

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE CIENCIAS
CAMPUS DE LUGO

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Área de Tecnología de los Alimentos



**OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE CONCENTRADOS
DE PROTEÍNAS SÉRICAS Y SUBPRODUCTOS DE
CLARIFICACIÓN PROCEDENTES DE SUERO DE
QUESERÍA Y SUERO DESPROTEINIZADO DE
ORIGEN OVINO**

Carlos Dias Pereira
TESIS DOCTORAL
Lugo, 2005

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE CIENCIAS
CAMPUS DE LUGO

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Área de Tecnología de los Alimentos



**OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE CONCENTRADOS
DE PROTEÍNAS SÉRICAS Y SUBPRODUCTOS DE
CLARIFICACIÓN PROCEDENTES DE SUERO DE
QUESERÍA Y SUERO DESPROTEINIZADO DE
ORIGEN OVINO**

Memoria que para optar al grado de Doctor en
Ciencia e Ingeniería de los Alimentos presenta
el Licenciado *Carlos Días Pereira*
Septiembre de 2005

D. **Ángel Cobos García** y Dña. **Olga Díaz Rubio**, Profesores Titulares del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

HACEN CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Obtención y estudio de concentrados de proteínas séricas y subproductos de clarificación procedentes de suero de quesería y suero desproteínizado de origen ovino**”, presentado por el Licenciado en Medicina Veterinaria D. **Carlos Dias Pereira** para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada en la Facultad de Ciencias del Campus de Lugo, bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes.

Y para que conste su autorización para la presentación de la misma, se expide la presente en Lugo, a catorce de septiembre de dos mil cinco.

Fdo. Ángel Cobos García

Fdo. Olga Díaz Rubio

El doctorando, Carlos Dias Pereira

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Santiago de Compostela y, en concreto a la Facultad de Ciencias de Lugo, por acogerme y permitirme desarrollar los estudios de Tercer Ciclo y la realización de esta Tesis Doctoral.

Deseo expresar mi agradecimiento a los Doctores Angel Cobos García y Olga Díaz Rubio por permitirme realizar la tesis bajo su dirección y por todo el apoyo que me han prestado en todo momento.

A los miembros del laboratorio Feder, Lucía Medina y Albina Castro por todo el apoyo prestado en la realización del trabajo analítico.

A todos mis compañeros del Departamento de Tecnología Alimentar de la Escuela Superior Agrária de Coimbra por su colaboración en muchas de las tareas ejecutadas en la planta piloto de productos lácteos. Un agradecimiento especial a David Gomes, Ivo Rodrigues, Jorge Arede, Jorge Viegas, Paula Oliveira, Helena Santa, Adélia Vaz y Lurdes Pires.

A los alumnos de proyecto del curso de Ingeniería Alimentaria de ESAC, que han colaborado en los trabajos- Sylvain Piegay, Sónia Fernandes, Carla Jorge y Filipa Guimarães.

A todos los miembros de Aula de Productos Lácteos por su apoyo y amistad.

A la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia por la financiación de este trabajo con el proyecto de Investigación XUGA26202B97.

A la “Fundação para a Ciência e Tecnologia” por la beca doctoral del programa PRAXIS XXI que me ha permitido la realización de los trabajos en España.

A todos los amigos que me han hecho sentir como si Galicia y España fueron mi pueblo. Especial agradecimiento a Isa, Carmen, Gloria, Santi y a mis compañeras de piso Ana y Pachi que, se quedarán siempre como hermanas mías.

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ORIGEN E IMPORTANCIA DEL LACTOSUERO	2
I.2. COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO	5
I.2.1. Tipos de lactosuero y composición general	5
I.2.2. Principales proteínas	6
I.2.3. Lípidos	11
I.3. VALOR NUTRITIVO DE LOS COMPONENTES DEL LACTOSUERO	13
I.4. TECNOLOGÍA DEL APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO Y APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	15
I.4.1. Introducción	15
I.4.2. Aprovechamiento del lactosuero sin modificar	17
I.4.3. Obtención y aplicaciones de productos derivados del lactosuero	21
I.4.4. Obtención de concentrados de proteínas de suero	23
I.4.5. Procesos de separación por membranas aplicados en la obtención de concentrados de proteínas de suero	28
I.4.5.1. Aspectos generales	28
I.4.5.2. Selectividad de las membranas y tipos de procesos	30
I.4.5.3. Materiales de membrana	33
I.4.5.4. Configuración de las membranas	34
I.4.6. El problema de la colmatación de las membranas en el tratamiento del lactosuero	38
I.4.6.1. Polarización de la concentración	38
I.4.6.2. Ensuciamiento o colmatado por obturación de los poros	39
I.4.7. Aplicaciones de los concentrados de proteínas de suero en la industria alimentaria	46
I.4.7.1. Productos lácteos	46
I.4.7.2. Productos cárnicos y pesqueros	48
I.4.7.3. Salsas, cremas y sopas	49
I.4.7.4. Productos de panadería, pastelería, confitería y aperitivos	49
I.4.7.5. Bebidas	50
I.4.7.6. Obtención de películas comestibles	51
I.4.7.7. Alimentos para grupos con necesidades nutritivas especiales	51
I.4.7.8. Aplicaciones en alimentos funcionales	52
I.4.7.9. Aplicaciones de productos de proteínas de suero modificadas	55
I.5. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO Y DE LOS CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DE SUERO	56
I.5.1. Solubilidad	57
I.5.2. Propiedades emulsionantes	59
I.5.3. Propiedades espumantes	62
I.5.4. Formación de geles	65

I.6. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	68
<i>II. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	72
II.1. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS DE USO GENERAL	73
II.1.1. Material	73
II.1.2. Reactivos	73
II.2. ORIGEN DE LAS MUESTRAS	74
II.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	76
II.3.1. Recepción de los sueros de queso y de suero desproteínizado (<i>sorelho</i>)	76
II.3.2. Clarificación de los sueros: precipitación termocálica-microfiltración	78
II.3.3. Ultrafiltración de los sueros	80
II.3.4. Deshidratación de los productos líquidos	82
II.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN GENERAL	82
II.4.1. Análisis de los productos líquidos de los sueros de queso y de <i>sorelho</i>	82
II.4.1.1. Determinación del contenido de proteína y grasa	82
II.4.1.2. Determinación del extracto seco	83
II.4.1.3. Determinación del contenido de cenizas	83
II.4.1.4. Determinación del contenido de calcio	83
II.4.1.5. Determinación del pH	84
II.4.2. Análisis de los productos en polvo de los sueros de queso y de <i>sorelho</i>	84
II.4.2.1. Determinación del contenido de proteína total	85
II.4.2.2. Determinación del contenido de grasa	85
II.4.2.3. Determinación del extracto seco	86
II.4.2.4. Determinación del contenido de cenizas	86
II.4.2.5. Determinación del contenido de calcio	86
II.4.2.6. Determinación del contenido de fósforo	87
II.4.2.7. Determinación del contenido de cloruros	87
II.5. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LOS PRODUCTOS EN POLVO	88
II.5.1. Determinación de la composición proteica	88
II.5.2. Determinación del contenido de componentes nitrogenados no proteicos y de proteína verdadera	89
II.6. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS PRODUCTOS EN POLVO	90
II.6.1. Determinación de la solubilidad proteica	90
II.6.2. Determinación de las propiedades emulsionantes	91
II.6.2.1. Determinación de la capacidad emulsionante	91
II.6.2.2. Determinación de la estabilidad de la emulsión	92
II.6.3. Determinación de las propiedades espumantes	93

II.6.4. Estudio de la capacidad gelificante	94
II.6.4.1. Preparación de los geles	94
II.6.4.2. Determinación de las propiedades reológicas de los geles	94
II.6.4.3. Estudio de la microestructura de los geles	95
II.7. ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DE QUESOS DE SUERO ADICIONADOS DE DESHIDRATADOS DE RETENIDOS DE ULTRAFILTRACIÓN Y DE MICROFILTRACIÓN	95
II.7.1. Elaboración de quesos de suero	95
II.7.2. Análisis realizados en los quesos de suero	96
II.7.2.1. Determinación del contenido en extracto seco	96
II.7.2.2. Determinación de los rendimientos de fabricación	96
II.7.2.2.1. Rendimiento bruto	96
II.7.2.2.2. Rendimiento corregido	97
II.7.2.2.3. Recuperación de extracto seco	97
II.7.2.3. Determinación de la firmeza	97
II.7.2.4. Determinación del color	97
II.7.2.5. Estudio de la microestructura de los quesos de suero	98
II.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	98
<i>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	99
III.1. MANUSCRITOS	100
Manuscrito I	101
Manuscrito II	113
Manuscrito III	124
Manuscrito IV	137
III.2. DISCUSIÓN GENERAL	160
<i>IV. CONCLUSIONES</i>	170
<i>V. BIBLIOGRAFÍA</i>	172

PRINCIPALES ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

APS: aislados de proteínas de suero

CPS: concentrados de proteínas de suero

DF: diafiltración

DFR: retenido de diafiltración líquido procedente de suero

DFRP 0.20: retenido de diafiltración en polvo procedente de suero clarificado usando una membrana de microfiltración de 0,20 μm

DFRP 0.65: retenido de diafiltración en polvo procedente de suero clarificado usando una membrana de microfiltración de 0,65 μm

EAI: índice de actividad emulsionante

ED: electrodiálisis

ESR: estabilidad de la emulsión

FCV: factor de concentración volumétrica

FE: expansión de la espuma

FS: estabilidad de la espuma

MF: microfiltración

MFF: filtrado de microfiltración líquido procedente de suero

MFR: retenido de microfiltración líquido procedente de suero

MFRP 0.20: retenido de microfiltración en polvo procedente de suero, usando una membrana de microfiltración de 0,20 μm

MFRP 0.65: retenido de microfiltración en polvo procedente de suero, usando una membrana de microfiltración de 0,65 μm

NF: nanofiltración

OI: ósmosis inversa

pI: punto isoeléctrico

S: *sorelho*

SDFR: retenido de diafiltración líquido procedente de *sorelho*

SDFRP 0.20: retenido de diafiltración en polvo procedente de *sorelho* clarificado usando una membrana de microfiltración de 0,20 μm

SDFRP 0.65: retenido de diafiltración en polvo procedente de *sorelho* clarificado usando una membrana de microfiltración de 0,65 μm

SMFF: filtrado de microfiltración líquido procedente de *sorelho*

SMFR: retenido de microfiltración líquido procedente de *sorelho*

SMFRP 0.20: retenido de microfiltración en polvo procedente de *sorelho*, usando una membrana de microfiltración de 0,20 μm

SMFRP 0.65: retenido de microfiltración en polvo procedente de *sorelho*, usando una membrana de microfiltración de 0,65 μm

SS: *sorelho* desnatado

SUFF: filtrado de ultrafiltración líquido procedente de *sorelho*

SUFR: retenido de ultrafiltración líquido procedente de *sorelho*

SUFRP: retenido de ultrafiltración en polvo procedente de *sorelho*

SW: suero desnatado

UF: ultrafiltración

UFF: filtrado de ultrafiltración líquido procedente de suero

UFR: retenido de ultrafiltración líquido procedente de suero

UFRP: retenido de ultrafiltración en polvo procedente de suero

W: suero

WPC: *whey protein concentrates*

WPI: *whey protein isolates*

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ORIGEN E IMPORTANCIA DEL LACTOSUERO

El suero lácteo es, principalmente, el subproducto originado en la elaboración de queso tras la separación de la cuajada, aunque también se origina durante la obtención de caseína ácida y caseinatos (Castillo y col., 1996; Foegeding y col., 2002); no obstante, el lactosuero de este origen sólo representa el 8% del total producido (De Wit, 2003). Este subproducto es un líquido verdoso translúcido con un 6% de sólidos, constituidos en su mayoría por lactosa (70% de los sólidos), minerales, trazas de grasa y aproximadamente 0,7% de proteínas séricas (8-10% de los sólidos) (Zall, 1992; Jelen, 2003).

El alto poder contaminante del suero deriva de este contenido en materia orgánica, siendo sobre todo la riqueza en lactosa la principal responsable del mismo debido a su capacidad para actuar como sustrato de la fermentación microbiana (Castillo y col., 1996). El suero lácteo está catalogado como un residuo altamente contaminante, con una demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) entre 32 y 60 g O₂/litro (Cheryan, 1998), siendo la media de 45 g O₂/litro; así, 100 litros de suero contaminan igual que una población de 45 personas (Riera y col., 1996b). Además este producto se produce en grandes cantidades, generándose como media unos 9 litros de suero por cada kg de queso producido (Riera y col., 1996b); sin embargo esta proporción puede variar algo dependiendo del tipo de queso, contenido en grasa de la leche de partida y otros factores (Jelen, 1992a). Así, el vertido del suero conduce a un serio problema de contaminación del agua y del medio ambiente, poniendo en peligro la estructura física y química del suelo, disminuyendo el rendimiento de la cosecha y reduciendo la vida acuática por consumo del oxígeno disuelto en el agua (Castillo y col., 1996).

Hasta épocas relativamente recientes, se vertía sin tratamiento con todos los problemas asociados que acarreaba y, aunque hoy día la mayor parte se transforma en productos de alto valor añadido, existen muchas situaciones en las cuales persiste el problema del tratamiento. Debido al carácter contaminante del suero, la industria quesera tuvo que recurrir a procedimientos tradicionales de tratamiento de sus efluentes, lo que impuso una carga económica sustancial, teniendo en cuenta que el suero representa entre el 80 y el 90 % de la leche de fabricación (Eck, 1990; Cheryan 1998).

La producción mundial de queso en 2001 alcanzó unas 15,5 millones de toneladas, lo que aproximadamente supone unas 145 millones de toneladas de suero; el 60% de este suero se industrializa, mientras que el 40% restante se destina a la alimentación animal, al uso como fertilizante o, simplemente, se elimina como efluente. Se calcula que la producción global de queso y, por lo tanto, la de suero, se incrementa entre un 2 y un 3% al año (Affertsholt y Nielsen, 2003). A escala mundial, la producción de leche de oveja es de aproximadamente 8 millones de toneladas y tiene una importancia bastante reducida si se compara con la leche de vaca en términos cuantitativos (2% del total). Sin embargo, tiene una gran importancia en los países mediterráneos y del Oriente Medio, donde las condiciones climáticas no son favorables para la cría del ganado vacuno. En general, la leche de oveja se emplea esencialmente en la elaboración de quesos, aunque en algunos países también se elaboran yogures y quesos de suero (Ramos y Juárez, 2003). En cuanto a la producción mundial anual de suero proveniente de quesos de cabra se puede estimar en 10,8 millones de toneladas (Cheryan, 1998).

Teniendo en cuenta la producción de quesos de vaca en la UE en 1999 (6.154.300 Tm.) (Anónimo, 2000), se puede estimar una producción de aproximadamente 55 millones de toneladas de suero de vaca, a las cuales se deberán añadir unas 4,5 millones de toneladas de sueros de quesos de oveja y cabra resultantes de la producción de 505.000 toneladas de quesos de estas dos especies (asumiendo que toda la leche de pequeños rumiantes producida en la UE, se destina a la fabricación de queso). Aunque la leche de pequeños rumiantes no se transforme toda en queso, la producción de otros productos o el consumo directo no debe probablemente sobrepasar el 10% de la cantidad de leche disponible.

Respecto a la Península Ibérica, la producción de quesos en España se encuentra estabilizada en torno a las 300.000 toneladas (FIAB, 2001), por lo que se puede calcular la producción de lactosuero de quesería en 2.700 millones de litros anuales, volumen que plantea problemas en cuanto a su uso y/o eliminación. Como otros países mediterráneos, España produce una gran variedad de quesos de oveja, cuya elaboración está muchas veces asociada a denominaciones de origen o indicaciones geográficas protegidas. Así, se obtienen unas 21.900 toneladas de queso de oveja (7,3% de la producción total) (FIAB, 2001), lo que implica una generación de aproximadamente 197.000 toneladas de lactosuero. Aunque existen algunas plantas de gran volumen de producción, en general muchos productores trabajan a pequeña o media escala. Esto hace que muchas de estas industrias no posean la tecnología suficiente para el aprovechamiento de los lactosueros de alto poder contaminante y que éstos se eliminen a

través de la red de alcantarillado, lo que puede causar problemas importantes de contaminación ambiental en determinadas zonas. Finalmente, la producción de quesos de oveja en Portugal se estima en unas 16.200 toneladas (Gulbenkian, 1993), lo que equivaldría a unos 145.800 toneladas de suero.

En ambos países una cierta cantidad se aprovecha para la producción de quesos de suero por precipitación térmica de las proteínas presentes en el suero. En España este producto se denomina requesón y en Portugal *requeijão*. Ésta es la forma más simple de reducir la capacidad contaminante del suero, al mismo tiempo que se obtiene un producto de elevado valor nutritivo. Sin embargo no se dispone de información detallada sobre la cantidad de suero transformada en estos productos. Pintado y col. (2001) refieren que apenas el 2% de la totalidad del suero producido anualmente en Portugal se utiliza en la elaboración de *requeijão*, lo que origina alrededor de 630 toneladas de este producto. La elaboración del requesón o *requeijão* genera a su vez un subproducto, el suero desproteínizado, que contiene aproximadamente un 60% del extracto seco del suero original y, por lo tanto, cantidades todavía considerables de proteína, nitrógeno no proteico, minerales y lactosa. Este subproducto se denomina *scotta* en Italia y *sorelho* en Portugal.

Inicialmente, y buscando un tratamiento sencillo y rentable, el suero se transformaba en suero en polvo por evaporación y deshidratación, obteniéndose un pienso compuesto enriquecido en proteína para alimentación de ganado. La lactosa se producía directamente por evaporación y cristalización. Posteriormente, y teniendo en cuenta, tanto el elevado valor nutricional y funcional (Hambraeus, 1992; Mulvihill, 1992; De Wit, 1998) como la posibilidad de aislar los componentes proteicos del lactosuero (Bramaud y col., 1997; Pearce y col., 1991; Smithers y col., 1996; Zydney, 1998) se extendió su utilización para consumo humano, aplicando tratamientos más sofisticados como la filtración por membranas.

La industria láctea produce grandes cantidades de suero deshidratado y productos derivados. De las 86 millones de toneladas de suero que se industrializan a nivel mundial, 48 millones se destinan a la producción de suero en polvo y lactosa, 30 millones a la elaboración de concentrados y aislados de proteínas de suero, y los restantes 8 millones a la obtención de sueros desmineralizados y otros productos (Affertsholt y Nielsen, 2003).

I.2. COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO

I.2.1. Tipos de lactosuero y composición general

Existen dos tipos básicos de suero lácteo, que se diferencian en el contenido mineral, la acidez y la composición de la fracción proteica (Jelen, 2003): el lactosuero dulce y el ácido. El suero dulce es el más abundante (aproximadamente el 75% del total producido) y es el subproducto de la coagulación enzimática de las caseínas durante la fabricación de queso a un $\text{pH} \geq 5,6$ (Zall, 1992). El suero ácido (el 25% del suero total) resulta de la fabricación de quesos de coagulación ácida, tales como el *cottage*, el *quarg* y otros quesos frescos, y de la obtención industrial de caseínas. Presenta mayor contenido en ácido láctico, calcio y fósforo, y menor de lactosa, siendo su $\text{pH} \leq 5,1$ (Jelen, 2003).

Su composición varía substancialmente dependiendo tanto de la variedad de queso producido como de la especie productora de leche. En la tabla I.1 se presentan las composiciones medias de los sueros de vaca y oveja.

Tabla I.1. Composición general del suero de vaca y oveja (g/l).

	Suero ácido de vaca (1) (pH 4,6 – 4,8)	Suero dulce de vaca (1,2) (pH 5,5 – 6,4)	Suero dulce de oveja (3,4,5)
Lactosa	44,0 – 46,0	46,0 – 52,0	47,5 – 59,8
Proteína	6,0 – 8,0	5,0 – 8,0	10,5 – 18,7
Grasa	2,3 – 2,4	1,5 – 6,0	6,5 – 12,5
Cenizas	-	6,0 – 9,0	4,3 – 6,2
Lactatos	6,4	2,0	-
Calcio	1,2 - 1,6	0,4 – 0,6	-
Fosfatos	2,0 – 4,5	1,0 – 3,0	-
Cloruros	1,1	1,1	-

(1) Jelen, 2003; (2) Morr y Ha, 1993; (3) Comendador y col., 1996; (4) Casper y col., 1998; (5) Pintado y col., 2001.

Asimismo, la composición del suero puede cambiar a lo largo del tiempo debido a variaciones estacionales, ocasionadas por la etapa de lactación en que se encuentren los animales y por modificaciones en la alimentación. En general, en el lactosuero bovino se observa un aumento de la concentración de proteínas en la segunda mitad de la lactación, debidas principalmente a la β -lactoglobulina, y un descenso paralelo del contenido de lactosa. Estos cambios pueden ser al menos en parte responsables de las diferencias de funcionalidad que se observan en los productos derivados del suero de vaca (Mangino, 1992). En el lactosuero de oveja también existen estas variaciones, aunque presentan diferencias con el de vaca; así, el contenido de β -lactoglobulina aumenta hasta la mitad de la lactación, disminuyendo posteriormente hasta alcanzar valores similares a los del inicio de la misma. La α -lactalbúmina decrece a lo largo de la lactación, mientras que la seroalbúmina y la Inmunoglobulina G disminuyen hacia la mitad del período (Casper y col., 1998).

Debido a su mayor concentración en sólidos totales y componentes nitrogenados, en algunos países el suero de origen ovino es sometido a un tratamiento térmico drástico (p. ej. 95°C durante 10-30 min) con o sin adición de leche y con o sin acidificación, con el objetivo de producir los denominados quesos de suero. De la producción de estos quesos resulta un suero con un contenido inferior en sólidos totales, proteína y grasa. Este suero desproteinizado contiene todavía una cantidad importante de materia orgánica, incluyendo proteínas (0,8-1,1%), lactosa (4,1-5,2%), lípidos (0,2%) y cenizas (0,5%), presentando por ello un elevado valor DBO₅ (74 g/l). La proteína más abundante en él es la α -lactalbúmina (Pizzichini y col., 1995; Comendador y col., 1996). Estos productos serán abordados más detalladamente en el apartado I.4.2.

I.2.2. Principales proteínas

La leche bovina contiene alrededor de 5,3 g de nitrógeno por kg. De este nitrógeno, alrededor del 95% se encuentra en forma de proteínas (\approx 32 g/kg). El 80% de las proteínas lácteas (\approx 26 g/kg) son caseínas, un grupo de fosfoproteínas (α_{s1} , α_{s2} , β y K) específicas de la leche y que precipitan a pH 4,6 (Walstra y Jenness, 1987). La mayoría de las caseínas se presentan bajo la forma de micelas. Las proteínas que se mantienen en solución a pH 4,6 (\approx 6,3 g/kg) se denominan proteínas del suero. Este grupo heterogéneo incluye la β -lactoglobulina, la

α -lactalbúmina, inmunoglobulinas, la seroalbúmina y péptidos de bajo peso molecular, algunos de ellos derivados de la proteólisis de las caseínas (sobre todo de la β caseína). Además, contiene otras proteínas y varios enzimas, localizados sobre todo en la membrana del glóbulo graso (Walstra y Jenness, 1987; Walstra y col., 2001; Ye y col., 2002). La tabla I.2 recoge el contenido y ciertas propiedades de las principales proteínas séricas.

Tabla I.2. Principales proteínas del suero bovino y algunas de sus propiedades. Adaptado de Morr y Ha (1993), Riera y col. (1996a) y Kilara y Vaghela (2004).

	% de las proteínas		Concentración en suero (gL ⁻¹)	Peso molecular (kDa)	pI
	Leche	Lactosuero			
β-lactoglobulina	7-12	48-50	3,0	18,3	5,1
α-lactalbúmina	2,5	13-19	0,7	14,2	4,2-4,5
Seroalbúmina	0,7-1,3	6	0,3	66,0	4,7-4,9
Inmunoglobulinas	1,9-3,3	8	0,6	15,0-100,0	5,5-8,3
Proteosa peptona*	2-6	20	1,4	4,0-80,0	-

* Incluye proteosa peptona, caseína residual y proteínas menores.

La leche de oveja tiene una mayor concentración en sólidos totales debido a su mayor contenido en grasa (6-8,5%) y en proteínas (5-5,5%) que la leche de vaca. Respecto a las proteínas séricas, la más abundante es la β -lactoglobulina, siendo los contenidos aproximados sobre el total de las proteínas más abundantes en el suero del 74% para la β -lactoglobulina, 14,8% para la α -lactalbúmina, 7,3% para la inmunoglobulina G y 4,1% para la seroalbúmina (Casper y col., 1998).

La β -lactoglobulina es la proteína más abundante en el lactosuero de los rumiantes. Es una proteína globular constituida por 162 aminoácidos, con un peso molecular de 18.300. Existen diversas variantes genéticas, aunque las que suelen estar presentes con más frecuencia son las formas A y B, que son las más abundantes en los preparados comerciales (Hambling y col., 1992). Sus moléculas difieren en la sustitución de una glicina en la variante B por ácido aspártico en la variante A. Las características de procesado de la leche y las propiedades de los productos derivados están claramente asociadas con las diferentes respuestas a los tratamientos térmicos que se observan en las distintas variantes genéticas. Además, la molécula posee dos enlaces disulfuro y un grupo sulfhidrilo libre, y no contiene fósforo (Swaisgood, 1982; Creamer y

Sawyer, 2003). Por debajo de pH 3,0 y por encima de pH 8,0, esta proteína existe en forma monomérica. Entre pH 3,1 y 5,1 a baja temperatura y alto contenido proteico se asocia formando octámeros. A otros valores de pH, incluido el de la leche, la β -lactoglobulina forma dímeros. Dada su abundancia en la leche bovina, muchas de las propiedades de productos como los concentrados de proteínas de este origen están directamente relacionadas con las propiedades de esta proteína (Kilara y Vaghela, 2004).

Todavía no está clara la función biológica de la β -lactoglobulina y parece no ser esencial para muchas especies; así, por ejemplo, se encuentra en la leche de los rumiantes, de los babuinos y los macacos, mientras que está ausente en la leche de roedores, lagomorfos y humana. Dado que posee una zona muy hidrofóbica capaz de formar un enlace muy efectivo con el retinol, esta unión pueda tener un efecto regulador en la glándula mamaria. También esta proteína podría tener un papel nutricional (Creamer y Sawyer, 2003; Kilara y Vaghela, 2004).

La α -lactalbumina es la segunda proteína más abundante en el suero lácteo. Tiene un peso molecular de 14.186, está constituida por 123 restos aminoacídicos, incluyendo ocho cisteínas que forman cuatro enlaces disulfuro, y no contiene grupos fosfato. Es una metaloproteína que fija fuertemente 2 átomos de Ca^{2+} . Cerca del 10% de la α -lactalbumina bovina son glicoproteínas, aunque parece que esta característica no está relacionada con su función, ya que el grado de glicosilación varía mucho con la especie (Zhang y Brew, 2003). Existen dos variantes genéticas de la α -lactalbúmina, pero en las razas bovinas europeas sólo aparece la variante B (Walstra y Jenness, 1987).

Esta proteína tiene un papel importante en la síntesis de la lactosa, modificando la actividad de la enzima galactosil transferasa (Brew y Grobler, 1992). Presenta además una secuencia aminoacídica coincidente en un 40% con la lisozima y un 20% más de los residuos muestran una estructura similar. Sin embargo, su actividad no afecta a los mismos sustratos y no está relacionadas antigénicamente (Kilara y Vaghela, 2004).

La α -lactalbumina presenta la peculiaridad de que es más estable al calor en la presencia de calcio que cuando éste está ausente. En la mayoría de las proteínas el calcio promueve la formación de enlaces iónicos intermoleculares, que mantienen las moléculas proteicas cerca unas de otras y aumentan la posibilidad de agregación en el calentamiento. La

α -lactalbumina emplea el calcio para formar enlaces iónicos intramoleculares, que tienden a hacer a la molécula resistente al desplegamiento térmico. Bajo condiciones favorables de concentración de calcio y pH, esta proteína puede permanecer soluble incluso después de someterla a temperaturas superiores a 100°C (Swaisgood, 1996).

La seroalbúmina presente en la leche es idéntica a la que se encuentra en el suero sanguíneo, apareciendo en ella por transporte pasivo desde el torrente sanguíneo a través de la célula secretora de la glándula mamaria. Tiene un peso molecular de 69.000, posee 17 enlaces disulfuro y un grupo sulfhidrilo libre; no contiene fósforo (Kilara y Vaghela, 2004). En la sangre tiene como funciones el mantenimiento de la presión osmótica coloidal y del pH, actuando también como proteína de reserva y como transportadora de ácidos grasos de cadena larga, hormonas esteroideas, bilirrubina e iones metálicos (Haggarty, 2003). Su capacidad para unir moléculas hidrofóbicas podría también desarrollarse en la leche, aunque su papel biológico en la leche no está claro y probablemente tenga poca importancia desde el punto de vista fisiológico (Walstra y Jenness, 1987; Haggarty, 2003).

Las inmunoglobulinas (Ig) están presentes en el calostro y la leche de todos los mamíferos. Existen cuatro clases de inmunoglobulinas en la leche: IgG₁, IgG₂, IgA e IgM; todas ellas muestran una estructura básica similar, estando compuestas por cuatro cadenas peptídicas, dos ligeras de pesos moleculares de 20.000-25.000 y dos pesadas, de 50.000-70.000 (Swaisgood, 1982). La concentración de los distintos tipos de inmunoglobulinas varía en función de la especie, raza, edad, etapa de lactación y salud del animal; en la leche de vaca predomina la IgG. Su función biológica es proporcionar protección inmunológica a la cría contra microorganismos y toxinas, así como proteger a la glándula mamaria de infecciones (Marnila y Korhonen, 2003). Las inmunoglobulinas pueden afectar al procesado de la leche; así, cuando están presentes en elevadas concentraciones (por ejemplo en leches mamíticas o con calostro) inhiben o retardan la actividad de los coagulantes bacterianos y ralentizan las fermentaciones. Estas proteínas también contribuyen al desnatado por aglutinación de los glóbulos grasos, acción que se evita mediante tratamiento térmico o agitación (Marnila y Korhonen, 2003).

Las proteosas peptonas se han definido como aquellas proteínas que permanecen en solución después de que la leche haya sufrido un calentamiento a 95°C durante 20 minutos y se acidifique hasta pH 4,7 con 12% de ácido tricloroacético (Swaisgood, 1982). Esta fracción se puede dividir en cuatro componentes principales, aunque también hay otros minoritarios. El

componente 3 de la proteosa peptona (también denominado lactoforina) se encuentra sólo en el lactosuero, no está asociado con la caseína y se ha sugerido que su origen es la membrana del glóbulo graso (Girardet y Linden, 1996). Es una fosfoglicoproteína y es en realidad una proteína nativa, por lo que el nombre de proteosa peptona no es del todo apropiado. Su peso molecular es de 28.000, correspondiendo 15.200-15.300 a la apolipoproteína; se ha detectado en leche de vaca y cabra. Desde el punto de vista biológico, esta proteína parece tener una función de defensa antimicrobiana y estimula el crecimiento de las bifidobacterias, entre otras actividades, aunque todavía su función biológica exacta se desconoce (Haggarty, 2003). Otras proteosas peptonas, como los componentes 5 y 8, están asociadas con la fracción caseínica de la leche, siendo en el caso concreto de estas dos en realidad productos de la proteólisis de la β -caseína (Swaisgood, 1982).

Otro componente de carácter proteico presente en el suero y que proviene de la hidrólisis de una caseína es el caseinomacropéptido o glucomacropéptido. Procede de la escisión de la κ -caseína por acción de la quimosina y, por lo tanto, sólo está presente en los sueros dulces, los cuales proceden de quesos de cuajada total o parcialmente enzimática. El peso molecular del monómero varía entre 6.000 y 8.000, presentándose de esta forma a valores de pH inferiores a 4, mientras que por encima se polimeriza hasta alcanzar pesos moleculares de 50.000 (Riera y col., 1996a). El glucomacropéptido es capaz de suprimir el apetito por medio del estímulo de la liberación de la colecistoquinina pancreática, altera la producción de pigmento por los melanocitos, actúa como prebiótico y presenta acciones inmunomodulatorias, aunque su actividad biológica depende de su glicosilación (U.S.D.E.C., 2004a). Asimismo, inhibe la agregación plaquetaria y se ha empleado en alimentación infantil y de personas que padecen fenilcetonuria (Riera y col., 1996a).

Existen también en el suero lácteo otras proteínas minoritarias que tienen importantes funciones y aplicaciones en la actualidad. Una de ellas es la lactoferrina o lactotransferrina, que es una glicoproteína capaz de enlazar hierro y cuya concentración varía mucho con la especie, estando presente en la leche de otros mamíferos en cantidades bastante más bajas que en la leche humana (1,48 g/l en la leche humana frente a 0,0012 g/l en la leche de vaca). Su acción antimicrobiana se encuentra ligada a su capacidad de secuestrar el hierro, reduciendo su disponibilidad para las bacterias (Fox y Flynn, 1992; Jovaní y col., 2001). Además es antioxidante, incrementa la biodisponibilidad de hierro, estimula el sistema inmunológico y modula la microflora intestinal. Precisamente debido a estas actividades, esta proteína se

emplea en alimentos infantiles, funcionales y para deportistas. En cuanto a sus propiedades tecnológicas, la lactoferrina no se ve afectada por un tratamiento de pasteurización estándar, aunque sí que pierde actividad antimicrobiana con los tratamientos UHT. Esta proteína parece proteger a los ácidos grasos insaturados frente a la oxidación y puede contribuir al incremento de la vida útil de alimentos enriquecidos con hierro y alto contenido graso (Korhonen y Marnila, 2003).

Diversas proteínas minoritarias del lactosuero proceden de la membrana de los glóbulos grasos de la leche, representando alrededor del 1% de la masa del glóbulo (0,3-0,4 g/l de leche) (Keenan y Patton, 1995): la xantina oxidasa ($P_m = 155.000$), la butirofilina ($P_m = 66.000$) y la lactoperoxidasa ($P_m = 78.000$). Además de estas proteínas, en la membrana se encuentran muchas otras fracciones nitrogenadas con pesos moleculares comprendidos entre 13.500 y 208.000, y más de 25 enzimas (Walstra y Jenness, 1987).

Entre estas enzimas asociadas a la membrana del glóbulo graso merece destacar la lactoperoxidasa. Es una glicoproteína con un peso molecular de 77.500. Ejerce como un agente antimicrobiano natural y está presente en el lactosuero dulce en una concentración de aproximadamente 30 mg/litro. Esta proteína presenta un amplio espectro antimicrobiano constituyendo, junto con dos cofactores (peróxido de hidrógeno y tiocianato) el sistema lactoperoxidasa. La efectividad del sistema depende de condiciones ambientales tales como el pH, la temperatura y la densidad celular. La presencia natural de la lactoperoxidasa puede utilizarse como un sistema de conservación de la leche durante un período corto de tiempo. Recientemente se ha añadido a yogures para prevenir la producción adicional de ácido durante el almacenamiento. También se emplea en la protección de la flora intestinal y para prevenir infecciones neonatales y también como antibacteriano en cosméticos (Bjorck, 1992; U.S.D.E.C., 2004a).

I.2.3. Lípidos

El 95% de los lípidos de la leche se encuentran en forma de glóbulos grasos, siendo al menos el 95% de ellos triglicéridos. La casi totalidad del 5% restante de lípidos está disperso en el suero de la leche y lo componen fosfolípidos (30-45%) y triglicéridos (40-55%) (Walstra y Jenness, 1987).

Como aparece en la tabla I.1, el lactosuero presenta un contenido graso muy variable, dependiente sobre todo del tipo de leche, del tipo de queso y de la eficiencia del proceso de fabricación. Aunque la presencia de estos lípidos, que luego aparecen residualmente en productos derivados del lactosuero como los concentrados de proteínas, afecta de forma importante a las propiedades funcionales de las proteínas y a su utilización, se conoce poco acerca de ellos (Vaghela y Kilara, 1996b). Parece ser que una considerable proporción de los lípidos del suero se deriva de la presencia de glóbulos grasos de pequeño tamaño, aunque también tienen una gran importancia los fragmentos de la membrana del glóbulo graso que permanecen dispersos en una forma coloidal estable (Joseph y Mangino, 1988a,b; Hwang y Damodaran, 1995).

La membrana que recubre los glóbulos grasos de la leche se forma en las células epiteliales de la glándula mamaria. Los materiales de la membrana constituyen el 2-6% de la masa total del glóbulo graso; esta variación en la proporción se debe al método empleado en su aislamiento (McPherson y Kitchen, 1983; Keenan y Dylewski, 1995). Tal como sucede en otras membranas biológicas, la membrana del glóbulo graso está formada principalmente por proteínas, lípidos y carbohidratos, en una relación aproximada de 4:3:1 (Deeth, 1997). El material lipídico consta de lípidos neutros, sobre todo triglicéridos, y de lípidos complejos, fosfolípidos y glicolípidos, en una proporción de aproximadamente 2:1. Los componentes de la membrana están íntimamente asociados unos a otros formando complejos, a menudo unidos covalentemente. De este modo, algunas proteínas son glicoproteínas y parte de ellas están unidas fuertemente a fosfolípidos y/o lípidos neutros (Deeth, 1997), formando lipoproteínas. La composición proteica es muy compleja, habiéndose detectado más de 40 polipéptidos diferentes, de los cuales al menos 8 son glicoproteínas, existiendo además diversas enzimas (buterofilina, xantín oxidasa, fosfatasa ácida y alcalina, etc.) (McPherson y Kitchen, 1983; Ye y col., 2002).

La presencia de fragmentos de membranas de glóbulos grasos, junto con las características antes mencionadas de los lípidos que no forman parte de los glóbulos grasos, puede explicar que los fosfolípidos representen entre el 20 y el 30% de los lípidos totales (Baumy y col., 1990; Pierre y col., 1993). Los fosfolípidos predominantes en los sueros son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la esfingomielina (Baumy y col., 1990; Vaghela y Kilara, 1996b), coincidiendo con los más abundantes en la membrana del glóbulo graso (McPherson y Kitchen, 1983).

En cuanto a la composición en ácidos grasos de los lípidos de los lactosueros dulces y ácidos, los saturados representan aproximadamente el 63-67%, los monoinsaturados entre 28 y 30%, y los poliinsaturados 3,2-4,7% (Boyd y col., 1999; U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2004; Danish Institute of Food and Veterinary Research, 2005). Dentro de los ácidos grasos saturados, los más abundantes son el palmítico y el esteárico, tanto en los lípidos totales como en la fracción de triglicéridos. Sucede igual en la de fosfolípidos, aunque también hay cantidades considerables de C-22:0 y C-24:0. El ácido oleico es el más abundante de los monoinsaturados y el linoleico lo es de los poliinsaturados tanto entre los triglicéridos como entre los fosfolípidos. No obstante, en éstos también se detecta la presencia de otros poliinsaturados que no aparecen en los glicéridos, como son C-18:3, C-20:3 y C-20:4 (Boyd y col., 1999).

I.3. VALOR NUTRITIVO DE LOS COMPONENTES DEL LACTOSUERO

Las proteínas del suero poseen un valor biológico muy alto, superior al de otras proteínas de la dieta, debido a su contenido en aminoácidos esenciales. El alto contenido en aminoácidos azufrados (cisteína, metionina) parece relacionado con el incremento en la inmunidad y la capacidad antioxidante a través de la modulación del tripéptido glutatión. Además, el aporte elevado de algunos aminoácidos esenciales (Lys, Met, Thr, Ile) hace que suplementen de forma efectiva a las proteínas vegetales (Renner, 1992; Walzem y col., 2002). De hecho, exceden las recomendaciones nutritivas realizadas por la FAO/OMS tanto para niños como para adultos (Glass y Hedrick, 1976). Las proteínas de suero poseen también la cantidad más elevada de aminoácidos de cadena ramificada (Ile, Leu, Val) de todas las fuentes proteicas. Estos compuestos deben estar presentes en las células musculares para promover la síntesis proteica y además se pueden transformar en energía en el propio músculo, de forma que favorecen la recuperación tras un ejercicio intenso y retrasan la fatiga durante el mismo (Pasin y Miller, 2000).

Por otra parte, durante la digestión, una cantidad importante de las proteínas de suero salen del estómago en forma intacta, mientras que otras sólo se hidrolizan a polipéptidos, y pasan al intestino con rapidez, donde se absorben así, a diferencia de las caseínas que se hidrolizan más (Boirie y col., 1997). La absorción de grandes moléculas en cantidades biológicamente activas se considera que tiene un papel importante en las diferentes respuestas fisiológicas e inmunológicas que contribuyen a su buena tolerancia. Aunque el principal papel de

las proteínas del suero desde el punto de vista nutritivo es proporcionar compuestos nitrogenados a la dieta, hay varios efectos fisiológicos que poseen alguna de las proteínas mayoritarias y ciertos péptidos minoritarios, como son proporcionar protección pasiva frente a infecciones, modular los procesos digestivos y metabólicos y actuar como factores de crecimiento de células, tejidos y órganos (Walzem, 2004). Estos aspectos se tratarán con más detalle en el apartado I.4.7.8.

La lactosa es otro de los componentes del suero de importancia desde el punto de vista nutricional. Su contenido varía bastante con el derivado de suero de que se trate; así, los sueros líquidos de partida contienen 4,2-4,8%, el lactosuero en polvo 68-73%, y los concentrados de proteínas oscilan entre el 46% de aquéllos que tienen un 40% de proteína, y un 5% de los que poseen una concentración proteica del 80% (Renner, 1992). La lenta hidrólisis de la lactosa durante la digestión da lugar a una generación prolongada de energía. Además incrementa la absorción de calcio, cinc y magnesio, y forma un sustrato útil para la microflora intestinal, estimulando el crecimiento de lactobacilos que generan ácido láctico en el intestino, de tal forma que inhiben a microorganismos menos beneficiosos; por lo tanto puede actuar como prebiótico (Renner, 1992; Walzem y col., 2002; Walzem, 2004).

Las vitaminas hidrosolubles que están en la leche permanecen en el lactosuero de quesería en proporciones variables: 40-70% de la vitamina B₁₂, 55-75% de la B₆ y el ácido pantoténico, 70-80% de la riboflavina y biotina, y proporciones mayores de tiamina, ácido nicotínico, fólico y ascórbico, aunque este último se reduce mucho durante el procesado posterior (Reif y col., 1976; Walzem, 2004). La vitamina A es la más abundante de las liposolubles, y tanto ella como la D, E y K se retienen durante la ultrafiltración del suero. En cuanto a las del grupo B, sólo se retienen en el concentrado el ácido fólico y la vitamina B₁₂ (Renner, 1992).

Los sueros ácidos son más ricos en minerales, particularmente en calcio, fósforo y magnesio, que los dulces, algo que se traslada a los productos derivados de ellos. Sin embargo, las concentraciones pueden verse alteradas durante el procesado del lactosuero. Durante la ultrafiltración para fabricar concentrados (ver apartado I.4.4), los minerales unidos a proteínas se retienen junto a ellas, mientras que los solubles pasan al permeado, en el cual aparecen en concentraciones elevadas sodio, potasio y citrato. Las concentraciones de minerales se reducen

mediante electrodiálisis y diafiltración, con el fin de mejorar las propiedades funcionales de los derivados del suero, aunque incide en el aspecto nutritivo (Renner, 1992; Walzem, 2004).

I.4. TECNOLOGÍA DEL APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO Y APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

I.4.1. Introducción

El lactosuero constituye, debido a su composición y propiedades, una fuente de materias primas de gran valor económico y de enorme versatilidad. Esto, unido al alto poder contaminante que posee, ha hecho que se apliquen diversas tecnologías para aprovechar sus constituyentes. Sin embargo, también cabe utilizar el lactosuero como tal, sin grandes modificaciones, para otros usos. Un esquema de las principales tratamientos y los productos obtenidos a partir del lactosuero se recoge en la figura I.1.

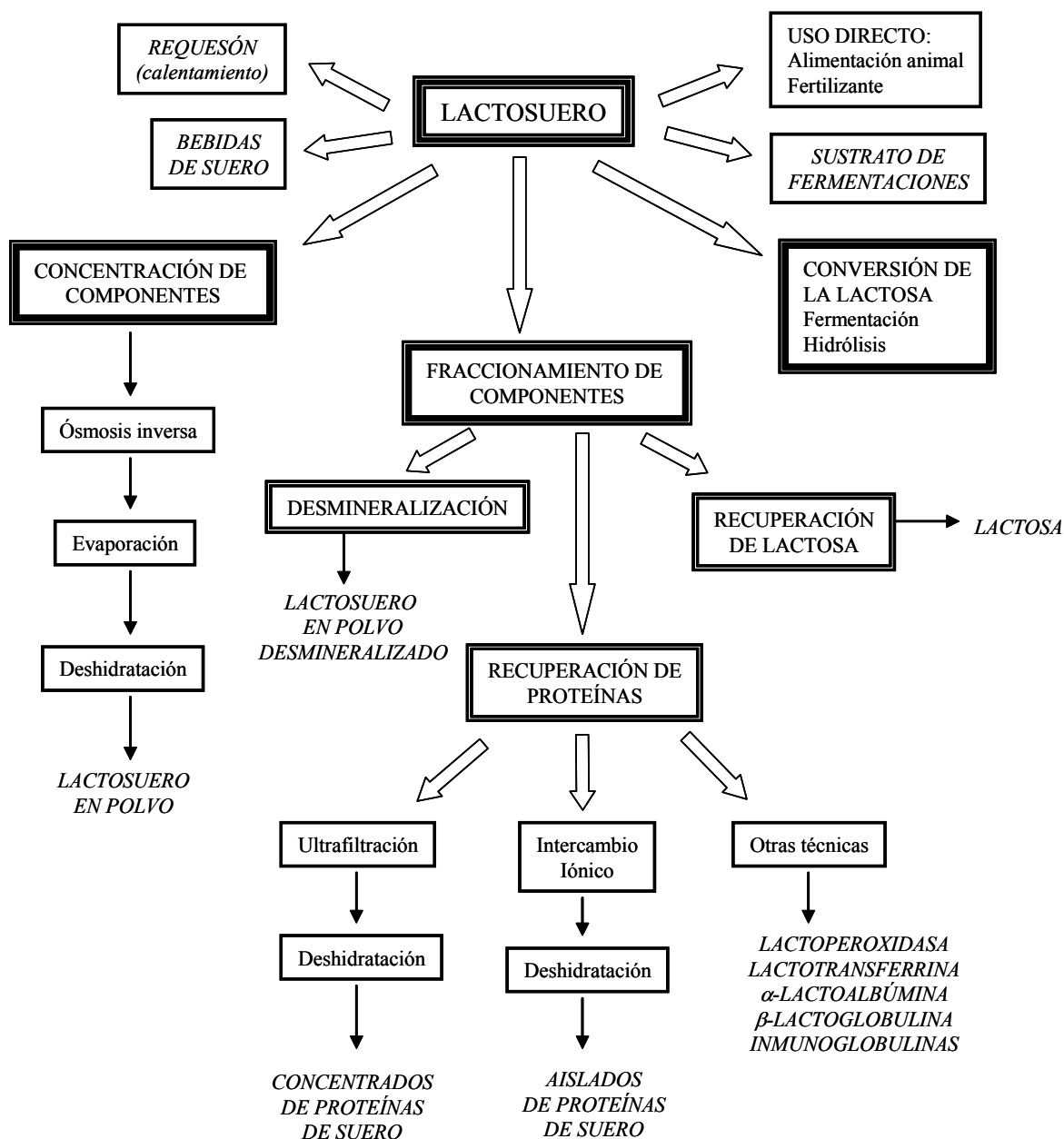


Figura I.1. Diagrama de procesamiento del lactosuero y principales productos obtenidos.

