 - 922.

Tárrega, A., Costell, E. (2006b) Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. *International Dairy Journal*,16 ,1104-1112

Twiford, R. (2004) Membrane filtration offers a variety of applications for dairy. *Dairy foods March*, 76-8.

Valencia García, F.E., Millán Cardona, L. de J., Jaramillo Garcés, Y. (2008) Estimación de la vida útil fisicoquímica, sensorial e instrumental de queso crema bajo en calorías. *Rev. Lasallista Investig.*, 5, 1.

- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Le Roy, K., Arckens, L., Van Laere, A. (2006) Cloning and functional analysis of a high DP fructan:fructan fructosyl transferase from *Echinops ritro* (Asteraceae): comparison of the native and recombinant enzymes. *Journal of Experimental Botany*, 57, 4, 775–789.
- Van Waes, C., Baert, J., Carlier, L., Van Bockstaele, E. (1998) A rapid determination of the total sugar content and the average inulin chain length in roots of chicory (*Cichorium intybus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 1, 107-110.
- Veisseyre, R. (1998) *Lactología técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*, Traducido de la 3ª. Edición francesa por: Jesús Ventanas Barroso, Zaragoza, Acribia, 2ª. Ed. española, 1ª, Reimpresión, I.S.B.N. 84-200-0458-8.
- Wadhvani, R. y McMahon, D. J. (2012) Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *Journal of Dairy Science* 95 2336–2346.
- Wang, Y. (2009) Prebiotics: Present and future science and technology. *Food Research International*, 42, 8-12.
- Wei, Y.P., Wang, C.S., Wu, J.S.B. (2001) Flow properties of fruit fillings. *Food Research International*, 34, 377-381.
- Yamul, D.K. (2008) *Propiedades de geles de concentrado de proteínas de lactosuero, miel y harina*. Tesis doctoral, CIDCA.
- Yu, J., Ahmedna, M., Goektepe, I. (2007) Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, 103, 121-129.
- Zimeri J, Kokini J. (2002) The effect of moisture content on the crystallinity and glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 48(3), 299-304.
- Zuleta, A., Sambucetti, M.E. (2001) Inulin determination for food labeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 10, 4570-2.