I.4.2. Aprovechamiento del lactosuero sin modificar

El aprovechamiento del suero lácteo de forma prácticamente directa tiene un especial interés para resolver el problema de los vertidos de las pequeñas queserías, que producen pequeñas cantidades de suero y carecen de los medios y la tecnología para un aprovechamiento más sofisticado (Jelen, 1992a).

a) Fabricación de quesos de suero:

Los quesos de suero se elaboran en todo el mundo, generalmente siguiendo un procesado tradicional y en pequeña escala, efectuando una desnaturalización de las proteínas del lactosuero, a las que va unida cierta cantidad de grasa residual. Sus nombres son muy variados dependiendo del lugar de origen; así, en Noruega se denomina al producto *mysost*, en Francia *serac*, en Grecia *manouri* o *anthotyros*, en Italia *ricotta*, en Portugal *requeijão* y en España requesón (Pintado y col., 2001). Estos productos pueden estar elaborados con sueros bovinos, ovinos o caprinos, aunque predominan estos dos últimos, especialmente en los países mediterráneos. En algunos casos se les añade cierta cantidad de leche durante su elaboración (Jelen, 1992a).

Los quesos de suero más conocidos internacionalmente son *mysost* y *ricotta*, y son representantes de dos tipos diferentes de elaboración. El *mysost* es originario de Noruega, comenzó a fabricarse hacia mediados del siglo XIX y originalmente se elaboraba a partir de lactosuero de cabra, aunque actualmente se fabrica también a partir de suero bovino y puede añadirsele ciertas cantidades de leche y nata. Este producto se obtiene evaporando el suero, seguido de un enfriamiento rápido en un intercambiador de superficie rascada para controlar la cristalización de la lactosa, y envasado de la pasta viscosa que se consigue en bolsas o tarrinas de plástico, en las cuales solidifica al cabo de unas horas. El *mysost* puede tener diversas consistencias, desde sólida hasta untable, y posee un color marrón muy característico, producto de la evaporación (Jelen, 1992a,b; Pintado y col., 2001).

El *ricotta* es el queso de suero más conocido y extendido, y su historia se remonta al tiempo de los romanos; su elaboración, como la de muchos otros quesos de suero, se basa en el calentamiento del mismo hasta que se logra desnaturalizar las proteínas pero sin efectuar una

evaporación. Se obtiene a partir de sueros dulces de oveja (en Italia) o de vaca (por ejemplo en E.E.U.U.). En la fabricación industrial más común, el suero se mezcla con 5-10% de leche, se le añade sal y se calienta a 80-85°C. En esta fase se le añade un agente acidificante, como una disolución de ácido cítrico o acético, y se agita. El calentamiento y la agitación se detienen cuando los coágulos suben a la superficie, y se deja reposar durante 5 minutos. Después se separan los coágulos y se introducen en moldes perforados, dejándolos desuerar durante 4-6 horas a baja temperatura (Mathur y Shahani, 1981; Pintado y col., 2001).

Otros quesos de suero se elaboran también por calentamiento del suero, pero sin realizar la acidificación del *ricotta*. Entre este último tipo se encuentran los productos griegos *myzithra* y *manouri* (Philippopoulos y Papadakis, 2001), el *requeijão* portugués y el requesón español. El *requeijão* se elabora a partir de lactosuero ovino o bovino, añadiéndosele también una cierta cantidad de leche de oveja, cabra o vaca, con el fin de mejorar la apariencia del producto y ralentizar su desecación. El proceso genérico de fabricación comienza cuando la mezcla de suero y leche se calienta a temperaturas entre 90 y 100°C durante unos 15-30 minutos y en agitación. Cerca de los 85°C, cuando empieza la coagulación, en ocasiones se añade una pequeña cantidad de agua fría para incrementar la formación de los coágulos. La cuajada sube espontáneamente a la superficie y se saca con una cuchara o utensilio similar, introduciéndola en un molde de madera o plástico, donde se deja desuerar y enfriar durante unas pocas horas. Los parámetros de elaboración más adecuados para la producción de *requeijão* son el calentamiento a 90°C durante 48 minutos con adición de 8,2% de leche de cabra (Pintado y col., 1996, 2001). De la producción de *requeijão* resulta un lactosuero desproteínizado, el *sorelho*, que todavía contiene lactosa, materia nitrogenada no precipitada térmicamente, grasa y sales, y para el cual no se han buscado hasta ahora aplicaciones de interés.

Este queso de suero se conserva a 0-6°C y presenta una vida útil de 5-7 días (Rodrigues y col., 2000). El rendimiento medio se sitúa en torno a los 6%, pero puede variar de manera considerable. La tasa de recuperación de proteínas, en el curso de la producción de este tipo de quesos, se sitúa en 95,5 % para las caseínas y 61,2 % para las proteínas del suero (\approx el 73 % para las proteínas totales), en el caso en que la materia prima se componga de 90% de suero y 10 % de leche de cabra/oveja, como suele ser común en Portugal (Pintado y col., 2001). Según Pintado y Malcata (1999), el *requeijão* presenta 59,5 % de humedad, 8,5 % de proteína, 29,5 % de grasa y 3,5% de lactosa. Debido a su pH relativamente elevado, el producto es muy

susceptible a la contaminación, por lo que la higiene de la producción, la adición de sal y el mantenimiento en frío son cruciales para garantizar la calidad del producto.

Pintado y col. (1996) caracterizaron el producto tradicional y han realizado estudios de optimización del proceso de producción variando la temperatura, el tiempo de calentamiento y los niveles de adición de leche ovina/ caprina. Han observado un máximo para el contenido en humedad usando una temperatura de 93°C, un tiempo de calentamiento de 30 minutos y una tasa de adición de 17% de leche de oveja. Constataron que la temperatura de calentamiento afectaba significativamente los contenidos en humedad, proteína y grasa, mientras que el tiempo de calentamiento apenas afecta al contenido en grasa. Han comprobado también que los productos modificados presentaban mejor calidad sensorial que el producto tradicional.

Teniendo en cuenta que la producción de *requeijão* se sitúa en aproximadamente 630 toneladas al año y que el rendimiento en producto se sitúa en torno a los 6%, es posible constatar que unas 11.000 toneladas de suero se utilizan en su producción, lo que representa menos del 20% de las estimaciones para la producción de suero de oveja en Portugal. Gran parte de las industrias elaboradores de quesos tradicionales no poseen sistemas efectivos de tratamiento del suero o del *sorelho* (Gomes, 2000).

b) Bebidas de suero:

La utilización del lactosuero como bebida es la aplicación más obvia que se le puede dar, y de hecho ya Hipócrates recomendaba su consumo con diferentes usos terapéuticos en el año 460 antes de Cristo. El interés por la tecnología de las bebidas de suero se incrementó considerablemente en Europa en los inicios de la década de los 80, comercializándose productos con suero crudo o procesado. Sin embargo, el suero crudo presenta un sabor desagradable por razones no bien conocidas, que limita bastante su aceptación. Actualmente, las nuevas bebidas de suero están basadas en mezclas de zumos de frutas con suero procesado o no, o con subproductos del aprovechamiento de algunos componentes del mismo, como los permeados de ultrafiltración (Jelen, 1992b, 2003). La mezcla de suero poco modificado con zumos puede producir la aparición de sedimentos, generalmente causados por las proteínas termolábiles y sus interacciones con algunos componentes de los zumos, como las pectinas, incluso a valores de pH de aproximadamente 3,8, donde suelen ser más termoestables (Jelen, 1992b). Dado que las

bebidas con suero modificado son las más abundantes, se tratará esta aplicación más adelante (1.4.7.5).

c) Fertilizante:

El suero puede utilizarse para corregir suelos con bajo contenido de nutrientes. Es una fuente de fósforo y potasio y la mayoría de los nutrientes que contiene son inorgánicos o son compuestos orgánicos simples. Su relación carbono:nitrógeno es generalmente de 20:1, lo que permite utilizarlo como fertilizante nitrogenado de liberación lenta. El lactosuero también incrementa los índices de estabilidad de los agregados del suero y de infiltración en suelos ácidos, con contenido elevado en carbonato cálcico y con contenidos salinos capaces de interferir con el crecimiento de las plantas (Jones y col., 1993, Lehrs y col., 1994; Landmark, 1999). Las cantidades de suero que puede soportar un suelo sin que se vea afectado negativamente son de hasta 64 toneladas/acre a la semana en el caso del cultivo de alfalfa. Estas cantidades deben determinarse cuidadosamente para minimizar problemas de salinidad y acidez excesivas que puede causar un uso indiscriminado (Radford y col., 1986). El lactosuero también se ha aplicado para mejorar la germinación de semillas de maíz, judías y trigo mediante un remojo previo de las mismas (Prasad y col., 2000; Haroun e Ibrahim, 2003).

d) Alimentación animal:

El lactosuero líquido se puede emplear con facilidad en la alimentación del ganado vacuno y porcino, aunque las granjas deben estar cerca de la industria productora del mismo, dado que un transporte demasiado largo del suero sin tratar conduce a crecimiento microbiano indeseable. Además la variación en su contenido de sólidos puede plantear problemas. Se puede emplear para sustituir parcialmente a la leche desnatada o a la cebada en la alimentación de los cerdos. Si el suero se utiliza como única fuente de proteínas, la ingestión de tanta cantidad de líquido puede causar problemas digestivos, por lo que es conveniente mezclar el suero con leche desnatada. Los cerdos con pesos iguales o mayores de 50 kg pueden ingerir hasta 15 kg de suero por día. En el caso de las cerdas reproductoras es bastante útil emplearlo, dado que necesitan ingerir gran cantidad de líquidos (15-25 kg/día) y presentan elevadas necesidades de vitaminas del grupo B, de las que el lactosuero contiene grandes cantidades, sobre todo de riboflavina y de ácido pantoténico (Anónimo, 2005a). Los rumiantes puede utilizar mayores cantidades de suero o derivados (ultrafiltrados) que otras especies, en cantidades de

12-15 litros/100 kg de peso vivo, sustituyendo total o parcialmente al agua de bebida. Sin embargo, necesitan un período de adaptación de la microbiota del rumen de al menos una semana, ya que en caso contrario pueden aparecer diarreas o timpanismo (Thivend, 1978). En muchos casos y para cualquier especie, resulta más útil deshidratar el suero en atomizadores para conservarlo más tiempo y conseguir concentraciones de sólidos más constantes sin variaciones estacionales.

e) Sustrato de fermentaciones:

Debido a su elevado contenido en lactosa, fermentable por algunos microorganismos, el lactosuero ha sido un sustrato tradicional para las fermentaciones industriales, obteniéndose tanto productos para alimentación humana como productos no comestibles. Así, se obtiene alcohol de grado industrial o alimentario, e incluso bebidas alcohólicas como el licor crema Bailey's irlandés o algunos licores neozelandeses. También se producen antibióticos, ácidos láctico y acético, bacteriocinas (nisina) o también biomasa, empleada en alimentación animal (Castillo y col., 1996; Jelen, 2003). Por último, se obtienen gomas formadas por exopolisacáridos que son útiles tanto en la elaboración de alimentos (son espesantes y estabilizantes) como en la industria no alimentaria (como adhesivos, en el tratamiento de aguas residuales, en la industria farmacéutica, etc.) (Malcata, 1999).

I.4.3. Obtención y aplicaciones de productos derivados del lactosuero

El suero que drena de las cuajadas durante la elaboración de queso contiene partículas o finos, lípidos, ácido láctico, minerales y otros componentes de la leche que no han sido retenidos en la cuajada. Como primer paso en el tratamiento del suero se suele realizar una centrifugación con el fin de separar los finos y la mayor parte de la grasa. Dado que en la mayoría de las cuajadas colaboran microorganismos, éstos también están presentes en el suero. Con el fin de que no se produzcan fermentaciones indeseables por transformación de la lactosa en ácido láctico, los sueros de quesería suelen pasterizarse inmediatamente o bien se refrigeran rápidamente hasta una temperatura inferior a 7°C y después se pasterizan. El tratamiento térmico mínimo suele ser de 72°C durante 15 segundos. Después el suero se somete a otros tratamientos con el fin de obtener productos muy diversos. El derivado del lactosuero más común y simple de obtener es el suero completo en polvo. Sin embargo, se comercializan también productos formados por uno o varios de los componentes originales del suero, separados o

fraccionados por diferentes técnicas: cristalización, cromatografía, intercambio iónico, procesos de membrana y electrodiálisis, absorción, etc. (Smith, 2004). Tras estos procesos se obtienen productos en polvo desmineralizados, hidrolizados, concentrados de proteínas o proteínas aisladas, o bien permeados deshidratados (Písecký, 2004).

La tecnología más simple para la transformación del suero en productos industriales es la deshidratación para conseguir lactosuero en polvo. El procesado tradicional consiste en la evaporación del suero en evaporadores de efectos múltiples a vacío, seguido de deshidratación por atomización. La temperatura alcanzada en el evaporador oscila entre 60-70°C y la concentración final oscila entre el 40 y 60% de sólidos. Antes de realizar la deshidratación suele realizarse un paso de precristalización de la lactosa, con el fin de que la lactosa amorfa se transforme en cristales de α -lactosa y se eviten problemas de higroscopicidad del producto final. Posteriormente el concentrado se deshidrata en un secador por atomización, aplicando aire a una temperatura de unos 180°C, pasando a continuación el polvo por un secador de lecho fluidizado para finalizar el proceso de deshidratación (Písecký, 2004; Anónimo, 2005a). Deben cuidarse especialmente los tratamientos térmicos aplicados con el fin de evitar una excesiva desnaturalización de las proteínas séricas (Jelen, 2003).

A partir del suero (o de alguna de sus fracciones, como el permeado de ultrafiltración al que luego nos referiremos) se puede obtener lactosa. Se obtiene concentrando el suero para lograr la sobresaturación de la misma, produciendo a continuación su cristalización y después separando los cristales en un decantador centrífugo. De esta forma se obtiene suero delactosado, producto que se puede deshidratar posteriormente, y los cristales de lactosa, que se secan y someten a molienda y tamizado, para lograr diferentes tipos de producto en función del tamaño de partícula. La lactosa se emplea en la elaboración de numerosos alimentos, como productos de panadería y bollería, dulces, aperitivos, alimentos infantiles, mermeladas, edulcorantes, productos cárnicos, sopas y salsas (Harper, 1992; U.S.D.E.C., 2004b). También se puede obtener del suero o los permeados lactosa hidrolizada por métodos enzimáticos, útil para productos dirigidos a personas intolerantes y para incrementar su poder edulcorante (Zadow, 1992).

Si se quiere obtener suero en polvo útil para diversos alimentos, especialmente para fórmulas infantiles, es necesario reducir su contenido mineral. En esta última aplicación, es necesario efectuar una reducción de hasta un 90-95%, siendo especialmente importante

disminuir la cantidad de Na, K, Cl y P. Si se pretende aplicar el suero a la elaboración de helados, es necesario reducir en un 50-70% los minerales para evitar la aparición de sabores salados. Las principales tecnologías empleadas para obtener este producto son la electrodiálisis y el intercambio iónico. La nanofiltración se suele utilizar como paso previo a este último método (Burling, 2003) y se tratará, al ser una técnica de separación por membranas y junto con la electrodiálisis, en el apartado I.4.5.2. El intercambio iónico es un tipo de cromatografía que consiste en hacer pasar el líquido a tratar (en este caso el lactosuero) a través de una columna que contiene resinas cargadas de iones que intercambian con los iones del líquido. Después de que la capacidad de intercambio iónico ha sido agotada, los iones adsorbidos deben eliminarse mediante una solución de regeneración apropiada. Las resinas modernas son materiales poliméricos porosos en forma de pequeñas perlas de unos 0,3-1,2 mm de diámetro. Químicamente actúan con ácidos o bases insolubles que cuando se convierten en sales permanecen en este mismo estado. Mediante esta técnica se puede conseguir una desmineralización del suero de 90-98%, permaneciendo en el mismo sin ser retenidas tanto la lactosa como las proteínas, las cuales no sufren desnaturalización (Burling, 2003; Smith, 2004).

I.4.4. Obtención de concentrados de proteínas de suero

Dentro de los productos derivados del suero destacan aquéllos en los que, aplicando diferentes tecnologías que eliminan lípidos, minerales y lactosa, se ha conseguido incrementar el contenido proteico o bien separar los diferentes tipos de proteínas séricas. Las proteínas del suero poseen un alto valor nutritivo y se emplean como emulsionantes, gelificantes o espumantes en numerosos alimentos; además, actualmente se aplican también como nutracéuticos. Los aspectos de funcionalidad de estas proteínas se abordarán en el apartado I.5.

Los principales productos con alto contenido en proteínas séricas son los concentrados de proteínas de suero (CPS o “whey protein concentrates”, WPC), con 25-80% de proteína, y aislados de proteínas de suero (APS o “whey protein isolates”, WPI), con contenidos iguales o superiores al 90% (Foegeding y col., 2002). Los productos comerciales se obtienen a partir de lactosuero bovino. En la actualidad se pueden emplear para su obtención diferentes técnicas de filtración por membranas, tales como la microfiltración, la ultrafiltración, la nanofiltración y la ósmosis inversa, así como la electrodiálisis. Además, para la fabricación de aislados se utilizan técnicas de adsorción como el intercambio iónico (Foegeding y Luck, 2003).

La figura 1.2 recoge los pasos generales de la obtención comercial de CPS procedentes de sueros dulces, los más abundantes. Los pasos iniciales son semejantes a los seguidos en la obtención de lactosueros en polvo (apartado 1.4.3). Tras la recepción del suero, y antes de someterlo al proceso de ultrafiltración (UF), es necesario eliminar los finos de caseína que pueda contener, así como grasa y cierta cantidad de microorganismos. Para ello se utilizan filtros rotatorios y separadoras centrífugas. Después el suero se pasteuriza, con tratamientos de 72°C durante 15 segundos o similar, y tras esto puede almacenarse en refrigeración hasta que se efectúe el procesado posterior, de forma que se minimice el deterioro bioquímico y microbiológico de las proteínas. El lactosuero ácido no suele pasteurizarse, ya que el tratamiento térmico aplicado al pH de este suero (aproximadamente 4,6) puede producir una gran desnaturalización proteica. En ocasiones el suero ácido se almacena a temperaturas superiores a 52°C, resultando suficientemente inhibitorio para los microorganismos y menos perjudicial para las proteínas (Hobman, 1992).

Después el suero suele someterse a diversos pretratamientos alternativos antes de la ultrafiltración, tales como desmineralización, modificaciones enzimáticas o eliminación de grasa no eliminada por centrifugación. Estos restos de grasa están formados en gran parte por fosfolipoproteínas, capaces de colmatar las membranas de UF con rapidez, y su eliminación implica realizar ajustes de pH y/o temperatura, adición de calcio o agentes acomplejantes del mismo, y centrifugación o microfiltración, de manera que se eviten problemas durante los tratamientos posteriores y se logren CPS de elevadas propiedades funcionales (Hobman, 1992; Anónimo, 2005b). Tanto la colmatación como las técnicas de filtración por membranas se tratarán con mayor amplitud en el apartado 1.4.5.

A continuación el suero se somete a ultrafiltración con el fin de incrementar su contenido en sólidos, particularmente de proteínas. Cuando se desea producir CPS hasta un 70% de proteínas sólo se necesita ultrafiltrar, mientras que si se quiere un producto con un 80% es necesario efectuar una diafiltración del retenido, eliminando mayor cantidad de lactosa y minerales (Anónimo, 2005b). El retenido de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) se somete más tarde a un nuevo tratamiento de pasteurización, pasando después a la etapa de evaporación. Suelen utilizarse evaporadores tubulares a vacío de película descendente y varios efectos, y las condiciones se seleccionan para minimizar el daño térmico de las proteínas del suero, empleando temperaturas de alrededor de 50°C (Smith, 2004). Actualmente la etapa de evaporación puede eliminarse si se diseñan adecuadamente los equipos de UF, obteniendo

concentrados con un nivel de sólidos apropiado para pasar a la etapa de deshidratación directamente (Hobman, 1992; Anónimo, 2005b).

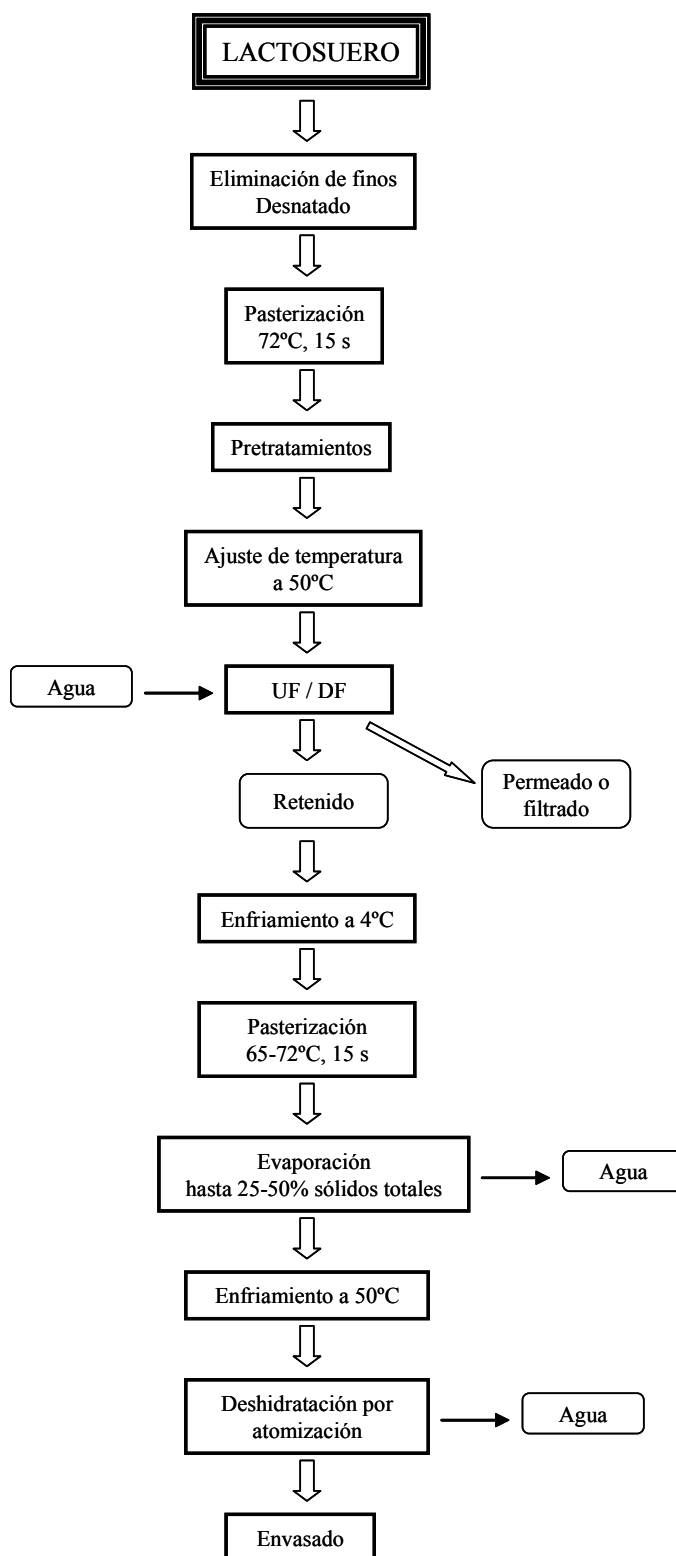


Figura I.2. Diagrama de elaboración de concentrados de proteínas de suero lácteo (adaptado de Hobman, 1992).

La deshidratación del retenido se suele realizar en secadores por atomización, empleando aire caliente con una temperatura de entrada de 160-180°C y de salida inferior a 80°C. A veces se emplea después un secador de lecho fluidizado para finalizar la deshidratación. Debido a que el polvo obtenido es fino y poco denso, y puede perderse en gran cantidad en el aire de salida, además de dos separadores ciclónicos suele ser necesario colocar un filtro textil después del primero de ellos (Hobman, 1992; Anónimo, 2005a). La tendencia actual es producir CPS aglomerado y lecitinado de disolución instantánea (Anónimo, 2005a). Finalmente el CPS se envasa en sacos constituidos por varias capas de papel y polietileno, de unos 20-25 kg, directamente desde el último ciclón o bien desde silos de almacenamiento (Hobman, 1992).

Los aislados de proteínas de suero contienen como mínimo un 90% de proteínas, un 4,0-5,5% de agua y el resto principalmente minerales. El método más utilizado en la obtención de APS es la cromatografía de intercambio iónico, que proporciona un nivel adicional de selectividad sobre el uso de membranas. El producto obtenido presenta mejores propiedades funcionales que los CPS, aunque también su precio es más elevado (Foegeding y Luck, 2003).

La tabla I.3 muestra la composición de CPS y APS comerciales. Las variaciones en la composición y, por lo tanto, en sus propiedades funcionales, se deben a varios factores, tales como la composición de la leche y las condiciones de elaboración de los quesos. Estas condiciones son principalmente la pasteurización de la leche, la adición de cloruro cálcico, el tipo de cultivo iniciador empleado, el agente coagulante y su concentración, el trabajo aplicado a la cuajada (corte, cocción y desuerado), el pH y la temperatura (Schmidt y col., 1984). También se ha señalado la influencia del procesado de los concentrados proteicos en la composición y propiedades, como los pretratamientos aplicados, el tratamiento térmico, la deshidratación o los procesos de membrana (Morr y Ha, 1993). Sin embargo, parece que los principales responsables de las variaciones en las proteínas (el componente responsable de la funcionalidad de estos productos) son los factores relacionados con la obtención del queso en los sueros dulces, o de la caseína ácida en los sueros ácidos, más que el propio procesado de los CPS y APS (De la Fuente y col., 2002).

Tabla I.3. Composición de concentrados y aislados de proteínas de suero comerciales (% extracto seco). ^a Morr y Foegeding (1990); ^b Foegeding y Luck (2003); ^c U.S.D.E.C. (2004a).

	CPS^a	CPS 35%^{b,c}	CPS 80%^{b,c}	APS^a	APS^{b,c}
Composición general					
Humedad	4,1-6,0	3,0-4,5	3,0-4,5	2,4-5,6	4,0-5,5
Proteína	72,0-76,6	34,0-36,0	80,0-82,0	88,6-92,7	90,0-96,0
Nitrógeno no proteico	0,93-4,6	-	-	0,29-0,34	-
Lactosa	2,1-5,8	48,0-54,5	4,0-8,0	0,42-0,46	0,5-2,0
Lípidos totales	3,3-7,4	3,0-5,0	4,0-8,0	0,39-0,67	0,4-1,0
Fosfolípidos	0,80-1,5	-	-	0,11-0,31	-
Cenizas	2,5-6,0	3,1-8,0	3,0-4,0	1,4-2,2	2,0-3,4
Sodio	0,15-1,7	-	-	0,36-0,42	-
Calcio	0,23-1,1	-	-	0,20-0,24	-
Composición proteica					
β-lactoglobulina	40,4-76,9	-	-	67,6-74,8	-
α-lactalbúmina	14,5-24,8	-	-	8,3-17,5	-
Inmunoglobulinas	3,8-15,4	-	-	5,9-7,5	-
Seroalbúmina	5,8-19,6	-	-	7,2-10,9	-

En cuanto a otros productos de proteínas de suero, la lactalbúmina es el más antiguo. Este producto contiene un mínimo del 80% de proteína y se obtiene por calentamiento del suero hasta desnaturalizar, coagular y precipitar las proteínas. Después se separa el precipitado por decantación o centrifugación, se lava para eliminar el exceso de sales y lactosa, y finalmente se deshidrata. Debido al fuerte calentamiento, las propiedades funcionales de las proteínas se ven muy afectadas, por lo que este producto se emplea en alimentos en los que se desea incrementar su contenido proteico y donde no importa la funcionalidad, por ejemplo en galletas y productos horneados (Pearce, 1992).

La aplicación de diversas técnicas, tales como la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis, la ultrafiltración, la cristalización y la precipitación, permiten aislar proteínas

individuales, no sólo las mayoritarias (α -lactalbúmina y β -lactoglobulina), sino también otras minoritarias, como la lactoperoxidasa, la lactotransferrina, las inmunoglobulinas, y otros productos como los péptidos biológicamente activos, obtenidos por modificación enzimática o química de las proteínas, con aplicaciones alimentarias o farmacéuticas (Castillo y col., 1996). Así, de forma habitual, tanto la α -lactalbúmina como la β -lactoglobulina se concentran mediante cromatografía de permeación en gel, procesado por membranas, intercambio iónico y precipitación selectiva (Idolo-Imafidon y col., 1997; Huffman y Harper, 1999). Los productos enriquecidos en inmunoglobulinas se obtienen mediante precipitación con sulfato amónico, intercambio iónico y procesado por membranas, mientras que la lactoferrina y la lactoperoxidasa se producen con un alto grado de pureza mediante intercambio iónico (Huffman y Harper, 1999).

I.4.5. Procesos de separación por membranas aplicados en la obtención de concentrados de proteínas de suero

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, muchos de los procesos de transformación del suero necesitan que los componentes proteicos del suero sean previamente aislados y purificados. Para el proceso de separación y purificación de las proteínas séricas, la centrifugación y, sobre todo, las tecnologías de membrana son las más utilizadas (Bramaud y col., 1997; Timmer y Van der Horst, 1998; Kiesner y col., 2000).

I.4.5.1. ASPECTOS GENERALES

Los procesos de membrana se emplean para concentrar o fraccionar un líquido, haciéndolo pasar a través de una membrana semipermeable, consiguiendo dos corrientes de diferente composición: la porción del mismo que contiene moléculas que no son capaces de atravesar dicha membrana, denominado retenido o concentrado, y otra porción líquida que contiene los compuestos que sí son capaces de atravesarla, el permeado o filtrado. Por lo tanto, el proceso de separación se basa en la permeabilidad selectiva hacia los diferentes componentes del líquido inicial. La permeación selectiva es el resultado además de una fuerza conductora, la aplicación de presión hidrostática; en función del tipo de separación que se realice se aplicará una presión más o menos elevada. Los mecanismos que gobiernan el transporte de masa en los diferentes procesos de membrana varían en función del tipo de membrana, las condiciones de proceso y la configuración del equipo. Habitualmente los distintos tipos de

membrana se describen haciendo referencia a su tamaño de poro o a su punto de corte respecto a la masa molecular (Rosenberg, 1995; Singh y Heldman, 2001; Smith, 2004).

Durante un proceso de filtración clásica, la suspensión a tratar se conduce perpendicularmente al medio filtrante. En estas condiciones, se produce una acumulación de materiales, formando una capa que disminuye la porosidad y, en consecuencia, el caudal de filtración (Cuperus y Nijhuis, 1993). La evolución del proceso no permite un trabajo de duración aceptable para las necesidades industriales. Los procesos de filtración frontal se mejoran mediante la introducción de un tercer componente, en forma de gradiente de velocidad paralelo a la superficie de la membrana. Este nuevo vector del proceso actúa a nivel del lado del fluido a concentrar. Así, la filtración tangencial es un proceso de membrana bajo la acción de un gradiente de presión, en el cual la membrana es barrida tangencialmente por el líquido que contiene las sustancias que se van separar. Este líquido ha de ser impulsado por una bomba, que crea el gradiente de presión suficiente para que el filtrado o permeado atraviese la membrana (Cohen-Maurel, 1990). El concentrado o retenido corresponde a la parte del líquido de alimentación que no atraviesa la membrana y en el que uno o varios de sus componentes aumentan su concentración respecto a la del líquido de alimentación. El flujo de filtración corresponde al caudal de permeado que pasa a través de una determinada superficie de membrana y normalmente se expresa en litros/hora m².

En los últimos treinta años, la evolución de los procesos de filtración y su expansión generalizada han estado condicionadas a la evolución de las membranas. Desde las primeras membranas fabricadas en acetato de celulosa, hasta la tercera generación de membranas minerales se han observado importantes avances. Los principales cambios de las membranas, que han permitido la expansión de las tecnologías de filtración fueron: la mejora de su permeabilidad selectiva y de la resistencia a temperaturas elevadas y a valores de pH extremos, la mayor resistencia mecánica, la disminución del volumen muerto, la facilidad de sustitución y la reducción del coste por m² (Lewis, 1996; Cheryan, 1998; Saboya y Maubois, 2000). Las membranas existentes en el mercado, pueden ser clasificadas según diferentes criterios, tales como selectividad, naturaleza química, estructura, modo de funcionamiento y configuración geométrica.

I.4.5.2. SELECTIVIDAD DE LAS MEMBRANAS Y TIPOS DE PROCESOS

Según su selectividad se pueden distinguir los siguientes tipos de membranas y procesos que se aplican al procesado del suero y a la obtención de CPS: microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa y electrodiálisis.

La microfiltración (MF) es un proceso que utiliza membranas con diámetros internos de poro de 0,1-20 μm y que separa partículas con pesos moleculares mayores de 200 kDa (Rosenberg, 1995). En función del tamaño del poro se pueden separar componentes del suero como restos de caseínas, fosfolipoproteínas o componentes de la leche desnatada tales como, células somáticas, bacterias y esporas (Fauquant y col., 1988; Trouvé y col., 1991; Maubois, 1997). Las presiones de trabajo utilizadas son inferiores a 0,2 MPa (Glover, 1985).

La ultrafiltración (UF) es un proceso de membrana que separa componentes basándose en un filtrado molecular (Kelly, 2003). Las membranas poseen un tamaño de poro entre 0,015 y 0,10 μm , permitiendo separar moléculas con una masa molecular entre 1 y 200 kDa (Mistry y Maubois, 1993). En el caso de la UF del suero de quesería, la lactosa, el nitrógeno no proteico, las vitaminas hidrosolubles y las sales pasan a través de la membrana, mientras que se retienen las proteínas y la grasa. La elección del diámetro de los poros dependerá de la masa molecular y de la conformación de las moléculas que se pretenden separar (más concretamente de su radio de Stokes). Las presiones de trabajo utilizadas son menores de 1 MPa (Glover, 1985).

La diafiltración (DF) se emplea para incrementar la recuperación de solutos permeables a través de la membrana durante procesos de UF o MF. El proceso de diafiltración consiste en diluir el concentrado, usualmente con agua, y después continuar la separación hasta lograr un grado satisfactorio de eliminación del soluto (Rosenberg, 1995). Permite, por ejemplo, lograr CPS con menor contenido en lactosa y minerales y mayor concentración proteica.

La nanofiltración (NF) es un proceso de separación por membranas a presión elevada que es capaz (al igual que la ósmosis inversa) de invertir los efectos osmóticos de los líquidos. La NF está gobernada por fenómenos de transferencia de masa, consistentes en la difusión y flujo a través de los poros; se pueden emplear también membranas cargadas eléctricamente, de manera que se puedan seleccionar aún más los iones que pueden atravesarlas (Rosenberg,

1995). Además de servir para concentrar, las membranas de NF son parcialmente permeables a iones minerales y otros componentes de bajo peso molecular (dejan pasar compuestos con una masa molecular de entre 30 y 1000 Da), empleándose para desmineralizar (Kelly, 2003). Los iones monovalentes normalmente pasan al permeado mientras que los divalentes se concentran en el retenido (Bird, 1996). Los diámetros de poro se sitúan entre 0,001 y 0,015 μm . Las presiones de trabajo utilizadas se sitúan en el rango 0,7-3,5 MPa (Glover, 1985). Este proceso empieza a ser aplicado en la industria láctea con el objetivo de obtener retenidos con bajas concentraciones en sales, aunque en algunos casos también se reduce algo el contenido en lactosa (Kelly, 2003).

La ósmosis inversa (OI) es un proceso en el que la membrana separa el solvente (en general agua) y solutos con pesos moleculares inferiores a 150 Da, de los restantes componentes de la solución. Esta separación se consigue aplicando presiones externas superiores a la presión osmótica, de forma que se logra un flujo de agua a través de la membrana contrario al que se produciría de forma natural (Singh y Heldman, 2001). Se puede considerar un caso puro de concentración de todos los solutos presentes. Los diámetros de poro son inferiores a 0,001 μm . Las presiones de trabajo utilizadas se sitúan entre 4-8 MPa (Glover, 1985). Una de sus aplicaciones es la concentración del lactosuero mediante la eliminación de agua y minerales ionizados (Rosenberg, 1995).

La electrodiálisis (ED) es un proceso de separación electroquímico por el cual se transportan ciertos iones a través de una o varias membranas selectivas permeables bajo la influencia de una corriente eléctrica continua, separándose así de compuestos no cargados eléctricamente (Batchelder, 1999; Bazinet, 2005). Por lo tanto es un método basado en el movimiento selectivo de iones en solución, de forma que las membranas de ED pueden ser permeables a aniones o a cationes, y no permiten en cambio el paso de agua a través de ellas (Singh y Heldman, 2001). Así, el proceso permite la separación de electrólitos de no-electrólitos, la concentración o la reducción de electrólitos en soluciones y el intercambio de iones entre soluciones. La principal aplicación de esta técnica en los sueros es la desmineralización, con el objetivo de producir CPS con un 25-90% menos de cenizas; las mayores reducciones se aplican en sueros destinados a la elaboración de alimentos infantiles (Grandison y Lewis, 1996; Batchelder, 1999).

Las figuras I.3 y I.4 muestran el espectro de separación de los componentes de la leche que poseen los distintos procesos de membrana según el tamaño de las moléculas y el diámetro de poro de las membranas empleadas en ellos.

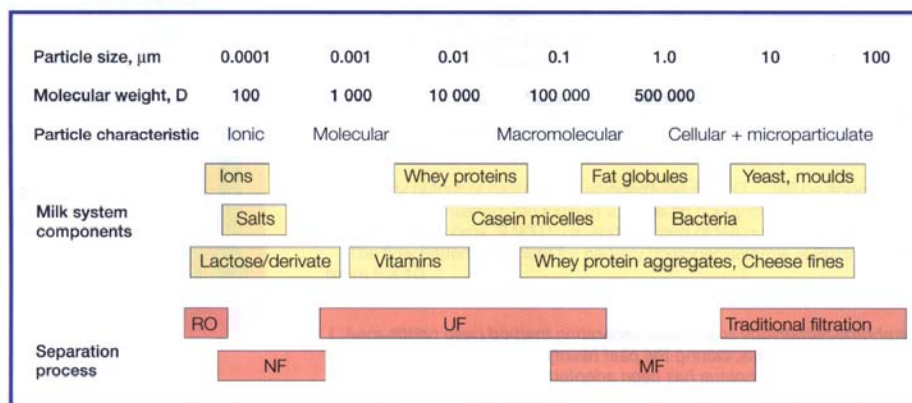


Figura I.3. Espectro de aplicación de los procesos de separación por membranas en la industria láctea (Alfa Laval/Tetra Pak, 1995).

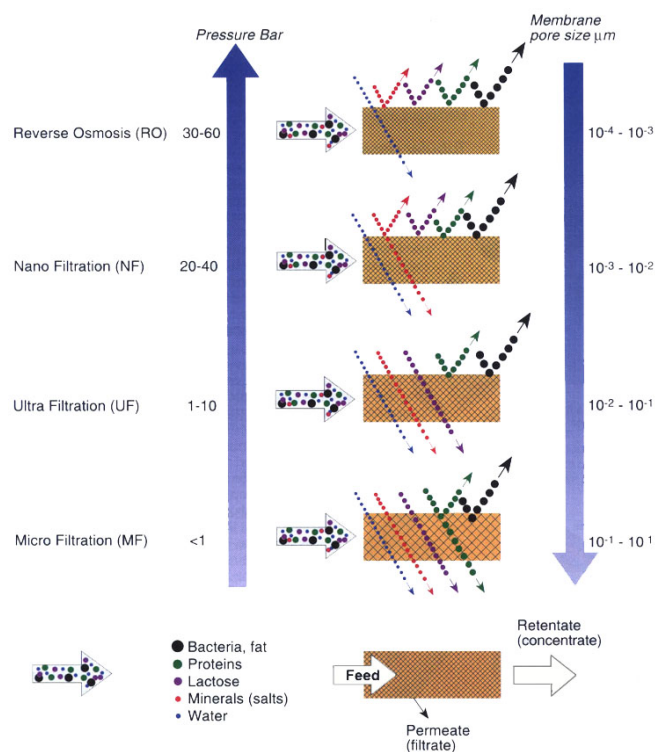


Figura I.4. Utilización de los sistemas de membrana para la separación de componentes de la leche, en función del tamaño de poro y de la presión de trabajo aplicada (Alfa Laval/Tetra Pak, 1995).

I.4.5.3. MATERIALES DE MEMBRANA

Las membranas semipermeables se pueden fabricar con materiales diversos, aunque se pueden clasificar en dos tipos, orgánicos e inorgánicos.

a) Membranas orgánicas:

El acetato de celulosa fue el primer material utilizado en las aplicaciones industriales, constituyendo las membranas de primera generación. El material base es la celulosa a la cual se reemplazan uno o varios grupos hidroxilo por grupos acetilo. Este tipo de polímero ya está en desuso puesto que los inconvenientes superan las ventajas. Este material permite obtener una elevada permeabilidad, es de fácil fabricación y barato, además de presentar una baja tendencia al colmatado. Sin embargo es sensible a la hidrólisis química, no soporta temperaturas superiores a 50°C y el intervalo de pH es muy limitado, entre 3 y 7. Presenta también reducida tolerancia al cloro y sensibilidad a la compactación por efecto de la presión aplicada, lo cual disminuye su permeabilidad y selectividad (Cheryan, 1998). Estas desventajas imposibilitan su utilización práctica en las industrias lácteas (Renner y Abd El-Salam, 1991).

Las membranas de polímeros orgánicos, o de segunda generación, se fabrican con polímeros sintéticos, como polisulfonas, polisulfonas modificadas, poliacrilonitrilo y poliamidas aromáticas. Sus características de resistencia térmica y química dependen del polímero utilizado. Las primeras membranas de polisulfonas aparecieron a mediados de los años setenta y se caracterizan por tener un grupo SO₂ relativamente estable. Son las más resistentes y se utilizan corrientemente en UF, MF, NF y OI. Toleran rangos de pH entre 1 y 13 y temperaturas de 75-80° C (Cheryan, 1998). Además tienen buena resistencia a concentraciones de cloro relativamente elevadas (5-200 ppm) (Pal, 1993; Cheryan, 1998). Como inconvenientes presentan cierta sensibilidad al compactado, no soportan altas presiones internas y muestran problemas de adsorción, en particular de proteínas, que producen ensuciamiento (Cheryan, 1986; Van der Horst, 1995).

b) Membranas minerales o inorgánicas:

Son conocidas como membranas de tercera generación por ser las más avanzadas del mercado. Las empleadas en la industria láctea son membranas cerámicas formadas en su

mayoría por deposición de óxido de aluminio (alúmina) o de circonio (circonia) sobre un soporte microporoso del mismo material (Mulder, 1991; Pal, 1993). Las ventajas que presentan son que toleran todo el rango de valores de pH, soportan temperaturas de hasta 400°C y presiones de hasta 2 MPa sin compactarse. Se aplican en MF, UF y NF. En el mercado se encuentran fundamentalmente bajo la geometría tubular y de monolito o multicanal (Anónimo, 2005c). Esta última consiste en un bloque cerámico atravesado en toda su longitud por varios canales (Figura 3). En la figura 4 se presenta una microfotografía de la sección transversal de una membrana mineral. Todavía su precio es muy elevado, y, como sólo se comercializan en configuración tubular, presentan un volumen muerto superior (Pal, 1993).

I.4.5.4. CONFIGURACIÓN DE LAS MEMBRANAS

Para sus aplicaciones industriales las membranas deben montarse sobre determinados soportes denominados módulos. Actualmente existen diferentes geometrías o configuraciones:

a) Configuración tubular:

Los módulos tubulares están constituidos por una red de tubos porosos (2-3 cm de diámetro interno) que soportan las membranas. El diámetro del tubo resulta de un compromiso entre el consumo de energía (el cual aumenta con el diámetro) y el coste de fabricación (que disminuye con el diámetro). El líquido a tratar circula en el interior de los tubos y el filtrado atraviesa por los poros y se recoge en un segundo tubo concéntrico (Singh y Heldman, 2001). Estos módulos tienen la ventaja de poder tratar fluidos relativamente cargados de partículas, con alta tendencia a producir ensuciamiento y son fáciles de limpiar (Mulder, 1991). Además, la tecnología de instalación de las membranas es simple. Presentan la desventaja de originar un volumen muerto importante. Los costes energéticos de su funcionamiento son elevados ya que el régimen del flujo tiene que ser turbulento para evitar riesgos de colmatado. Esto se refleja en la energía de impulsión demandada por las bombas de alimentación (0,6-1,0 kW/m²) (Mistry y Maubois, 1993). Además poseen baja compacidad, ya que la relación superficie de intercambio/unidad de volumen es la más reducida de todas las configuraciones existentes (10-300 m²/m³). Por otro lado presentan una elevada caída de presión (Pal, 1993). Ésta es la configuración menos usada en la actualidad (2%) (Bird, 1996), aunque sea la configuración común de las membranas minerales. En la figura I.5 se muestra una fotografía de varios módulos de configuración tubular.

b) Configuración en placa y bastidor:

Los módulos planos están constituidos por un apilamiento de placas porta-membranas hechas en cloruro de polivinilo y de placas separadoras. Cada porta-membranas tiene en las dos caras una rejilla de drenaje y una hoja porosa que sostiene la hoja plana de membrana. Los módulos planos pueden ser modificados de manera relativamente fácil por el industrial y representan el 20% de los equipos instalados (Bird, 1996). En el caso de un defecto en una membrana es fácil aislar un elemento del módulo sin afectar la marcha del equipo. Además, existe la posibilidad de visualizar el permeado de cada membrana, lo cual permite detectar fácilmente su deterioro. Uno de los parámetros importantes es la distancia entre membranas. Si es reducida, el volumen muerto es más pequeño, pero hay necesidades de prefiltración del producto a tratar, mayor dificultad de limpieza y baja adaptabilidad a productos viscosos. Si la distancia es elevada, el volumen muerto es superior y el consumo de energía para el bombeo más elevado. El consumo energético es moderado si se compara con el diseño tubular y se sitúa en torno a 0,5-0,7 kW/m² (Mistry y Maubois, 1993). La inversión inicial es relativamente elevada y la limpieza de la membrana es relativamente difícil (Pal, 1993). En la figura I.6 se muestra una fotografía de un módulo de configuración en placa y bastidor.

c) Configuración en fibra hueca:

Las membranas de fibra hueca están constituidas por tubos huecos que tienen un diámetro exterior comprendido entre 50 y 1000 μm y un diámetro interior entre 25 y 800 μm . Se obtienen mediante procesos de hilado similares a los utilizados en la industria textil. Su estructura es generalmente asimétrica. En este caso, las fibras huecas juegan a la vez el papel de soporte y de membrana. Estos tubos se encuentran cerrados en cartuchos cilíndricos. Se pueden encontrar desde 50 a 3000 fibras en cada cartucho. El producto circula en los microtubos y el permeado se recoge en el cartucho. Estos módulos permiten obtener grandes superficies de membrana en poco espacio ya que poseen la relación superficie de intercambio/unidad de volumen más elevada de todas las geometrías (1.000-10.000 m²/m³) y su volumen muerto es pequeño. Su consumo energético es reducido (0,2 kW/m²) y existe la posibilidad de limpieza en contracorriente (Mistry y Maubois, 1993; Pal, 1993). Están bien adaptadas al tratamiento de productos poco viscosos, en particular para el tratamiento de agua (Mulder, 1991). Sin embargo, presentan gran sensibilidad al colmatado y un elevado coste de reposición, debido a que la

ruptura de una fibra obliga al cambio del módulo entero; además sólo pueden operar en un intervalo muy estrecho de presión (170-270 kPa) (Pal, 1993). Por estas razones, este tipo de configuración no tiene gran implantación en la industria láctea, representando el 8% de los equipos instalados (Bird, 1996). En la figura I.7 se muestra una fotografía de un módulo de configuración en fibra hueca y un esquema de su funcionamiento.

d) Configuración en espiral:

Los módulos en espiral están constituidos por membranas planas que se enrollan alrededor de un tubo perforado y hueco, destinado a conducir el permeado. Entre las membranas se instala una rejilla plástica de espesor variable que tiene la función de crear una turbulencia en el seno del fluido. Los extremos de las láminas enrolladas están sellados con el fin de impedir la mezcla de retenido y filtrado estando todo el conjunto encerrado en una carcasa metálica tubular (Singh y Heldman, 2001). Presentan una compacidad elevada (300-1000 m²/m³), el más bajo coste de inversión y un consumo energético reducido. La naturaleza del soporte de la membrana y el diseño general permiten operar con elevadas presiones transmembranarias sin afectar a la membrana (Mistry y Maubois, 1993). Tienen las desventajas de presentar baja adaptabilidad a los productos viscosos, flujos reducidos, pérdida de carga elevada y facilidad de colmatado (Pal, 1993). Este tipo de configuración se utiliza en el 70% de los equipos (Bird, 1996). En la figura I.8 se muestra una fotografía de un módulo de configuración en espiral y un esquema de su funcionamiento.



Figura I.5. Módulos de membranas de configuración tubular

Origen: <http://www.geafiltration.com/html/technology/ftechsys.htm>



Figura I.6. Módulo de membranas de configuración en placa y bastidor
 Origen: <http://www.geafiltration.com/html/technology/ftechsys.htm>

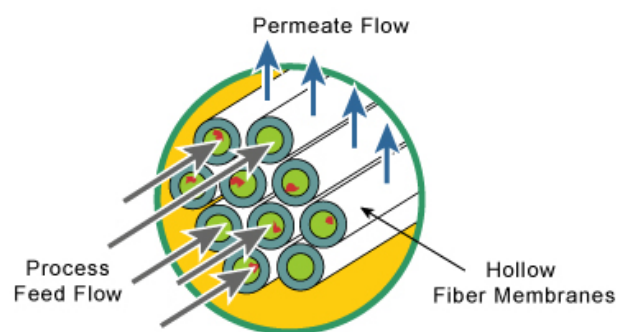


Figura I.7. Módulo de membranas de configuración en fibra hueca y esquema de su funcionamiento

Origen: <http://www.geafiltration.com/html/technology/ftechsys.htm>
http://www.kochmembrane.com/prod_hf.html

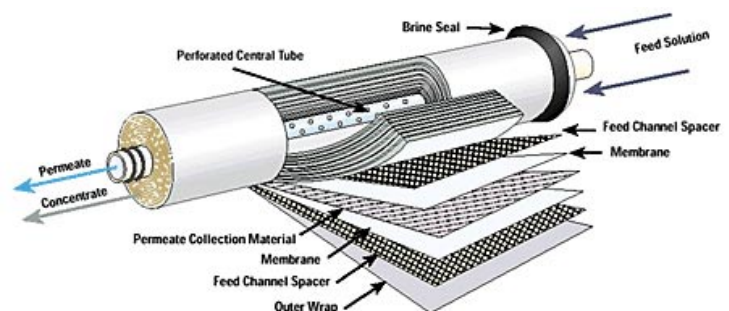


Figura I.8. Módulo de membranas de configuración en espiral y esquema de su funcionamiento

Origen: <http://www.geafiltration.com/html/technology/ftechsys.htm>
<http://aquaoptimal.tripod.com/id3.html>

1.4.6. El problema de la colmatación de las membranas en el tratamiento del lactosuero

El fenómeno de ensuciamiento o colmatación de las membranas ocurre cuando las sustancias a filtrar se acumulan con el consiguiente descenso del caudal. Este fenómeno, que es más acusado en los sistemas de filtración frontal, se produce también en los sistemas de filtración tangencial, aunque de una forma más lenta y progresiva. Se pueden distinguir dos fases básicas en la disminución del flujo a través de la membrana: el fenómeno de polarización de la concentración y el ensuciamiento propiamente dicho. Aunque no están causados por el mismo fenómeno, es habitual que el primero preceda al segundo durante la filtración.

1.4.6.1. POLARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

Es un fenómeno de consecuencias negativas sobre la separación y se presenta en la práctica totalidad de los procesos de membrana, siendo especialmente perjudicial en el caso de la microfiltración, la ultrafiltración y la ósmosis inversa (Rodríguez y col., 2002). Es el responsable de la rápida caída de flujo en los primeros minutos de filtración (Marshall y Daufin, 1995).

Durante el proceso de filtración, la disolución se conduce a la superficie de la membrana por transporte hidráulico. Debido a la naturaleza semipermeable de dicha membrana, una porción del disolvente, con o sin solutos, pasa a través de ella. Esto ocasiona una mayor concentración de solutos en la superficie de la membrana que en el seno de la disolución, de forma que algunos de estos compuestos retornan a ella. El desarrollo de un gradiente de concentración de los componentes retenidos cerca de la membrana es lo que se denomina polarización por concentración. Este fenómeno aumenta rápidamente y es función de las condiciones hidrodinámicas del sistema de membranas. La pérdida de flujo es reversible; si se limpia con agua la membrana, puede recuperarse el flujo si el proceso no ha avanzado (Pal, 1993; Marshall y Daufin, 1995).

Generalmente, los solutos rechazados por la membrana se suelen depositar en su superficie en forma de una capa viscosa y gelatinosa. Esta capa de gel es la que se considera

principal responsable del descenso del flujo de filtración, debido a la resistencia hidrodinámica. Cuando la concentración de solutos de la capa de gel alcanza el punto de sobresaturación, el ensuciamiento o colmatación de la membrana se inicia (Pal, 1993). También se atribuyen los efectos de la polarización de la concentración al incremento en la presión osmótica. Sin embargo, se considera que el efecto de la presión osmótica debe aplicarse a solutos de pequeños tamaños (< 100 kDa), mientras que la limitación ocasionada por la capa de gel es más probable con solutos de gran tamaño (Kelly, 2003). La polarización de la concentración se suele minimizar favoreciendo la turbulencia de la disolución (por aumento de la velocidad de desplazamiento o mediante un diseño adecuado del módulo de filtración), aunque también disminuye bajando la concentración de la alimentación (Pal, 1993; Rodríguez y col., 2002).

1.4.6.2. ENSUCIAMIENTO O COLMATADO POR OBTURACIÓN DE LOS POROS

El ensuciamiento de las membranas es un factor limitante muy importante en los procesos por membranas, especialmente en UF y MF. Este fenómeno es irreversible, ocasionado por la deposición de partículas sólidas, macromoléculas, sales, etc., sobre la superficie o el interior de la membrana. Esto ocasiona un descenso del flujo de filtrado, generalmente rápido en las etapas iniciales y más lento posteriormente (Mulder, 1991). El ensuciamiento se atribuye a (Pal, 1993):

- la acumulación o adsorción de macromoléculas o partículas coloidales, como proteínas, lípidos, microorganismos y/o sales inorgánicas, sobre la superficie de la membrana;
- la precipitación de solutos permeables, tales como azúcares y sales, en los poros de la membrana.

El fenómeno del ensuciamiento es muy complejo y depende de muchos factores físicos y químicos: concentración, temperatura, pH, fuerza iónica e interacciones específicas (enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo) (Mulder, 1991). El ensuciamiento no sólo reduce el flujo, sino que también hace que las operaciones de limpieza sean más difíciles y caras.

a) Ensuciamiento por deposición de proteínas

En general se considera que la deposición de proteínas sobre la membrana juega un papel muy importante en el ensuciamiento. En la UF de sueros se ha observado que la β -lactoglobulina y la seroalbúmina forman hojas de proteína sobre la superficie de la membrana,

sobre todo cerca de la entrada a los poros, uniéndose además componentes de gran tamaño, como microorganismos, γ -globulinas, polímeros y complejos proteicos para formar una estructura de reja, en cuyos huecos quedan atrapadas proteínas más pequeñas (Lee y Merson, 1975, 1976). Las proteínas también se depositan en los poros de las membranas, aunque en mayor cantidad en las de MF, dado su mayor tamaño, que en las de UF; de cualquier forma, es mayor la deposición en la superficie, y ésta es la que domina el comportamiento de la membrana. Las proteínas adsorbidas están fuertemente unidas a la superficie y sólo pueden eliminarse mediante limpieza. Sobre ellas se sitúan muchas capas de proteína, más débilmente unidas. Cambios en la hidrofobicidad de la membrana y la diferencia de carga entre la membrana y la proteína pueden reducir la cantidad de proteína adsorbida; sin embargo, lo que más afecta al flujo de filtrado es la cantidad de proteína depositada y la porosidad de la multicapa proteica. Estos parámetros se pueden controlar modificando las propiedades de la corriente de alimentación, como el pH, la fuerza iónica, el contenido en calcio y el grado de agregación proteica (Marshall y Daufin, 1995).

b) Ensuciamiento por minerales:

La precipitación de calcio y fosfatos sobre la membrana produce un ensuciamiento importante. En el caso del tratamiento del lactosuero, cuando calcio y fosfato están presentes y las condiciones de operación son favorables (pH y temperatura elevados, concentración de calcio y fosfato, etc.) se produce la precipitación y este tipo de ensuciamiento prevalece, aunque con la participación de las proteínas siendo la capa formada densa y poco permeable. Si el contenido en iones de calcio y fosfato disminuye por efecto de un pretratamiento adecuado (por ejemplo, la agregación termocálcica, que elimina también fosfolipoproteínas), las proteínas son el principal constituyente de la capa de colmatación y ésta es más permeable (Daufin y col., 1992, 1993).

c) Ensuciamiento por lípidos:

Aunque no hay evidencias directas de que los lípidos del suero produzcan ensuciamiento, se han propuesto diversos pretratamientos del mismo con el fin de reducir su contenido lipídico que han mejorado los flujos de permeado (Muller y Harper, 1979; Fauquant y col., 1985; Maubois y col., 1987; Rinn y col., 1990). Sin embargo, no es posible determinar si estas mejoras se deben a la reducción lipídica o a cambios en el estado físico-químico de las

proteínas y minerales debido a los pretratamientos. Es posible que la baja concentración de lípidos que suelen poseer los lactosueros corrientes haga destacar la influencia de los otros componentes en el ensuciamiento, ya que cuando los lactosueros poseen alto contenido lipídico se produce un colmatado muy severo y hace necesario reducirlo lo más posible con un pretratamiento (Marshall y Daufin, 1995).

Los fosfolípidos presentes en el suero (0,2-0,4 g/l para la leche de vaca) (Christie y col., 1987) no se pueden separar mediante centrifugación debido a su íntima asociación con materiales proteicos (58% de ellos entran en la composición de la membrana del glóbulo graso y el restante 48% está asociado a proteínas como son la butirofilina o la xantinoxidasa) (Patton y Keenan, 1971). Su presencia origina problemas en el procesado posterior del suero y en los productos deshidratados obtenidos. Los fosfolípidos, que proceden de las membranas de los glóbulos grasos, se concentran durante las etapas del proceso de producción de deshidratados.

Se ha señalado que la presencia de fosfolípidos en los CPS y en el suero antes de su concentración es negativa por varias razones. En primer lugar porque algunas de las propiedades funcionales y organolépticas de los CPS se ven alteradas (especialmente las propiedades espumantes) (Maubois, 1984; Maubois y col., 1987; Pearce y col., 1991); y, en segundo lugar y como ya se ha dicho respecto a los lípidos en general, porque afectan negativamente a los flujos de permeado durante la UF, por lo que el coste de producción de CPS se incrementa de forma significativa (Hiddink y col., 1981; Maubois, 1984; Muller y Harper, 1979). Este último efecto se debe a que, prácticamente de forma independiente al tipo de membranas que se utilicen en la concentración, las características anfífilas de las fosfolipoproteínas hacen que éstas se absorban fácilmente sobre la superficie de las membranas (Lee y Merson, 1976; Maubois y col., 1987; Marshall, 1982).

Debido a la complejidad del fenómeno de ensuciamiento o colmatación, los métodos para reducir este fenómeno son diversos (Mulder, 1991):

1) Pretratamiento del fluido a filtrar:

El ensuciamiento de las membranas debido a los componentes de la leche y del lactosuero es extremadamente dependiente de las propiedades físicas y químicas del fluido tratado. El objetivo general de los pretratamientos es eliminar o inactivar los componentes químicos implicados en el ensuciamiento (Pouliot y Jelen, 1995). Los pretratamientos generales

aplicados al fluido a tratar por membranas incluyen tratamientos térmicos, ajuste del pH, adición de agentes complejantes (EDTA, etc.), clarificación química, pre-microfiltración y pre-ultrafiltración (Mulder, 1991). Actualmente se están proponiendo otros métodos de mejora del funcionamiento de las membranas en el tratamiento de fluidos lácteos, como altas velocidades de flujo cruzado, flujos cruzados pulsantes, inversión de la presión transmembranaria, promotores de turbulencia, ultrasonidos, módulos vibratorios o campos eléctricos (Brans y col., 2004). Por supuesto, los tratamientos aplicables dependerán fundamentalmente del tipo de fluido que se desee tratar. A la hora de elegir un pretratamiento, en concreto de un fluido lácteo, la selección de uno o varios procedimientos se basa en el conocimiento de sus factores de composición, analizando éstos de forma secuencial. La figura I.9 recoge un esquema de decisión básico.

En el caso concreto de la obtención industrial de CPS, se suelen emplear uno o más procesos de UF; su desarrollo depende de forma muy importante de las propiedades físicas y químicas de la alimentación. Los pretratamientos disponibles para el suero suelen ser efectivos sólo para uno de los agentes responsables del ensuciamiento, y además deben adecuarse al diseño del sistema de membranas usado. Las proteínas séricas en forma nativa poseen una fuerte tendencia a adsorberse en los materiales poliméricos, como polisulfonas o poliamidas. Aunque no se conocen exactamente los mecanismos de la adsorción, se ha visto que en este tipo de membranas los tratamientos térmicos suaves disminuyen la colmatación. Para eliminar los fosfatos es necesario, bien precipitar o eliminarlos mediante EDTA o desmineralización, o bien disminuir el pH para asegurar su solubilidad. Sin embargo, este tratamiento puede no ser compatible con CPS con buena funcionalidad. En cuanto a los lípidos residuales, la única opción es eliminarlos (Pouliot y Jelen, 1995).

Por lo tanto, siempre es recomendable algún tipo de pretratamiento del suero, sobre todo para aumentar el flujo de permeado en la UF, ya que el suero contiene muchos compuestos que ensucian de forma importante las membranas. Gran parte de los pretratamientos tenían como objetivo reducir el ensuciamiento de las membranas por la disminución del contenido en sales cálcicas mediante tratamientos térmicos (asociación de Ca^{2+} y proteínas) (Lee y Merson, 1976; de Boer y Hiddink, 1980; Merin y Cheryan, 1980), adición de complejantes y secuestrantes, eliminación de grasa y eliminación de caseína por filtración o decantación (Marshall, 1982). También se ha estudiado la utilidad de emplear quitosano en la eliminación de los lípidos residuales (Hawng y Damodaran, 1995).

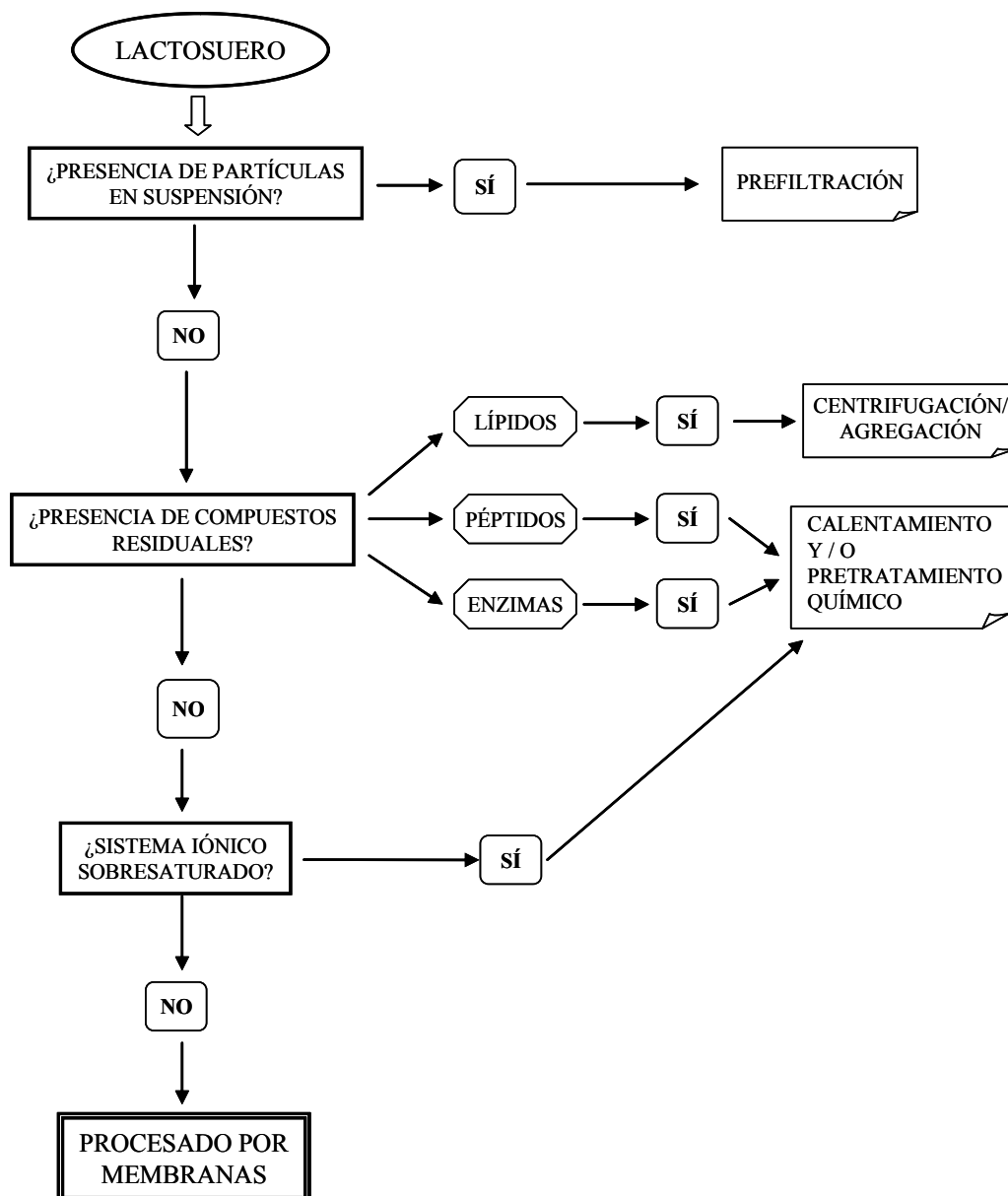


Figura I.9. Diagrama de decisión para la selección de pretratamientos que minimicen el ensuciamiento a largo plazo (Adaptado de Pouliot y Jelen, 1995).

Los pretratamientos propuestos para la eliminación de los fosfolípidos han sido variados aunque algunos de ellos resultan muy costosos o bien inadecuados para la naturaleza alimentaria del producto final (Aragoza y col., 1996). Otros métodos conducen a la obtención de CPS de pH muy bajo, lo que limita su posterior utilización (de Wit y de Boer, 1975; Melachouris, 1977).

Entre todos los pretratamientos, el método de precipitación termocálcica propuesto por Fauquant y col. (1985) ha sido el de mayor éxito. Se basa en la posibilidad de formación de compuestos fosfocálcicos bastante insolubles, del tipo $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ (hidroxiapatita), a temperaturas moderadas y pH próximo a la neutralidad. El método se basa en la modificación de una patente registrada en EEUU por Atterbery en 1971. La técnica consiste en ajustar la concentración de calcio a 1,2 g/l, el pH a 7,3-7,5 y calentar a 50°C por 8 minutos. Con estas condiciones los fosfolípidos se agregan y precipitan con las proteínas que llevan asociadas (Baumy y col., 1990). La agregación producida permite que las sales fosfocálcicas queden retenidas en el concentrado cuando son sometidas a un proceso de microfiltración previo a la UF o puedan ser separadas por centrifugación como propusieron Wasen y Lehman (1989).

Las reducciones de calcio y fósforo después del tratamiento son de alrededor del 60-70%, mientras que se disminuye el contenido en nitrógeno en un 10%. Existe una extensa lista de trabajos en que la técnica basada en la precipitación termocálcica seguida de microfiltración o de centrifugación ha sido utilizada con el objetivo de optimizar la separación de los fosfolípidos y de mejorar las condiciones de procesado del suero y las características funcionales de los deshidratados obtenidos (Baumy y col., 1990; Rinn y col., 1990; Daufin y col., 1993; Gésan y col., 1993, 1995; Pierre y col., 1994; Karleskind y col., 1995a; Aragoza y col., 1996). Por otro lado, algunos autores han destacado las potenciales propiedades funcionales de las lipoproteínas extraídas (Joseph y Mangino, 1998a,b; Maubois, 1984; Maubois y Ollivier 1991). Así, la precipitación termocálcica seguida de MF se presenta como una técnica que permite mejorar mucho el rendimiento de la UF. Maubois y col. (1987) refieren mejoras en los flujos de ultrafiltración del orden de 1,8 veces, utilizando membranas de MF de 0,25 μm .

Más recientemente, Martínez-Hermosilla y col. (2000) han estudiado un pretratamiento que combina agregación termocálcica, adición de EDTA y microfiltración de flujo cruzado de dos fases gas-líquido, tras lo cual efectuaban una ultrafiltración. Este pretratamiento mejora los flujos de UF, aunque se retiene una cantidad considerable de proteínas en el retenido de MF, disminuyendo su contenido en el concentrado de proteínas final. No obstante, concluyen que en caso de que este retenido de MF pueda ser aprovechado en otros productos o fines (contiene altos niveles de seroalbúmina e inmunoglobulinas), el pretratamiento podría tener aplicación práctica.

2) Propiedades de la membrana:

Un cambio en las propiedades de la membrana puede reducir el ensuciamiento. Las membranas más susceptibles a un ensuciamiento más severo son las porosas (MF, UF), mientras que lo son menos las densas (OI). Así, un tamaño de poro estrecho puede reducir el fenómeno. Por otro lado, el uso de membranas hidrofílicas en vez de hidrofóbicas también puede disminuirlo, ya que las proteínas tienen más afinidad por estas últimas (Mulder, 1991).

3) Condiciones del módulo y del procesado:

El fenómeno del ensuciamiento disminuye cuando se reduce la polarización por concentración. Por ello es efectivo el incremento de la turbulencia para prevenirlo (Mulder, 1991).

4) Limpieza:

Aunque se emplee alguno de los métodos ya mencionados, siempre es necesario realizar una limpieza frecuente de las membranas. Hay tres métodos de limpieza, y la elección del más adecuado depende de la configuración del módulo, la resistencia de la membrana y el tipo de agente colmatante (Mulder, 1991):

- Limpieza hidráulica: incluye la inversión del flujo, alternancia de compresión-descompresión y cambios de la dirección del flujo.
- Limpieza mecánica: sólo posible en sistemas tubulares utilizando bolas de esponja de gran tamaño.
- Limpieza química: es el método más importante y se emplean diferentes compuestos químicos por separado o combinados. Los más importantes son los ácidos (perclórico, cítrico), álcalis (hidróxido sódico), detergentes (alcalinos, no iónicos), enzimas, agentes complejantes (EDTA) y desinfectantes (peróxido de hidrógeno).

I.4.7. Aplicaciones de los concentrados de proteínas de suero en la industria alimentaria

Los concentrados y aislados de proteínas de suero presentan muchas aplicaciones en la industria alimentaria debido a sus excelentes propiedades nutritivas y funcionales: poseen un alto contenido en aminoácidos esenciales, son solubles en un amplio rango de pH, presentan propiedades emulsionantes, espumantes y gelificantes, entre otras; además su coste es relativamente bajo (Kilara y Vaghela, 2004). Por lo tanto se utilizan en la elaboración de productos lácteos, cárnicos, salsas, productos de panadería y confitería, bebidas y alimentos para deportistas, entre otros. A continuación se describen sus efectos en estos y otros productos.

I.4.7.1. PRODUCTOS LÁCTEOS

Las proteínas séricas pueden incorporarse a los quesos elaborados de manera tradicional, tanto en forma nativa como desnaturalizada, por diferentes métodos (Lawrence, 1993). Desde hace bastante tiempo se están añadiendo a la leche de quesería concentrados de suero líquidos obtenidos por UF con las proteínas desnaturalizadas por el calor, con el fin de incrementar el rendimiento y el valor nutritivo, aunque en ocasiones pueden aparecer sabores y texturas poco agradables (Jameson y Lelievre, 1996). Más recientemente se han desarrollado estudios sobre la adición de CPS a diversos tipos de quesos (Lucey y Gorry, 1994; Santoro y Faccia, 1996), así como de CPS y APS con proteínas particuladas, sometiendo estos productos a calentamiento y agitación simultáneos, obteniendo quesos con sabores normales o algo ácidos y con texturas más blandas lo que puede permitir desarrollar nuevas variedades de estos productos lácteos (Hinrichs, 2001). Los CPS también se añaden a quesos procesados y quesos cremosos para extender, incrementando la unión de agua y grasa sin afectar al sabor (de Wit, 1989). Se ha visto además que mejoran la textura, siendo más cremosa y con más cuerpo, mejoran el color y apariencia e incrementan el valor nutritivo al aumentar el contenido proteico y de calcio. Las cantidades empleadas varían con el tipo de producto de lactosuero: 4-8% de suero dulce en polvo, 1-5% de CPS ó 0,5-1% de APS (Young, 1999a).

Los efectos del uso de CPS como sustituto parcial de la leche en polvo desnatada en la fortificación de la leche durante la elaboración de yogur son bastante variables sobre todo en la

textura, ya que algunos autores afirman que no tiene apenas efecto en la firmeza (Jelen y col., 1987; Morris y col., 1995), mientras que otros han observado una disminución de la misma y mayor suavidad (Modler y Kalab, 1983; Guzmán-González y col., 1999; Remeuf y col., 2003); incluso en otros casos se ha señalado un incremento de la firmeza de los yogures (Lucey y col., 1999; Puvanenthiran y col., 2002). Estos diferentes resultados se pueden deber a los diferentes instrumentos y tests utilizados para medir la fuerza del gel o bien a las variaciones en la preparación de los CPS utilizados (Puvanenthiran y col., 2002). Por otro lado, parece que el uso de CPS reduce la sinéresis del yogur (de Wit, 1989; Hugunin, 1999; Puvanenthiran y col., 2002). Los concentrados de proteínas de suero convencionales solos o mezclados con proteínas de suero microparticuladas, cuando se emplean como reemplazantes de la grasa en yogures bajos en calorías, proporcionan una textura similar a la de los yogures enteros (Sandoval-Castilla y col., 2004).

La industria elaboradora de helados ha buscado productos que puedan reemplazar parte de los sólidos provenientes de la leche desnatada empleada normalmente con el fin de ajustar los costes de elaboración (de Wit, 1989). Habitualmente se añaden a las fórmulas para fabricar helados un 10% de sólidos lácteos no grasos; cuando se añaden derivados del lactosuero se recomienda añadir 1,5-3% de CPS con 34% de proteína ó 0,5-2% de CPS con el 80%, e incluso cantidades menores para los APS, y aproximadamente el 7% de sólidos lácteos no grasos. Se pueden además obtener productos bajos en grasa. Proporcionan mayor estabilidad a la descongelación, sirven de sustitutos de otros emulsionantes e incrementan la incorporación de aire (Young, 1999b).

Los productos con proteínas de suero, tanto concentrados como los permeados de UF obtenidos durante su elaboración, pueden utilizarse también para estandarizar el contenido proteico de la leche de partida para fabricar productos lácteos (Jelen, 1998; Tong, 2004). Además, en función del producto elegido, se podrá incrementar en mayor o menor medida el contenido en lactosa, aspecto que en algunos productos lácteos puede ser interesante (por ejemplo si se desea modificar el punto de congelación o el sabor dulce). En cualquier caso, esta estandarización no debería modificar apenas la relación natural caseínas:proteínas del suero y también es preciso controlar los posibles cambios en el contenido de nitrógeno no proteico, dada su influencia en el valor nutritivo y las propiedades funcionales (Tong, 2004).

I.4.7.2. PRODUCTOS CÁRNICOS Y PESQUEROS

El uso de ingredientes lácteos para reemplazar o suplementar la funcionalidad de las proteínas cárnicas es muy común. En los productos cárnicos, las proteínas han de poseer dos propiedades funcionales principales: la capacidad de retener agua y la capacidad de formar y estabilizar emulsiones. Además en algunos productos, como los tratados por el calor, es importante la facultad de formar geles por calentamiento (de Wit, 1989, 2003; Keaton, 1999). Los CPS, en concentraciones del 0,25%, incrementan tanto la capacidad emulsionante como la estabilidad de las emulsiones cárnicas, como se ha comprobado en carnes de diferentes especies (Kurt y Zorba, 2005). Además mejoran las características de loncheado, reducen las pérdidas por cocinado y los costes de fabricación, permitiendo sustituir en parte a las proteínas cárnicas y a otros componentes, como proteínas de soja y ciertos estabilizantes (almidón, alginatos, etc.) (Keaton, 1999). Así mismo, son útiles en la elaboración de jamones cocidos, siendo incluidos en la salmuera de inyección (de Wit, 2003).

También se emplean en la fabricación de carnes reestructuradas, donde actúan en la unión de los trozos de carne especialmente durante el calentamiento al que se puedan someter durante su elaboración o previo a su consumo, debido a la capacidad de formar geles por calor (Keeton, 2004). Además actúan como "mimetizadores" de grasa, permitiendo fabricar productos cárnicos como hamburguesas o salchichas tipo Frankfurt con contenido graso reducido, añadiéndoles 3-4% de CPS (a veces combinado con carragenatos), con buenas características sensoriales y menores pérdidas por cocinado (Johnson, 2000b; Keeton, 2004). Mediante la adición de CPS se puede reducir el contenido graso de los productos por debajo del 10% (Mangino, 1999). También se ha utilizado un reemplazante de la grasa sólida, constituido por gel de proteínas de suero (enriquecido en β -lactoglobulina) particulado junto con hidrocoloides y cierta cantidad de grasa emulsionada, obteniéndose productos muy similares a los convencionales. Además se incluye en las líneas de fabricación sin problema y sólo es un poco más caro que la grasa (Pearce y col., 1998). También pueden resultar útiles en la fabricación de productos con contenido de sal reducido, empleando APS precalentados, presentando capacidades de retención de agua más altas, menores pérdidas por calentamiento y mejoras de textura sobre todo con un contenido en sal menor del 1,5% (Hongsprabhas y Barbut, 1999).

La utilización de CPS en los productos pesqueros, en concreto los derivados del surimi, es básicamente como modificador de la textura, debido a su capacidad gelificante, y como

incrementador de la retención de agua. Además los concentrados son inhibidores de las proteinasas autolíticas, causantes de la hidrólisis de las proteínas miofibrilares, que son las responsables de las propiedades de estos productos; se ha visto que la adición de un 3% de CPS con 80% de contenido proteico inhibe de forma muy efectiva esta actividad enzimática (de Wit, 2003; Keeton, 2004). Los CPS son además económicamente competitivos con otros ingredientes comunes del surimi, como el almidón de patata y la proteína de plasma bovino (Hsu y Kolbe, 1996).

I.4.7.3. SALSAS, CREMAS Y SOPAS

Los CPS son también ingredientes importantes en productos como salsas y cremas comercializadas como tales o bien aquéllas incorporadas a diversos productos precocinados. Así, constituyen una fuente barata de sólidos, proporcionan viscosidad, aromas y sabores agradables, y actúan como emulsionantes (Mangino, 2003). Las proteínas del suero contribuyen a la formación de la salsa disminuyendo la tensión interfacial y estabilizando el film formado en la interfase (Christiansen y col., 2004). Además pueden utilizarse sin problemas en productos con pH reducido dada su alta solubilidad en medios ácidos y compiten con ventaja en cuanto a costo con la yema de huevo, muy utilizada en algunas salsas (de Wit, 1989). También son útiles en la elaboración de salsas con contenido graso reducido, en las que, además de actuar como emulsionante, ayudan a dar mayor opacidad y dan una apariencia semejante a salsas con gran cantidad de grasa, reteniendo además el agua que es necesario añadir en mayor cantidad en las formulaciones (Johnson, 2000b).

I.4.7.4. PRODUCTOS DE PANADERÍA, PASTELERÍA, CONFITERÍA Y APERITIVOS

Los CPS son ingredientes muy comunes en la industria panadera y pastelera debido en buena parte al sabor lácteo y a la mayor blandura que imparten a los productos, además de mejorar el valor nutritivo, el color y la apariencia de los mismos, sirviendo también para reemplazar total o parcialmente a los huevos en la elaboración. Además de ligar gran cantidad de agua a temperatura ambiente, algunos CPS muestran un amplio rango de temperaturas de desnaturalización, lo cual tiene interés porque la desnaturalización se ve afectada por el efecto estabilizador de los azúcares añadidos y la mayor localización de las proteínas en las películas interfaciales que en solución. Cuando se añaden CPS a estos productos es posible disminuir la cantidad de gasificante añadido (Burrington, 1999; de Wit, 2003; Strouts, 2004).

En algunos productos de confitería, las proteínas de suero contribuyen a su textura, como ocurre en el “nougat”, en algunos caramelos blandos o en coberturas de chocolate. Incluso cuando la cantidad de proteínas no sea muy alta en algunos de ellos, la textura se relaciona con el tipo de la misma, el nivel de inclusión y las condiciones de procesado. En aquellos productos en los que exista una espuma, como los merengues, también las proteínas tienen importancia (Boutin, 2004). En ellos pueden incluso sustituir a la clara de huevo (de Wit, 2003). Los CPS se emplean como fuente de sólidos lácteos en la formulación de envolturas con aroma a chocolate con leche para helados o barritas dulces. La presencia de lactosa en mayor o menor proporción en los CPS, conjuntamente con la presencia de las proteínas y otros azúcares reductores añadidos, permiten el desarrollo de la reacción de Maillard de forma adecuada para el color y el sabor durante la elaboración de caramelos, toffes y chocolate con leche (Bouzias, 1999).

En la fabricación de aperitivos o *snacks*, los CPS son buenos portadores de sabores y aromas, ejerciendo también un efecto de intensificación de los mismos, aspecto también en el que está implicada la lactosa; aunque su contenido puede variar en función del producto de suero utilizado, generalmente se suelen aplicar CPS de bajo contenido proteico (35% aproximadamente), en los que este disacárido es más abundante. Además, modifican la textura mediante la formación de geles térmicos irreversibles y, cuando se incluyen en los saborizantes, dan lugar a sensaciones más suaves en la boca. Finalmente, incrementan el valor nutritivo de estos productos (Johnson, 2000a).

1.4.7.5. BEBIDAS

La buena solubilidad y el sabor suave de las proteínas de suero nativas en un intervalo de pH muy amplio son atributos especialmente importantes para emplear los CPS en bebidas refrescantes. La adición de estos productos hasta concentraciones del 1% de proteína permite obtener bebidas con mayor calidad nutricional sin modificaciones de sabor y apariencia, aunque el precio del producto se incrementa. Además el sabor y la solubilidad permanecen tras la pasteurización del producto envasado (de Wit, 2003). Las proteínas de suero presentan un buen comportamiento cuando se añaden junto con hidrocoloides de celulosa y carragenatos en productos con pH menos ácidos. Por otro lado, las pectinas estabilizan a estas proteínas en productos de pH reducido (Burrington, 2004a). En bebidas lácteas, las proteínas del suero proporcionan mayor cuerpo y suavidad, mejoran el sabor (especialmente en productos bajos en grasa), reducen costes de fabricación, presentan capacidad tampón (afecta a la supervivencia en

el estómago de las bacterias prebióticas), sustituyen a otros estabilizantes y aumentan el contenido proteico y de calcio (Lagrange y Pasin, 2004). El uso de productos de suero en bebidas funcionales se tratará en el apartado I.4.7.8.

I.4.7.6. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES

Las películas comestibles son polímeros naturales obtenidos de proteínas vegetales y animales, que actualmente presentan un gran interés no sólo porque mejoren la apariencia y conservación de los alimentos, sino también porque son respetuosas con el medio ambiente, biodegradables y reducen el uso de otros envases. Los efectos de la desnaturalización por el calor en las proteínas del suero, sobre todo de la β -lactoglobulina, permiten formar películas insolubles en agua útiles para recubrir alimentos. Las películas comestibles fabricadas con CPS o APS presentan muchas aplicaciones potenciales en la industria alimentaria. Se están estudiando películas que actúen como barreras frente al oxígeno para productos con nueces, cubiertas modificadoras de la atmósfera para frutas y verduras, o mantenedoras de la integridad de productos frágiles como alimentos liofilizados. También se estudia la formación de estas películas mediante extrusión para obtener bolsas que contengan leche, sopas o bebidas en polvo (Khwaldia y col., 2004; Krochta y Foegeding, 2004). El uso de películas formadas por CPS polimerizados ayuda a la carne a retener el agua durante el calentamiento sin afectar su textura. Si además se integran con agentes antimicrobianos, inhiben de forma efectiva el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos, incluyendo a *Listeria monocytogenes* (Keeton, 2004).

I.4.7.7. ALIMENTOS PARA GRUPOS CON NECESIDADES NUTRITIVAS ESPECIALES

Los alimentos para lactantes se basan generalmente en leche de vaca, empleando la leche humana como el modelo ideal que se intenta imitar. Una de las principales diferencias entre ambas es la relación proteínas séricas:caseína, que en la leche humana es de 60:40 y en la de vaca de 18:82; otra es que la leche humana no contiene β -lactoglobulina y la proporción de α -lactalbúmina es bastante superior (30% en humana frente al 19% en vaca). Por lo tanto, suele aumentarse la proporción de proteínas del suero mediante la adición de concentrados. El incremento de concentración mediante adición de fracciones, como de α -lactalbúmina, es especialmente interesante, aunque en ocasiones resulta demasiado caro para la mayoría de los productos comerciales (Lloyd, 2004). No obstante, no sólo es importante la relación entre tipos

de proteínas, sino también la concentración en el plasma sanguíneo de los niños de aminoácidos esenciales. Se ha visto que, para lograr una concentración plasmática similar a la conseguida con la lactancia natural, la proporción de proteínas de suero:caseínas debe ser 48:52 (O'Connor y col., 1997), dada la diferencia en la composición aminoacídica de las proteínas humanas y las bovinas. Por otro lado, es necesario minimizar la destrucción de componentes de la leche (particularmente los del suero) durante el procesado, optimizando los tratamientos térmicos clásicos o bien investigando nuevas técnicas de conservación en condiciones suaves, como la pasterización a alta presión o la microfiltración (de Wit, 1998). El uso de hidrolizados de proteínas de suero parece tener bastante efectividad en la alimentación de niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca, eliminando la aparición de los síntomas y con ventajas en cuanto a coste, sabor y olor respecto a los hidrolizados de caseínas utilizados tradicionalmente (Halcken y col., 1993; Odelram y col., 1996). Las fórmulas para niños de mayor edad (de 1 a 3 años) también comienzan a suplementarse con proteínas de suero (Lloyd, 2002).

Los CPS, APS y los hidrolizados de proteínas de suero se utilizan frecuentemente en la elaboración de alimentos dietéticos y para deportistas, ya que presentan un aprovechamiento muy eficiente, una alta digestibilidad y son una fuente excelente de aminoácidos esenciales. Se suelen comercializar como suplementos dietéticos, bebidas y barritas proteicas, galletas e incluso en forma de tabletas (Pasin y Miller, 2000; Lee, 2004).

La incorporación de productos con alto contenido en proteínas de suero a alimentos especialmente destinados a personas de edad avanzada es muy interesante por diversas razones: son una fuente de excelentes proteínas con alto contenido en aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina, valina) y de aminoácidos esenciales, y además contienen proteínas y péptidos bioactivos. Su incorporación a la dieta de este grupo de personas ayuda a incrementar la síntesis de proteínas musculares, la absorción de calcio en el intestino (por acción de las proteínas y por el contenido en calcio de los productos de suero), mejoran la digestión e incluso algunas proteínas parecen poseer actividades antimicrobianas, antihipertensivas e inmunoreguladoras (Walzem y col., 2002; Kreider y Lloyd, 2004).

I.4.7.8. APLICACIONES EN ALIMENTOS FUNCIONALES

Los nutracéuticos o alimentos funcionales son alimentos o ingredientes de los mismos que proporcionan beneficios médicos o sobre la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento

de enfermedades. Ejemplos de estos alimentos son las proteínas bioactivas, los probióticos y los prebióticos (de Wit, 2003). El cada vez mayor interés en la investigación sobre las propiedades terapéuticas de las proteínas lácteas en general y de las séricas en particular (o de sus derivados) sugiere un futuro prometedor para este tipo de aplicaciones.

Se han descrito en los últimos años numerosas actividades biológicas, tanto de las proteínas de lactosuero mayoritarias como de componentes nitrogenados que se encuentran en menor proporción; en muchos casos no se conoce todavía el factor específico responsable de estos efectos o si éste aparece tras sufrir el ataque de las enzimas digestivas. También es importante señalar que muy a menudo se trata de resultados de pruebas *in vitro* o sobre animales y que no se han realizado todavía ensayos clínicos (Harper, 2004). Así, se han observado actividades biológicas en los siguientes productos de suero o en componentes de ellos:

- a) En los concentrados de proteínas de suero, o en las proteínas de suero totales, se ha observado que proporcionan actividades antivirales y anticancerígenas, controlan la microflora intestinal, tienen actividad inmunoestimuladora y disminuyen el contenido de colesterol sanguíneo (McIntosh y col., 1998). En algunos casos, los CPS y los APS contienen suficiente concentración de componentes para proporcionar funcionalidad fisiológica, pero en otros casos es necesario aislar el componente concreto (Harper, 2004).
- b) La β -lactoglobulina no tiene un papel biológico específico conocido, de hecho está ausente de la leche de algunas especies como la humana. Sin embargo, une minerales, vitaminas liposolubles y lípidos, y contiene elevada cantidad de aminoácidos ramificados (Walzem y col., 2002; Kreider y Lloyd, 2004). Además parece que incrementa la protección frente al cáncer de colon (McIntosh y col., 1998).
- c) La α -lactalbúmina parece tener efectos anticancerígenos y antimicrobianos, incrementa la inmunidad, la producción de serotonina, disminuye los niveles de cortisol, reduce el estrés y tiene efectos opiáceos (Harper, 2004; Kreider y Lloyd, 2004)
- d) La seroalbúmina tiene propiedades antioxidantes y antimutágenas (Bosselaers y col., 1994; Tong y col., 2000).
- e) Las inmunoglobulinas proporcionan inmunidad pasiva. Aunque este efecto era bien conocido en niños, actualmente se está estudiando en la dieta de adultos (Kreider y Lloyd, 2004).

-
- f) La lactoferrina posee propiedades antioxidantes, antivirales y antibacterianas, previniendo el crecimiento de microorganismos patógenos en el intestino, estimula el sistema inmunológico, regula el metabolismo del hierro, controla los daños celulares y tisulares (anticancerígena) y es antioxidante y antiinflamatoria (Caccavo y col., 2002; Tsuda y col., 2002). Se utiliza ya en aplicaciones comerciales como alimentos infantiles, para deportistas y alimentos funcionales (Lloyd, 2002).
- g) La lactoperoxidasa tiene actividad antibacteriana, antioxidante e incrementadora de la inmunidad (Wong y col., 1997).
- h) El glucomacropéptido parece tener actividades antivirales, anticancerígenas, contra la agregación plaquetaria, antihipertensiva e inmunomoduladora y además disminuye el apetito (Brody, 2000). Por otro lado, al carecer de fenilalanina, se emplea en la formulación de alimentos para pacientes con fenilcetonuria. Es un factor de crecimiento de las bifidobacterias y controla la microflora intestinal, aplicaciones ya comercializadas (Harper, 2004).
- i) Péptidos bioactivos: la bioactividad de algunas proteínas séricas puede estar ausente o ser incompleta en la molécula nativa y sólo aparece cuando se rompen en péptidos por proteólisis; esto suele ocurrir durante el procesado de los alimentos, por hidrólisis inducida (algunos alimentos infantiles), por enzimas endógenas del alimento o por la actividad microbiana en alimentos fermentados, o incluso también por acción de las enzimas digestivas. Una vez liberados, los péptidos pueden actuar como compuestos reguladores con una actividad similar a la de las hormonas. Dicha actividad se basa en la composición aminoacídica y la secuencia, y generalmente contienen entre 3 y 20 restos aminoacídicos por molécula (Pihlanto-Leppälä, 2001). Algunos péptidos derivados de las proteínas séricas son las α y β lactofinas (derivadas respectivamente de la α -lactalbúmina y de la β -lactoglobulina), las lactoferroxinas (derivadas de la lactoferrina), que actúan como antagonistas de opiáceos; las lactoforinas (derivadas de la α -lactalbúmina y de la β -lactoglobulina) y la seroforina (de la seroalbúmina) que tienen actividad opiácea; la lactoferricina (también derivada de la lactoferrina), con propiedades antimicrobianas, y las casoplatelinas (procedentes del glucomacropéptido), con propiedades antitrombóticas (Fox y Flynn, 1992; Meisel, 1998; Schanbacher y col., 1998; Tomé y Debabbi, 1998; Gerdes y col., 2001).

Existen además compuestos no nitrogenados en el suero y sus derivados que son bioactivos. La lactosa es un prebiótico que promueve el crecimiento de bacterias beneficiosas y es precursor de otros compuestos bioactivos, como la lactulosa o el ácido lactobiónico (Walzem y col., 2002). Aunque la concentración de lípidos suele ser baja en el suero, las bioactividades de la esfingomielina y el ácido linoleico conjugado son de potencial interés sobre la salud. Los esfingolípidos complejos y sus productos de digestión, las ceramidas y esfingosinas, son compuestos con efectos en la regulación celular (Vesper y col., 1999). El impacto del ácido linoleico conjugado, dado su papel en la modulación del metabolismo de macronutrientes, se centra en aspectos como la prevención del cáncer, la obesidad, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Belury, 2002).

I.4.7.9. APLICACIONES DE PRODUCTOS DE PROTEÍNAS DE SUERO MODIFICADAS

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones relacionadas con productos derivados de las proteínas del lactosuero bovino modificadas, aunque en algunos casos ya existen productos comerciales. Uno de estos productos se elabora a partir de proteínas séricas sometidas en disolución a un tratamiento térmico de 70-90°C durante 5-60 min, de manera que se sufran una desnaturalización pero sin que aparezca una agregación inmediata. Ésta se consigue posteriormente en frío mediante la adición de sales. Los productos obtenidos son útiles como reemplazantes de otros gelificantes y espesantes habitualmente empleados en la elaboración de productos cárnicos, postres o salsas (Bryant y McClements, 1998; Johnson, 2000b). También se está trabajando en el campo de la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero bajo condiciones controladas, que parece mejorar sus propiedades espumantes y emulsionantes, permitir la formación de geles sin aplicación de calor, e incrementar la estabilidad frente a los tratamientos térmicos; incluso se mejora la absorción intestinal en relación a la proteína intacta y puede reducir los fenómenos alérgicos (Doucet y col., 2001). Por otra parte, ya se encuentran en el mercado productos de proteínas del suero modificados, como los CPS extruidos, con un contenido proteico del 50%, que se aplican, con el fin de mejorar su textura y propiedades nutritivas, en barritas proteicas, cereales y en productos cárnicos (Foegeding y Luck, 2003).

I.5. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO Y DE LOS CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DE SUERO

Las proteínas juegan un papel vital en la expresión de los atributos sensoriales de muchos alimentos debido a las propiedades físico-químicas únicas que poseen y que suelen denominarse propiedades funcionales. Existen numerosas definiciones de propiedades funcionales. Las propiedades funcionales de las proteínas se pueden definir como aquellos atributos físico-químicos que hacen que sean útiles en los alimentos, o bien como aquellas propiedades físicas y químicas que afectan al comportamiento de las proteínas en sistemas alimentarios durante el procesado, almacenamiento, preparación y consumo (Damodaran, 1996). Sin embargo, hay otros aspectos a tener en cuenta, además de estas propiedades fundamentales, para que un ingrediente proteico pueda ser utilizado: debe estar libre de componentes tóxicos y factores antinutritivos, de sabores, aromas y colores extraños, y ser compatible con otros ingredientes de la formulación, así como con los procesos a los que pueda ser sometido durante la elaboración del alimento (Morr, 1979; Kilara y Vaghela, 2004).

Las propiedades funcionales de las proteínas se relacionan con sus propiedades físicas, químicas y estructurales intrínsecas. Éstas incluyen el tamaño, forma, composición y secuencia aminoacídica, carga neta y distribución de la carga, y relación hidrofobia/hidrofilia. Las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, los enlaces inter- e intrapeptídicos (enlaces disulfuro), la rigidez o flexibilidad molecular en respuesta a los cambios ambientales, y la naturaleza y extensión de las interacciones con otros componentes son también importantes (Damodaran, 1996). Cuando se aplican en la elaboración de alimentos, las propiedades funcionales de los CPS se ven además influidas por su propia composición, la composición del alimento al que se añaden, y por las condiciones requeridas para la fabricación de éste. Por ejemplo, su funcionalidad está afectada por el pH y la composición iónica, la concentración de azúcares, estabilizantes, emulsionantes y lípidos en el alimento, además de por los tratamientos que sufre el mismo: tratamientos térmicos, congelación, concentración, deshidratación, etc. (Morr y Ha, 1993). Además las propiedades intrínsecas de las proteínas de suero están influidas por la fuente de suero, el pretratamiento y las condiciones de procesado; sin embargo, parece que las diferencias en funcionalidad en los CPS están más relacionadas con la modificación proteica durante la fabricación de queso o caseína ácida que el propio proceso de elaboración de los concentrados (De la Fuente y col., 2002).

Existen diversas propiedades funcionales de las proteínas de interés: interacciones proteína-agua (incluye solubilidad, viscosidad, capacidad de unir agua), propiedades espumantes y emulsionantes, capacidad de formar geles, etc. La mayoría de los alimentos procesados son geles, emulsiones o espumas, y la capacidad de las proteínas de desarrollar estas estructuras está muy relacionada con su solubilidad (Damodaran, 1996; Zayas, 1997). A continuación describiremos las principales propiedades funcionales de las proteínas del suero en relación a sus aplicaciones en la industria alimentaria.

I.5.1. Solubilidad

La solubilidad es a menudo considerada como un prerrequisito para el desarrollo de otras funcionalidades y para que se pueda aplicar en la elaboración de numerosos alimentos (Kinsella, 1976). Las proteínas del suero nativas son altamente solubles, especialmente si se las compara con los caseinatos o la proteína de soja, en un amplio intervalo de concentraciones, valores de pH, temperatura, actividad de agua y condiciones iónicas (Morr, 1989). La solubilidad proteica tiene muchas definiciones, ya que las proteínas, en un medio acuoso, pueden formar soluciones verdaderas o coloidales, o suspensiones de partículas insolubles (Borderías y Montero, 1988). Desde el punto de vista termodinámico, la solubilidad de una proteína es la concentración de dicha proteína en el disolvente en un sistema con una o dos fases (solución proteica en fases líquido-líquido o líquido-sólido) en el estado de equilibrio (Vojdani, 1996).

La solubilidad de las proteínas séricas está influida, además de por factores intrínsecos de las moléculas, por el pH de disolución, la fuerza iónica del medio y el efecto del calentamiento. La solubilidad de las proteínas del suero es pH-dependiente, de forma que la solubilidad disminuye a medida que desciende el pH hacia su punto isoeléctrico que se sitúa alrededor de 4-5 (Morr y Ha, 1993), aunque aún en este caso siempre es superior al 68% (Hung y Zayas, 1992). De hecho, la β -lactoglobulina es casi soluble al 90% a su pl en solución acuosa (1mg/ml en agua, pH 5,1) y la α -lactalbúmina en un 68% a pH 5,0 a la misma concentración (Vojdani, 1996). Esto hace que puedan ser empleadas en alimentos con pH ácido sin problemas, aunque la solubilidad de las proteínas del suero en CPS comerciales puede ser relativamente baja incluso a pH neutro y presenta una gran variabilidad; se han citado valores que oscilan entre el 35 y el 91% (de Wit y col., 1986; Liao y Mangino, 1987). Esta variación se ha atribuido a los

tratamientos aplicados durante la obtención de CPS y APS, que pueden a veces producir cierto grado de desnaturalización, tendiendo a disminuir la solubilidad. Ésta no suele verse alterada por la ultrafiltración o la deshidratación por atomización, aunque sí por los tratamientos térmicos que puede sufrir el suero (Singh, 2003). El pH y la temperatura presentan una gran interacción entre ambos a la hora de influir en la solubilidad proteica (Pelegri y Gasparetto, 2005).

La temperatura es el factor más importante que afecta a la solubilidad de las proteínas de suero y sus derivados. En general la solubilidad aumenta al incrementarse la temperatura entre 0 y 40-50°C. El incremento de la temperatura desordena progresivamente las moléculas de proteína y disolvente mediante la rotura de enlaces iónicos y de hidrógeno, que desestabiliza la estructura proteica y causa desplegamiento, reversible o irreversible. Cuando se produce el desplegamiento, los grupos hidrofóbicos (como los enlaces sulfhidrilo) inicialmente ocultos en el interior, interaccionan y reducen la unión con el agua. Si es irreversible, las interacciones proteína-proteína se intensifican y se produce agregación y precipitación (Robin y col., 1993; Vojdani, 1996). La β -lactoglobulina es muy sensible a la desnaturalización por el calor, aunque el grado de desnaturalización de ésta y otras proteínas del suero depende de otros factores, siendo mayor alrededor de su pI y disminuye con la concentración proteica (de Wit y Klarenbeek, 1984).

El efecto de los tratamientos térmicos que puede sufrir el suero durante la fabricación de los CPS es fuente de contradicción entre diversos autores. La pasterización del suero puede causar hasta un 20% de desnaturalización con la consecuente pérdida de solubilidad según algunos (Singh, 2003), mientras que otros afirman que afecta muchísimo más el calentamiento del retenido de UF (Morr, 1987a); así, la solubilidad de los CPS no disminuye con un tratamiento a 65°C 30 minutos (Schmidt y col., 1986), pero la pasterización del retenido a 72°C 15 segundos la disminuye (Mangino y col., 1987). También una desnaturalización parcial, bien durante la obtención de los CPS o bien en el procesado de los alimentos a los que se añade, hace a la solubilidad de las proteínas mucho más sensible a los efectos del pH y de las sales (de Wit, 1984).

En cuanto al efecto de la presencia de sales y la fuerza iónica, la solubilidad de las proteínas globulares se incrementa cuando lo hace la concentración de las sales neutras (*salting-in*) hasta alcanzar un máximo, a partir del cual si aumenta aún más la concentración disminuye la solubilidad (*salting-out*). En este punto hay una competencia entre la proteína y los iones de la sal por unirse al agua (Vojdani, 1996). Los CPS con alto contenido en cenizas suelen

mostrar una baja solubilidad; en el otro extremo se encuentran los APS, obtenidos por intercambio iónico, que poseen un 95% de contenido proteico con valores cercanos al 100% de solubilidad (Morr, 1987b). En concreto, el contenido en calcio está correlacionado negativamente con la solubilidad. La solubilidad mejora si se sustituyen por iones sodio antes de la UF y la deshidratación, sobre todo a valores de pH entre 4,5 y 5,5 (Zayas, 1997). La solubilidad de los CPS se ve poco afectada por la adición de NaCl (Renner y Abd El-Dalam, 1991).

La disolución de la proteína de los CPS implica una serie de fenómenos: a) dispersión de las partículas de polvo en el disolvente para permitir la hidratación; b) disociación de los solutos de pequeño tamaño y los complejos moleculares de proteínas mediante el debilitamiento de los enlaces inter- e intramoleculares; y c) reorganización de las estructuras de las moléculas proteicas mediante la rotura de enlaces electrostáticos y puentes de hidrógeno, para permitir que los residuos hidrofílicos se proyecten dentro de la solución, pero manteniendo los enlaces hidrofóbicos de forma que los residuos hidrofóbicos estén protegidos del ambiente acuoso (Morr y Ha, 1993).

En la mayoría de los alimentos procesados, la elaboración se simplifica y la consistencia del producto mejora cuando se emplean ingredientes solubles y fáciles de dispersar. La solubilidad elevada es especialmente importante en bebidas y en sopas y salsas, de manera que no se formen precipitados o sedimentos. En otros productos, como productos cárnicos picados, aderezos de ensaladas, productos lácteos y de panadería, son más importantes otras propiedades funcionales, pero igualmente éstas se ven afectadas por la solubilidad proteica (Burrington, 2004b)

1.5.2. Propiedades emulsionantes

Un grupo muy importante de propiedades funcionales son las de superficie, que incluyen las propiedades emulsionantes y espumantes. Se deben a la habilidad de las proteínas para reducir la tensión interfacial entre componentes hidrofóbicos e hidrofílicos en los alimentos, y están estrechamente relacionadas con la solubilidad de la proteína (Bech, 1981). No obstante, las proteínas no sólo disminuyen dicha tensión, sino que también inhiben activamente la coalescencia mediante la alteración de las propiedades viscoelásticas de la interfase. El material adsorbido puede también prevenir la aproximación de las gotas de aceite (en las emulsiones aceite en agua) haciendo que las superficies tengan suficiente carga para repelerse o creando

una capa superficial extendida, que también dificulta el acercamiento. Cuando las proteínas se adsorben en una interfase aceite-agua, las regiones hidrofóbicas de su molécula se sitúan, o posiblemente se disuelven de forma parcial, en la fase de aceite, mientras que las regiones hidrofílicas se disponen hacia la fase acuosa (Dalgleish, 2004). Una vez adsorbidas, algunas proteínas son capaces de interactuar químicamente formando enlaces disulfuro intermoleculares, como ocurre con la β -lactoglobulina o la α -lactalbúmina, (Dickinson y Matsumura, 1991; Damodaran y Anand, 1997) aunque esta reacción no ocurre en solución a menos que las proteínas estén desnaturalizadas por el calor (Foegeding, 1989). La desnaturalización superficial de las proteínas adsorbidas es parcialmente reversible en la α -lactalbúmina, pero causa cambios irreversibles en la β -lactoglobulina (Dalgleish, 2004).

Cuando se habla de las propiedades emulsionantes, se emplean a menudo dos expresiones: capacidad emulsionante y estabilidad de la emulsión. La capacidad emulsionante es la cantidad de aceite que puede ser emulsionada por cierta cantidad de proteína antes de que se produzca una inversión de fase o que la emulsión se colapse. La estabilidad de la emulsión es la habilidad de una proteína para formar una emulsión y que ésta permanezca sin cambios por un cierto período de tiempo y bajo determinadas condiciones (Hill, 1996). Además se suele manejar otro concepto, el de actividad emulsionante, que se refiere a máxima área interfacial por unidad de proteína de una emulsión estabilizada en sistemas bien definidos (de Wit y col., 1988). En general, la capacidad emulsionante de los CPS es baja en relación a su actividad emulsionante y a la estabilidad de las emulsiones que forma (Renner y Abd El-Salam, 1991).

La concentración de proteína, el tipo de la proteína, el pH y la concentración en sales afectan la capacidad emulsionante de una solución proteica (Klemaszewski y col., 1992; Cayot y Lorient, 1998). Otros factores que afectan la capacidad emulsionante son la competencia entre proteínas (Dalgleish y col., 1991) o entre proteínas y otras moléculas (p.ej. fosfolípidos) (Dickinson y Tanai, 1992) para la adsorción en la interfase.

Se ha observado que la capacidad emulsionante de la β -lactoglobulina es superior a la de la α -lactalbúmina y la seroalbúmina (Klemaszewski y col., 1992; Zayas, 1997); esto se explica por el hecho de que las dos últimas poseen una integridad estructural (debida a la presencia de puentes disulfuro) que les impide una rápida dispersión en la interfase, lo que origina una película más débil. La β -lactoglobulina es más flexible y produce gotículas más pequeñas,

películas más fuertes y, por consecuencia, emulsiones más estables. La disminución de la fuerza iónica hace aumentar la cantidad de aceite emulsionado para todas estas proteínas, lo que indica la importancia de las interacciones electrostáticas en la reducción de la coalescencia. En cuanto a la concentración de proteína, se ha observado que cuando ésta aumenta, el tamaño de las gotas de grasa disminuye (Pearce y Kinsella, 1978) y que la estabilidad de la emulsión se ve incrementada al facilitar que exista mayor cantidad de proteína adsorbida (Zayas, 1997).

Cerca del pI de las proteínas del suero (entre pH 4 y 5) se observa una disminución de sus propiedades emulsionantes debido al descenso de su solubilidad. Sin embargo, existen otros factores por los que en el pI la capacidad emulsionante pueda aumentar, como es el aumento de enlaces hidrofóbicos entre lípidos y proteínas (Borderías y Montero, 1988). En el caso de las proteínas del suero, Klemaszewski y col. (1992) comprobaron que con excepción de la β -lactoglobulina, el comportamiento emulsionante es independiente del pH . Lorient y col. (1991) refieren que las proteínas del suero presentan buenas propiedades emulsionantes excepto a valores de pH entre 4 y 5 si se presentan desnaturalizadas por acción térmica. También estos autores han observado que a valores de pH entre 3 y 5 la α -lactalbumina predomina sobre la β -lactoglobulina en la superficie de las gotículas de grasa de las emulsiones, mientras que, con valores de pH entre 7 y 9 la β -lactoglobulina predomina sobre todas las otras proteínas séricas. Por su parte, Walstra y col. (2001) refieren que las proteínas séricas desnaturalizadas por el calor son poco eficaces en estabilizar emulsiones, pero también afirman que la desnaturalización con valores de pH elevados no es tan perjudicial. El comportamiento frente al pH es algo diferente en las proteínas de suero individuales en relación a los CPS, ya que éstos presentan buenas propiedades emulsionantes en aderezos para ensaladas con un valor de pH de 4,0 y en emulsiones cárnicas (de Wit, 1984).

El incremento en la fuerza iónica disminuye las interacciones entre proteínas basadas en la carga y consecuentemente produce el mismo efecto que los cambios de pH hacia el pI (Robin y col., 1993).

La pasterización de la leche para la fabricación de queso o el suero que se produce durante la misma no parece afectar negativamente a las propiedades emulsionantes, aunque sí que disminuye la capacidad emulsionante de una manera clara si se pasteriza el retenido de UF (Mangino y col., 1987), al igual que sucede con la solubilidad. A diferencia de lo que sucede con

otras proteínas, el calentamiento de la β -lactoglobulina produce un descenso de la hidrofobicidad superficial comparado con la que presenta la proteína nativa, lo que da lugar a un empeoramiento de las propiedades emulsionantes (Damodaran, 1996).

Los efectos desestabilizantes de las moléculas de lípidos sobre la capacidad emulsionante de las proteínas fueron demostrados sobre todo para fosfolípidos y monoglicéridos. Este hecho se debe a su capacidad de reducir la cantidad de proteína adsorbida en la interfase con las gotículas de grasa (Yamachi, 1980). Cayot y Lorient (1998) afirman que, con la adición de mono y diglicéridos a una emulsión estabilizada por proteínas séricas no desnaturalizadas térmicamente, se observa una disminución de la cantidad de proteína adsorbida sin que se modifique el tamaño de las gotículas de grasa. Así, sugieren que en estas condiciones, la separación no se ve afectada por las modificaciones en la reología del medio dispersante. Los lípidos y surfactantes de baja masa molecular también afectan la formación de espumas porque compiten con la proteína en los locales de adsorción en las interfases (Vaghela y Kilara, 1996a). Karleskind y col. (1996) observaron que el contenido en fosfolípidos de los CPS se correlacionaba positivamente con el tamaño de las gotículas de la emulsión y con la intensidad de separación de la grasa, y que CPS con bajos contenidos en lípidos presentan emulsiones más estables. El contenido en cenizas de CPS se correlaciona positivamente con sus propiedades emulsionantes. Blecker y col. (1997) observaron mejoras en las propiedades emulsionantes y espumantes de CPS a pH 7 y 4, después de hidrólisis enzimática de la grasa residual. Patel y Kilara (1990) refieren que la grasa libre y ligada se correlacionan negativamente con las propiedades emulsionantes y espumantes de CPS mientras que las cenizas, el calcio y la entalpía de desnaturalización de las proteínas se correlacionan positivamente con aquellas propiedades. La información recogida por estos autores confirma el interés en utilizar técnicas de eliminación de la grasa residual en el proceso de producción de CPS.

I.5.3. Propiedades espumantes

Una espuma es un sistema coloidal que contiene burbujas de aire dispersas en una fase acuosa continua; estas burbujas pueden ser esféricas o poliédricas (Damodaran, 2005). La formación de una espuma puede describirse como la creación y estabilización de burbujas de gas en un líquido. Un factor esencial para la formación de espumas a partir de soluciones proteicas es la difusión rápida de las proteínas a la interfase aire-agua para reducir la tensión

superficial, seguida del desplegamiento parcial de la proteína, orientándose los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos hacia la fase acuosa y no acuosa, respectivamente. Esto da lugar al encapsulamiento de las burbujas y a la asociación de las moléculas proteicas, a veces con una desnaturalización parcial y coagulación, dando lugar a un film cohesivo intermolecular con un cierto grado de elasticidad (de Wit y col., 1988; Zayas, 1997). Usualmente se distingue entre capacidad espumante, que es el volumen de espuma formado por volumen de dispersión proteica; y estabilidad de la espuma, que es la habilidad de la espuma para mantener su volumen máximo durante cierto período de tiempo (Renner y Abd El-Salam, 1991); usualmente para determinarla se expresa como el volumen de líquido drenado de la espuma o el descenso de volumen de la misma por unidad de tiempo (Robin y col., 1993). Las espumas más estables se forman con proteínas solubles que pueden interactuar y formar películas viscosas gruesas. Existe una clara correlación entre la solubilidad de las proteínas y sus propiedades espumantes (Zayas, 1997). La capacidad espumante tiene una correlación positiva con la hidrofobicidad media de las proteínas (Damodaran, 2005).

Las proteínas del suero poseen excelentes propiedades espumantes porque son molecularmente solubles y estabilizan las espumas mediante el incremento de la viscosidad. En estado nativo, la β -lactoglobulina, la α -lactalbúmina y la seroalbúmina muestran una adsorción similar en la interfase gas/agua (Zayas, 1997).

Numerosos factores influyen en las propiedades espumantes: concentración de proteína, nivel de desnaturalización, fuerza iónica, tratamiento térmico previo y presencia de lípidos (Singh, 2003). Generalmente, la capacidad espumante se incrementa con la concentración de proteína hasta un valor máximo, a partir del cual decrece; para las espumas obtenidas con CPS el máximo se observa con concentraciones de 8-12% de proteína.

La estabilidad de las espumas puede incrementarse mediante la apertura de las estructuras globulares de la α -lactalbúmina y la β -lactoglobulina, y la exposición de grupos -SH, aunque no mejora la capacidad espumante (Zayas, 1997). Así, la desnaturalización parcial por calor de las proteínas incrementa las propiedades espumantes de los CPS, con mayor efecto en la estabilidad de la espuma que en la capacidad espumante. Sin embargo, una excesiva desnaturalización y agregación de las proteínas tiene un efecto negativo sobre las espumas (Singh, 2003; Damodaran, 2005). La desnaturalización parcial de la β -lactoglobulina durante la homogeneización puede mejorar sus propiedades espumantes (Zayas, 1997).

Los lípidos en general y, en particular, la presencia de fosfolípidos y ácidos grasos insaturados, puede romper las espumas, como resultado de su mayor actividad superficial y el efecto adelgazante de la película proteica que ejercen (Singh, 2003). La hidrofobicidad superficial de las proteínas se relaciona negativamente con el contenido de lípidos porque éstos compiten por los lugares de unión de las proteínas. Si los grupos hidrofóbicos están ocupados por los lípidos, están bloqueados y no participan en otras interacciones hidrofóbicas (Zayas, 1997). La eliminación de lípidos residuales de los sueros incrementa de forma importante las propiedades espumantes de los CPS (Pearce y col., 1991; Karleskind y col., 1995c).

El pH de la solución afecta significativamente a las propiedades de las espumas influyendo en la carga neta de la proteína y a la formación de la película y sus propiedades. El desarrollo de presión superficial, las interacciones proteína-proteína, el espesor de la película y las propiedades viscoelásticas se ven afectadas por la carga neta (Phillips y col., 1994). La máxima capacidad espumante y estabilización de la espuma se ha observado a valores de pH de 4-6 (Phillips y col., 1990; Singh, 2003). Esto se atribuye a la formación de una película proteica más cohesiva en la interfase aire-agua, debido a la reducción de las repulsiones electrostáticas, que alcanzan el máximo en el pI de las proteínas, de forma que se adsorben más proteínas en la interfase (Zayas, 1997; Singh, 2003).

No está claro el efecto que ejercen los iones y el contenido en cenizas sobre las propiedades espumantes. Mientras que algunos autores han observado correlaciones positivas entre la capacidad espumante y el contenido en calcio, cloruro sódico y cenizas (Halling, 1981; Patel y Kilara, 1990), otros detectan peores propiedades cuando existe una elevada cantidad de NaCl (Phillips y col., 1991). Zhu y Damodaran (1994) han señalado que los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} influyen significativamente en las propiedades espumantes de los APS. Parece que la agregación lenta que inducen los cationes produce una película viscoelástica mejor que retarda el drenaje del líquido mediante la prevención del adelgazamiento del film.

La hidrólisis parcial de las proteínas del suero mediante proteasas incrementa el volumen de espuma pero reduce su estabilidad (Zayas, 1997). Sin embargo, la hidrólisis limitada de los CPS combinada con un calentamiento a 55-70°C proporciona unas excelentes capacidad espumante y estabilidad, siempre que el pH se encuentre entre 7 y 8 antes de la formación de la espuma (Singh, 2003).

I.5.4. Formación de geles

Bajo circunstancias adecuadas, el balance entre interacciones polímero-polímero y polímero-agua dan lugar a la formación de redes o estructuras denominadas geles. Los geles son capaces de retener grandes cantidades de agua y otros compuestos en la red, lo cual los diferencia de los coágulos. Hay dos pasos en el proceso de formación del gel: el primero implica la desnaturalización de la proteína, y el segundo es una reorganización de las moléculas desnaturalizadas produciéndose una agregación y la formación de la red (Kilara y Vaghela, 2004).

El espesamiento de las soluciones o formación de geles depende de la capacidad de las proteínas para formar agregados. Muchos de los aminoácidos reactivos (no polares y residuos cisteína) se localizan en el interior de las proteínas globulares y suele ser necesario provocar cierto grado de desplegamiento antes de que se produzca la agregación. La principal fuerza responsable del mantenimiento del estado plegado en las proteínas del suero en solución es el efecto hidrofóbico, mientras que la fuerza que más favorece el desplegamiento es la entropía configuracional (Bryant y McClements, 1998). A temperaturas relativamente bajas (< 65°C), el efecto hidrofóbico predomina y se favorece la estructura plegada, aunque se ha comprobado que el desplegamiento de las proteínas del suero empieza a 40°C y progresa lentamente hasta alcanzar un 10% de desnaturalización a 62°C; después se observa una vuelta a casi el estado inicial hacia los 65°C. A temperaturas más altas la entropía configuracional es más importante y se favorece el desplegamiento, observándose un incremento del porcentaje de desnaturalización en relación lineal con el aumento de la temperatura, llegando al 95% a 85°C (Parris y Baginski, 1991; Hvidt y Westh, 1992). Sin embargo, algunos autores afirman que, a las temperaturas normalmente usadas para la preparación de los ingredientes de proteínas de suero (<100°C), las proteínas globulares sólo se hallan parcialmente desplegadas en un “estado globular fundido” de la molécula de proteína de suero que retiene mucha de la estructura secundaria del estado nativo de la molécula, aunque el desplegamiento ocasiona la formación de zonas hidrofóbicas en la superficie de las proteínas (McSwiney y col., 1994; Qi y col., 1997).

Los mecanismos moleculares responsables de la formación de los agregados durante y después del desplegamiento de las proteínas todavía no están muy claros. Se considera que la agregación se produce como una secuencia de reacciones de desplegamiento monomoleculares

y de pasos de agregación bimoleculares para dar lugar a estructuras poliméricas de orden más alto. Se asume que las fuerzas implicadas en la agregación son interacciones no específicas entre regiones hidrofóbicas de las cadenas polipeptídicas desplegadas, aunque los enlaces de hidrógeno y las interacciones iónicas pueden participar también (Aguilera, 1995).

Los geles formados por las proteínas del suero varían desde aquéllos que son elásticos y translúcidos a los que son más quebradizos, con estructuras similares a cuajadas. Los geles translúcidos y elásticos se forma calentando dispersiones de CPS con baja concentración de proteína (3-5%) a bajas temperaturas, o dispersiones que han sido dializadas. Geles más rígidos y opacos se forman a altas concentraciones de proteínas, elevadas temperaturas o en la presencia de iones (Schmidt y Morris, 1984). Existen diferencias estructurales entre ambos tipos de geles. En soluciones de proteínas con un nivel bajo de sales, la mayoría de la superficie de las moléculas proteicas es incapaz de formar enlaces con otras moléculas debido a la repulsión electrostática residual que existe entre ellas. Sin embargo, pueden formarse enlaces entre zonas no polares y otra proteína, o entre dos zonas no polares debido a interacciones hidrofóbicas. Las moléculas en este caso se agregan en una cadena ordenada de "cuentas" o estructura filamentosa. A concentraciones de sales relativamente altas, la repulsión electrostática entre moléculas está completamente anulada u oculta y, consecuentemente, se pueden formar enlaces en cualquier punto de su superficie. Esto da lugar a la formación de agregados esféricos de gran tamaño. Con niveles intermedios de sales, se forma una mezcla de los dos tipos de estructuras (Doi, 1991; Kitabake y Doi, 1993).

La capacidad de gelificar y la fuerza del gel de las soluciones de CPS se incrementan con la concentración proteica, mientras que la presencia de lípidos y lactosa puede impedir la gelificación (Mulvihill y Kinsella, 1987). La concentración mínima de proteína de los CPS para formar geles oscila entre el 6,5-7,5% (Stevenson y col., 1991; Britten y Pouliot, 1996), aunque esta concentración varía con diversos factores, entre ellos el pH de la disolución: 4% a pH 4,5, 6-8% a pH 6 y 8-12% a pH 7,5 (Morr y Foegeding, 1990). Las proporciones de las distintas proteínas de suero en los CPS afectan a su gelificación. Se forman geles translúcidos por calentamiento de concentrados con baja concentración de β -lactoglobulina, mientras que los que poseen cantidades elevadas dan lugar a geles opacos. La fuerza de los geles se relaciona directamente con la concentración de esta proteína (Langley y Green, 1989). Aunque la β -lactoglobulina es la principal proteína que forma los geles térmicos formados por los CPS, la seroalbúmina también tiene esta capacidad. Paulsson y col. (1986) observaron que se formaban

geles en soluciones del 2% de seroalbúmina, del 5% de β -lactoglobulina, mientras que la α -lactalbúmina no forma geles por calentamiento hasta concentraciones del 20%.

Sin embargo la gelificación de estas proteínas no se produce independientemente en las mezclas y se ha observado que la presencia de α -lactalbúmina, seroalbúmina o incluso de caseína-macropéptido mejoran la capacidad gelificante de la β -lactoglobulina. Se ha comprobado que en mezclas de β -lactoglobulina y de α -lactalbúmina, la primera gobierna el mecanismo de agregación (Schokker y col., 2000), pero que en geles obtenidos a 75-80°C se forman agregados hidrofóbicos que incluyen ambas proteínas, entre las que se establecen puentes disulfuro (Gezimati y col., 1997). Durante las fases iniciales del calentamiento de soluciones mixtas de estas dos proteínas junto con seroalbúmina, las moléculas de esta proteína se despliegan y agregan entre sí y con la α -lactalbúmina. En etapas más avanzadas, las moléculas de β -lactoglobulina se despliegan a su vez y forman polímeros de distintos tamaños entre ellas y con la α -lactalbúmina. A concentraciones proteicas suficientemente elevadas, estas interacciones, constituidas básicamente por puentes disulfuro, dan paso a la formación del gel. Esta estructura consistirá en cadenas de copolímeros de β -lactoglobulina y α -lactalbúmina con agregados de seroalbúmina embebidos en los espacios que dejan entre ellas. Este mismo fenómeno, en el que se forman homo- y heteropolímeros de las proteínas antes de la gelificación, se produce también en los CPS (Havea y col., 2001).

Los geles de proteínas séricas más fuertes se obtienen a valores de pH de 5-6, disminuyendo a pHs inferiores o superiores; sin embargo, la fuerza aumenta a pH alcalino (Renner y Abd El-Salam, 1991). Vreeker y col. (1992) refieren que a valores de pH bajos o elevados, en los que las repulsiones electrostáticas son elevadas, las moléculas de proteína tienen tendencia a presentar una agregación lineal con pocas ramificaciones. Los geles formados en estas condiciones tienen una matriz estructural uniforme y son transparentes. Con valores de pH intermedios (4-6), las repulsiones electrostáticas son bajas y se observa una agregación aleatoria. Los geles formados en estas condiciones son opacos y se asemejan a agregados de partículas coloidales.

Las variaciones en la concentración de sales, junto con las modificaciones en el pH, afectan al desarrollo de los geles porque alteran el balance entre las fuerzas atractivas y repulsivas que regulan las interacciones proteína-proteína; además sus efectos son interactivos

(Tang y col., 1995); de hecho, y como se comentó anteriormente, dan lugar a geles con diferentes estructuras y aspectos. Los iones como el calcio, sodio y magnesio afectan a la gelificación de las proteínas del suero. Los cationes divalentes (como el calcio) disminuyen la temperatura de desnaturalización de las proteínas, mientras que el cloruro sódico la incrementa. La sensibilidad al calor de la β -lactoglobulina se incrementa por la presencia de iones calcio (VarunSATIAN y col., 1983). La máxima fuerza del gel se produce a 10 mM de cloruro cálcico, mientras que si se añade cloruro sódico, esto ocurre cuando alcanza una concentración de 200 mM, lo que refleja la mayor efectividad de los iones calcio comparados con los de sodio en el incremento de los parámetros reológicos relacionados con la fuerza del gel. Sin embargo, cuando se supera un nivel crítico en ambos tipos de sales, la matriz proteica se colapsa en agregados grandes, densos y discontinuos rodeados de medio acuoso, los que contribuye a un descenso de la fuerza del gel y refleja una formación de enlaces excesiva entre cadenas polipeptídicas (Mulvihill y Kinsella, 1987, 1988; Lupano y col., 1992). La adición de niveles bajos de NaCl o CaCl₂ reducen el tiempo de gelificación y, en concreto, la adición de NaCl da lugar a un descenso en la concentración mínima de proteína necesaria para que se produzca la gelificación (Morr y Foegeding, 1990).

El efecto de la presencia de lípidos no está muy claro, parece que existe una correlación negativa entre la concentración de lípidos y la fuerza de los geles (Karleskind y col., 1995b), pero que las lipoproteínas residuales no son el factor primario en la desestabilización de las propiedades gelificantes de las proteínas del suero (Pearce y col., 1991).

I.6. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los países del sur de Europa son tradicionalmente productores de leche y quesos de oveja con características únicas y con elevado potencial de desarrollo de mercado. España y Portugal son de los países más interesados en el desarrollo de la producción agropecuaria basada en los pequeños rumiantes por diversas razones, de las cuales destacan las condiciones geoclimáticas que favorecen su competitividad, la potencialidad de producción de quesos acogidos a Denominaciones de Origen Protegidas y, como consecuencia, de mayor valor añadido, el ordenamiento forestal y la fijación de poblaciones en regiones poco favorables.

La obtención de quesos origina una gran cantidad de suero que puede generar consecuencias muy perjudiciales para el medio ambiente. En el caso de los sueros procedentes de quesos de vaca, la investigación y su aprovechamiento son muy intensos. Sin embargo, en los quesos de oveja se desaprovecha en su mayoría y no son raros los casos en los que se desecha directamente. Los sueros bovinos se transforman sobre todo en concentrados de proteínas séricas (CPS) y aislados de proteínas séricas (APS) de alto valor en el mercado debido a las propiedades nutricionales (Hambraeus, 1992) y funcionales (Mulvihill, 1992) de sus proteínas. No obstante, tal y como se ha mencionado en el apartado I.4.6.2., la presencia de lípidos residuales no separados por centrifugación, principalmente fosfolipoproteínas, y procedentes de la membrana del glóbulo graso, causan diversos problemas en el procesado del lactosuero bovino, como son la rápida colmatación de las membranas de UF y empeoramiento de las propiedades funcionales de los CPS y APS, especialmente su capacidad espumante (Lee y Merson, 1976; Muller y Harper, 1979; Hiddink y col., 1981; Marshall, 1982; De Wit, 1984; Maubois, 1984; Fauquant y col., 1985; Christie y col., 1987; Maubois y col., 1987; Baomy y col., 1990; Rinn y col., 1990; Pearce y col., 1991; Daufin y col., 1992, 1993; Gesan y col., 1993, 1995; Pierre y col., 1994; Karleskind y col., 1995a; Aragoza y col., 1996).

De los tratamientos para separar dichas fosfolipoproteínas, el método de precipitación termocálcica propuesta por Fauquant y col. (1985) ha sido el de mayor éxito. Básicamente, el método consiste en la formación de agregados de sales fosfocálcicas con las fosfolipoproteínas a moderadas temperaturas y pH neutro (véase apartado I.4.6.2.). Posteriormente, con un proceso de MF, estos compuestos quedan en el retenido. Algunos investigadores han señalado el posible aprovechamiento de estos subproductos de la clarificación, los retenidos de MF, ricos en fosfolipoproteínas y, por eso, potencialmente utilizables porque pueden tener interesantes propiedades funcionales, sobre todo las emulsionantes (Maubois, 1984; Maubois y col., 1987; Joseph y Mangino, 1988a; Maubois y Ollivier, 1991). Sin embargo, no hay trabajos sobre las propiedades funcionales de estos retenidos de microfiltración ni sobre su utilización en la elaboración de alimentos.

La investigación sobre el aprovechamiento de los sueros de queso de oveja es escasa. Como se ha señalado en un apartado anterior (I.4.2.), la utilización clásica es la elaboración de quesos de suero, denominados en Italia *ricotta*, en Portugal *requeijão* y en España requesón (Pintado y col., 2001). De esta manera, se aprovechan una gran parte de las proteínas del suero ovino. Sin embargo, se genera un subproducto, el suero “desproteínizado”, denominado en Italia

scotta y en Portugal *sorelho*, que aún contiene un 60% de la materia seca del suero, donde se incluye no sólo lactosa y minerales, también grasa residual y proteínas. El tratamiento de este subproducto apenas ha sido realizado, sólo Pizzichini y col. (1995) señalaron que con la aplicación de la UF se podría reducir un 40% del efecto contaminante del suero desproteínizado *scotta*.

No obstante, la utilización de suero de oveja con la elaboración de requesón es bastante reducida y la obtención de CPS a partir de suero debería ser una manera más importante de aprovechamiento de este subproducto. Sin embargo, los estudios que se han realizado sobre las propiedades funcionales de CPS de suero ovino son escasos (Chianese y col., 1996; Comendador y col., 1996; Casper y col., 1999; Pintado y col., 1999). Se ha observado que los CPS de oveja poseen mejores capacidad espumante, estabilidad de la espuma y propiedades gelificantes que los CPS bovino y caprino, lo cual se atribuye a su mayor contenido en β -lactoglobulina (Casper y col., 1999; Pintado y col., 1999), ya que estas propiedades presentan una correlación positiva con el contenido en esta proteína (Kim y col., 1987).

En cuanto a los posibles pretratamientos del suero ovino, Comendador y col. (1996) señalaron que las propiedades funcionales de los CPS obtenidos de suero desproteínizado podrían mejorarse con un proceso de clarificación antes de la UF. Sólo Casper y col. (1999) estudiaron algunas propiedades de CPS ovino en los cuales se eliminaron lípidos usando quitosano. No obstante, no hay información sobre la obtención de CPS ovino tanto de suero de queso de oveja como de suero desproteínizado empleando como método de clarificación la precipitación termocálcica seguida de MF, ni tampoco de las propiedades funcionales de estos CPS ni por supuesto de los correspondientes retenidos de MF. La utilización de los CPS y los correspondientes retenidos de MF en la elaboración de alimentos, sobre todo en los lácteos obtenidos con leche de oveja (queso y requesón), podría ser muy interesante ya que, aunque son abundantes los trabajos con CPS de origen vacuno, no hay ninguna investigación sobre el empleo de CPS ovino en la elaboración de alimentos. Así, por ejemplo, su adición en quesos de suero sería una manera fácil de incorporar estas proteínas en un alimento, siendo posible aumentar el rendimiento de fabricación, como sucede en quesos con CPS bovinos (Jameson y Lelievre, 1996). Sin embargo, este posible incremento del rendimiento podría afectar a ciertos parámetros de calidad del producto como su textura y color.

Teniendo en cuenta estas premisas, el principal fin de esta Tesis Doctoral ha sido la obtención y estudio de concentrados de proteínas séricas de oveja elaborados mediante precipitación termocálcica y microfiltración seguida de ultrafiltración/diafiltración a partir del suero de queso y suero desproteínizado obtenido en la fabricación de queso de suero (*requeijão*), con lo cual se aprovecharían estos dos subproductos. Este fin se ha desarrollado en los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar la viabilidad de la precipitación termocálcica y microfiltración utilizando dos membranas de tamaño de poro diferentes (0,65 y 0,20 μm) y su efecto en los correspondientes flujos de ultrafiltración, comparándolos con los medidos en el proceso realizado en sueros sin clarificar.

2. Determinar la composición química general y la composición nitrogenada de los concentrados obtenidos por clarificación o sin ella, con el fin de determinar la membrana de microfiltración más adecuada para obtener productos de alta concentración proteica, y de establecer la posible relación con sus propiedades funcionales.

3. Estudiar las principales propiedades funcionales (solubilidad, propiedades emulsionantes y espumantes, capacidad gelificante) de los deshidratados de retenidos de ultrafiltración/diafiltración y compararlos con los retenidos de ultrafiltración convencionales.

4. Efectuar las mismas determinaciones en los retenidos de microfiltración (subproductos de la clarificación) para evaluar su posible utilidad en la elaboración de alimentos, lo que aumentaría el interés de aplicar el tratamiento de clarificación.

5. Realizar un primer aprovechamiento de proteínas séricas de oveja en la elaboración de alimentos; en este caso, utilizando tanto los deshidratados de retenidos convencionales de ultrafiltración como los de microfiltración en la elaboración de un queso de suero (*requeijão*), y estudiar si aumentan el rendimiento de fabricación y si afectan a ciertas características del producto como la textura, la microestructura y el color del producto.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS DE USO GENERAL

II.1.1. MATERIAL

Las pesadas se realizaron en balanzas analíticas de las marcas Mettler, modelo AE-200, Haereus, modelo ADP 360, y AND, modelo HR-120.

Se utilizaron baños termostatados de las marcas Grant, Kottermann y Selecta.

Se utilizaron agitadores magnéticos y baños de calentamiento de las marca Bibby, modelo HC-502 y SBS.

Para las determinaciones del pH se utilizaron un pHmetro de mesa Crison modelo GLP 21, y otro portátil Metrohm, modelo 704 pHmetrom, ambos dotados de sondas termométricas.

En las determinaciones de extracto seco se emplearon estufas de las marcas Indelab y Memmert y en las de cenizas un horno mufla Naber.

La destilación del agua necesaria para realizar las extracciones y para la preparación de las disoluciones acuosas se realizó en un aparato "Millipore" mod. Rios 5.

II.1.2. REACTIVOS

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo fueron de calidad analítica, suministrados por las firmas Merck, Panreac, Riedel de Haen y Sigma.

II.2. ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Los sueros de queso y *sorelhos* procedían de la elaboración de queso *Serra da Estrela* y de *requeijão*.

El queso *Serra da Estrela* es el más conocido de los quesos tradicionales portugueses y fue el primero en beneficiarse del estatuto de queso con Denominación de Origen Protegida. Su nombre se relaciona con la región de *Serra da Estrela*, la montaña más alta de Portugal. Se produce en 18 ayuntamientos siendo los de mayor producción: Celorico da Beira, Gouveia, Guarda, Manteigas, Oliveira do Hospital y Seia. El queso se obtiene por coagulación de la leche cruda de oveja con un extracto de la flor de cardo (*Cynara cardunculus* L.). De acuerdo con el estándar legal (NP-1922, 1985 y Decreto 42/85), el producto tiene la forma de un cilindro bajo, sin bordes salientes. Tiene un diámetro de 15-20 cm y una altura de 4-6 cm y pesa entre 1 y 1,7 Kg. Las caras laterales son convexas. La corteza es fina, uniforme y de color amarillo-paja. La masa es de color marfil, con pocos agujeros y de textura blanda, que se deforma rápidamente y de forma espontánea al corte. Su aroma es fuerte y ligeramente ácido. El contenido de humedad en el queso libre de materia grasa se deberá situar entre 61 y 69% y el contenido de grasa en el extracto seco deberá estar comprendido entre 45 y 60%. Su fabricación es artesanal. La producción anual es de aproximadamente 2.000 Tm y su valor comercial se sitúa en torno a los 15-20 €/kg.

Como ya se mencionó en la Introducción (apartado I.4.2), el *requeijão* es un queso de suero ovino tradicionalmente, al que se le añade cierta cantidad de leche de oveja y que se obtiene por calentamiento y sin acidificación. Se obtiene además un subproducto, el *sorelho*, que contiene menos proteínas que el lactosuero. En la figura II.1 se presenta un diagrama de flujo del proceso de elaboración habitual del queso *Serra da Estrela* junto con el proceso de producción de *requeijão*.

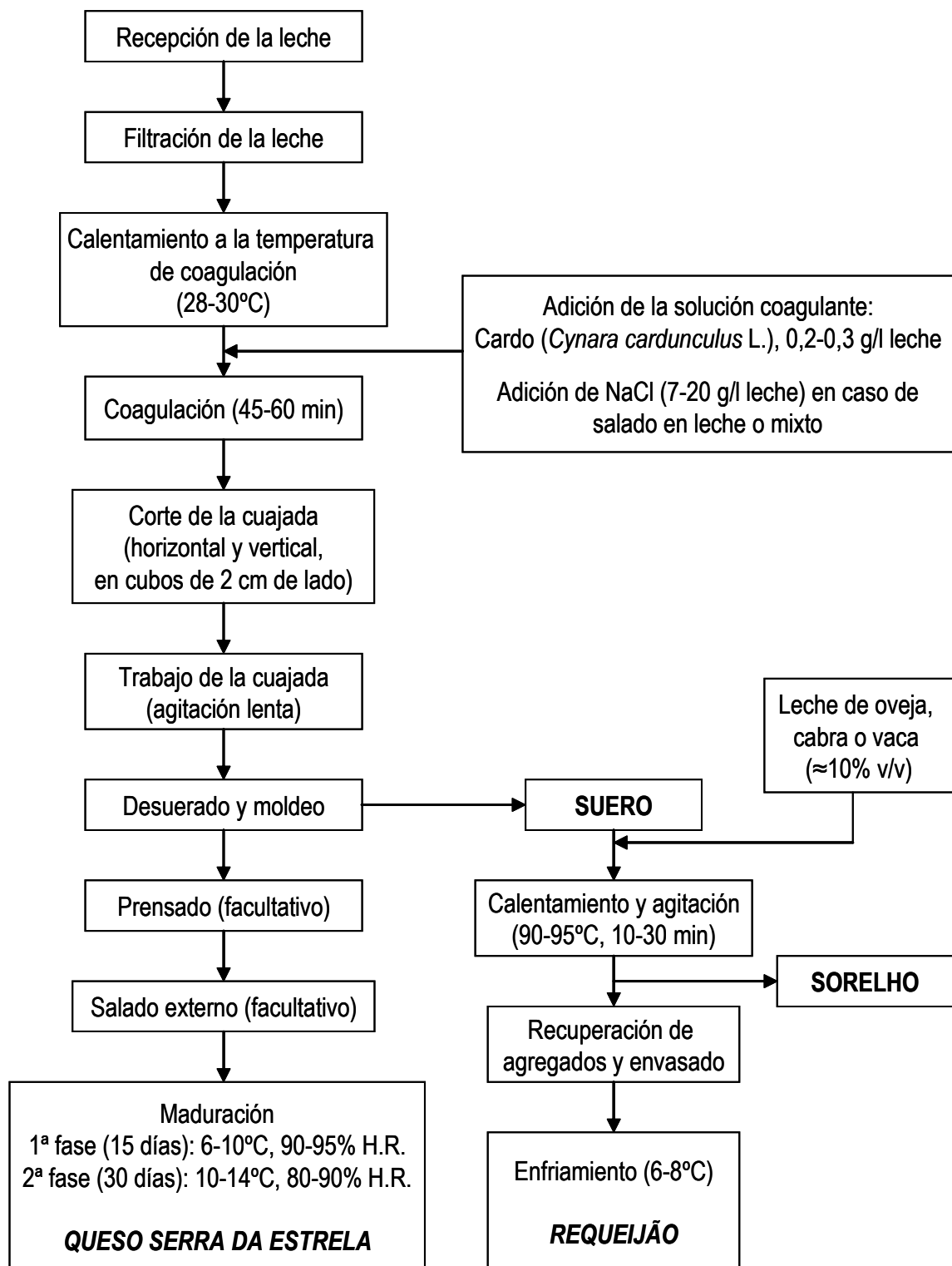


Figura II.1. Diagrama de los procesos de fabricación del queso *Serra da Estrela* y de *Requeijão*. Adaptado de Rodrigues y col. (2000).

II.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

II.3.1. RECEPCIÓN DE LOS SUEROS DE QUESO Y DE SUERO DESPROTEINIZADO (SORELHO)

El lactosuero ovino y el suero desproteínizado o *sorelho* fueron suministrados por la Asociación de Criadores de Ovejas “Serra da Estrela” (ANCOSE, Portugal). La preparación de las muestras fue similar en ambos productos. El suero y el *sorelho* se refrigeraron inmediatamente después de la producción de queso o de *requeijão* y fueron transportados rápidamente en recipientes metálicos a temperatura ambiente a la planta piloto, donde se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Entre la recogida y el inicio del procesado en planta piloto no transcurrieron más que 3 horas.

Inmediatamente después de la recepción en planta piloto, los productos se desnataron en una centrífuga Westfalia tipo ADB. Se utilizaron aproximadamente 100 litros de producto en cada prueba, los cuales se dividieron en dos porciones de 50 litros, una para ser usada en la ultrafiltración convencional, y otra para ser sometida a precipitación termocálcica (PT) y microfiltración (MF), seguido de ultrafiltración (UF) y diafiltración (DF).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La figura II.2 muestra el esquema de los pasos seguidos en el tratamiento de suero y *sorelho* y de obtención de las muestras líquidas y en polvo analizadas en la presente Tesis Doctoral.

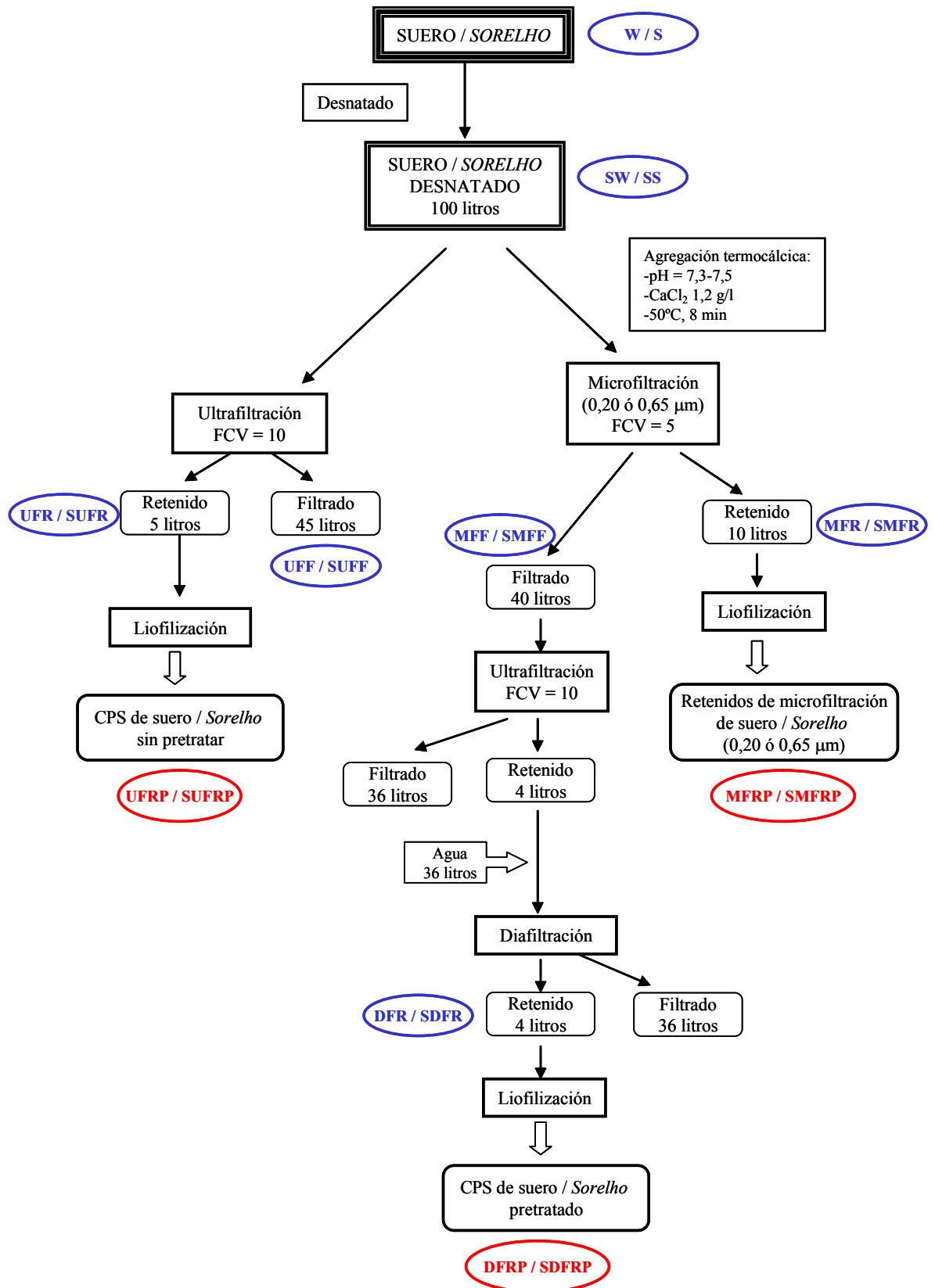


Figura II.2. Diagrama de obtención de las muestras de suero y *sorelho* ovinos. En color azul se señalan las abreviaturas correspondientes a los productos líquidos y en color rojo las de los productos deshidratados.

II.3.2. CLARIFICACIÓN DE LOS SUEROS: PRECIPITACIÓN TERMOCÁLCICA - MICROFILTRACIÓN

Tras la determinación del contenido en calcio inicial de suero y *sorelho* por el método que se describe en el apartado II.4.1.4., la precipitación termocálcica se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Fauquant y col. (1985): el contenido en calcio se ajustó a 1,2 g/l con una solución de CaCl_2 10N. A continuación el pH se llevó a valores de 7,3-7,5 con NaOH 10N y se calentó rápidamente a 50°C, manteniendo esta temperatura durante 8 minutos. Finalmente se refrigeró a 4-6°C y así se mantuvo hasta el día siguiente.

La microfiltración del producto sometido a la precipitación termocálcica se realizó de forma discontinua en una planta piloto equipada con membranas de fibra hueca con poros de 0,20 μm (diámetro interno de 1mm y 0,8 m² de superficie, modelo CFP-2-E-35 A) y de 0,65 μm (diámetro interno de 0,75 mm y 1,0 m² de superficie, modelo CFP-6-D-35 A), suministradas por A/G Technology Corporation. El proceso se llevó a cabo a una presión transmbranaria de 1,6-1,8 bares y con un flujo de recirculación de producto de 2000 l/h. El volumen final de retenido fue del 20% del volumen inicial de la alimentación, es decir, se aplicó un factor de concentración volumétrica de 5 (FCV=5). La temperatura inicial de la alimentación fue de 8-10°C.

La figura II.3 presenta la unidad piloto utilizada en los procesos de separación por membranas, tanto los de microfiltración como los de ultrafiltración de los sueros, efectuando cuando fue necesario el cambio de las membranas. En la figura II.4 se muestra un detalle de la planta piloto con una membrana de microfiltración instalada. En la figura II.5 se pueden observar las características de las membranas de MF utilizadas.

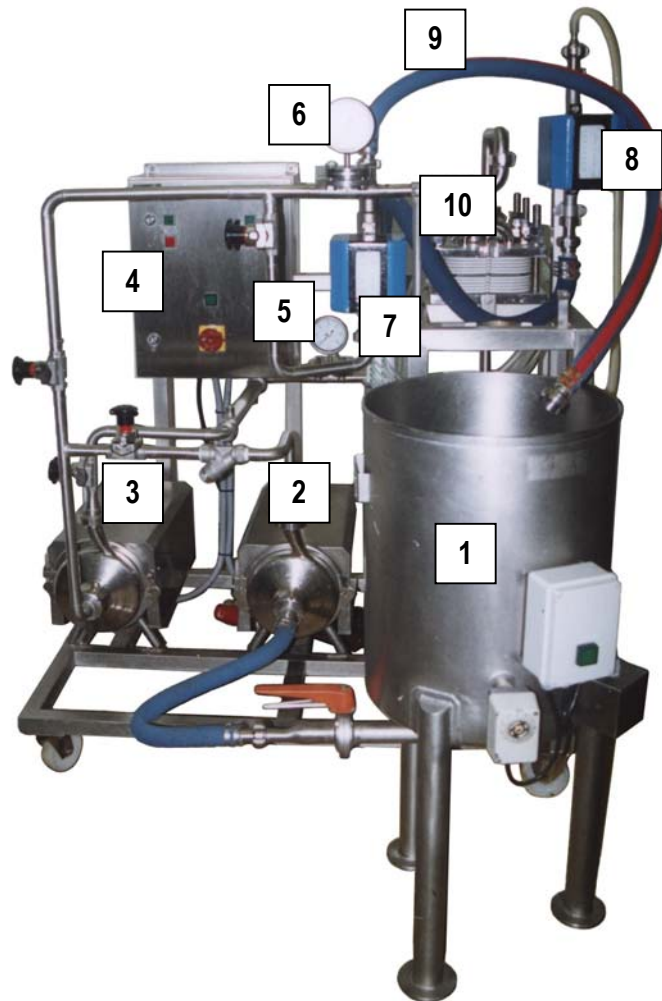


Figura II.3. Unidad piloto para efectuar las separaciones por membranas.

- (1) Tanque de alimentación de 50 litros.
- (2) Bomba centrífuga de alimentación.
- (3) Bomba centrífuga de recirculación.
- (4) Panel de control.
- (5) Manómetro para determinación de presión a la entrada del módulo.
- (6) Manómetro para determinación de presión a la salida del módulo.
- (7) Caudalímetro para medición de caudal de alimentación.
- (8) Caudalímetro para medición de caudal de permeado.
- (9) Permutador tubular para control de la temperatura de alimentación;
- (10) Módulo de placas de UF (Pleiade UFP 10 BIO); opcionalmente, los módulos de membranas de fibras huecas para MF de $0,65\ \mu\text{m}$ y $0,20\ \mu\text{m}$ (A/G Technology Corporation).



Figura II.4. Membrana de microfiltración instalada en la unidad piloto.



Figura II.5. Detalle de una de las membranas de microfiltración empleadas.

II.3.3. ULTRAFILTRACIÓN DE LOS SUEROS

La ultrafiltración del suero y *sorelho* desnatados no clarificados se realizó de forma discontinua usando un módulo de placa y marco Pleiade UFP 10 BIO, (Figura 17) equipado con una membrana orgánica (copolímero de acrilonitrilo) IRIS de Rhône Poulenc Tech-Sep (1,1 m² de superficie y 35 kDa de punto de corte) instalado en la unidad piloto que se muestra en la

figura II.6. El proceso de ultrafiltración se inició con una presión transmembranaria de 1,9-2,1 bares y un flujo de recirculación de producto de 2000 l/h. A lo largo del proceso, el flujo de recirculación se redujo gradualmente con el objetivo de mantener la presión transmembranaria en el mismo rango de valores. Se aplicó un factor de concentración volumétrica de 10 (FCV=10). La temperatura inicial del producto era de 10-12°C.



Figura II.6. Detalle de la membrana de ultrafiltración empleada.

En cuanto a los productos sometidos a clarificación, la ultrafiltración se realizó empleando los filtrados de microfiltración obtenidos a partir de ellos, en las mismas condiciones que se han descrito, con el fin de comparar sus flujos con los correspondientes a los de los sueros no pretratados. El pH del suero y *sorelho* se situó entre 5,2-5,6 y los filtrados de microfiltración presentaban valores de 7,3-7,5.

Los retenidos de UF procedentes de los filtrados de microfiltración, es decir, de los sueros clarificados, se diafiltraron añadiendo 36 litros de agua desionizada y concentrando luego en las mismas condiciones que se utilizaron para la UF, empleando un FCV de 10.

Al final de cada proceso el equipo fue lavado y desinfectado de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El flujo de permeación de agua se midió antes de empezar cada proceso de UF.

Se tomaron muestras líquidas de suero y *sorelho* de partida, de los mismos tras el desnatado, de los retenidos y los filtrados de UF sin clarificar, de los retenidos y filtrados de MF, y del retenido de diafiltración para su posterior análisis químico, conservándolas hasta ese

momento a 4°C. Las muestras tomadas aparecen señaladas en la figura II.2. con sus abreviaturas correspondientes en color azul.

II.3.4. DESHIDRATACIÓN DE LOS PRODUCTOS LÍQUIDOS

Los productos de la separación por membranas se liofilizaron en un equipo Labconco modelo Lyph-Lock, obteniéndose diez productos en polvo; cinco procedían del suero: el retenido de UF sin clarificar (UFRP), los retenidos de microfiltración empleando la membrana de MF de 0,65 μm de tamaño de poro (MFRP 0.65) o la membrana de 0,20 μm (MFRP 0.20), y los retenidos de diafiltración, procedentes de los filtrados de microfiltración usando las dos membranas de MF (DFRP 0.65 y DFRP 0.20). Los otros cinco productos en polvo se obtuvieron del *sorelho* utilizando tratamientos similares: SUFRP (retenido de UF sin clarificar), SMFRP 0.65 y SMFRP 0.20 (retenidos de MF), y SDFRP 0.65 y SDFRP 0.20 (retenidos de diafiltración). Las muestras tomadas aparecen también en la figura II.2., junto con sus abreviaturas correspondientes en color rojo. Estas muestras liofilizadas se conservaron en bolsas a vacío y temperatura ambiente hasta la realización de los análisis de composición, el estudio de la funcionalidad y la elaboración de requesón.

Los tratamientos aplicados al suero y al *sorelho*, y la preparación de las muestras se efectuó en la planta piloto e instalaciones de la Escuela Superior Agraria de Coimbra.

II.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN GENERAL

II.4.1. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS LÍQUIDOS DE LOS SUEROS DE QUESO Y DE *SORELHO*

El análisis de la composición general de los productos líquidos de suero y *sorelho* se realizó en las instalaciones de la Escuela Superior Agraria de Coimbra.

II.4.1.1. Determinación del contenido de proteína y grasa

La proteína y la grasa de los productos líquidos intermedios se determinaron por espectrofotometría de absorción infrarroja en un equipo Lactoscope, modelo C3 (Delta Instruments).

El equipo se calibró previamente para la medida de proteína y grasa usando como referencia el método de Kjeldahl y el método de la AOAC (AOAC, 1996a). Las muestras contenidas en botes (aproximadamente 50 ml), se agitaron y calentaron a 40°C antes de ser colocadas en el aparato que aspiraba automáticamente el volumen a analizar. Los valores de proteína y grasa inferiores a 0,5% (m/v) en los productos líquidos fueron calculados basándose en su concentración en los correspondientes productos sólidos.

Las determinaciones se hicieron por duplicado. Los contenidos en proteína se expresaron en porcentaje de peso húmedo y los de grasa en porcentaje de peso húmedo y en gramos por litro.

II.4.1.2. Determinación del extracto seco

El extracto seco se determinó por desecación a 105°C hasta peso constante (unas 12 horas), empleando muestras de aproximadamente 10 g pesadas con exactitud. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

II.4.1.3. Determinación del contenido de cenizas

Las cenizas de las muestras desecadas como se describe en el apartado II.4.1.2, se determinaron por incineración a 550°C durante 6 horas en un horno mufla y posterior pesado. Las determinaciones se hicieron por duplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de peso húmedo.

II.4.1.4. Determinación del contenido de calcio

El contenido de calcio de las muestras líquidas se determinó mediante un método colorimétrico rápido, siguiendo el procedimiento nº 587 y empleando el kit comercializado por Sigma diagnostics. Este método se basa en la siguiente reacción en medio alcalino:



El complejo tiene color púrpura a pH 10-12, presentando una absorbancia máxima a 575 nm. La intensidad de color, medida a esta longitud de onda, es directamente proporcional a la

concentración de calcio de la muestra, y la respuesta es lineal hasta concentraciones de calcio de 15 mg/dl. Los reactivos incluidos en el kit eran:

a) Reactivo enlazante de calcio, conteniendo o-cresolftaleína complexona (0,024%) y 8-hidroxiquinolina (0,25%). Este último compuesto está presente para evitar la interferencia con iones magnesio.

b) Tampón conteniendo, además de otros ingredientes no reactivos y estabilizantes, 2-amino-2 metil-1,3 propanodiol en una concentración de 500 mmol/l.

Además se dispuso de un estándar preparado conteniendo 10 mg/dl de calcio, también suministrado por Sigma.

Las determinaciones se efectuaron por duplicado. La solución de trabajo se preparó mezclando partes iguales de cada uno de estos dos reactivos. Se preparó una serie de tubos identificados como blanco, estándar, y muestras. En cada tubo se colocó 1 ml de la solución de trabajo, añadiendo después 10 μ l de agua desionizada (blanco), de estándar o de la muestra, según el caso, y mezclándolo con el reactivo. Después se dejó reaccionar un mínimo de 3 minutos a temperatura ambiente y a continuación se procedió a leer la absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Zuzi. La absorbancia correspondiente al blanco se restó a los valores determinados en las muestras y en el estándar para determinar el cambio en absorbancia debido al calcio (ΔA). El contenido en calcio de las muestras se calculó según la ecuación siguiente:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ (mg/dl)} = (\Delta A \text{ muestra} / \Delta A \text{ estándar}) \times \text{concentración del estándar}$$

II.4.1.5. Determinación del pH

El pH se determinó a la recepción de los productos y durante los ajustes a lo largo del proceso. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

II.4.2. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS EN POLVO DE LOS SUEROS DE QUESO Y DE SORELHO

El análisis de la composición general de los productos en polvo de suero y *sorelho* se realizó en las instalaciones de la Escuela Superior Agraria de Coimbra, con excepción de la determinación de cloruros, que se realizó en la Facultad de Ciencias de Lugo.

II.4.2.1. Determinación del contenido de proteína total

El nitrógeno total de los deshidratados fue determinado por el método de Kjeldahl utilizando un equipo Kjeltec System 1003 de Tecator.

Se pesó 1 g de muestra que se introdujo en un tubo de digestión. Se añadieron seguidamente dos pastillas catalizadoras de 5 g (óxido de mercurio y selenio, de Merck) y 15 ml de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos se colocaron en la unidad de digestión, manteniéndolos a una temperatura de 420°C hasta su total clarificación.

Tras la digestión se añadieron 50 ml de una disolución de NaOH al 33% (m/v) a la muestra. Seguidamente se llevó a la unidad de destilación del equipo. El amoníaco destilado se recogió en 25 ml de una solución de ácido bórico al 4%. A continuación se valoró con una solución de HCl 0,1 N en presencia de un indicador que contenía rojo de metilo y verde bromocresol.

El porcentaje de nitrógeno total se determinó según la ecuación siguiente:

$$NT (\%) = (14,007 \times (V - V_o) \times N \times 100) / (\text{mg de muestra})$$

donde:

N = Normalidad del HCl;

V = Volumen de HCl gastado en la titulación (ml);

V_o = Volumen de HCl gastado en la titulación de un blanco (ml);

El contenido en proteína total se calculó multiplicando el resultado de nitrógeno total obtenido por 6,38. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de extracto seco.

II.4.2.2. Determinación del contenido de grasa

La grasa de los productos deshidratados fue determinada gravimetricamente después de su extracción, de acuerdo con el método de la AOAC (1996a). Este método utiliza el hidróxido de amonio y el etanol como disolventes de la caseína, y la separación de la materia grasa se hace con disolventes orgánicos, por decantaciones sucesivas.

A 1 g de muestra se añadieron 10 ml de agua destilada y 2 ml de NH_4OH , y se transfirieron a un embudo de decantación. A continuación, se añadieron 25 ml de éter y se agitó la mezcla 1 minuto. Luego se añadieron 25 ml de éter de petróleo. Después de una agitación vigorosa se dejó decantar y se recogió la fase orgánica, la cual se transfirió a un recipiente apropiado. Se repitió la extracción, mezclando la fase orgánica con la previamente obtenida. Finalmente, se evaporaron los disolventes y se pesó la grasa extraída. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de extracto seco.

II.4.2.3. Determinación del extracto seco

El extracto seco de los productos sólidos se determinó por duplicado como se describe en el apartado II.4.1.2., usando en este caso una muestra de 1 g.

II.4.2.4. Determinación del contenido de cenizas

Las cenizas de los productos sólidos se determinaron por duplicado, tal y como se describe en el apartado II.4.1.3. Los resultados se expresaron en porcentaje de extracto seco.

II.4.2.5. Determinación del contenido de calcio

El contenido de calcio se determinó por espectrofotometría de absorción atómica en un equipo Perkin Elmer, modelo 2380, de acuerdo con el método oficial de la AOAC (1996b).

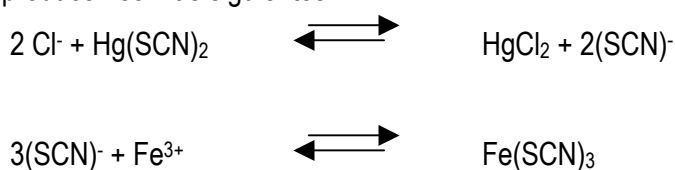
Una alícuota de la muestra incinerada tal y como se describe en el apartado II.4.2.4 se disolvió en una solución acuosa acidificada con HNO_3 . A 10 ml de solución conteniendo la muestra se añadieron 10 ml de solución acidificada de lantano (11,73 g La_2O_3 + 25 ml HNO_3 en 1000 ml de agua destilada). La mezcla se introdujo en el espectrofotómetro y se determinó la absorbancia a 422,7 nm. El resultado se refirió a una recta patrón previamente obtenida con varias concentraciones de una solución patrón de CaCO_3 . Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de extracto seco.

II.4.2.6. Determinación del contenido de fósforo

El contenido de fósforo se determinó de acuerdo con el método colorimétrico de la AOAC (1996b). La muestra se preparó de la misma manera que para la determinación del contenido en calcio. A 10 ml de solución de muestra se añadieron 10 ml de reactivo de molibdovanadato (60 g de molibdato de amonio tetrahidratado en 1 litro de agua + 1,5 g de metavanadato de amonio disuelto en 700 ml de agua y 300 ml de HNO₃) y, después del desarrollo del color, su absorbancia se leyó a 400 nm. El resultado se refirió a una recta patrón previamente obtenida a partir de varias concentraciones de una solución patrón de H₃PO₄. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de extracto seco.

II.4.2.7. Determinación del contenido de cloruros

El contenido de cloruros de las muestras líquidas se determinó mediante un método colorimétrico, siguiendo el procedimiento nº 461 y empleando el kit comercializado por Sigma diagnostics. Este método se basa en que los iones cloro desplazan cuantitativamente a los iones tioacianato del tiocianato mercúrico. El tiocianato liberado forma un complejo de color rojo al reaccionar con iones férricos, presentando una absorbancia máxima a 460 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de cloruro en la muestra. Las reacciones que se producen son las siguientes:



El reactivo para la determinación se suministraba listo para su uso y se componía de cloruro mercúrico (0,74 mmol/l), nitrato mercúrico (72,5 µmol/l), tiocianato mercúrico (1,7 mmol/l), nitrato férrico (22 mmol/l), ácido sulfúrico (10 mmol/l), ácido nítrico (30 mmol/l) y estabilizantes. Además se dispuso de una solución estándar que contenía 100 mEqu/l de cloruro, también suministrada por Sigma.

Se preparó una serie de tubos identificados como blanco, estándar y muestras. En cada tubo se colocó 1 ml del reactivo y se añadieron 10 µl de agua deionizada (blanco), de estándar o

de la muestra, según el caso, se mezcló y los tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó la medida de la absorbancia a 460 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Zuzi. La absorbancia obtenida en el blanco se restó de los valores correspondientes a las muestras y el estándar para determinar el cambio en absorbancia debido a los cloruros (ΔA). El contenido en cloruros de las muestras se calculó según la ecuación siguiente:

$$\text{Cl}^- (\text{mEq/l}) = (\Delta A \text{ muestra} / \Delta A \text{ estándar}) \times \text{concentración del estándar}$$

Los resultados se expresaron finalmente como porcentaje de extracto seco. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

II.5. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LOS PRODUCTOS EN POLVO

Las determinaciones de la composición nitrogenada se realizaron en la Facultad de Ciencias de Lugo. Todas ellas se efectuaron por duplicado.

II.5.1. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA

El contenido de α -lactalbúmina, β -lactoglobulina y seroalbúmina bovina, las tres proteínas implicadas en la funcionalidad de los productos derivados del lactosuero, se determinó mediante HPLC de fase reversa, siguiendo el método propuesto por Kim y col. (1987) y utilizando el gradiente de elución descrito por González de Llano y Santa María (1997). Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC; los patrones de las distintas proteínas procedían de Sigma.

Se prepararon disoluciones al 3% (p/v) de las muestras de los productos en polvo en 0,1% de ácido trifluoroacético en agua Milli-Q, así como varias disoluciones de distinta concentración de cada uno de los patrones de proteína con el fin de realizar las rectas patrón. A continuación se inyectaron en el cromatógrafo 20 μ l de muestras y estándares tras previa filtración utilizando filtros Millipore de 0,45 μ m de diámetro de poro.

Los análisis por RP-HPLC se realizaron en un cromatógrafo líquido Beckman System Gold, equipado con un módulo de bombas programable modelo 126, y con un detector de diodo array modelo 168. La separación de las proteínas se llevó a cabo utilizando una columna C4 de 300 Å de poro y 250 x 4,6 mm Supelcosil LC-304, suministrada por Supelco.

Como eluyente A se empleó ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) en agua Milli-Q, y el eluyente B fue ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) en acetonitrilo. Los eluyentes se desgasificaron en un baño de ultrasonidos Selecta, modelo Ultrasons-H durante 15 minutos. La separación se realizó a temperatura ambiente.

El gradiente empleado, expresado en proporción de eluyente B, fue el siguiente: entre el minuto 0 y el 1, 35%; entre el minuto 1 y el 8, 38%; entre el minuto 8 y el 16, 42%; entre el minuto 16 y el 22, 46%; 100% entre el minuto 22 y el 22,5, 100%; entre el minuto 22,5 y el 23,5, 35%. El flujo fue de 1 ml/min y la detección se efectuó a 210 nm.

La identificación se hizo teniendo en cuenta los tiempos de retención comparados con los de los estándares utilizados (β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y seroalbúmina). La cuantificación se realizó mediante el método de estándar externo. Se prepararon 6 soluciones patrón de cada proteína a concentraciones comprendidas entre 0,05 y 8 mg/ml y se inyectaron en el cromatógrafo, efectuando la separación en las condiciones descritas anteriormente. Con las áreas obtenidas y las concentraciones correspondientes se realizó una recta patrón por cada proteína a determinar. Las concentraciones de cada proteína en las muestras se calcularon por extrapolación en la recta patrón correspondiente. Los resultados finales se expresaron como gramos de proteína por 100 g de producto en polvo.

II.5.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPONENTES NITROGENADOS NO PROTEICOS Y DE PROTEÍNA VERDADERA

El contenido de nitrógeno no proteico se determinó por el método Kjeldahl, tal y como se describe en el apartado II.4.2.1. El nitrógeno no proteico se definió como el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12%, y los componentes nitrogenados no proteicos se calcularon multiplicando el nitrógeno no proteico por un factor de 3,60. La proteína verdadera se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Proteína verdadera} = (\text{Nitrógeno total} - \text{Nitrógeno no proteico}) \times 6,45$$

Los factores de conversión 3,60 y 6,45 utilizados son los recomendados por Karman y Van Boekel (1986) para los compuestos nitrogenados no proteicos y las proteínas de suero dulce, respectivamente. Los resultados se expresaron en gramos de proteína verdadera o de nitrógeno no proteico por 100 g de producto en polvo.

II.6. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS PRODUCTOS EN POLVO

Las determinaciones de la funcionalidad de los productos liofilizados se realizaron en la Facultad de Ciencias de Lugo.

II.6.1. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD PROTEICA

La solubilidad de la proteína a pH 4 y 7 se determinó por triplicado utilizando el método descrito por Morr y col. (1985). Aproximadamente 500 mg de muestra se disolvieron en 40 ml de NaCl 0,1M. Inmediatamente después de obtener una dispersión completa se ajustó el pH a 4,0 o 7,0 con soluciones de HCl o NaOH 0,1N según el caso. Las dispersiones se agitaron durante 1 hora en un agitador magnético a una velocidad que apenas permitía la formación de remolino; a lo largo de este período se controló el pH y se ajustó siempre que fue necesario. A continuación la dispersión se transfirió a un matraz aforado de 50 ml, diluyendo hasta la marca con la solución de NaCl 0,1M. Una alícuota de la dispersión se centrifugó a 20.000 x g durante 30 minutos en una ultracentrífuga Kontron, modelo Centrikon T-2070, a 15 °C. A continuación, el sobrenadante se filtró con papel de filtro Whatman nº 1.

Los contenidos de proteína del filtrado y de la dispersión inicial se determinaron por el método del biuret. Se tomó 1 ml de disolución de muestra al cual se le añadieron 4 ml de reactivo de biuret (1,5 g de $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 6 g de tartrato sódico-potásico tetrahidratado en 500 ml de agua destilada, a los cuales se añadieron 300 ml de NaOH al 10% (m/v) y se llevó todo a 1 litro con agua destilada). Tras agitarlo, se dejó la mezcla en reposo 30 minutos y se leyó después la absorbancia a 550 nm contra un blanco sin proteína (agua + reactivo). Como en cualquier técnica colorimétrica y cuantitativa, es necesario referir los resultados obtenidos a una recta patrón realizada de antemano, utilizando en este caso la seroalbúmina bovina como proteína

patrón empleando distintas concentraciones. Las determinaciones espectrofotométricas se efectuaron en un espectrofotómetro ultravioleta/visible (UV/VIS) Zuzi.

La solubilidad de la proteína se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Solubilidad proteica (\%)} = [\text{SPC} \times 50 / \text{SW} \times (\text{SP} / 100)] \times 100$$

donde,

SPC = concentración de proteína verdadera en el sobrenadante (mg/ml);

SW = peso de la muestra (mg);

SP = concentración de proteína verdadera en la muestra (%).

II.6.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIONANTES

II.6.2.1. Determinación de la capacidad emulsionante

La capacidad emulsionante de los productos liofilizados se determinó según el procedimiento turbidimétrico de Pearce y Kinsella (1978), modificado por Patel y Kilara (1990). Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Se preparó una disolución al 2% (m/v) de los deshidratados en tampón fosfato 0,1 M a pH 7. Esta solución se mantuvo en agitación durante una hora. Con el uso de un picnómetro Duran se determinó su densidad a 20°C, después de eliminar los gases disueltos en un baño de ultrasonidos Selecta. Una alícuota se desecó en una estufa a 120°C durante una hora para determinar su extracto seco.

A 75 ml de la solución de cada uno de los deshidratados (fase continua) se añadieron 25 ml de aceite de oliva (fase dispersa). La mezcla se emulsionó en homogeinizador Polytron modelo 15/30 PT, dotado de un vástago PTA 20 TS (Kinematica Ag), a 17.200 r.p.m. durante 3 minutos. Seguidamente, se retiró una alícuota que se diluyó 500 veces con una solución 0,1% (m/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS) en tampón fosfato a pH 7, y se midió su absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Zuzi. Una alícuota de la emulsión se desecó en estufa a 120° C una hora para determinarse su extracto seco. La densidad del aceite de oliva también se determinó con un picnómetro Duran.

La capacidad emulsionante, expresada como “índice de actividad emulsionante” (EAI, *emulsifying activity index*) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = (2 \times 2,303 \times A500) / (\Phi \times L \times C)$$

donde,

A500 = absorbancia de la emulsión diluída a 500 nm;

Φ = fracción volúmica de la fase dispersa;

L = anchura de la celda (m)

C = peso de producto por unidad de volumen de la dispersión de producto (g/m³)

La fracción volúmica de la fase dispersa se calculó de la siguiente forma:

$$\Phi = W_d \times (E - W_1) / W_d + W_1 [((1 + E) \times D_o) / D_m] - E]$$

donde:

W_d = (peso de la emulsión desecada/ peso de la emulsión);

E = concentración de solutos de la dispersión (masa/ unidad de masa de solvente);

W₁ = (pérdida de peso de la emulsión durante el desecado/peso de la emulsión);

D_o = densidad del aceite de oliva;

D_m = densidad de la solución de deshidratado.

II.6.2.2. Determinación de la estabilidad de la emulsión

La estabilidad de la emulsión (ESR, *emulsifying stability rating*) se determinó mediante el método de Tornberg y Hermansson (1977) con la modificación de Kim y col. (1989), usando alícuotas de las emulsiones preparadas como se ha descrito en el apartado II.6.2.1. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Inmediatamente después de la emulsificación se separaron dos alícuotas: una que correspondía a la emulsión original (E₀), y otra que se transfirió a un embudo de decantación y se mantuvo a 4°C durante 24 horas. Pasado ese periodo, se retiró la fracción inferior del embudo (E₂₄). En ambos casos se determinó el contenido en grasa por el método de Gerber.

En un butirómetro Gerber para leche entera se introdujeron 10 ml de H₂SO₄ al 90-91% y se agregaron 11 ml de la fracción E₂₄. A continuación se añadió 1 ml de alcohol isoamílico. Seguidamente se cerró el butirómetro y se agitó hasta completar la mezcla. Los butirómetros se sometieron a centrifugación a 1.200 r.p.m. en una centrifuga Gerber calentada a 65°C. La grasa

separada se midió directamente en la escala del butirómetro. En el caso de la fracción E₀, se utilizó un butirómetro para nata, al cual se añadieron 5 ml de la fracción y 5 ml más de agua destilada.

La estabilidad de la emulsión (ESR) se calculó como sigue:

$$\text{ESR (\%)} = (\text{GE}_{24} / \text{GE}_0) \times 100$$

donde:

GE₀ = Contenido en grasa de la emulsión en el momento de la preparación (% v/v);

GE₂₄ = Contenido en grasa de la emulsión a las 24 horas (% v/v).

II.6.3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESPUMANTES

La expansión de la espuma (FE) y la estabilidad de la espuma (FS) de las muestras en polvo se determinaron utilizando dispersiones con un 1% (m/v) de concentración de proteína a pH 7,0. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Las muestras deshidratadas se añadieron lentamente a vasos de precipitados conteniendo 250 ml de agua destilada, colocados en un agitador magnético en condiciones que originaron un vortex profundo. La agitación se mantuvo 30 minutos. De igual forma se preparó una dispersión de ovoalbúmina, proteína que se utilizó como referencia. Después de disueltas, las dispersiones se transfirieron al recipiente de una batidora Braun, modelo MR550, y batida a la velocidad máxima (10.000 r.p.m.) durante 5 minutos, utilizando el accesorio de batido.

De acuerdo con el método descrito por Patel y col. (1988), la espuma se transfirió rápidamente a una probeta de 2 litros, la cual, mantenida en la vertical, se sometió a dos rápidos movimientos de descenso, con el objetivo de eliminar las bolsas de aire presentes. Inmediatamente se midió el volumen total de la espuma. Ésta se dejó en reposo 30 minutos a temperatura ambiente y después se midió el volumen de líquido drenado de la siguiente manera: para volúmenes de líquido por encima de la marca de los 200 ml la lectura se hizo directamente de la probeta. Cuando los volúmenes de líquido quedaron por debajo de la marca de los 200 ml, se midió la distancia h (cm), entre la marca de los 250 ml y el menisco del líquido. El volumen V (ml) se determinó usando la siguiente fórmula:

$$V = \pi \times (D / 2)^2 \times h, \text{ siendo } D \text{ el diámetro interno de la probeta.}$$

La expansión de la espuma se calculó como sigue:

$$FE (\%) = [(FV - 250) / 250] \times 100$$

donde FV es el volumen inicial de la espuma.

La estabilidad de la espuma se calculó de la siguiente manera:

$$FS (\%) = 100 - [(\text{volumen de líquido drenado después de 30 min} / 250) \times 100]$$

II.6.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD GELIFICANTE

II.6.4.1. Preparación de los geles

Se prepararon disoluciones de las muestras en polvo en agua destilada a concentraciones de 20, 10 y 5% en vasos de precipitados de 100 ml. Las dispersiones se sometieron a agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, procediendo al ajuste del pH a 7 o 4 con NaOH o HCl 0,1N. Los geles se obtuvieron por calentamiento a 90°C durante 30 minutos en un baño termostático. Después se procedió a enfriarlos inmediatamente en agua con hielo hasta que alcanzaron 8°C. Finalmente, con el objetivo de permitir la maduración de los geles, se dejaron 15 horas a 8°C hasta su análisis reológico.

II.6.4.2. Determinación de las propiedades reológicas de los geles

Las pruebas reológicas dinámicas se realizaron en un reómetro de *stress* controlado Haake Rheostress, modelo RS 100 (Fisons), equipado con sistema de medición, unidad electrónica de control para el sistema de medidas, sistema de termostatación y ordenador para el manejo del sistema y análisis de datos. Las medidas se realizaron trabajando en modo oscilatorio y empleando un dispositivo de medición cono-plato C35/4 (con un ángulo de 4° y 35 mm de diámetro de cono).

En primer lugar, se realizaron barridos de tensión (*stress sweep*) a la frecuencia de 1 Hz con el objetivo de determinar la zona de comportamiento viscoelástico lineal de la muestra. A continuación, se determinaron el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') en el intervalo de frecuencias de 0,428-42,8 s⁻¹ a 20 Pa para los geles con 20 y 10% de concentración de polvo, y a 10 Pa para los geles con un 5% de concentración, siempre dentro de la zona viscoelástica lineal.

Las medidas se realizaron a temperaturas de 15°C y 60°C, después de calentar y mantener las muestras a estas temperaturas durante 3 horas, con el fin de estudiar la dependencia de la temperatura de los parámetros medidos. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

II.6.4.3. Estudio de la microestructura de los geles

La microestructura de los geles producidos como se describe en el apartado II.6.4.1 se estudió mediante microscopía electrónica de barrido. Las muestras se tomaron a las 24 horas de preparación de los geles y consistieron en cubos de 5 mm de lado, los cuales se conservaron en una solución acuosa de triclorometano al 10% (v/v) hasta su análisis.

Las muestras de geles se deshidrataron secuencialmente mediante sucesivos tratamientos en soluciones acuosas de etanol (30, 50, 70, 90, 100%). Después el etanol se sustituyó por acetona al 100% y se realizó un secado por punto crítico con CO₂ en un equipo Bal-Tec, modelo CPD 020. Después las muestras se metalizaron con una fina capa de iones de oro (300 Å, a 1.200 V y 10mA) en un equipo Jeol, modelo JFC-1100. Las observaciones de la microestructura se realizaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol, modelo JSM-T220 A, a 1.500 aumentos y operando a 15 kV. Las imágenes se recogieron utilizando una cámara fotográfica acoplada al microscopio electrónico.

II.7. ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DE QUESOS DE SUERO ADICIONADOS DE DESHIDRATADOS DE RETENIDOS DE ULTRAFILTRACIÓN Y DE MICROFILTRACIÓN

II.7.1. ELABORACIÓN DE QUESOS DE SUERO

Se elaboraron diecinueve lotes de quesos de suero (*requeijão*). El lote control se fabricó con 900 g de suero de queso y 100 g de leche bovina; dicha leche se estandarizó al 12,2% de extracto seco, 3,1% de proteína y 3,5% de materia grasa. Los dieciocho lotes restantes se elaboraron añadiendo los retenidos de ultrafiltración (UFRP) y de microfiltración (MFRP 0,65 y MFRP 0,20) de suero y los procedentes del *sorelho* (SUFPR, SMFRP 0,65 y SMFRP 0,20). A la mezcla de suero y leche se le añadieron los productos deshidratados con tasas de incorporación de 0,5, 1,0 y 1,5% (p/p).

Las mezclas preparadas se introdujeron en recipientes de acero inoxidable y se calentaron bajo agitación constante. Se controló la temperatura y cuando se detectó el inicio de la ebullición, se añadieron aproximadamente 20 ml de agua fría y se mantuvo la temperatura a 95°C durante 10 minutos. A continuación, las mezclas se introdujeron en sacos de desuerado previamente pesados y se llevaron rápidamente a una cámara de refrigeración a 2°C, en la cual se dejaron desuerar 24 horas. Transcurrido este tiempo se pesaron los sacos con el producto con el fin de calcular el rendimiento de fabricación y los correspondientes quesos de suero se extrajeron de los sacos y se conservaron durante 5 días en una cámara de refrigeración a 2°C.

El experimento se repitió cuatro veces, elaborando cada vez tres requesones del lote control y uno de cada uno de los otros lotes. La fabricación de los *requeijões* se realizó en la Escuela Superior Agraria de Coimbra.

II.7.2. ANÁLISIS REALIZADOS EN LOS QUESOS DE SUERO

Las determinaciones del extracto seco, de la firmeza, de los parámetros de color y los rendimientos de fabricación se realizaron en la Escuela Superior Agraria de Coimbra. El estudio de la microestructura se efectuó en las instalaciones del Campus de Lugo.

II.7.2.1. Determinación del contenido en extracto seco

El extracto seco de cada queso se determinó por duplicado tras 1, 3 y 6 días de la coagulación, tal y como se describe en el apartado II.4.1.2., usando en este caso una muestra de 3 g.

II.7.2.2. Determinación de los rendimientos de fabricación

II.7.2.2.1. Rendimiento bruto

El rendimiento bruto se determinó del siguiente modo:

Rendimiento bruto (%) = $[\text{Peso del queso de suero} / \text{Peso inicial de suero+leche+polvo}] \times 100$

II.7.2.2.2. Rendimiento corregido

El rendimiento corregido se determinó teniendo en cuenta un extracto seco de referencia a las 24 horas del 30% (m/m). Esto se determinó en acuerdo con la siguiente ecuación:

Rendimiento corregido (%) = [Extracto seco de queso de suero (%) / 30] x Rendimiento bruto

II.7.2.2.3. Recuperación de extracto seco

La recuperación de extracto seco (DMR) se calculó de la siguiente forma:

$$\text{DMR (\%)} = \frac{\text{Peso del requesón (g)} \times \text{E.S. requesón (\%)}}{100 \times 12,2 + 900 \times 11,35 + \text{peso de polvo (g)} \times \text{E.S. del polvo (\%)}} \times 100$$

donde,

E.S. = extracto seco;

100 = peso de la leche añadida (g);

12,2 = extracto seco de la leche añadida (%);

900 = peso del suero añadido (g);

11,35 = extracto seco del suero (%);

II.7.2.3. **Determinación de la firmeza**

La firmeza relativa de los quesos de suero se midió con un texturómetro Stevens LFRA™ (Stevens & Sons Ltd., UK), equipado con una sonda cilíndrica TA 24 de 4 mm de diámetro. La evaluación de este parámetro se realizó tras 1, 3 y 6 días de la coagulación, haciendo penetrar la sonda en una superficie lisa del mismo hasta una profundidad de 20 mm a una velocidad de 10 mm/s. Se tomó como medida de la firmeza relativa del producto a la fuerza máxima (g) necesaria para lograr la penetración. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

II.7.2.4. **Determinación del color**

El color de las muestras se determinó empleando un colorímetro Minolta modelo CR 200 (Minolta Camera Co., Osaka, Japon). Todas las medidas se realizaron en el espacio de color

Hunter Lab, usando el iluminante estándar D65 y el observador estándar 10°. Antes de realizar las medidas en las muestras, el instrumento se calibró frente a un patrón blanco ($L = 97,8$; $a = -0,6$; $b = 2,1$). Los parámetros de color se expresaron como L (luminosidad), a (coordenada rojo-verde) y b (coordenada amarillo-azul). Las determinaciones se realizaron por duplicado tras 1, 3 y 6 días de la coagulación.

II.7.2.5. Estudio de la microestructura de los quesos de suero

El estudio de la microestructura de los quesos de suero mediante microscopía electrónica de barrido se realizó a las 24 horas de coagulación de acuerdo con el método descrito en el apartado II.6.4.3., aunque operando a 15 o 20 kV según la muestra.

II.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados relacionados con los flujos de permeación, la composición general de productos líquidos, la composición general y nitrogenada de los productos deshidratados, así como los datos de las propiedades funcionales de los retenidos de ultrafiltración y los de diafiltración deshidratados, se analizaron mediante ANOVA de un factor, y las medias se compararon usando el test de la diferencia menos significativa con una significancia de $p \leq 0,05$. La comparación de medias de la solubilidad proteica a diferentes valores de pH se efectuó usando t-test. Estos análisis se realizaron utilizando el programa Statistica versión 5.1 para Windows (StatSoft Inc., USA, 1997).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de las características del *requeijão* se efectuó también mediante ANOVA de un factor, comparando las medias mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett y empleando el programa SPSS 12.0 versión 12.0.1 para Windows (2003).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. MANUSCRITOS

1. Pereira, C.D., Díaz, O., Cobos, A. (2002). Valorization of by-products from ovine cheese manufacture: clarification by thermocalcic precipitation/microfiltration before ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 12 (9), 773-783.
2. Díaz, O., Pereira, C.D., Cobos, A. (2004). Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products. *Food Hydrocolloids*, 18 (4), 601-610.
3. Díaz, O., Pereira, C.D., Cobos, A. (2005). Rheological properties and microstructure of heat-induced gels of ovine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. *Milchwissenschaft*. Aceptado.
4. Pereira, C.D., Díaz, O., Cobos, A. (2005). Use of ovine whey protein concentrates and clarification by-products on whey cheese: impact on yield and quality. *International Dairy Journal*. Enviado.

Valorization of by-products from ovine cheese manufacture: clarification by thermocalcic precipitation/microfiltration before ultrafiltration

Carlos D. Pereira^a, Olga Diaz^b, Angel Cobos^{b,*}

^aEscola Superior Agrária de Coimbra (ESAC/IPC), Bencanta, 3040-316 Coimbra, Portugal

^bFacultad de Ciencias de Lugo, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Área de Tecnología de Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

Received 3 July 2001; accepted 13 May 2002

Abstract

The objective of this work was to valorize ovine cheese whey and deproteinized whey (*Sorelho*), resulting from portuguese whey cheese (*Requeijão*) manufacture, by means of thermocalcic precipitation and microfiltration (TP/MF) followed by ultrafiltration–diafiltration (UF/DF). The chemical composition of microfiltration and UF/DF retentate powders was studied and compared with that of conventional ultrafiltration powders, in view of further applications.

Clarification of by-products from ovine cheese manufacture by TP/MF significantly improved posterior ultrafiltration treatments. When ovine cheese whey was used, microfiltration retentate powders obtained using a 0.20 μm pore size membrane showed higher protein concentration than powders produced with a 0.65 μm membrane, while no significant differences were found in the protein content of *Sorelho* MF powders. In all cases, UF/DF retentate powders from clarified products using a 0.65 μm microfiltration membrane showed the highest protein concentration. Clarified and diafiltered products presented the lowest Ca²⁺ levels.

It could be concluded that the clarification procedure studied, particularly the use of a 0.65 μm microfiltration membrane in clarification treatment, allowed us to obtain acceptable microfiltration fluxes and improved ultrafiltration rates and also gave rise to products of potential use in the food industry. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ovine cheese whey; Deproteinized whey; Whey clarification; Microfiltration

1. Introduction

Southern European countries are major producers of ovine cheeses. Ovine cheese production is normally associated with Protected Geographical Indication labels, and the majority of production plants are of small to medium scale. In most cases the whey resulting from cheese production is disposed off into public sewage, since the existing plants do not possess the technology for the recuperation of its components. In small scale plants (i.e. processing < 1 × 10⁵ L of milk per year) the utilization of whey does not seem to be a problem since it may be used as complementary feed-stock for animal feed. However, larger scale production makes the use of complex and expensive treatment

systems necessary in order to avoid environmental problems.

In some countries (e.g. Italy, Spain and Portugal), part of the production of ovine cheese whey is further processed in order to obtain products such as *Ricotta*, *Requesón* and *Requeijão* (Italian, Spanish and Portuguese whey cheeses, respectively). The latter product is obtained by heating the whey to ca. 90–100°C for 15–30 min, with or without addition of 10–20% (v/v) of ovine/caprine milk. Pintado, Lopes da Silva, and Malcata (1996), characterized the product and reported on the optimization of its manufacturing process. At the moment, this process seems to be the easiest method for the recuperation of valuable components from ovine cheese whey, and *Requeijão* is well accepted by Portuguese consumers. However, all cheese whey production can not be transformed due to the high volumes generated.

*Corresponding author. Tel.: +34-982223325; fax: +34-982224904.
E-mail address: cobusa@lugo.usc.es (A. Cobos).

The residual “deproteinized” whey called *Sorelho*, resulting from the manufacture of *Requeijão*, contains approximately 60% of the original dry matter of whey. Lactose and minerals largely contribute to its dry mass, but residual fat and non-thermally precipitated nitrogen components are still present. The composition of this product does not allow for its direct disposal without treatment. Hence, attempts to recover some of the solid components present before final disposal may be of interest. Concomitantly, the market for milk and whey powders of ovine origin might be a potential means of reducing the limitations imposed by seasonal productions, since the production of ovine milk in Mediterranean countries is concentrated in winter and spring. In addition, the use of these powders as additives to other milks, with the objective of producing novel products such as mixture cheeses, also offers some market potential.

The whey, mainly resulting from bovine cheese production, is normally transformed into whey protein concentrates and whey protein isolates of high economical value due to the high nutritional (Hambraeus, 1992) and functional (Mulvihill, 1992) properties of its proteins. The utilization of membrane technologies for the production of bovine whey protein concentrates or for the purification of their components (e.g. β -lactoglobulin, α -lactalbumin) is nowadays common and of growing economical interest. However, the lack of uniformity in composition and the presence of fat in whey protein concentrates may restrict their utilization (Morr & Ha, 1993).

The non-centrifugeable residual lipids present in these products are mainly phospholipoproteins resulting from the fat globule membrane (Maubois, Pierre, Fauquant, & Piot, 1987). Their presence in the whey favors rapid ultrafiltration (UF) membrane fouling with substantial decrease in membrane performance (Muller & Harper, 1979; Hiddink, De Boer, & Nooy, 1981), as well as detrimental effects on the functional properties of whey protein concentrates (Pearce, Marshall, & Dunkerley, 1991; Karleskind, Laye, Mei, & Morr, 1995a). Most researchers focused mainly on the fractionation processes as well as on the enhanced processing and functional properties of delipidized whey powders (Fauquant, Vieco, Brule, & Maubois, 1985; Rinn, Morr, Seo, & Surak, 1990; Daufin, Michel, Labbé, Quemerais, & Grangeon, 1993; Pierre, Le Graet, Daufin, Michel, & Gésan, 1994; Karleskind, Laye, Mei, & Morr, 1995b, c; Karleskind, Laye, Morr, & Schenz, 1996).

Thermocalcic precipitation followed by microfiltration for the removal of the non-centrifugeable lipids of whey was firstly proposed by Fauquant et al. (1985). This pre-treatment is based on the formation of insoluble lipid–calcium phosphate aggregates at moderate temperatures and neutral pH. The associated proteins precipitate with the lipid–calcium phosphate

aggregates (Baumy, Gestin, Fauquant, Boyaval, & Maubois, 1990). Some authors call attention to the potential functional properties, namely the emulsifying capacity (Maubois, 1984; Joseph & Mangino, 1998) of the extracted phospholipoproteins.

The information about ovine cheese whey and deproteinized ovine whey is not abundant. Recent work of Casper, Wendorf, and Thomas (1999) evidences the superiority of ovine and caprine whey protein concentrates in what concerns functional properties such as foaming and gelling. The production of powders from *Scotta*, a ovine deproteinized whey obtained from the manufacture of *Ricotta*, as well as some of their functional properties were reported by Comendador, Nardo, Bertone, Maurizi, and Quaglia (1996). Pizzichini et al. (1995) also studied the application of membrane technologies to this product and observed that the recuperation by UF of proteins present in *Scotta* allowed for a reduction of 40% of its pollutant effect. However, the application of thermocalcic precipitation followed by microfiltration (TP/MF) to ovine cheese whey and deproteinized whey is not reported in literature.

The objective of this work was to valorize ovine cheese whey and deproteinized whey resulting from whey cheese manufacture by means of thermocalcic precipitation and microfiltration followed by ultrafiltration–diafiltration (UF/DF). The chemical composition of microfiltration and UF/DF retentate powders was compared with the one of conventional ultrafiltered powders and studied in view of further applications. The effect of TP/MF using two microfiltration membranes (0.65 and 0.20 μm pore size) on subsequent UF fluxes was evaluated by comparison with original whey UF fluxes, in order to obtain information about the technological feasibility of such a procedure.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Ovine cheese whey and deproteinized whey (*Sorelho*) were obtained from the Association of Producers of *Serra da Estrela* Sheep (ANCOSE/Portugal). Sample preparation was similar for both products. Immediately after reception, the products were skimmed by means of a Westfalia™ separator type ADB. Approximately 100 L of each product (cheese whey or *Sorelho*) were used in each trial; 50 L were submitted to conventional UF and 50 L were used for thermocalcic precipitation–microfiltration followed by UF and diafiltration.

All experiments were made in triplicate. An overview of the successive steps is shown in Fig. 1.

Thermocalcic precipitation was carried out following the method described by Fauquant et al. (1985): the

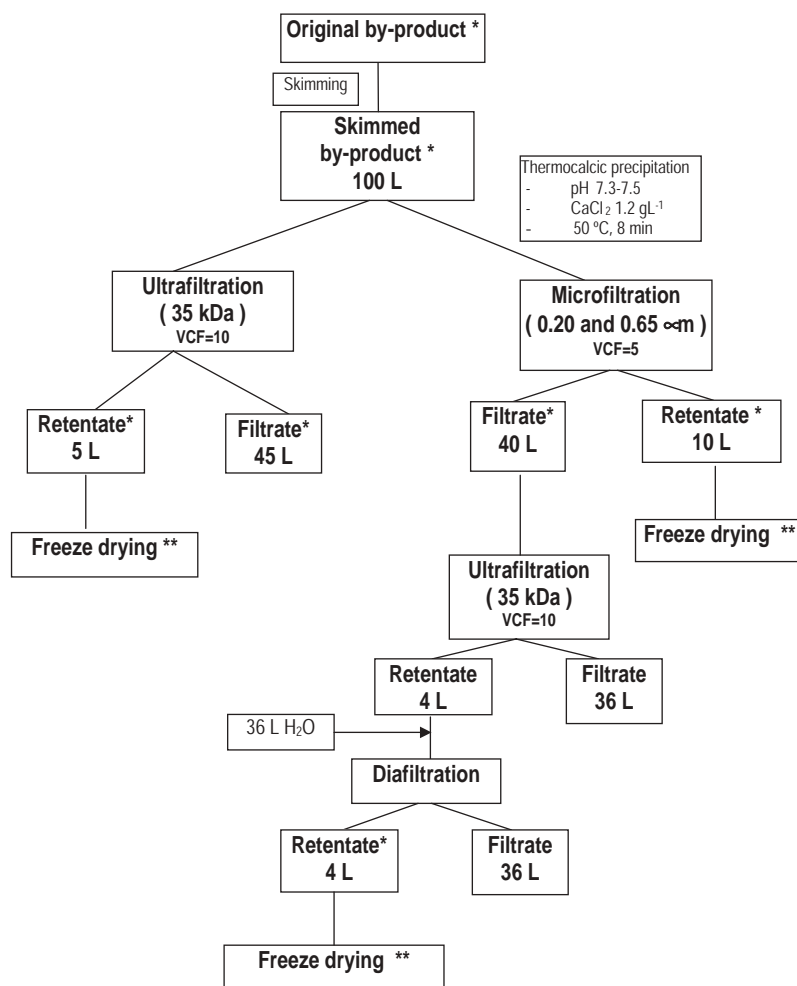


Fig. 1. Diagram of the process employed for the production of ultrafiltration retentate powders, microfiltration retentate powders and diafiltration retentate powders: (*) intermediate sampling steps of liquid products; (**) dry products.

calcium content of the skimmed products was adjusted to 1.2 g L^{-1} with CaCl_2 10N, the pH adjusted to 7.3–7.5 with NaOH 10N and the temperature rapidly raised to 50°C and maintained at this value for 8 min. Finally, the whey products were cooled to $4\text{--}6^\circ\text{C}$ and kept overnight prior to MF. Microfiltration was performed in batch conditions, starting with a feed recirculation flow rate of 2000 L h^{-1} in order to maintain the transmembrane pressure in the range 1.6–1.8 bar. A pilot unit, equipped with hollow fiber membranes of $0.20 \mu\text{m}$ or $0.65 \mu\text{m}$ diameter pore sizes, was used. The 0.20 (1.0 mm internal diameter, and 0.8 m^2 surface area, model CFP-2-E-35 A) and the $0.65 \mu\text{m}$ (0.75 mm internal diameter, and 1.0 m^2 surface area, model CFP-6-D-35 A) membranes were supplied by A/G™ Technology Corporation. The final volume of retentate was 20% of the initial volume of the feed (volumetric concentration factor (VCF)=5). The initial temperature of the feed was in the $8\text{--}10^\circ\text{C}$ range.

Ultrafiltration of skimmed non-clarified by-products was performed in batch conditions using a PLEIADE™

UFP 10 BIO plate and frame system equipped with an IRIS™ organic (acrylonitrile copolymer) membrane (1.1 m^2 surface area, 35 kDa MW cut-off) (Rhône Poulenc Tech-Sep). The ultrafiltration process started with a feed recirculation flow rate of 2000 L h^{-1} and at a transmembrane pressure of 1.9–2.1 bar. At the final stages of concentration, the feed recirculation was gradually reduced in order to maintain transmembrane pressure in the same range of values. A ten-fold volumetric concentration factor (VCF=10) of the retentate was applied. The initial temperature of the feed was in the $10\text{--}12^\circ\text{C}$ range. The microfiltration filtrates were submitted to ultrafiltration (VCF=10) in the same conditions, in order to compare fluxes with those of the non-clarified product. The pHs of the original whey and *Sorelho* were in the 5.2–5.6 range and the ones of microfiltration filtrates were in the 7.3–7.5 range.

Subsequently, the ultrafiltration retentates of the microfiltration filtrates were diafiltrated by addition of

36L of deionized water followed by concentration (VCF=10) in order to produce the final diafiltration retentates. Diafiltration working parameters were maintained as in the case of UF. The water permeation flux was measured at the beginning of each UF trial.

The liquid ultrafiltration retentate, the microfiltration retentates and the diafiltration retentates (from the microfiltration filtrates) were freeze dried in a Lyph-Lock™ (Labconco) freeze dryer for compositional analysis. Fig. 1 also shows the sampling steps in which aliquots of original and intermediate liquid products were taken for chemical analysis.

2.2. Compositional analysis

Protein and fat of the liquid intermediate products were determined by infrared spectroscopy with the Lactoscope™ model C3 (Delta Instruments). The equipment was calibrated with ovine cheese whey using the Kjeldahl and the gravimetric procedure of AOAC (AOAC, 1996a) as references for protein and fat, respectively. Values below 0.5% (w/v) were calculated based on their concentration in dry products. All the other compositional analyses of intermediate and final products were determined as follows: dry matter by oven drying at 105°C for 12 h; ash by incineration at 550°C for 6 h; protein by the Kjeldahl method (Kjeltec System 1003-Tecator™) (N*6.38); fat according to the gravimetric AOAC procedure (AOAC, 1996a); chloride by the Sigma Diagnostics kit (Sigma-Aldrich Chemical CO); Ca²⁺ by atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer™, model 2380); PO₄²⁻ according to the colorimetric method of AOAC (1996b). All determinations were made in duplicate.

2.3. Statistical analysis

The results were analyzed by one-way ANOVA and the means were compared using the least significant difference test with significance at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were implemented with the Statistica™ package (StatSoft Inc. USA).

3. Results and discussion

3.1. Composition of ovine cheese whey and deproteinized whey (Sorelho)

Table 1 shows the composition of original ovine cheese whey and of the corresponding deproteinized whey (Sorelho) resulting from whey cheese production. All cheese whey components showed higher values than those reported by Casper, Wendorff, and Thomas (1998) for Manchego-type cheese whey, except for the protein contents that were lower. Fat and ash concen-

Table 1

Composition of original ovine cheese whey and of “deproteinized” ovine whey (Sorelho). Mean values and standard deviation (\pm) ($n = 6$)

(%)	Ovine cheese whey	(\pm)	Sorelho	(\pm)
Dry matter	11.35	(0.28)	6.71	(0.64)
Protein	1.53	(0.45)	0.49	(0.09)
Fat	1.11	(0.53)	0.53	(0.28)
Ash	2.90	(0.34)	2.08	(0.11)

trations were also higher than those found by Chianese et al. (1996) in ovine cheese whey. A similar observation can be made for Sorelho composition in comparison with data reported by the latter authors. Table 1 allows us to calculate the retention of solid components occurring in the manufacturing process of Requeijão. This process approximately reduces the dry matter of whey by 40%, nitrogen by 74% and fat by 60%. The recovery of protein in the manufacturing process of Requeijão coincides with data reported by Pintado, Macedo, and Malcata (2001) for whey cheeses made with incorporation of 10% (w/w) milk to the whey.

3.2. Processing parameters

The evolution of UF permeation fluxes and VCF for the products clarified with the 0.20 μm and with the 0.65 μm MF membranes as well as those of non-clarified products are displayed in Fig. 2 ((A) ovine cheese whey; (B) Sorelho). The evolution of the temperature of the products during the ultrafiltration process followed a regular increase from 8–12 to 32–36°C (average ΔT was 0.31°C min⁻¹ from min 0 to min 75); it was not controlled until an anticipated maximum of 45°C was reached.

The ultrafiltration flux patterns were similar and not significantly different between skimmed whey and skimmed Sorelho (SW and SS) and between their respective MF filtrates (MFF and SMFF) obtained with both MF membranes. Ultrafiltration fluxes decreased from 0 to 15 min, as a result of the deposition of fouling materials on the surface of the membrane. Afterwards, except in Sorelho clarified products, the permeate flow rates were relatively constant probably due to the gradual increase in the temperature of the product. The permeate flow rates of Sorelho clarified products showed a constant decrease from the beginning, particularly the products obtained using a 0.20 μm membrane. At high volumetric concentration factors, the increased solids concentration of retentates started to affect UF filtrate fluxes negatively, as was clearly observed in the case of the clarified products. The improvements in flux for products clarified by TP/MF, calculated as the ratio between the volumes of permeate in clarified and non-clarified products collected until

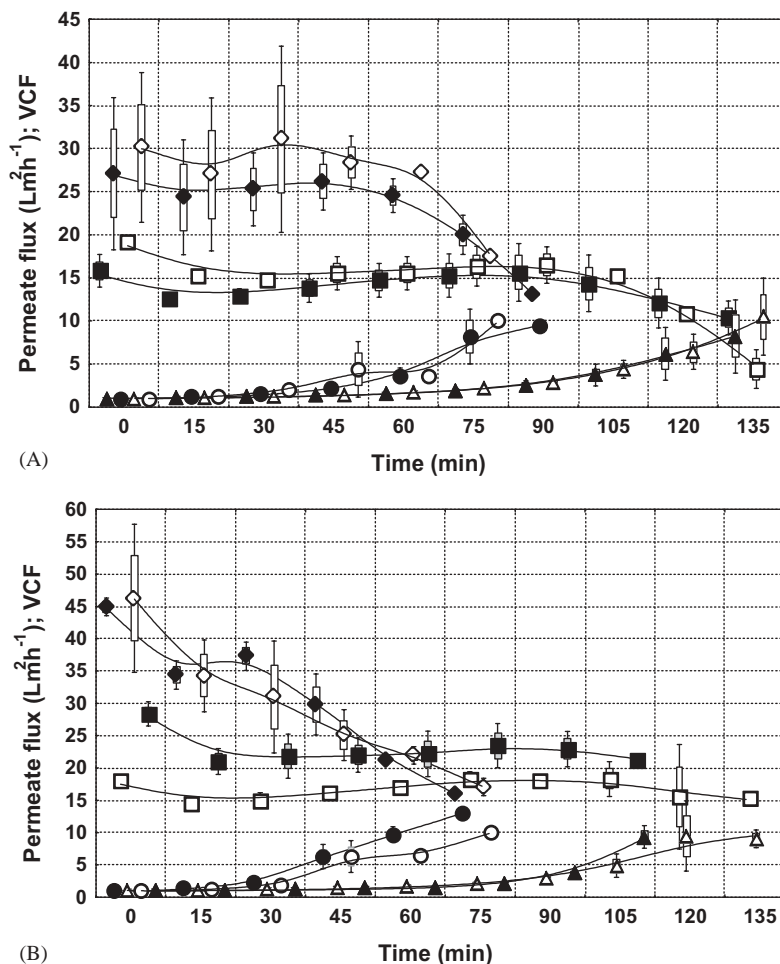


Fig. 2. Experimental flux data obtained with UF trials: (A) Ovine cheese whey; (B) *Sorelho*. Permeate fluxes (Lm^2h^{-1}) (■) and volumetric concentration factor (VCF) (▲) for UF of skimmed product (similar to that used in trials with $0.65\ \mu\text{m}$ MF membrane, see below). Idem (□ PF and (△) VCF) for skimmed product (similar as that used in $0.20\ \mu\text{m}$ MF trials, see below). PF (◆) and VCF (●) correspond to UF of MF filtrates obtained using $0.65\ \mu\text{m}$ membrane. PF (◇) and VCF (○) correspond to UF of MF filtrates obtained using $0.20\ \mu\text{m}$ membrane. Mean; box: mean \pm standard error; whisker: mean \pm standard deviation ($n = 3$). Curve fit by distance weighted-least squares.

min 75, ranged from 1.4 to 1.7 for both MF membrane types.

Fig. 3 ((A) ovine cheese whey; (B) *Sorelho*) shows UF fluxes as the % of water flux of the cleaned membranes at the beginning of each test. This type of presentation takes into account the variations noticed in the water permeation flux of the membrane from trial to trial. The positive effect of previous clarification of whey on subsequent UF fluxes is clearly observed. Clarified whey and *Sorelho* showed superior UF fluxes with clear advantages for the use of $0.20\ \mu\text{m}$ MF. With this MF membrane an improvement in the relative filtrate flux (calculated as the ratio between the average of relative permeation fluxes of clarified and non-clarified products) of 3.2 times was observed in the case of whey, and of 2.4 times in the case of *Sorelho*. For the treatment with the $0.65\ \mu\text{m}$ membrane, the improvements were 1.6 and 1.3 times, respectively for whey and *Sorelho*. In both

types of TP/MF treatments, the respective permeation fluxes did not show significant differences. The values obtained with the $0.20\ \mu\text{m}$ membrane were superior to the improvement factor of 1.8 times reported by Maubois et al. (1987) using a $0.25\ \mu\text{m}$ MF membrane.

However, one has to mention that previous clarification with the $0.20\ \mu\text{m}$ membrane took significantly more time than the one with $0.65\ \mu\text{m}$ pore size, due to lower average filtrate flow rates. In fact, the $0.65\ \mu\text{m}$ membrane showed an average permeation rate of $31.1 \pm 5.6\ \text{Lm}^{-2}\text{h}^{-1}$ whereas the $0.20\ \mu\text{m}$ one had permeation rates of $19.1 \pm 6.8\ \text{Lm}^{-2}\text{h}^{-1}$. These values can be considered low in view of the needs of industrial processes. Although hollow fiber membranes show the best ratio surface area/volume and low dead volumes, they are more sensitive to fouling (Cheryan, 1986). The use of ceramic based multi-channel membranes and of equipment able to run with uniform and low

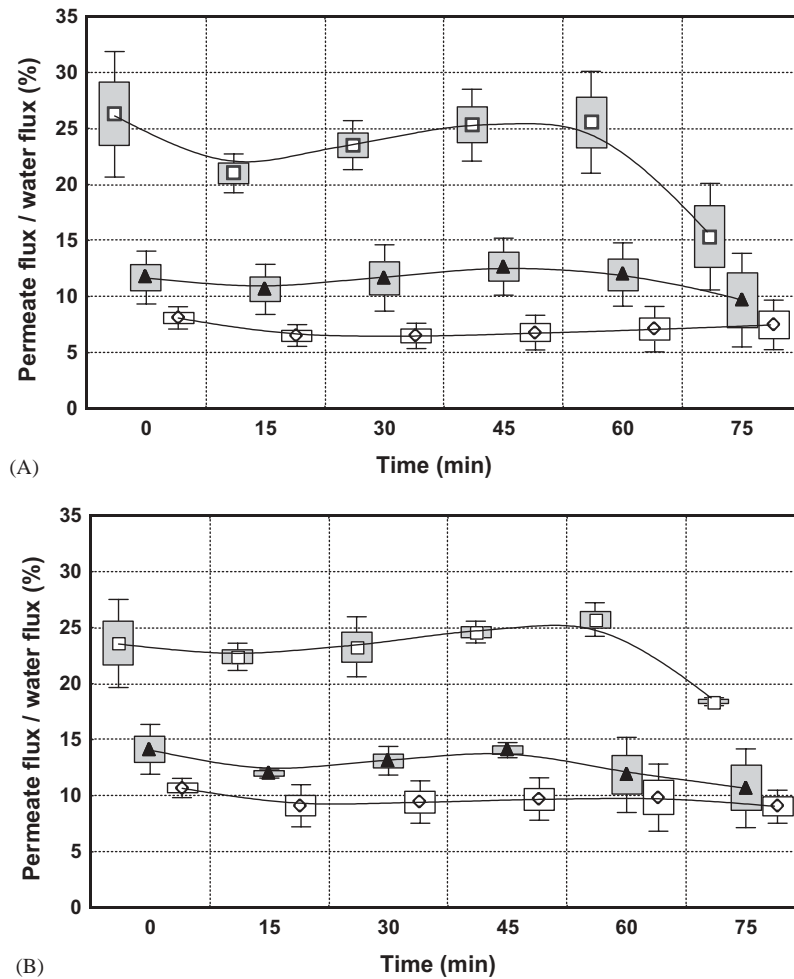


Fig. 3. Relative UF fluxes of non-clarified and clarified products: (A) Ovine cheese whey; (B) *Sorelho*. (\diamond) Skimmed non-clarified products ($n = 6$); (\square) clarified products previously microfiltered through $0.20\ \mu\text{m}$ membrane; (\blacktriangle) idem for $0.65\ \mu\text{m}$ membrane. Mean; box: mean \pm standard error; whisker: mean \pm standard deviation ($n = 3$). Curve fit by distance weighted-least squares.

transmembrane pressure by means of co-current recirculation of the filtrate could improve MF filtration rates significantly (Sandblom, 1974; Kessler, 1997). This aspect must be considered in a large-scale operation.

3.3. Compositional analysis of liquid products

Fig. 4 (ovine cheese whey) and Fig. 5 (*Sorelho*) show the changes in the composition of the different liquid products along the processing steps employed. The most noticeable fact is the very high retention of protein by the $0.20\ \mu\text{m}$ MF membrane. Appropriate mass balances (taking into account the volumes of microfiltration retentates (MFR) and microfiltration filtrates (MFF) produced) show that the $0.20\ \mu\text{m}$ MF membrane retained 84.6% and 75.0% of the original protein found in skimmed ovine cheese whey and skimmed *Sorelho*, respectively. Therefore, in these cases, only 15.4% and 25.0% of the original proteins were further utilized for the production of diafiltrated powders. With the $0.65\ \mu\text{m}$

MF membrane treatments, 47.5% and 40.8% of the original proteins found in skimmed ovine cheese whey and skimmed *Sorelho*, respectively, were filtered and further utilized. Even in this case, the values obtained can be considered low, if the intention is only to produce protein-rich diafiltration retentates powders.

The ash content of liquid diafiltrated products showed significantly lower values than those observed in other liquid products.

One must also point out the fact that the protein concentration factors of the retentates of conventional ultrafiltration (5.2 ± 1.4 and 6.2 ± 2.4 for whey and *Sorelho*, respectively) and of diafiltration (4.2 ± 1.6 and 2.8 ± 1.9 for whey and *Sorelho*, respectively) do not reflect the VCF 10 applied. This is probably due to: (1) the dilution of the volume of product with approximately 3 L of water retained in dead volumes; (2) a protein retention lower than 100%, presumably by loss of α -lactalbumin and lower molecular weight nitrogen compounds in the filtrate, owing to the relatively high

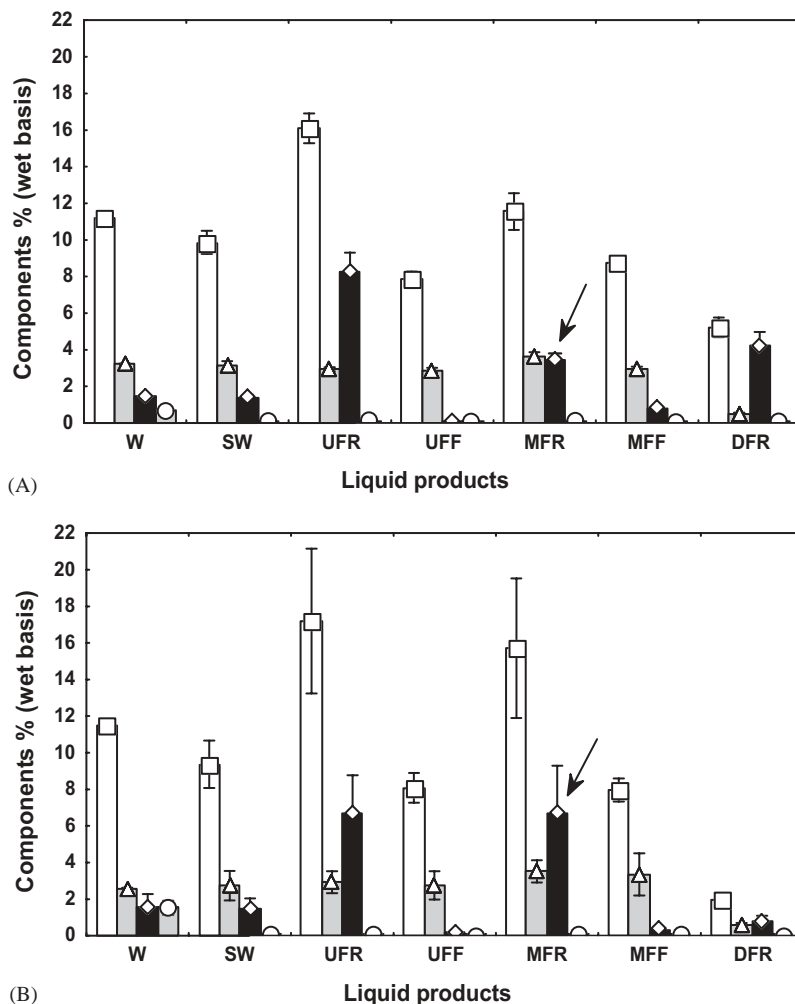


Fig. 4. Chemical composition of original and intermediate liquid ovine cheese whey products: (A) whey and whey products submitted to microfiltration with 0.65 μm membrane; (B) whey and whey products submitted to microfiltration with 0.20 μm membrane. W: ovine cheese whey; SW: skimmed whey; UFR: retentate of ultrafiltration; UFF: filtrate of ultrafiltration; MFR: retentate of microfiltration; MFF: filtrate of microfiltration; DFR: diafiltration retentate: (□), dry matter; (△), ash; (◇), protein; (○), fat. Whisker: mean \pm standard deviation ($n = 3$).

molecular weight cut-off of the membrane; (3) the high foaming capacity of MF filtrates—leading to protein losses in the balance tank during posterior UF and diafiltration. This latter cause evidences the better foaming capacity of clarified products already referred to by other authors (Pearce et al., 1991; Maubois, 1984), encouraging further research on this functional property.

The changes in the fat content of the different liquid products during the processing steps are shown in Table 2. From the data presented, it can be concluded that, after centrifugation, around 5% (between 2.2% and 8.6%) of the original fat still remained in the skimmed products. Taking into account the volumes of each product, it can be observed that, on average, 15% (between 7.0% and 26.6%) and 11% (between 6.0% and 16.5%) of the lipids of the skimmed products were found in ultrafiltration retentates (UFR) and

ultrafiltration filtrates (UFF), respectively. The low levels of this component detected in UFR resulted from the fact that, during processing, significant losses of fat in the retentate side occurred. These losses, most probably, were due to the adherence of fat to the walls of the equipment and to the surface of the membrane. This fact can also explain the low levels of this component found in whey and *Sorelho* ultrafiltration retentate powders (Tables 3 and 4, respectively).

In the case of the MF treatments, around 63% of the fat detected in skimmed products was found in three types of MFF: for ovine cheese whey with a 0.65 μm membrane (62.6%), with a 0.20 μm membrane (63.2%) and for *Sorelho* with a 0.65 μm membrane (64.0%). In these cases, the MF membranes retained around 37% of the fat. For *Sorelho* with a 0.20 μm membrane, only 21.3% of fat was detected in MFF. However, the fat

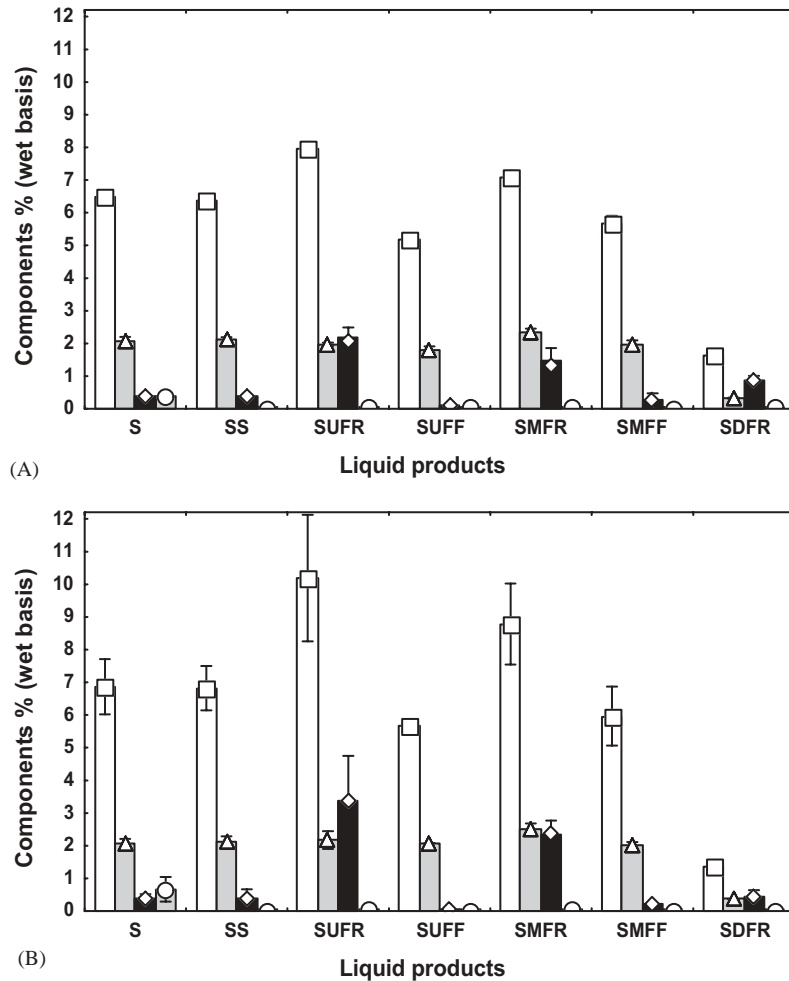


Fig. 5. Chemical composition of original and intermediate liquid *Sorelho* products: (A) *Sorelho* and *Sorelho* products submitted to microfiltration with 0.65 µm membrane; (B) *Sorelho* and *Sorelho* products submitted to microfiltration with 0.20 µm membrane. S: deproteinized whey (*Sorelho*); SS: skimmed *Sorelho*; SUFR: retentate of ultrafiltration; SUFF: filtrate of ultrafiltration; SMFR: retentate of microfiltration; SMFF: filtrate of microfiltration; SDFR: diafiltration retentate: (□), dry matter; (△), ash; (◇), protein; (○), fat. Whisker: mean ± standard deviation ($n = 3$).

Table 2

Changes of the fat content (g L^{-1}) of liquid cheese whey and *Sorelho* products during the successive steps of the filtration process

Ovine cheese whey	W	(±)	SW	(±)	UFR	(±)	UFF	(±)	MFR	(±)	MFF	(±)	DFR	(±)
A	6.97	(1.79)	0.60	(0.35)	0.70	(0.10)	0.11	(0.02)	0.61	(0.17)	0.47	(0.15)	0.25	(0.05)
B	15.27	(3.80)	0.76	(0.25)	0.53	(0.06)	0.07	(0.06)	0.64	(0.14)	0.60	(0.01)	0.12	(0.03)
<i>Sorelho</i>	S	(±)	SS	(±)	SUFR	(±)	SUFF	(±)	SMFR	(±)	SMFF	(±)	SDFR	(±)
A	4.00	(0.35)	0.25	(0.04)	0.39	(0.11)	0.03	(0.06)	0.37	(0.15)	0.20	(0.17)	0.04	(0.00)
B	6.67	(3.79)	0.15	(0.06)	0.40	(0.36)	0.01	(0.00)	0.35	(0.27)	0.08	(0.03)	0.06	(0.03)

(A) Batches submitted to UF or clarification with 0.65 µm membrane. (B) Batches submitted to UF or clarification with 0.20 µm membrane. Mean values and standard deviation (±) ($n = 3$). Note: Ovine cheese whey (W); *Sorelho* (S); skimmed whey (SW); skimmed *Sorelho* (SS). Ultrafiltration retentate of whey (UFR) or of *Sorelho* (SUFR); ultrafiltration filtrate of whey (UFF) or of *Sorelho* (SUFF); microfiltration retentate of whey (MFR) or of *Sorelho* (SMFR); microfiltration filtrate of whey (MFF) or of *Sorelho* (SMFF); diafiltration retentate of whey (DFR) or of *Sorelho* (SDFR).

content of neither liquid nor solid MFR products reflected this retention due to the reasons already mentioned above concerning the UF retentates. The final diafiltration step of liquid MFF also caused losses

of fat on the retentate side; so, the diafiltration retentates from ovine cheese whey (DFR) and *Sorelho* (SDFR) only showed between 1% and 3% of the fat contained in the skimmed products.

Table 3
Chemical composition of dry ovine cheese whey products

	UFRP	(±)	MFRP 0.65 µm	(±)	MFRP 0.20 µm	(±)	DFRP 0.65 µm	(±)	DFRP 0.20 µm	(±)
Dry matter (%)	88.77 ^{ab}	(0.32)	88.99 ^{ab}	(1.05)	90.29 ^a	(2.68)	86.90 ^b	(1.05)	86.58 ^b	(2.40)
Protein (% DM)	40.61 ^a	(4.29)	21.34 ^b	(0.99)	35.80 ^a	(5.77)	66.85 ^c	(5.09)	22.39 ^b	(1.01)
Fat (% DM)	0.41 ^a	(0.03)	0.52 ^a	(0.11)	0.46 ^a	(0.11)	0.44 ^a	(0.05)	0.49 ^a	(0.10)
Ash (% DM)	30.08 ^a	(0.12)	31.55 ^a	(1.54)	28.08 ^a	(3.52)	9.28 ^b	(2.71)	28.93 ^a	(3.77)
Chloride (% DM)	10.45 ^a	(0.33)	14.14 ^b	(0.91)	13.09 ^b	(1.35)	4.81 ^c	(1.30)	12.21 ^{ab}	(1.39)
Ca ²⁺ (% DM)	0.73 ^a	(0.04)	1.01 ^a	(0.13)	0.99 ^a	(0.24)	0.09 ^b	(0.03)	0.06 ^b	(0.02)
PO ₄ ²⁻ (% DM)	0.12 ^a	(0.02)	0.11 ^a	(0.01)	0.12 ^a	(0.02)	0.13 ^{ab}	(0.01)	0.16 ^b	(0.01)

^{a,b,c}Means within the same row without the same superscript differ significantly ($p \leq 0.05$).

UFRP: ultrafiltration retentate powder, MFRP 0.65 µm; MFRP 0.20 µm: microfiltration retentate powders, DFRP 0.65 µm; DFRP 0.20 µm: diafiltration retentate powders. Mean values and standard deviation (±) ($n = 3$).

Table 4
Chemical composition of dry *Sorelho* products

	SUFRP	(±)	SMFRP 0.65 µm	(±)	SMFRP 0.20 µm	(±)	SDFRP 0.65 µm	(±)	SDFRP 0.20 µm	(±)
Dry matter (%)	89.46 ^a	(0.39)	91.32 ^b	(0.50)	91.21 ^b	(2.67)	85.47 ^a	(0.22)	91.54 ^b	(3.92)
Protein (% DM)	32.52 ^{ac}	(6.44)	18.82 ^b	(2.31)	24.14 ^{ab}	(5.07)	42.63 ^c	(5.65)	21.59 ^b	(9.29)
Fat (% DM)	0.49 ^a	(0.08)	0.54 ^a	(0.03)	0.57 ^a	(0.16)	0.54 ^a	(0.03)	0.47 ^a	(0.12)
Ash (% DM)	30.46 ^a	(0.46)	32.67 ^a	(0.41)	30.35 ^a	(0.82)	19.84 ^b	(2.11)	29.92 ^a	(5.30)
Chloride (% DM)	16.94 ^a	(0.57)	16.50 ^a	(0.47)	15.61 ^{ac}	(0.66)	10.08 ^b	(1.63)	14.15 ^c	(1.19)
Ca ²⁺ (% DM)	0.79 ^a	(0.24)	0.95 ^a	(0.03)	0.83 ^a	(0.40)	0.18 ^b	(0.04)	0.24 ^b	(0.05)
PO ₄ ²⁻ (% DM)	0.12 ^a	(0.01)	0.16 ^a	(0.05)	0.12 ^a	(0.01)	0.14 ^a	(0.04)	0.14 ^a	(0.01)

^{a,b,c}Means within the same row without the same superscript differ significantly ($p < 0.05$).

SUFRP: ultrafiltration retentate powder, SMFRP 0.65 µm; SMFRP 0.20 µm: microfiltration retentate powders, SDFRP 0.65 µm; SDFRP 0.20 µm: diafiltration retentate powders. Mean values and standard deviation (±) ($n = 3$).

3.4. Compositional analysis of dry products

Table 3 shows the chemical composition of dry products obtained from ovine cheese whey. Protein content of ultrafiltration retentate powder was lower than values reported by Casper et al. (1999), since our product was not diafiltrated. Consequently, ash concentration was higher in our product. Significant differences were observed between microfiltration retentate powders for protein contents, whereas fat, ash, Ca²⁺ and PO₄²⁻ did not differ significantly. As expected, diafiltration retentate powders (DFRP) also showed significant differences in their protein contents. With the exception of DFRP 0.65 µm, that contained just about one-third of the ash content, all the other products showed no significant differences in this component. The calcium content of the DFRP products was, as expected, much lower than its content in microfiltration retentate powders and ultrafiltration retentate powder. This could have happened as a consequence of the diafiltration process. Maubois et al. (1987) also alluded to the fact that most of Ca²⁺ added during thermocalcic precipitation could be retained with lipoproteins. This reduction in Ca²⁺ in both DFRP might be one of the most important features of these products concerning the improvement of some aspects of their functionality (Karleskind, Laye, Mei, & Morr, 1995b; Mangino, 1992).

Chloride accounted for a high proportion of the ash content of the powders, since the whey resulted from the production of a cheese in which half of the sodium chloride was added to the milk prior to coagulation. The composition of DFRP 0.65 µm powders clearly reflected the lower retention of proteins by the 0.65 µm pore size membrane. Dry products with less than 0.5% fat (% dry matter) and approximately 65% protein (% dry matter) could be obtained in this case. Although the improvement of UF filtration fluxes with TP/MF using the 0.65 µm membrane was lower than with the 0.20 µm membrane, the possibility of obtaining high protein—low Ca²⁺ DFRP powders could support the choice of the 0.65 µm membrane.

Table 4 shows the chemical composition of dry products obtained from *Sorelho*. Microfiltration retentate powders showed no significant differences in protein, fat, ash, Ca²⁺ and PO₄²⁻ contents. The protein content of microfiltration retentate powders did not reflect the differences observed in the liquid products. Both diafiltration retentate powders (SDFRP) showed significant differences in protein and ash contents, reflecting the differences observed in liquid products. The protein content of the 0.65 µm SDFRP was lower than the ones reported by Comendador et al. (1996) for dry *Scotta* powders obtained by UF/DF. This fact can be explained by the higher MW cut-off of the membrane used, by the losses of protein in the balance tank due to

foam formation, or more probably, by the lower protein content of *Sorelho* ($0.38\% \pm 0.11$) when compared to original *Scotta* ($1.10\% \pm 0.07$). With the exception of the $0.65\ \mu\text{m}$ SDFRP, that showed a lower ash content, no significant differences in this component were observed in the other products. As in ovine cheese whey, although the ash content of both liquid diafiltration retentates was not different, the lower levels of ash content in the $0.65\ \mu\text{m}$ SDFRP are due to the higher content of dry matter of the $0.65\ \mu\text{m}$ SDFR in relation to the $0.20\ \mu\text{m}$ SDFR. The calcium content of the diafiltrated products was, as expected, much lower than its content in retentates of microfiltration and ultrafiltration. As mentioned above, chloride accounted for a high proportion of the ash contents.

The low dry matter content of *Sorelho* that involves working with higher volumes and the lower protein content of most *Sorelho* dry products, when compared to whey products, may reduce the economical interest in the application of TP/MF to this product.

Diafiltrated retentate powders using the $0.65\ \mu\text{m}$ MF membrane of both by-products (whey and *Sorelho*) showed the highest protein content, which is in the range of commercial bovine whey protein concentrates (Mangino, 1992), and low fat and Ca^{2+} concentrations.

4. Conclusions

The clarification of by-products from ovine cheese manufacture (cheese whey and deproteinized whey *Sorelho*) by thermocalcic precipitation followed by microfiltration improves posterior UF treatments significantly. The clarification was more efficient in what concerns filtration rates using the $0.65\ \mu\text{m}$ MF membrane. Although the clarifications with this membrane showed lower effects on the improvement of posterior UF treatments, the diafiltrated product obtained in this case seems to be more appropriate for potential uses in the food industry due to its higher protein content.

The poor MF flux performance and the high degree of protein retention observed with the $0.20\ \mu\text{m}$ membrane lead us to conclude that, at least with the type of membranes used, the process is more feasible with the $0.65\ \mu\text{m}$ MF membrane.

The use of MF involves high capital and running costs. Therefore, the utilization of this technology can only be considered if the volume of the product to be treated versus the increase in UF permeation rates justify the investment. For the production of clarified and diafiltrated powders, the efficiency of the MF process should be improved using more adequate equipment in order to attain higher volumetric concentration factors and lower retention of proteins with the MF membrane. In any case, the functional properties of the dry products obtained deserve further investigation.

Acknowledgements

We thank S. Piegay for his technical support in the separation of cheese whey products. This work was supported by the “Consellería de Educación e Ordenación Universitaria da Xunta de Galicia” (XUGA26202B97). Funding for author C.D.P. was provided by a Ph.D. fellowship (BD 19672/99) issued within the framework “PRAXIS XXI”, administered by JNICT, Portugal. Our thanks are extended to ANCOSE and Inês Milheiro for supplying the products used in the trials as well as to Dr. JoDee Anderson for the linguistic support she provided.

References

- AOAC. (1996a). Fat in dried milk. In P. Cunliffe (Ed.), *Official methods of analysis* (16th ed.). Vol. II. AOAC, Maryland, USA.
- AOAC (1996b). Phosphorus in dried milk: colorimetric procedure. In P. Cunliffe (Ed.), *Official methods of analysis* (16th ed.). Vol. II. AOAC, Maryland, USA.
- Baomy, J. J., Gestin, L., Fauquant, J., Boyaval, E., & Maubois, J. L. (1990). Technologies de purification des phospholipides du lactosérum. *Process*, 1047, 29–33.
- Casper, J. L., Wendorff, W. L., & Thomas, D. L. (1998). Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *Journal of Dairy Science*, 81, 3117–3122.
- 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.
- Cheryan, M. (1986). *Ultrafiltration handbook*. Lancaster: Technomic Publishing Company Inc..
- Chianese, L., Laeze, P., Nicolai, M. A., Garro, G., D’Auria, R., Iametti, S., Bonomi, F., Orban, E., & Quaglia, G. B. (1996). Chemical composition and functional properties of ovine rennet whey and deproteinized whey. *Milchwissenschaft*, 51(10), 569–573.
- Comendador, F. J., Nardo, N., Bertone, A., Maurizi, A., & Quaglia, G. (1996). Effetto dell’ultrafiltrazione sulle proprietà funzionali della scotta ovina. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 47(2), 103–112.
- Daufin, G., Michel, F., Labbé, J. P., Quemerais, A., & Grangeon, A. (1993). Ultrafiltration of deffated whey: Improving performance by limiting membrane fouling. *Journal of Dairy Research*, 60, 79–88.
- Fauquant, J., Vieco, E., Brule, G., & Maubois, J. L. (1985). Clarification des lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matiere grasse résiduelle. *Le Lait*, 65, 1–20.
- Hambraeus, L. (1992). Nutritional aspects of milk proteins. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, Vol. I (pp. 457–490). London: Elsevier Science Publishers.
- Hiddink, J., De Boer, R., & Nooy, P. F. C. (1981). Effect of various pre-treatments on the ultrafiltration of sweet cheese whey at about 55°C. *Milchwissenschaft*, 36(11), 657–663.
- Joseph, M. S. B., & Mangino, M. E. (1998). The effect of milk fat globule membrane on the foaming and gelation properties of β Lactoglobulin solutions and whey protein concentrates. *Australian Journal of Dairy Technology*, 43, 9–11.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F. I., & Morr, C. V. (1995a). Chemical pretreatment and microfiltration for making delipidized whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 60, 221–227.

- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F. I., & Morr, C. V. (1995b). Gelation properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, *60*, 731–737.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F. I., & Morr, C. V. (1995c). Foaming properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, *60*, 738–741.
- Karleskind, D., Laye, I., Morr, C. V., & Schenz, T. W. (1996). Emulsifying properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, *61*, 54–58.
- Kessler, H. G. (1997). Engineering aspects of currently available technological processes. *IDF Bulletin*, *320*, 16–25.
- Mangino, M. E. (1992). Properties of whey protein concentrates. In J. G. Zadow (Ed.), *Whey and lactose processing* (pp. 231–270). London: Elsevier Science Publishers.
- Maubois, J. L. (1984). Separation, extraction and fractionation of milk protein components. *Le Lait*, *64*, 485–495.
- Maubois, J. L., Pierre, A., Fauquant, J., & Piot, M. (1987). Industrial fractionation of main whey proteins. *IDF Bulletin*, *212*, 154–159.
- Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *33*, 431–476.
- Muller, L. I., & Harper, J. W. (1979). Effects on membrane processing of pretreatments of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *27*(4), 862–864.
- Mulvihill, D. M. (1992). Production, functional properties and utilization of milk protein products. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry: Proteins*, Vol. I (pp. 369–404). London: Elsevier Science Publishers.
- Pearce, R. J., Marshall, S. C., & Dunkerley, J. A. (1991). Reduction of lipids in whey protein concentrates—effect on functional properties. *IDF (Special Issue)*, *9201*, 118–129.
- Pierre, A., Le Graet, Y., Daufin, G., Michel, F., & Gésan, G. (1994). Whey microfiltration performance: Influence of protein concentration by ultrafiltration and of physicochemical treatment. *Le Lait*, *74*, 65–77.
- Pintado, M. E., Lopes da Silva, J. A., & Malcata, F. X. (1996). Characterization of Requeijão and technological optimization of its manufacturing process. *Journal of Food Engineering*, *30*, 363–376.
- Pintado, M. E., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2001). Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, *7*(2), 105–116.
- Pizzichini, M., Zeddit, G., Comendador, F. J., Bertone, A., Maurizi, A., Nardo, N., & Quaglia, G. (1995). Recupero di sieroproteine e acqua depurata dalla scotta ovina con tecnologie di membrana. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, *46*(6), 361–379.
- Rinn, J. C., Morr, C. V., Seo, A., & Surak, J. G. (1990). Evaluation of nine semi-scale whey pretreatment modifications for producing whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, *55*(2), 511–515.
- Sandblom, R. M. (1974). Filtering process. Swedish Patent No. 7416257.

Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products

Olga Díaz^a, Carlos D. Pereira^b, Angel Cobos^{a,*}

^aFacultad de Ciencias de Lugo, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Área de Tecnología de Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

^bEscola Superior Agraria de Coimbra (ESAC/IPC), Bencanta, 3040-316 Coimbra, Portugal

Received 28 February 2003; accepted 8 October 2003

Abstract

Functionality (solubility, emulsifying and foaming properties) of ovine cheese whey and deproteinized whey (*Sorelho*) protein concentrates was evaluated. Both by-products of ovine cheese manufacture were clarified by thermocalcic precipitation and microfiltration using two pore size membranes (0.65 and 0.20 μm). Next, they were ultrafiltered/diafiltered, and then, the lyophilization of the corresponding retentates was carried out. The functionality of these powders, as well as that of untreated ultrafiltered whey protein concentrate (WPC) and microfiltration retentates powders, was evaluated.

The clarification treatment increased solubility of the WPC produced from ovine whey and deproteinized ovine whey. Moreover, these products had foaming properties, whereas conventional WPC and microfiltration retentate powders (MFRP) were unable to produce foams. The whey product obtained after clarification using a 0.65 μm microfiltration membrane had the best foaming properties. The clarification treatment did not significantly increase emulsifying activity and stability, except for the *Sorelho* product obtained using a 0.65 μm membrane.

MFRP from ovine whey and *Sorelho*, the by-products of the clarification procedure, showed similar solubility and higher emulsifying activity than conventional WPC, although their emulsion stability was lower.

The clarification procedure studied, particularly when a 0.65 μm microfiltration membrane was used, improved some functional properties of the whey and *Sorelho* protein concentrates, and also generated microfiltration retentates for potential use in food manufacturing.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Functional properties; Ovine cheese whey; Deproteinized whey; Whey clarification; Microfiltration

1. Introduction

Whey protein concentrates (WPC) are ingredients widely used in the food industry in a variety of formulated products, such as dairy, bakery, meat, beverage and infant formula products (Morr, 1992) due to the excellent functional properties of their proteins (Kinsella & Whitehead, 1989). Moreover, WPC production represents the best means for the utilization of whey proteins (Morr & Foegeding, 1990). Ultrafiltration (UF) has proved to be the system of choice for preparing WPC with good functional properties; however,

membrane fouling, caused by several whey components, is a drawback in UF (Zall, 1992). Among these compounds, phospholipids cause rapid decrease in membrane performance and seriously impair some functional properties of WPC (DeWit, 1984; Hiddink, De Boer, & Nooy, 1981; Karleskind, Laye, Mei, & Morr, 1995a; Pearce, Marshall, & Dunkerley, 1991). Several physico-chemical and biochemical (enzymic) treatments have been applied for the removal of these compounds (Blecker et al., 1997; Mangino, 1992; Rinn, Morr, Seo, & Surak, 1990); one of these treatments is based on the aggregation of the phospholipids with protein and calcium and removal of aggregates by microfiltration (Fauquant, Vieco, Brule, & Maubois, 1985; Timmer & Van der Horst, 1998). The extracted phospholipoproteins could

* Corresponding author. Tel.: +34-982223325; fax: +34-982285872.
E-mail address: cobusa@lugo.usc.es (A. Cobos).

have interesting functional properties as some authors have mentioned (Maubois & Ollivier, 1991; Maubois, Pierre, Fauquant, & Piot, 1987).

Mediterranean countries produce a large variety of ovine cheeses; however, the resulting wheys are not used for WPC manufacture, as happens with WPC bovine cheese whey, and this situation causes environmental problems, mainly in large scale production. Traditionally, a small amount of this whey is used in whey cheese production, such as Ricotta, Requesón, Manouri and Requeijão, manufactured in Italy, Spain, Greece and Portugal, respectively. Nevertheless, most ovine cheese whey cannot be processed and, on the other hand, whey cheese manufacture also generates a new by-product, a deproteinized whey called *Sorelho* in Portugal (Pereira, Díaz, & Cobos, 2002).

Few studies have been developed about functional properties of WPC obtained from ovine cheese whey and deproteinized ovine whey by UF (Casper, Wendorff, & Thomas, 1999; Comendador, Nardo, Bertone, Maurizi, & Quaglia, 1996) or other methods (Chianese et al., 1996; Pintado, Lopes da Silva, & Malcata, 1999). Comendador et al. (1996) concluded that the functional properties of deproteinized WPC could be improved by a clarification pre-treatment before UF. Only Casper et al. (1999) studied some properties of delipidized ovine WPC using chitosan.

However, there is no available information about functional properties of ovine WPC obtained from clarified whey or deproteinized whey using thermocalcic aggregation followed by microfiltration. As mentioned above, this method eliminates phospholipoproteins and might allow for the production of an ovine WPC of better functional properties; it would also generate another product, the microfiltration retentate, with the potential application as a functional ingredient. Its properties have scarcely been considered in the production of bovine WPC (Maubois & Ollivier, 1991) and there is no information about this product when generated from the ovine whey or deproteinized ovine whey at all.

In a previous work (Pereira et al., 2002), we studied the technological feasibility of the clarification of by-products from ovine cheese manufacture (cheese whey and deproteinized whey called *Sorelho* in Portugal) by thermocalcic precipitation followed by microfiltration using two pore size membranes (0.65 and 0.20 μm). This pre-treatment improved posterior UF treatments significantly in both cases. However, the poor microfiltration flux performance and the degree of protein retention observed with the 0.20 μm membrane led us to conclude that, at least with the type of membranes used, the process is more feasible with the 0.65 μm microfiltration membrane. We also concluded that the utilization of this technology can only be considered in large-scale operations and if the functional properties of the products obtained (WPC and microfiltration retentates) were appropriate.

The main objective of this work was to study some functional properties (solubility, emulsifying and foaming

properties) of clarified UF/diafiltration retentate powders, and to compare them with the functionality of conventional UF retentate powders in order to evaluate the interest of the application of the clarification procedure to generate products of increased usefulness as food ingredients. Besides, the functional properties of microfiltration retentate powders (MFRP), the by-products obtained in clarification, were also studied in view of their possible application in food industry.

2. Material and methods

2.1. Sample obtention

Ovine cheese whey and deproteinized whey (*Sorelho*) were obtained from the Association of Producers of *Serra da Estrela* Sheep (ANCOSE/Portugal). Sample preparation was similar for both products. Immediately after reception, the products were skimmed by means of a Westfalia™ separator type ADB. Approximately 100 l of each product (cheese whey or *Sorelho*) were used in each trial; 50 l were submitted to conventional UF and 50 l were used for thermocalcic precipitation–microfiltration followed by UF and diafiltration. All experiments were made in triplicate. A diagram of the process is shown in Fig. 1 (adapted from Pereira et al., 2002).

Thermocalcic precipitation, microfiltration (MF) and UF/diafiltration steps were carried out following the method described by Pereira et al. (2002). Two microfiltration pore size membranes (0.20 and 0.65 μm) were used in the clarification procedures. Simultaneously, part of the whey/*Sorelho* was processed in a conventional way (unclarified) in order to use it as a control batch. Membrane retentates were freeze dried in a Lyph-Lock™ (Labconco Corporation, Kansas City, USA) freeze dryer and used for analysis. Ten products were obtained; five from whey: the conventional UF retentate powder (UFRP), the MFRP using a 0.65 μm pore size MF membrane (MFRP 0.65), the MFRP using a 0.20 μm pore size MF membrane (MFRP 0.20), and the diafiltration retentate powders (from the diafiltration of microfiltration filtrates using the two MF membranes, DFRP 0.65 and DFRP 0.20). The other five powders were obtained from *Sorelho* using similar treatments: SUFRP (UF retentate powder used as control), SMFRP 0.65 and SMFRP 0.20 (MFRP), and SDFRP 0.65 and SDFRP 0.20 (diafiltration retentate powders). The chemical composition of ovine cheese whey and deproteinized whey is shown in Table 1 (adapted from Pereira et al., 2002).

2.2. Protein composition analyses

Total nitrogen and nonprotein nitrogen (NPN) were determined by the Kjeldahl method (Kejltec Sistem 1003-Tecator). NPN was defined as the Kjeldahl nitrogen soluble in 12% trichloroacetic acid and the nonprotein

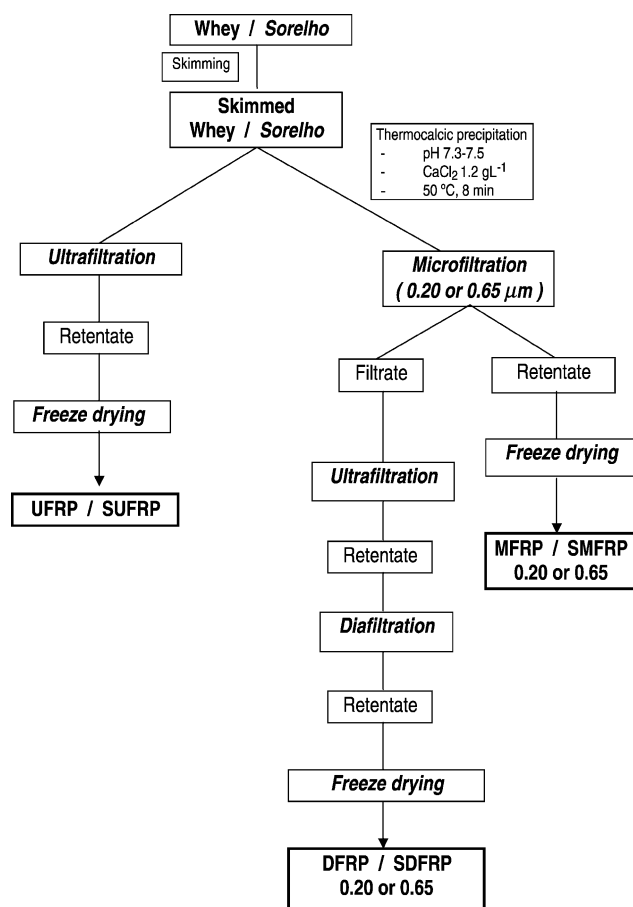


Fig. 1. Processing diagram for making UF retentate powders, microfiltration retentate powders and diafiltration retentate powders. For abbreviation definitions, see Section 2 (adapted from Pereira et al., 2002).

nitrogen components (NPNC) were calculated as follows: $NPNC = NPN \times 3.60$. True protein was determined as: Total Kjeldahl nitrogen— $NPN \times 6.45$. The conversion factors 3.60 and 6.45 used have been recommended by Karman and Van Boekel (1986) for NPN compounds and rennet whey proteins, respectively.

Table 1

Chemical composition (g/100 g powder) of ovine cheese whey and Sorelho powders (adapted from Pereira et al., 2002)

Ovine cheese whey	UFRP* *	(±)	DFRP 0.65	(±)	DFRP 0.20	(±)	MFRP 0.65	(±)	MFRP 0.20	(±)
Moisture	11.23	(0.32)	13.10	(1.05)	13.42	(2.40)	11.01	(1.05)	9.71	(2.68)
Total nitrogen	5.65	(0.58)	9.12	(0.82)	3.04	(0.17)	2.98	(0.13)	5.05	(0.72)
Fat	0.36	(0.03)	0.39	(0.08)	0.43	(0.08)	0.47	(0.10)	0.42	(0.11)
Ash	26.70	(0.01)	8.05	(2.24)	24.99	(2.77)	28.06	(1.12)	25.41	(3.73)
Calcium	0.65	(0.03)	0.08	(0.02)	0.05	(0.01)	0.90	(0.11)	0.88	(0.23)
Chloride	9.28	(0.26)	4.18	(1.06)	10.35	(1.15)	12.57	(0.64)	11.78	(1.52)
Sorelho	SUFRP* *	(±)	SDFRP0.65	(±)	SDFRP0.20	(±)	SMFRP0.65	(±)	SMFRP0.20	(±)
Moisture	10.54	(0.39)	14.53	(0.22)	8.46	(3.92)	8.68	(0.50)	8.79	(2.67)
Total nitrogen	4.56	(0.90)	5.71	(0.77)	3.06	(1.15)	2.69	(0.32)	3.45	(0.70)
Fat	0.44	(0.07)	0.45	(0.02)	0.44	(0.11)	0.49	(0.02)	0.52	(0.14)
Ash	27.24	(0.33)	16.96	(1.78)	27.47	(5.42)	29.83	(0.21)	27.69	(1.29)
Calcium	0.71	(0.21)	0.16	(0.04)	0.22	(0.05)	0.86	(0.03)	0.75	(0.35)
Chloride	15.12	(0.56)	8.62	(1.41)	12.54	(0.49)	15.07	(0.50)	14.17	(0.62)

* * For abbreviation definition, see Section 2. Mean values and standard deviation (±) (n = 3).

The content of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and bovine serum albumin (BSA) was determined by reversed-phase HPLC, following the method proposed by Kim, Chism III, and Mangino (1987) but using the eluent gradient described by González de Llano and Santa María (1997). Reagents were HPLC grade. Protein standards were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, USA). Samples of dry products were dissolved (3% w/v) in doubled-distilled, demineralised water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Several concentrations of each standard protein were prepared by the same procedure for construction of standard curves. All chromatography was performed with a 300 Å pore C4 bonded silica column (Supelcosil LC-304, Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 250 × 4.6 mm). Proteins were chromatographed at room temperature at a flow-rate of 1 ml/min using a Beckman System Gold Liquid Chromatograph (Beckman Instruments, Madrid, Spain). Eluent A was 0.1% TFA in water, and eluent B was 0.1% TFA in acetonitrile. Elution gradient expressed as solvent B was as follows: 0–1 min, 35%; 1–8 min, 38%; 8–16 min, 42%; 16–22 min, 46%; 22–22.5 min, 100%; 23–23.5 min, 35%. The detection was carried out at 210 nm. Quantification was based on peak areas of whey proteins and external standards for each protein.

All determinations were made in duplicate.

2.3. Functional properties

The solubility of protein at pH 4 and 7 was determined in triplicate using the method of Morr et al. (1985). About 500 mg of powder were dissolved in 40 ml of 0.1 M NaCl. Immediately after obtaining a complete dispersion, the pH was adjusted to 4.0 or 7.0 with 0.1N HCl or NaOH solution. The dispersion was stirred for 1 h; during this period, pH was monitored and adjusted when necessary. After that, the dispersion was transferred into a 50 ml volumetric flask, diluted to the mark with additional 0.1 M NaCl solution. An aliquot of the dispersion was centrifuged 30 min at

20,000 × g and the resulting supernatant fraction was filtered through Whatman No. 1 filter paper. The protein content of the filtrate and the original dispersion was determined by biuret. The solubility of the products was calculated as:

$$\text{Protein solubility (\%)} = [\text{SPC} \times 50/\text{SW} \times (\text{SP}/100)] \times 100$$

where SPC, supernatant true protein concentration (mg/ml); SW, sample weight (mg); and SP, sample true protein concentration (%).

The turbidimetric method of [Pearce and Kinsella \(1978\)](#), modified by [Patel and Kilara \(1990\)](#), was used to determine the emulsifying capacity. Volumes of 75 ml of 2% (w/v) dispersion (pH 7.0) of each product were used as a continuous phase and the dispersed phase was 25 ml of olive oil. The emulsions were prepared using a Polytron PT-20 homogenizer (Brikman Instruments, Westbury, USA) at 17,200 rpm for 3 min. An aliquot was diluted 1/500 using a 0.1% SDS solution in phosphate buffer at pH 7.0 and the absorbance of the diluted emulsion was determined at a wavelength of 500 nm in a spectrophotometer Zuzi mod. UV-4210 (Auxilab, Beriain, Spain).

The emulsifying capacity, expressed as emulsifying activity index (EAI), was calculated as follows:

$$\text{EAI}(\text{m}^2/\text{g}) = 2 \times 2.303 \times A_{500}/\phi \times L \times C$$

where A_{500} , absorbance of dilute emulsion at 500 nm; ϕ , volume fraction of dispersed phase; L, path length of cell (in meters); and C, weight of product per unit volume of product dispersion (in g/m³).

The method of [Tornberg and Hermansson \(1977\)](#) with the modification proposed by [Kim, Morr, Seo, and Surak \(1989\)](#) was used to determine the emulsifying stability rating (ESR) of the samples. Aliquots of the emulsions, prepared as previously described, were transferred to a separatory funnel and were stored at 4 °C for 24 h. The fat contents of the bottom fraction and of the initial emulsion were determined by the Gerber method. ESR was computed by dividing the fat content of the bottom fraction by the fat content of the initial emulsion and multiplying by 100.

Foam expansion (FE) and foam stability (FS) of the samples and of ovalbumin (used as reference) were determined using dispersions (250 ml) of 1% protein concentration (w/v) at pH 7, at the whipping time of 5 min in a Braun mixer mod. MR550 (Braun Española, Esplugues de Llobregat, Spain) at maximum speed (10,000 rpm), using the whipping accessory. According to [Patel, Stripp, and Fry \(1988\)](#), the foam was rapidly transferred from the bowl into a 2 l measuring cylinder and the total volume of foam was measured. The foam was allowed to stand for 30 min at room temperature and afterwards the volume of drained liquid was measured

([Patel et al., 1988](#)). The FE was calculated as follows:

$$\text{FE (\%)} = [(\text{FV} - 250)/250] \times 100$$

where FV is the initial volume of foam.

The FS was calculated as:

$$\text{FS (\%)} = 100 - [(\text{volume of liquid drained after 30 min}/250) \times 100]$$

All determinations were made in duplicate.

2.4. Statistical analysis

The data from conventional UF retentate powders and diafiltration retentate powders were analyzed by one-way ANOVA and the means were compared using the least significant difference test with significance at $p \leq 0.05$. The comparison of means of protein solubility at different pH values was made using *t*-test. All statistical analyses were implemented with the Statistica™ package for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

3. Results

3.1. Protein composition of powders

[Table 2](#) shows the protein composition of the powders obtained from ovine cheese whey and *Sorelho*.

In ovine cheese whey, the clarification procedure using a 0.65 μm pore size MF membrane significantly increased the true protein content of the corresponding diafiltration retentate powder in comparison with UFRP, while the clarification using a 0.20 μm MF membrane decreased these values. Consequently, MFRP 0.65 showed lower values of protein than MFRP 0.20.

Something similar happened with α-lactalbumin and β-lactoglobulin contents, which were higher in DFRP 0.65. No significant differences were found in BSA and NPN values.

In *Sorelho* powders, true protein, α-lactalbumin, β-lactoglobulin, BSA and NPNC contents were higher in SDFRP 0.65 in comparison with the values found in UFRP and SDFRP 0.20.

It is important to note that, in *Sorelho* diafiltrated retentate powders, the three proteins determined were the main components of the true protein. However, these proteins were in lower proportion in SUFRP and in both clarification by-products (SMFRP).

3.2. Solubility

[Table 3](#) shows the results obtained for protein solubility of ovine whey and deproteinized whey derived products. When the effect of the pH on the protein solubility was

Table 2
Protein composition (g/100 g powder) of ovine cheese whey and *Sorelho* powders

Ovine cheese whey	UFRP*	(±)	DFRP 0.65	(±)	DFRP 0.20	(±)	MFRP 0.65	(±)	MFRP 0.20	(±)
True protein	32.58 ^a	(4.74)	52.70 ^b	(6.57)	16.45 ^c	(0.28)	16.39	(0.36)	29.64	(1.60)
α-Lactalbumin	5.83 ^a	(0.55)	7.72 ^b	(0.71)	4.15 ^c	(0.01)	2.35	(0.24)	4.63	(0.38)
β-Lactoglobulin	23.81 ^a	(3.77)	38.78 ^b	(1.18)	11.61 ^c	(0.86)	11.78	(1.24)	19.75	(0.79)
Bovine serum albumin	0.88 ^a	(0.58)	0.74 ^a	(0.17)	0.43 ^a	(0.12)	0.52	(0.08)	0.27	(0.15)
NPNC	2.18 ^a	(0.28)	3.18 ^a	(0.46)	1.79 ^a	(1.18)	1.49	(0.37)	1.86	(0.23)
<i>Sorelho</i>	SUFRP*	(±)	SDFRP 0.65	(±)	SDFRP 0.20	(±)	SMFRP 0.65	(±)	SMFRP 0.20	(±)
True protein	25.38 ^a	(6.15)	29.28 ^a	(2.78)	13.84 ^b	(0.41)	15.90	(1.32)	19.99	(3.83)
α-Lactalbumin	6.02 ^a	(1.89)	11.05 ^b	(1.41)	8.12 ^{ab}	(1.38)	3.09	(0.94)	5.17	(1.02)
β-Lactoglobulin	7.60 ^a	(1.26)	14.35 ^b	(1.65)	4.63 ^c	(0.87)	3.91	(1.83)	4.11	(0.54)
Bovine serum albumin	0.58 ^a	(0.36)	1.29 ^a	(0.74)	0.23 ^a	(0.05)	0.82	(0.18)	0.63	(0.21)
NPNC	2.65 ^a	(0.96)	4.22 ^a	(0.64)	1.22 ^b	(0.08)	1.41	(0.07)	1.95	(0.34)

^{a,b,c}Means within the same row without the same superscript differ significantly ($p < 0.05$). *For abbreviation definition, see Section 2. NPNC: non protein nitrogen components. Mean values and standard deviation (±) ($n = 3$).

studied, no significant differences were found between solubility values except for diafiltrated retentated powder DFRP 0.65 (for abbreviation description, see Section 2), in which solubility at pH 4 was significantly lower than that at pH 7.

Clarificated-diafiltrated products from whey and *Sorelho* (DFRP and SDFRP) showed higher protein solubility than conventional UF powders (UFRP and SUFRP) with significant differences at pH 7 in products from whey and at both pH values in products from *Sorelho*. Results obtained from ovine whey UFRP doubled the mean values found for the *Sorelho* SUFRP (88–90% and 34–37%, respectively).

Solubility results for the clarification process by-products, the MFRP from whey and *Sorelho* (MFRP and SMFRP), were similar to UFRP and SUFRP values, respectively.

3.3. Emulsifying properties

Table 4 shows the EAI and the ESR of the emulsions prepared with ovine whey and deproteinized whey dry products.

In whey powders, UFRP, DFRP 0.65 and DFRP 0.20 showed similar EAI values, while ESR decreased with clarification treatment.

In relation to clarification by-products, whey MFRP showed higher EAI values and lower ESR values than those

observed in conventional UFRP. So, clarification did not increase the emulsifying properties of diafiltrates, although it did generate two new products (MFRP 0.65 and 0.20) of better EAI. The microfiltration membrane type used in the clarification treatment did not significantly influence the emulsifying properties of diafiltrated whey powder.

In *Sorelho* products, only SDFRP 0.65 showed higher values of EAI and ESR than unclarified SUFRP.

In relation to clarification by-products, as in whey powders, SMFRP products showed higher EAI values and lower ESR values than those observed in conventional UFRP, although both EAI and ESR were lower than the corresponding whey powders values.

3.4. Foaming properties

Table 4 also shows the results of the foaming properties of the products studied. Only clarificated-diafiltrated powders produced foams. Due to the lack of foaming capacity of conventional UFRP and SUFRP products, the values obtained for foaming of ovalbumin were used for comparison. When foaming properties of solutions of ovalbumin were determined, FE of this protein was 256% and FS 19.9%.

The highest FE was found in DFRP 0.65 product in comparison with DFRP 0.20 and the ovalbumin used as

Table 3
Protein solubility (% of true protein in samples) of ovine cheese whey and *Sorelho* powders

Ovine cheese whey	UFRP*	(±)	DFRP 0.65	(±)	DFRP 0.20	(±)	MFRP 0.65	(±)	MFRP 0.20	(±)
pH 7	88.85 ^a	(7.53)	100.47 ^b	(2.26)	102.88 ^b	(2.30)	84.81	(12.40)	91.72	(3.21)
pH 4	90.12 ^a	(10.38)	96.66 ^a	(2.26)	102.32 ^a	(5.34)	89.31	(6.78)	93.84	(4.70)
<i>Sorelho</i>	SUFRP	(±)	SDFRP 0.65	(±)	SDFRP 0.20	(±)	SMFRP 0.65	(±)	SMFRP 0.20	(±)
pH 7	34.70 ^a	(5.16)	98.34 ^b	(1.50)	92.86 ^b	(0.86)	30.45	(8.78)	42.69	(5.95)
pH 4	37.71 ^a	(4.41)	98.59 ^b	(2.32)	97.34 ^b	(6.10)	30.37	(9.42)	40.56	(5.38)

^{a,b}Means within the same row without the same superscript differ significantly ($p < 0.05$). *For abbreviation definition, see Section 2. Mean values and standard deviation (±) ($n = 3$).

Table 4

Emulsifying activity index (EAI, m²/g), emulsifying stability rate (ESR, %), foam expansion (FE, %) and foam stability (FS, %) of ovine cheese whey and Sorelho powders

Ovine cheese whey	UFRP *	(±)	DFRP 0.65	(±)	DFRP 0.20	(±)	MFRP 0.65	(±)	MFRP 0.20	(±)
EAI	15.78 ^a	(1.90)	17.53 ^a	(0.42)	18.10 ^a	(2.50)	34.46	(4.42)	41.53	(1.59)
ESR	7.36 ^a	(2.35)	5.75 ^{ab}	(0.78)	3.37 ^b	(1.38)	2.79	(1.19)	1.82	(0.03)
FE	0 ^a	–	403.50 ^b	(7.10)	250.50 ^c	(2.12)	0	–	0	–
FS	0 ^a	–	12.52 ^b	(0.70)	0 ^a	–	0	–	0	–
Sorelho	SUFRP	(±)	SDFRP 0.65	(±)	SDFRP 0.20	(±)	SMFRP 0.65	(±)	SMFRP 0.20	(±)
EAI	17.72 ^a	(0.77)	25.86 ^b	(5.67)	17.14 ^a	(1.80)	22.06	(3.03)	22.14	(2.41)
ESR	6.85 ^a	(2.50)	12.92 ^b	(0.59)	1.90 ^c	(0.21)	0.70	(0.14)	0.47	(0.17)
FE	0 ^a	–	237.50 ^b	(2.34)	205.00 ^c	(4.11)	0	–	0	–
FS	0 ^a	–	3.90 ^b	(0.14)	4.03 ^b	(0.04)	0	–	0	–

^{a,b,c}Means within the same row without the same superscript differ significantly ($p < 0.05$). *For abbreviation definition, see Section 2. Mean values and standard deviation (±) ($n = 3$).

reference. Both *Sorelho*-derived powders showed lower values than the reference.

FS value of DFRP 0.65 was lower than that for egg albumin, while the foams produced with the other samples collapsed almost completely after 30 min.

4. Discussion

The composition of DFRP 0.65 clearly reflected the lower retention of proteins by a 0.65 µm pore size MF membrane in comparison with a 0.20 µm membrane. Consequently, MFRP 0.20 showed higher protein content than MFRP 0.65. The protein retention was similar for all the proteins determined, because the proportion of each protein was similar in all products. The α-lactalbumin and β-lactoglobulin contents, when are expressed in percentage of total true protein, are in the range of values reported by Casper, Wendorff, and Thomas (1998) in ovine whey, by Morr and Ha (1993) in commercial bovine WPC and by Karleskind, Laye, Mei, and Morr (1995b) in lipid-reduced bovine WPC. However, true protein contents showed lower values than those reported by these authors. Clarification using a 0.65 µm MF membrane improved the protein content of ovine WPC, with lower losses of protein in MF as it can be observed in MFRP 0.65.

The influence of the pore size of the microfiltration membranes (0.65 and 0.20 µm) on protein retention is similar in *Sorelho* products. Nevertheless, some differences could be observed comparing to ovine whey products. The protein content of the SUFRP and SDFRP products was lower in comparison with their equivalent whey powders, due to the low protein concentration of *Sorelho*. Besides, the proportions of the main proteins were different: while in whey powders, the relation β-lactoglobulin/α-lactalbumin was between 4/1 and 5/1, in *Sorelho* powders was nearly 1/1. This is probably due to the fact that *Sorelho* is the by-product of *Requeijão* ovine whey cheese production, obtained mainly after heat gelation of β-lactoglobulin. In deproteinized whey from *Requeijão* production, Pintado,

Lopes da Silva, and Malcata (1996) also observed a decrease of β-lactoglobulin proportions in the soluble proteins detected. Thermal denaturation induces the formation of aggregates primary composed of β-lactoglobulin with a modest amount of α-lactalbumin (Anand, Brody, Ward, & Landry, 1998).

Finally, it is important to note that SUFRP contains a large amount of other proteins that were not quantified by RP-HPLC but were detected as true protein. In UFRP, about 8% of other proteins were present. These other proteins, that usually remain in whey, are immunoglobulins, proteose-peptones, enzymes and fat-globule membrane proteins (Morr & Ha, 1993). However, this percentage increased to 44% in SUFRP and it is not only composed by these proteins. Probably the heat treatment of the whey used in *Requeijão* production, 90 °C for 15–30 min (Pereira et al., 2002) induced other changes in whey proteins, besides of thermal gelation. The association of serum proteins, especially β-lactoglobulin, with the residual fat globule membranes (which proteins denature above 70 °C; Van Boekel & Walstra, 1995) has been described by Dalgleish and Banks (1991) and Houlihan, Goddard, Nottingham, Kitchen, and Masters (1992) in whole milk during heating. Anand et al. (1998) reported decreases of non-aggregated β-lactoglobulin to 23% of the initial amount when concentrated whey was heated at 82 °C for 3 min, while α-lactalbumin only decreased to 72%. The aggregates can be quantified in terms of true protein by Kjeldahl method, but they can not be detected by the HPLC method used by us, which can only measure the soluble proteins of the sample (Anand et al., 1998; Kim et al., 1987).

However, clarified products (SDFRP) true protein is composed mainly by α-lactalbumin, β-lactoglobulin and BSA. Probably, the aggregates formed during heating that remained in *Sorelho* were retained by the MF membranes; in agreement with this, SMFRP 0.65 and SMFRP 0.20 show a low proportion of the three proteins in total true protein content (Table 2).

Solubility values found for ovine whey conventional UFRP and DFRP products were in the range of those

described by other authors for ultrafiltrated bovine WPC (Harper & Man Lee, 1998; Kilara, 1984; Schmidt, Packard & Morris, 1984), for commercial WPC and WPI (Morr & Foegeding, 1990) and for lipid-reduced WPC (Karleskind, Laye, Morr, & Schenz, 1996). UFRP product showed similar values to those of Chianese et al. (1996) and lower than Casper et al. (1999) in ovine WPC. Diafiltrated powders showed higher values than those observed in ovine WPC. The increase in solubility observed in DFRP products could be due to the retention of less soluble proteins by MF membranes. This fact is reflected in the lower solubility of MFRP products in comparison with clarified powders.

Significant differences were found between *Sorelho* conventional SUFRP and SDFRP products solubilities. High solubility values, similar to values reported by the authors mentioned above, were found for diafiltrated *Sorelho* powders. SUFRP showed low protein solubilities, in the range of those observed by Comendador et al. (1996) in unclarified WPC from *Scotta* (deproteinized whey obtained in *Ricotta* manufacture).

The lower solubility of SUFRP and SMFRP *Sorelho* products in comparison with ovine whey products was probably due to the remarkable heat treatment that was used in the whey cheese manufacture (90 °C, 10 min); this heating probably produced the denaturation of the whey proteins (DeWit & Klarenbeek, 1984; Li-Chan, 1983) and decreased the whey protein solubility (Mangino, Huffman, & Regester, 1988). Many of the denatured proteins were retained in whey cheese, but the possibility that some of them were lost in *Sorelho* exists. However, this denaturation was not reflected in the diafiltration retentate powders obtained from *Sorelho*, which showed similar solubility values to those observed for diafiltrated whey powders. The presence of a great proportion (44%) of proteins which were not identified by HPLC in SUFRP could be related to the low solubility of this product. These insoluble proteins present in *Sorelho* and, consequently, in unclarified SUFRP, were retained by MF membranes with the aggregates generated by thermocalcic precipitation; this would cause the low solubility values found in the SUFRP as well as in the microfiltration retentate powders (SMFRP) in our study.

The solubility values of the products (except for DFRP 0.65) were not affected by pH; our results agree with those described by other authors in ovine whey and deproteinized ovine WPC (Chianese et al., 1996; Comendador et al., 1996) and in bovine WPC (Kim et al., 1989; Patel & Kilara, 1990; Vaghela & Kilara, 1996).

The EAI results observed in whey and *Sorelho* conventional UF and diafiltrated powders were lower than those observed by other authors in commercial and delipidized WPC (Kim et al., 1989; Patel & Kilara, 1990; Vaghela & Kilara, 1996) and in whey protein isolate (Lee, Morr, & Ha, 1992). The emulsifying capacity of ovine WPC reported by Casper et al. (1999) was similar to the absorbance values at 500 nm observed in our work.

In relation to the ESR, we observed values similar to those reported by Lee et al. (1992) for whey protein isolate and by Kim et al. (1989) in the freeze-dried WPC of bovine origin. No information could be found about the emulsifying stability of ovine WPC in the literature.

The pretreatment only improved the emulsifying properties of the diafiltrated *Sorelho* product clarified using a 0.65 µm pore size MF membrane (SDFRP 0.65 sample). With respect to emulsifying properties, clarification only seems to be useful in *Sorelho* valorization, although they are influenced by the MF conditions during pre-treatment.

SDFRP 0.65 showed higher true protein and β-lactoglobulin contents than SUFRP and SDFRP 0.20 products. The stability of an emulsion is enhanced by the increase in protein concentration (Zayas, 1997). β-Lactoglobulin shows a higher capacity of emulsify oil than BSA or α-lactalbumin (Klemaszewski, Das, & Kinsella, 1992) and SDFRP 0.65 showed a higher proportion of β-lactoglobulin than SDFRP 0.20.

SDFRP 0.65 also showed better emulsifying properties than ovine whey products. Although heat treatment of aqueous solution of WPI before emulsification decreases emulsion capacity and stability (Foley & O'Connell, 1990), limited denaturation improves emulsifying properties of whey protein, probably due to unfolding of protein molecules and exposition of hydrophobic groups (Zayas, 1997).

The MFRP from whey showed higher values in EAI than the unclarified and clarified-diafiltrated powders, while the ESR values were significantly lower. These results do not seem to be related to the fat, ash, or protein contents of samples (Tables 1 and 2); possibly the different nature of their proteins could influence this functional property. Thermocalcic aggregation produces the precipitation of fat globule membrane proteins, that are retained by the MF membranes (Fauquant et al., 1985; Pearce et al., 1991). These proteins could be the compounds responsible for the increase in EAI observed in MFRP products. Other authors (Joseph & Mangino, 1988) have mentioned this possibility; however, no literature is available about the functionality of this fraction.

An acceptable emulsifying activity was found in MFRP from *Sorelho*, although it was lower than that found in whey products. This is probably due to the protein denaturation derived from heat treatment during Requeijao manufacture, which impairs this property. The denatured proteins could be retained by the MF membranes. Emulsifying stability values were lower than those found in WPCs reported in above-mentioned literature.

Clarification pretreatments made it possible to produce foams from ovine whey and *Sorelho* products; untreated powders did not produce them in assayed conditions. Similar results are reported by Rinn et al. (1990) in bovine WPC. Probably antifoaming components were retained by MF membranes during pretreatment. Consequently, MFRP did not show foaming capacity.

The improvement in the foaming properties of WPC when pre-treatment is applied has been attributed to residual total lipid reduction by several authors (DeWit, 1984; Karleskind, Laye, Mei, & Morr, 1995c; Pearce et al., 1991; Zayas, 1997). However, untreated and clarified ovine powders used in our work showed similar total lipid content (Table 1) and untreated WPCs were unable to produce foams, while an acceptable foaming capacity was found in clarified WPCs. According to this, it is possible that lipids per se are not the most important antifoaming components, at least when they are present at very low concentrations in WPC. Lipoproteins impair the foaming properties of whey proteins by weakening the cohesive forces between the protein layers surrounding the air bubbles (Zayas, 1997). But it might be that the protein component of those lipoproteins was the responsible for this effect. Hawks, Phillips, Rasmussen, Barbano, and Kinsella (1990) improved foaming properties of WPI by microfiltration and concluded that a high molecular mass whey component was a foam depressant. In a previous work, Joseph and Mangino (1988) studied the effects of different amounts of milk fat globule membrane in foaming properties of β -lactoglobulin; the components of this membrane impaired foaming more than the addition of soy oil or lecithin. These authors concluded that it was possible for a protein fraction associated with the fat globule membrane to be a powerful anti-foaming agent.

The methodology of whey clarification could have a great influence in enhancing the foaming properties of WPC. Thermocalcic precipitation following by centrifugation seems to have little effect on improving this property (Kim et al., 1989; Vaghela & Kilara, 1996). However, the combination of thermocalcic precipitation + microfiltration seems to improve foaming in WPC, such as we found in ovine WPC and is reported by other authors (Karleskind et al., 1995c; Rinn et al., 1990) in bovine WPC.

The foaming capacity of ovine WPCs was lower than the bovine WPC analysed by Morr and Foegeding (1990), Rinn et al. (1990), and Vaghela and Kilara (1996). Only the DFRP 0.65 product showed similar values for this property. The values reported by Casper et al. (1999) for ovine WPC were also higher than those observed in our study. Nevertheless, it is important to note that we worked with whey from raw milk cheese manufacture (*Serra da Estrela* cheese), while the authors mentioned above studied the properties of WPC obtained from pasteurised milk cheese whey. Mangino, Liao, Harper, Morr, and Zadow (1987) reported that WPC produced from pasteurised milk cheese wheys produced significantly better foams, which were more stable.

Sorelho WPC showed lower values in FE compared with ovine whey WPC, and lower values of FS in comparison with DFRP 0.65. It is known that mild heat treatment (to approximately 55 °C) enhances the foaming properties of WPC due to partial protein denaturation, while higher heating produces intense denaturation and adversely affects

this property (Mangino et al., 1988; Karleskind et al., 1995c; Schmidt et al., 1984), particularly at neutral pH (Phillips, Schulman, & Kinsella, 1990). At high heating temperatures (60–100 °C) irreversible physicochemical changes induced by protein denaturation occur (DeWit & Klarenbeek, 1984), producing an excessive interaction that can cause protein aggregation and reduction of film formation (Zayas, 1997). As we mentioned above, Requeijão is produced by heating ovine whey to 90 °C, 10 min and *Sorelho* is the by-product of its manufacture. Similar differences between ovine whey and deproteinized ovine whey WPCs (Scotta protein concentrate) have been reported by Chianese et al. (1996).

However, heat treatment only decreased the foaming of SDFRP products, but this capacity was not eliminated. Probably the strongly denatured proteins would be retained by MF membranes during clarification procedure, and in clarified powders only partially denatured and soluble proteins remained. This hypothesis agrees with our observations of protein composition and solubility.

Whey and *Sorelho* diafiltrated powders after clarification using a 0.65 μm pore size MF membrane showed better FE values than the diafiltrated powders clarified using a 0.20 μm MF membrane. Some differences in composition have been found between these samples (Tables 1 and 2), that could be responsible for the different values obtained. Both DFRP 0.65 and SDFRP 0.65 showed higher proportion of β -lactoglobulin than DFRP 0.20 and SDFRP 0.20 (Table 2). Kim et al. (1987) observed that the β -lactoglobulin determined by HPLC was significantly correlated with whipped topping overrun. Lower ash and sodium chloride contents were found in DFRP 0.65 and SDFRP 0.65 products in comparison with their equivalents when a 0.20 μm MF membrane was used. The solutions for foaming determination of diafiltrated powders from whey clarified using 0.65 μm MF membranes showed ash contents of 0.20–0.42% (w/v) and a chloride concentration of 30–61 mM. The solutions of samples clarified using a 0.20 μm MF membrane contained 1.25–1.36% (w/v) ash and 149–183 mM chloride (values calculated from data of Table 1). It is important to note that the differences between samples are increased by the fact that it was necessary to dissolve different amounts of sample in order to reach a protein concentration of 1% (w/v) in solution [DFRP and SDFRP 0.65 at 2.5% (w/v) solids and DFRP and SDFRP 0.20 at 5% (w/v) solids]. As coincides with previous research, the effect of ash and sodium chloride in foaming is not clearly defined. Patel and Kilara (1990) found that the foaming capacity of WPC is positively correlated to calcium and ash content, and something similar has been reported (Halling, 1981) when sodium chloride is added. Karleskind et al. (1995c) did not find significant correlations between the foaming and sodium concentrations for WPC. However, the lower foaming expansion and FS that we found in samples with a high sodium chloride content agree with the results reported by Phillips, Yang, and Kinsella (1991) when 0.1 M NaCl was added to the WPI solutions prior to

foaming. The influence of these compounds in the foaming properties of ovine WPC needs further investigation.

The obtaining of 1% protein concentration in DFRP 0.20 and SDFRP 0.20 made necessary the increase of total solids that also involved the presence of higher amounts of lipids, which could impair foaming properties of WPC (Phillips, Whitehead, & Kinsella, 1994; Zayas, 1997).

5. Conclusions

Thermocalcic aggregation followed by microfiltration, particularly when the 0.65 μm microfiltration membrane was used, improved some of the functional properties studied (solubility and foaming) for ovine whey and *Sorelho* protein concentrates. Moreover, the MFRP obtained could also be of potential use in food manufacturing due to their acceptable emulsifying activity. In any case, other aspects of the functionality of ovine whey and *Sorelho* derived products deserve further investigation in order to determine their practical applications in the food industry.

Acknowledgements

This work was supported by the “Consellería de Educación e Ordenación Universitaria da Xunta de Galicia” (XUGA26202B97). Autor C.D.P.’s funding was provided by a PhD fellowship (BD19672/99) issued within the framework “PRAXIS XXI”, administered by JNICT, Portugal. Our thanks to Dr JoDee Anderson for the linguistic support she provided.

References

- Anand, K., Brody, E., Ward, G., & Landry, J. (1998). Custom denaturation of whey proteins: thermal effects. *IDF (Special Issue)*, 9804, 101–115.
- Blecker, C., Paquot, M., Lamberti, I., Sensidoni, A., Lognay, G., & Deroanne, C. (1997). Improved emulsifying and foaming of whey proteins after enzymic fat hydrolysis. *Journal of Food Science*, 62, 48–52, 74.
- Casper, J. L., Wendorff, W. L., & Thomas, D. L. (1998). Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *Journal of Dairy Science*, 81, 3117–3122.
- 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.
- Chianese, L., Laezza, P., Nicolai, M. A., Garro, G., D’Auria, R., Iametty, S., Bonomi, F., Orban, E., & Quaglia, G. B. (1996). Chemical composition and functional properties of ovine rennet whey and deproteinized whey. *Milchwissenschaft*, 51(10), 569–573.
- Comendador, F. J., Nardo, N., Bertone, A., Maurizi, A., & Quaglia, G. (1996). Effetto dell’ultrafiltrazione sulle proprietà funzionali della scotta ovina. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 47(2), 103–112.
- Dalgleish, D. G., & Banks, J. M. (1991). The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk. *Milchwissenschaft*, 46, 75–78.
- DeWit, J. N. (1984). Functional properties of whey proteins in food systems. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 38, 71–84.
- DeWit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effect of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 2701–2710.
- Fauquant, J., Vieco, E., Brule, G., & Maubois, J. L. (1985). Clarification des lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matière grasse résiduelle. *Le Lait*, 65, 1–20.
- Foley, J., & O’Connell, C. (1990). Comparative emulsifying properties of sodium caseinate and whey protein isolate in 18% oil in aqueous systems. *Journal of Dairy Research*, 57, 377–391.
- González de Llano, D., & Santa-María, G. (1997). Análisis of whey proteins during ripening of Afuega’l Pitu cheese by reversed phase HPLC. *Food Science and Technology International*, 3, 445–449.
- Halling, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 155–203.
- Harper, W. J., & Man Lee, K. (1998). Functional properties of 34% whey protein concentrate. *IDF (Special Issue)*, 9804, 140–153.
- Hawks, S. E., Phillips, L. G., Rasmussen, R. R., Barbano, D. M., & Kinsella, J. E. (1990). Effect of processing treatment and cheese-making parameters on foaming properties of whey protein isolates. *Journal of Dairy Science*, 76, 2468–2477.
- Hiddink, J., De Boer, R., & Nooy, P. F. C. (1981). Effect of various pre-treatments on the ultrafiltration of sweet cheese whey at about 55 °C. *Milchwissenschaft*, 36(11), 657–663.
- Houlihan, A. V., Goddard, P. A., Nottigham, S. M., Kitchen, B. J., & Masters, C. J. (1992). Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating whole milk. *Journal of Dairy Research*, 59, 187–195.
- Joseph, M. S. B., & Mangino, M. E. (1988). The effect of milk fat globule membrane protein on the foaming and gelation properties of α -Lactoglobulin solutions and whey protein concentrates. *Australian Journal of Dairy Technology*, 43, 9–11.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F. I., & Morr, C. V. (1995a). Chemical pre-treatment and microfiltration for making delipidized whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 60, 221–227.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F. I., & Morr, C. V. (1995b). Gelation properties of lipid-reduced, and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 60, 731–737.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F. I., & Morr, C. V. (1995c). Foaming properties of lipid-reduced and calcium reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 60, 738–741.
- Karleskind, D., Laye, I., Morr, C. V., & Schenz, T. W. (1996). Emulsifying properties of lipid-reduced and calcium reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 61, 54–58.
- Karman, A. H., & Van Boekel, M. A. J. S. (1986). Evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 315–336.
- Kim, Y. A., Chism, G. W., III, & Mangino, M. E. (1987). Determination of the beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin of whey protein concentrates and their relationship to protein functionality. *Journal of Food Science*, 52, 124–127.
- Kim, S.-H., Morr, C. V., Seo, A., & Surak, J. G. (1989). Effect of whey pre-treatment on composition and functional properties of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 54, 25–29.
- Kilara, A. (1984). Standardization of methodology for evaluating whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 2734–2744.
- Kinsella, E., & Whitehead, D. M. (1989). Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, 343–438.
- Klemaszewski, J. L., Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1992). Formation and coalescence stability of emulsions stabilized by different milk proteins. *Journal of Food Science*, 57, 366–371, 379.
- Lee, S.-Y., Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1992). Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. *Journal of Food Science*, 57, 1210–1213, 1229.

- Li-Chan, E. (1983). Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 48, 47–56.
- Mangino, M. E. (1992). Properties of whey protein concentrates. In J. G. Zadow (Ed.), *Whey and lactose processing* (pp. 231–270). London: Elsevier Science Publishers.
- Mangino, M. E., Huffman, L. M., & Regester, G. O. (1988). Changes in the hydrophobicity and functionality of whey during the processing of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 53, 1684–1686. 1693.
- Mangino, M. R., Liao, S. W., Harper, W. J., Morr, C. V., & Zadow, J. G. (1987). The effects of heating during processing on the functionality of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 52, 1522–1524.
- Maubois, J. L., & Ollivier, G. (1991). Milk protein fractionation. *IDF (Special Issue)*, 9201, 15–22.
- Maubois, J. L., Pierre, A., Fauquant, J., & Piot, M. (1987). Industrial fractionation of main whey proteins. *Bulletin of the IDF*, 212, 154–159.
- Morr, C. V. (1992). Whey utilization. In J. G. Zadow (Ed.), *Whey and lactose processing* (pp. 133–155). London: Elsevier Science Publishers.
- Morr, C. V., & Foegeding, E. A. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, 44, 100–112.
- 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.
- Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431–476.
- Patel, M. T., & Kilara, A. (1990). Studies on whey protein concentrates. 2. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. *Journal of Dairy Science*, 73, 2731–2740.
- Patel, P. D., Stripp, A. M., & Fry, J. C. (1988). Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. *International Journal of Food Science and Technology*, 23, 57–63.
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716–722.
- Pearce, R. J., Marshall, S. C., & Dunkerley, J. A. (1991). Reduction of lipids in whey protein concentrates-effect on functional properties. *IDF (Special Issue)*, 9201, 118–129.
- Pereira, C. D., Díaz, O., & Cobos, A. (2002). Valorization of by-products from ovine cheese manufacture: clarification by thermocalcic precipitation/microfiltration before ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 12(9), 773–783.
- Phillips, L. G., Schulman, W., & Kinsella, J. E. (1990). pH and heat treatment effects on foaming of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 55, 1116–1119.
- Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. E. (1994). Structure-function properties of food proteins. San Diego: Academic Press.
- Phillips, L. G., Yang, S. T., & Kinsella, J. E. (1991). Neutral salt effects on stability of whey protein isolate foams. *Journal of Food Science*, 56, 588–589.
- Pintado, M. E., Lopes da Silva, J. A., & Malcata, X. (1996). Characterization of requeijão and technological optimization of its manufacturing process. *Journal of Food Engineering*, 30, 363–376.
- Pintado, M. E., Lopes da Silva, J. A., & Malcata, X. (1999). Comparative characterization of whey protein concentrates from ovine, caprine and bovine breeds. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 32(4), 231–237.
- Rinn, J. C., Morr, C. V., Seo, A., & Surak, J. G. (1990). Evaluation of nine semi-scale whey pre-treatment modifications for producing whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 55(2), 511–515.
- Schmidt, R. H., Packard, V. S., & Morris, H. A. (1984). Effect of processing on whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67, 2723–2733.
- Timmer, J. M. K., & Van der Horst, H. C. (1998). Whey processing and separation technology: state-of-the-art and new developments. *IDF (Special Issue)*, 9804, 40–65.
- Tornberg, E., & Hermansson, A. M. (1977). Functional characterization of protein stabilized emulsions: effect of processing. *Journal of Food Science*, 42, 468–472.
- Vaghela, M. N., & Kilara, A. (1996). Foaming and emulsifying properties of whey protein concentrates as affected by lipid composition. *Journal of Food Science*, 61, 275–280.
- Van Boekel, M. A. J. S., & Walstra, P. (1995). Effect of heat treatment on chemical and physical changes to milkfat globules. *IDF (Special Issue)*, 9501, 51–65.
- Zall, R. R. (1992). Sources and composition of whey and permeate. In J. G. Zadow (Ed.), *Whey and lactose processing* (pp. 1–72). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Zayas, J. F. (1997). Functionality of proteins in food. Berlin: Springer-Verlag.

Manuscrito III

milchWissenschaft

MILK SCIENCE INTERNATIONAL

Journal of Nutrition Research and Food Science
Zeitschrift für Ernährungsforschung
und Lebensmittelwissenschaften
Scientific Editor: Prof. Dr. W.H. Heeschen

Dielsweg 9
D-24105 Kiel, Germany
Tel. +49 431 3 41 06
Fax +49 431 33 79 83
e-mail: heeschen@t-online.de

June 1, 2005

Dr. Angel Cobos
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Facultad de Ciencias. USC
27002 Lugo
Spain

Re 367 (Please, use this reference number in all correspondence!)

Dear colleague,

Referring to our e-mail of May 3, 2005, I am glad to inform you that your paper "Rheological properties and microstructure of heat-induced gels of ovine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey" has been accepted for publication.

The preparation of the manuscript must follow exactly the Instructions to Authors which are attached. In particular, please, take care of the following requirements:

- 1) The **figures** must be submitted in a width of exactly 80 mm (without outer frame) and inscriptions (first letter in the first word of a line upper case!) of about **2 mm (Arial type, not bold face)**. The size of the symbols and the strength of the curves must fit into the layout. Please, adjust the figures and the size of the symbols accordingly in order to reach a harmonized appearance.
- 2) **Citation of references** see Instructions to Authors (names of the authors not in capitals, but in **small capitals**).

Please, send the manuscript in its final version to Dr. Karin Heeschen, Dielsweg 9, D-24105 Kiel, Germany, telefax: +49 431 33 89 73. e- mail: heeschen@t-online.de.

Thank you very much again for your contribution and cooperation.
Sincerely yours,

Walther Heeschen

Rheological properties and microstructure of heat-induced gels of ovine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey

O. DÍAZ ^a, C. D. PEREIRA ^{a,b}, A. COBOS ^{a*}

^a Facultad de Ciencias de Lugo. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Área de Tecnología de Alimentos. Universidad de Santiago de Compostela. 27002 Lugo. Spain.

^b Escola Superior Agraria de Coimbra (ESAC/IPC). Bencanta, 3040-316 Coimbra. Portugal.

* Corresponding author.

Fax: + 34-982285872

E-mail address: cobusa@lugo.usc.es

Abstract

Rheological properties and microstructure in gels of ovine whey protein concentrates (WPC) were evaluated. The ovine whey was clarified by thermocalcic precipitation and microfiltration. Next, it was ultrafiltrated/diafiltrated, and then, the liofilization of the retentate was carried out. The study was done in heat-induced gels prepared with solutions from this powder as well as with untreated ultrafiltrated WPC and microfiltration retentate powders.

Clarified WPC were able to gel at 10 and 5% (w/v) powder concentrations while only 20% solutions of untreated WPC and microfiltrate retentate powders formed gels. The pH values of the sample solutions influenced the rheological properties of the gels formed, since they became harder at pH 7 than at pH 4. The elastic moduli of the gels were not affected either by the pore size membrane (0.20 and 0.65 μm) used in the microfiltration step or the measuring temperature (15 and 60°C). In the microstructural observations, clarified WPC gels showed larger and better defined protein aggregates than in the other samples, although their microstructure was influenced by pH value.

1. Introduction

The bovine whey protein concentrates (WPC) are applied in food products because of the functionality of their proteins (11), and many of them because of to their tendency to form irreversible heat-induced gels (1). The information about the gelling properties of ovine WPC produced by ultrafiltration or other methods is very scarce although better gel strength of ovine WPC than that of bovine WPC has been reported (4, 15); moreover the thermocalcic aggregation has been never used as a clarification method of ovine whey. No

previous studies have been reported on the microstructural characteristics of ovine whey gels.

In previous works (5, 14), we studied the technological feasibility of the clarification of ovine cheese whey by thermocalcic precipitation followed by microfiltration and some functional properties (solubility, emulsifying and foaming properties) of the clarified and diafiltrated ovine WPCs and the microfiltration retentates.

The objective of this work was to study the rheological properties and the microstructure of heat-induced gels prepared with solutions of conventional ultrafiltration, microfiltration and clarified ultrafiltration/diafiltration retentate powders from ovine cheese whey, in order to evaluate the possible utility of these products in food manufacture. Moreover, the influence of pH in WPC gelation, the measuring temperature and the use of two microfiltration membranes used in the clarification process were studied.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

Ovine cheese whey was obtained from the Association of Producers of *Serra da Estrela* Sheep (ANCOSE, Portugal). After skimming, approximately 100 L of whey were used in each of the three trials made; 50 L were submitted to conventional UF and the other 50 L to thermocalcic precipitation+microfiltration followed by UF and diafiltration. All experiments were made in triplicate. More details and a diagram of the process can be found in PEREIRA et al. (14).

Two microfiltration pore size membranes (0.20 and 0.65 μm) were used in the clarification procedure. Membrane retentates were freeze dried in a Lyph-Lock freeze dryer (Labconco Corporation, Kansas City, USA). Five products were obtained: the conventional ultrafiltration retentate powder (UFRP), the microfiltration retentate powder

using a 0.65 μm pore size MF membrane (MFRP 0.65), the microfiltration retentate powder using a 0.20 μm pore size MF membrane (MFRP 0.20), and the diafiltration retentate powders (from the diafiltration of microfiltration filtrates using the two MF membranes, DFRP 0.65 and DFRP 0.20). The chemical composition of ovine cheese whey is reported by PEREIRA et al. (14) and the protein composition is described in DÍAZ et al. (5).

2.2. Preparation of gels

Sample solutions, at concentrations of 20, 10 and 5% (w/v), were prepared in 100 ml beakers by dispersing appropriate amounts of powder in doubled distilled water. The dispersions were stirred for 1 h at room temperature and eventually the pH of solutions was adjusted to pH 7 or 4 using NaOH or HCl. Gels were obtained by heating at 90°C for 30 min in a water bath. Then they were immediately cooled in ice water to 8°C. The gels were aged 15 h at 8°C.

2.3. Rheological properties of gels

The dynamic rheological tests were performed by a Haake Rheostress RS100 rheometer (Thermo Electron, Karlsruhe, Germany) fitted with a cone-and-plate device (angle of 4° and a cone diameter of 35 mm). Stress-sweep test were conducted at a frequency of 1 Hz to determine the linear viscoelastic range. The storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were determined between frequencies of 0.428-42.80 s^{-1} , at 20 Pa for gels with 20 and 10% powder concentrations, and 10 Pa for gels with 5% powder concentration, in the linear range. Measurements were made at 15°C and at 60°C, after heating and maintaining each of the samples at these temperatures for 3 h, in order to verify the temperature dependence of the parameters measured. All determinations were made in duplicate.

2.4. Microstructure of gels

Scanning electron microscopy (SEM) was used to study the microstructure of the gels produced as described above. The samples taken 24 h after gel manufacture consisted in 5 mm cubes, which were left in a 100ml/l trichloromethane-water solution until analysis.

Gel samples were sequentially dehydrated with successive treatments in aqueous ethanol solutions that progressively increased in ethanol concentration from 30 to 100%. Afterwards the ethanol was substituted by 100% acetone and a critical point drying was made in a Bal-Tec CPD 020 critical point dryer (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Dried specimens were fractured with a razor blade, mounted on stubbs and sputter coated with gold ions (300 Å at 1200 V and 10 mA) in a Jeol JFC-1100 ion sputtering device (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), and examined by SEM in a Jeol JSM-T220A scanning electron microscope, operated at 15 kV.

3. Results and discussion

3.1. Rheological properties of gels

Fig. 1 shows G' and G'' which vary according to the frequency of the gels prepared with solutions from UFRP and adjusted to pH 7. G' showed little frequency dependence. This indicates the presence of a network not prone to rupture at junction zones within the frequencies used. G'' had values about 5 times lower than G' , which means that gels mainly react elastically. Similar patterns were observed in the other gels and in those of unclarified ovine WPC gels studied by PINTADO et al. (15).

The values of G' of all the gels at the frequency of 4.28s^{-1} are shown in Fig. 2. The concentration needed in order to obtain a gel was different depending on the product. In this way, only UFRP, MFRP 0.65 and MFRP 0.20 20% solutions formed a gel, while 10% solutions could not produce gels. Interestingly enough both DFRP 0.65 and 0.20 were able

to gel in 10 and 5% powder concentrations; however the latter concentration generated weaker gels than those from more concentrated solutions.

The effect of the pH was important in all the gels. In this way, the gels adjusted at pH 7 and prepared with solutions of UFRP, MFRP 0.65 and MFRP 0.20 showed higher values of G' than the gels adjusted at pH 4. The influence of the pH was also observed in the gels prepared with DFRP solutions. The rheological measurements of samples adjusted at pH 7 of these powders (DFRP 0.65 and DFRP 0.20) were not possible at the assayed conditions due to they produced very hard structures after heating which were different from the gels obtained at pH 4. It is known that the strength of bovine WPC gels is dependent on the pH of the solution (12) and this agrees with our observations in ovine whey products. Gels from pH 4 solutions were softer than those from pH 7 ones, probably due to unordered electrostatic interactions and low sulfhydryl group reactivity that occur at pH values near the pI of whey proteins (10, 12). At neutral pH, heat induced sulfhydryl-disulfide interchange reactions are enhanced and the high net negative electrostatic charges between molecules favour formation of an ordered and firm protein structure (10, 16). The hardness and the low water retention capacity of DFRP gels and pH 7 could be attributed to the increased protein-protein association which reduced the water-protein interaction. The effect of pH observed in the experimental products coincides with the results reported by other authors in bovine WPC (3, 7) with sodium chloride and calcium contents in the range of our samples.

The differences in the minimum powder concentration necessary for gelling and the characteristics of gels may be attributed to several factors. True protein concentration (g/100ml) in sample solutions (UFRP= 6.5, MFRP 0.65= 3.3 and MFRP 0.20= 5.9 in 20% solutions; DFRP 0.65= 5.2; DFRP 0.20= 1.7 in 10% solutions; calculated from data of DÍAZ et al. 5) does not seem to be related to these differences because samples of different

concentration produced gels of similar characteristics (e.g. UFRP and MFRP 0.65 at pH 7; DFRP products at both pH values).

Other proteins, different from β -lactoglobulin, α -lactalbumin or serum albumin, could also be responsible for the different gelling properties of ovine whey gels. Moreover, residual lipid-protein complexes have been reported as gelling inhibitors of WPC (2, 9) and lipid modified gelation as interfering with protein-protein polymerization (17); they are probably present in UFRP and in MFRP.

Ionic strength influences the gelling ability of WPC, since the ions in the solution affect the gelling properties of bovine proteins (20). β -lactoglobulin gels show maximum hardness at 200 mM NaCl or 10-20 mM CaCl (13). Increases in the concentration of both salts produce a less ordered gel with lower hardness. WPI gels at NaCl concentrations above 0.5 M and neutral pH have a more open structure and lower G' values (6). NaCl and calcium contents were higher in UFRP and MFRP products (525-710 mM chloride and 32-45 mM calcium in 20% solutions) than in clarified powders (118 and 298 mM chloride, and 2.0 and 1.2 mM calcium in 10% solutions of DFRP 0.65 and DFRP 0,20, respectively; calculated from data reported in PEREIRA et al. (14). These differences could also be responsible for the gelation of DFRP at a lower concentration than UFRP and MFRP products, mainly due to NaCl concentration. Chloride content in the powders resulted from the addition of half of the sodium chloride to the milk prior to coagulation.

The elastic moduli of the gels were not influenced by the pore size membrane (0.65 or 0.20 μ m) used in the MF step or by the measuring temperature (15 or 60°C).

3.2. Appearance and microstructure of gels

Thermally induced gels exhibited a white opaque appearance, except DFRP structures obtained at pH 7, which showed a collapsed sponge-like structure with extremely low water

holding capacity that was similar to those observed by HUANG et al. (8) in gels obtained from enzyme-treated WPI.

SEM micrographs (1,500 magnifications; Fig. 3) showed that all samples formed particulate networks, similar to microstructures reported by other authors for protein gels of similar appearance (18, 19). However, some differences can be found. UFRP gels (Fig. 3.A) showed less defined structure with aggregates of different size, while the MFRP products (Fig. 3.B) exhibited a more compact homogeneous network with small pores. Protein aggregates were bigger and better defined in DFRP products (Fig. 3.C and 3.D), although the microstructure was influenced by pH value. DFRP gels obtained at pH 4 (Fig. 3.D) were more compact, homogeneous and less porous than the structures obtained at pH 7 (Fig. 3.C). These observations are consistent with those of rheological analyses, in which DFRP products showed different gelling characteristics than the other powders. The presence of high chloride concentrations in UFRP and MFRP did not increase the size of protein aggregates in comparison with DFRP products; the protein composition and nature might be responsible for the differences in the structures observed.

Acknowledgements

This work was supported by the Xunta de Galicia (XUGA26202B97). Funding for author C.D.P. was provided by a Ph.D. fellowship (BD19672/99) issued within the framework “PRAXIS XXI”, administered by JNICT, Portugal. Our thanks to Dr. JoDee Anderson for the linguistic support she provided.

4. References

- (1) AGUILERA, J.M.: Food Technol. **49** (10) 83-89 (1995)
- (2) BLECKER, C., PAQUOT, M., DEROANNE, C.: J. Food Sci. **65** 561-563 (2000)

- (3) BOYE, J. I., ALLI, I., RAMASWAMY, H., RAGHAVAN, V. G. S.: *J. Food Sci.* **62** 57-65 (1997)
- (4) CASPER, J. L., WENDORFF, W. L., THOMAS, D. L.: *J. Dairy Sci.* **82** 265-271 (1999)
- (5) DÍAZ, O., PEREIRA, C. D., COBOS, A.: *Food Hydrocol.* **18** 601-610 (2004)
- (6) FOEGEDING, E. A., DAVIS, J. P., DOUCET, D., MCGUFFEY, M. K.: *Trends Food Sci. Technol.* **13** 151-159 (2002)
- (7) FOEGEDING, E. A., GWARTNEY, E. A., ERRINGTON, A. D.: In *Functional properties of proteins and lipids* (Eds. J. R. Whitaker, F. Shahidi, A. López Munguia, R. Y. Yada, G. Fuller) ACS Symposium Series, Washington, 145-157 (1998)
- (8) HUANG, W. L., CATIGNANI, G. L., SWAISGOOD, H. E.: *Nahrung* **43** 79-85 (1999)
- (9) KARLESKIND, D., LAYE, I., MEI, F. I., MORR, C. V.: *J. Food Sci.* **60** 731-737,741 (1995)
- (10) KINSELLA, J. E.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **21** 197-262 (1984)
- (11) MANGINO, M. E.: In *Whey and lactose processing* (Ed. J. G. Zadow) Elsevier Science Publishers, London, 231-270 (1992)
- (12) MORR, C. V., HA, E. Y. W.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **33** 431-476 (1993)
- (13) MULVIHILL, D. M., KINSELLA, J. E.: *J. Food Sci.* **53**, 231-236 (1988)
- (14) PEREIRA, C. D., DÍAZ, O., COBOS, A.: *Int. Dairy J.* **12** 773-783 (2002)
- (15) PINTADO, M. E., LOPES DA SILVA, J. A., MALCATA, J. X.: *Lebensm.-Wiss. Technol.* **32** 231-237 (1999)
- (16) SHIMADA, K., CHEFTEL, J. C.: *J. Agr. Food Chem.* **37** 161-168 (1989)
- (17) STERNBERG, M., CHIANG, J. P., EBERTS, N. J.: *J. Dairy Sci.* **59** 1042-1050 (1976)
- (18) VARDHANABHUTI, B., FOEGEDING, E. A., MCGUFFEY, M. K., DAUBERT, C. R., SWAISGOOD, H. E.: *Food Hydrocol.* **15** 165-175 (2001)
- (19) VERHEUL, M., ROEFS, S. P. F. M.: *Food Hydrocol.* **12** 17-24 (1998)
- (20) ZAYAS, J. F.: *Functionality of proteins in food*. Springer-Verlag, Berlin (1997)

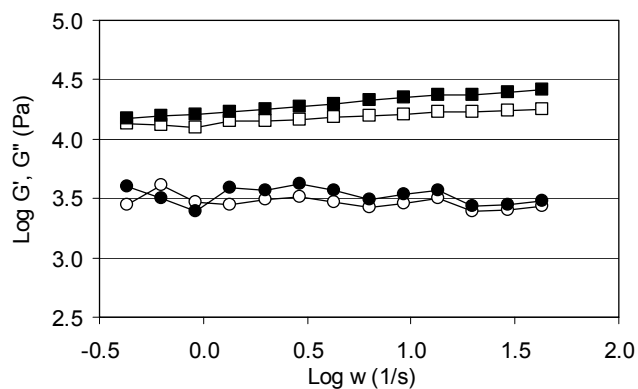


Fig. 1: Evolution of G' and G'' depending on frequency applied to UFRP gels with 20% powder concentration at pH 7. Log G' of gels measured at 15°C (□) and at 60°C (■). Log G'' of gels measured at 15°C (○) and at 60°C (●).

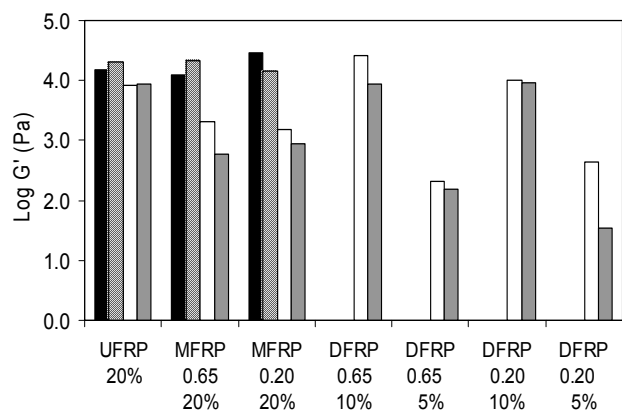


Fig. 2: Values of log G' (Pa) at the frequency of 4.28 s^{-1} of the gels formed with ovine cheese whey powders. Gels at pH 7, measured at 15°C (■) and at 60°C (▨). Gels at pH 4, measured at 15°C (□) and at 60°C (■).

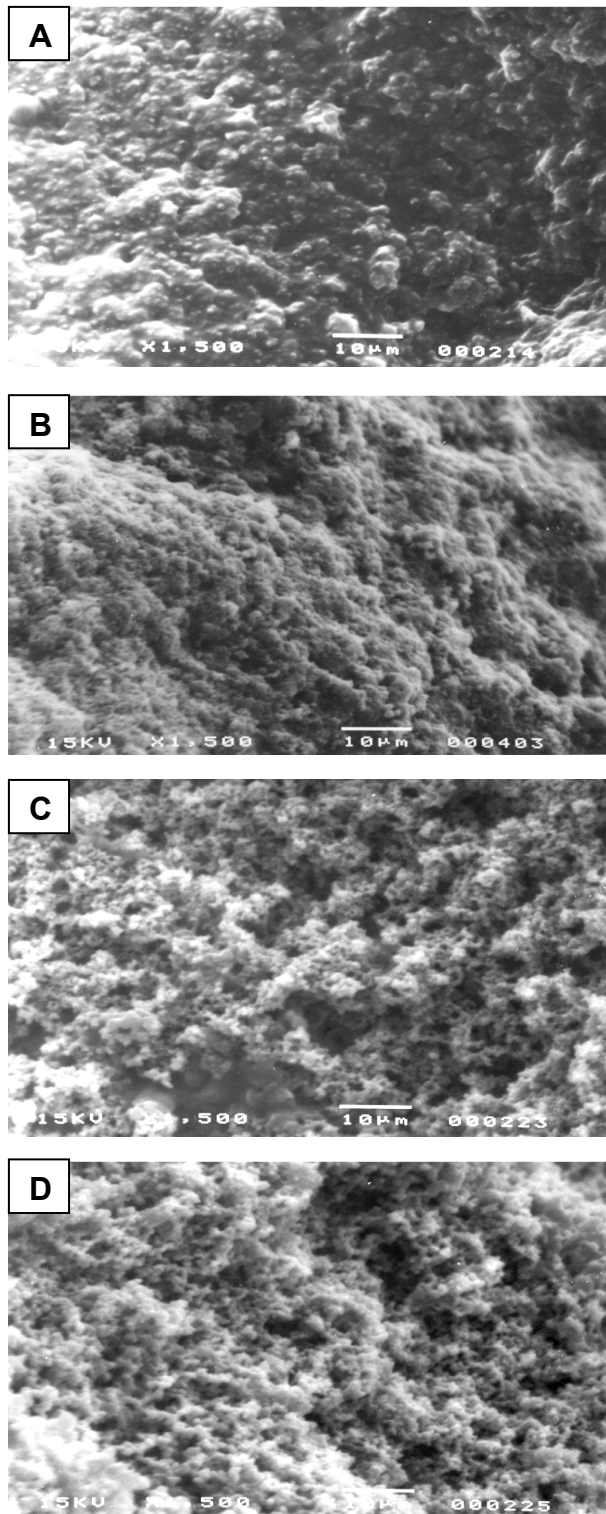


Fig. 3: Scanning electron micrographs of gels formed with ovine whey powders. A: UFRP, gel with 20% at pH 4; B: MFRP 0.20, gel with 20% at pH 7; C: DFRP 0.65, gel with 10% at pH 7; D: DFRP 0.65, gel with 10% at pH 4.

Manuscrito IV

Angel Cobos

De: "Dr. Paul Jelen" <idj.jelen@interbaun.com>
Para: "Angel Cobos" <cobusa@lugo.usc.es>
Enviado: jueves, 08 de septiembre de 2005 5:07
Asunto: RE: Manuscript IDJ

Dear Author:

Paper received - confirming receipt. It will be logged in a.s.a.p. and will undergo a preliminary evaluation. You will be notified of the result in the near future. If the paper will be found of sufficient standard, it will then be assigned to one of the Editors for further management of the customary full scientific review.

Thank you for submitting your work to us for consideration.

P. Jelen

Editor-in-Chief, Int. Dairy J.

-----Original Message-----

From: Angel Cobos [mailto:cobusa@lugo.usc.es]
Sent: Wednesday, September 07, 2005 2:57 AM
To: idj.jelen@interbaun.com
Subject: Manuscript IDJ

Dear Professor P. Jelen,

Please, find enclosed the manuscript entitled "Use of ovine whey protein concentrates and clarification by-products on whey cheese: impact on yield and quality" to be considered for publication in INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL.

Yours sincerely,

Dr. Angel Cobos

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Facultad de Ciencias. USC.

27002 Lugo.

SPAIN

E-mail:cobusa@lugo.usc.es

12/09/2005

1 **Use of ovine whey protein concentrates and clarification by-products on whey**
2 **cheese: impact on yield and quality**

3

4

Carlos D. Pereira ^{a,b}, Olga Díaz ^a, Angel Cobos ^{a *}

5

6

7

8 ^a Facultad de Ciencias de Lugo. Departamento de Química Analítica, Nutrición y
9 Bromatología, Área de Tecnología de Alimentos. Universidad de Santiago de
10 Compostela. 27002 Lugo. Spain.

11

12 ^b Escola Superior Agraria de Coimbra (ESAC/IPC). Bencanta, 3040-316 Coimbra.
13 Portugal.

14

15

16 * Corresponding autor. Tel.: + 34-982223996; Fax: + 34-982285872

17 E-mail address: cobusa@lugo.usc.es (A. Cobos)

18 Correspondence address: Dr. Angel Cobos

19 Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

20 Facultad de Ciencias de Lugo. USC.

21 27002 Lugo. SPAIN

22

23

1

2

3 Abstract

4

5 The effects of the addition of whey protein concentrates and clarification by-
6 products obtained from ovine cheese whey and deproteinized whey (*Sorelho*) on yield
7 and quality of a whey cheese (*Requeijão*) were evaluated. Whey protein concentrates
8 were obtained by ultrafiltration of skimmed wheys and *Sorelhos*. The clarification by-
9 products were obtained after treatment of the skimmed wheys and *Sorelhos* by
10 thermocalcic precipitation and microfiltration with two membranes (0.20 and 0.65
11 µm pore size). Next, the liophilization of the corresponding retentates was carried out.
12 The addition of the powders caused higher yields of the whey cheeses mainly with
13 whey powders without affecting the strength of the products. The retention of water
14 and other components of whey and milk in the whey cheeses was influenced by the
15 protein composition of the powders. Some colour parameters (L and a values) and the
16 microstructure of the whey cheeses were influenced by the addition of the powders.

17

18 *Keywords:* Whey cheese; Ovine cheese whey; Deproteinized whey; Whey protein
19 concentrates; Yield; Quality parameters

20

21 1. Introduction

22

23 Whey cheese is a dairy product manufactured mainly from ovine whey in the
24 Mediterranean countries. The production of whey cheeses is important because the
25 heating process in the manufacture of this dairy product allows the recuperation of

1 whey proteins from wheys. These cheeses have different names depending on the
2 country where they are elaborated. For example, in Italy, Spain and Portugal, the
3 whey cheeses obtained with ovine cheese whey are called *Ricotta*, *Requesón* and
4 *Requeijão*, respectively (Pintado, Macedo & Malcata, 2001). The latter product is
5 obtained by heating the whey at a temperature ranging from 90 to 100°C for 15-30
6 min, with or without addition of 10-20% (v/v) of ovine/caprino/bovine milk. The
7 residual “deproteinized” whey called *Sorelho*, resulting from the manufacture of
8 *Requeijão*, contains approximately 60% of the original dry matter of the whey.
9 Lactose and minerals largely contribute to its dry mass, but residual fat and non-
10 thermally precipitated nitrogen components are still present. Hence, attempts to
11 recover some of the solid components present before final disposal may be of interest
12 (Pereira, Díaz & Cobos, 2002).

13 In previous works (Pereira et al., 2002; Díaz, Pereira & Cobos, 2004, 2005), we
14 studied the composition and some functional properties of ultrafiltration retentate
15 powders obtained from ovine cheese whey and deproteinized whey (*Sorelho*). These
16 whey protein concentrates have different composition and functional properties
17 depending on their origin (whey or *Sorelho*). Moreover, in these studies, both by-
18 products of ovine cheese manufacture were clarified by thermocalcic precipitation
19 and microfiltration using two pore size membranes (0.20 and 0.65µm). Next, the
20 filtrates were ultrafiltrated/diafiltrated and then, the corresponding retentates were
21 freeze dried. The clarification improved posterior ultrafiltration rates and improved
22 some functional properties of the whey and *Sorelho* protein concentrates and also
23 generated microfiltration retentates for potential use in food manufacturing. These
24 microfiltration retentates also showed interesting functional properties.

1 Whey protein concentrates (WPC) have been widely used in the food industry in a
2 variety of products (Morr, 1992). One important use is in dairy products, such as
3 yoghurts, cheeses, etc. The addition of denatured whey proteins in cheese milk leads
4 to an increased yield attributed to an increased retention of serum in the cheese matrix
5 and to the incorporation of whey proteins, but it may also result in a slightly poorer
6 quality of cheese flavour and texture (Hinrichs, 2001). All the investigations have
7 been done with bovine whey proteins and in dairy products manufactured with bovine
8 milk. There are no studies about the effect of the addition of whey proteins in the
9 properties of ovine whey cheeses. This addition could increase the yield of the whey
10 cheeses as well as allow for the recuperation of more whey proteins. However, some
11 quality parameters of the whey cheeses (colour, texture) might be affected.

12 The objective of this work was to study the influence of the addition of
13 ultrafiltration retentate powders and clarification by-products (microfiltration
14 retentate powders) obtained from ovine cheese whey and deproteinized whey
15 (*Sorelho*) on some parameters (yields, dry matter content, texture, colour and
16 microstructure) of a whey cheese (*Requeijão*).

17

18 **2. Materials and Methods**

19

20 *2.1. Sample preparation*

21

22 Ovine cheese whey and deproteinized whey (*Sorelho*) were obtained from the
23 Association of Producers of *Serra da Estrela* Sheep (ANCOSE/Portugal). Sample
24 preparation was similar for both products. Immediately after reception, the products
25 were skimmed by means of a WestfaliaTM separator type ADB. Approximately 100 L

1 of each product (cheese whey or *Sorelho*) were used in each trial; 50 L were
2 submitted to ultrafiltration and 50 L were used for thermocalcic
3 precipitation+microfiltration. All experiments were made in triplicate. More details
4 and a diagram of the process can be found in Pereira et al. (2002).

5 Two microfiltration pore size membranes (0.20 and 0.65 μm) were used in the
6 clarification procedure. Membrane retentates were freeze dried in a Lyph-Lock
7 freeze dryer (Labconco Corporation, Kansas City, USA). Six different powders were
8 obtained: three from ovine whey and three from *Sorelho*. The three powders from
9 whey were: the ultrafiltration retentate powder (UFRP), the microfiltration retentate
10 powder using a 0.65 μm pore size MF membrane (MFRP 0.65) and the
11 microfiltration retentate powder using a 0.20 μm pore size MF membrane (MFRP
12 0.20). The other three powders were obtained from *Sorelho* using similar treatments:
13 SUFRP (ultrafiltration retentate powder), SMFRP 0.65 and SMFRP 0.20
14 (microfiltration retentate powders).

15

16 2.2. Whey cheese preparation

17

18 Nineteen different batches of whey cheeses were manufactured. The control batch
19 was elaborated with 900 g of cheese whey and 100 g of bovine milk standarized to
20 12.2% dry matter, 3.1% protein and 3.5% lipids. The whey was constituted by
21 11.35% dry matter, 1.53% protein, 1.11% lipids and 2.9% ash. The remaining
22 eighteen whey cheese batches were manufactured adding the three different powders
23 from ovine whey and the three powders from *sorelho*. Each powder was added in
24 three levels of incorporation: 0.5, 1.0 and 1.5% (w/w). The chemical and protein

1 composition of these powders is shown in Table 1 (adapted from Pereira et al., 2002
2 and Díaz et al., 2004).

3 The mixture was heated in a stainless steel kettle under smooth stirring
4 conditions. When it began to boil, 20 mL of cold water was added and the
5 temperature was maintained at 95°C for 10 min. Afterwards, the mixture was poured
6 into cheesecloth bags so it could drain for 24h at 2°C. Finally, the whey cheeses were
7 recovered from the bags and left for 5 days at 2°C.

8 Three cheeses from the control batch and one cheese of the other batches were
9 manufactured and analysed in each experiment. This experiment was repeated four
10 times.

11

12 *2.3. Dry matter content and whey cheese yields*

13

14 Whey cheeses were analysed for dry matter by oven drying at 105°C for 12 h.
15 All determinations were made in duplicate.

16 Whey cheese yield was determined by dividing the weight of the whey cheese by
17 the weight of the original mixture (whey, milk and powders) and multiplying by 100.

18 Yield adjusted to a 30% dry matter content was calculated as follows:

19 $\text{Adjusted yield} = (\% \text{ dry matter in whey cheese} / 30) \times \text{whey cheese yield}.$

20 Dry matter recovery has been calculated as follows:

21 $\text{Dry matter recovery} = [(\text{weight of cheese (g)} \times \% \text{ dry matter in cheese}) / (100 \times$
22 $12.2 + 900 \times 11.35 + \text{weight of powder (g)} \times \% \text{ dry matter in powder})] \times 100$

23 where 100 is the weight of added milk (g), 12.2 is the % of dry matter in added
24 milk, 900 is the weight of added whey (g) and 11.35 is the % of dry matter in added
25 whey.

1

2 *2.4. Strength of whey cheeses*

3

4 The strength of the whey cheeses was measured using a Stevens LFRA
5 Texture Analyser (Stevens & Sons Ltd., UK) fitted with the cylindrical probe TA 24
6 (diameter of 4 mm). The whey cheeses were penetrated to a depth of 20 mm at a rate
7 of 10 mm s⁻¹. The maximum force (g) required to penetrate the gel was taken as a
8 measure of the relative gel strength. The measurements were carried out at 1, 3 and 6
9 days after coagulation. All determinations were made in duplicate.

10

11 *2.5. Colour coordinates*

12

13 The colour of the samples was measured using a Minolta CR 200 colorimeter
14 (Minolta Camera Co., Osaka, Japan). All measurements were made in the Hunter Lab
15 colour space using the D65 standard illuminant and 10° standard observer. The
16 instrument was standardized with a white (L = 97,8, a = -0,6, b = 2,1) tile before
17 sample measurements. The colour values were expressed as L (lightness), a
18 (redness/greenness) and b (yellowness/blueness). Colour was tested at 1, 3 and 6 days
19 after coagulation. All determinations were made in duplicate.

20

21 *2.6. Microstructure of whey cheeses*

22

23 Scanning electron microscopy (SEM) was used to study the microstructure of the
24 whey cheeses. The samples taken 24 h after coagulation consisted in 5 mm cubes,
25 which were left in a 100ml/l trichloromethane-water solution until analysis.

1 Whey cheeses samples were sequentially dehydrated with successive treatments
2 in aqueous ethanol solutions that progressively increased in ethanol concentration
3 from 30 to 100 %. Afterwards the ethanol was substituted by 100% acetone and the
4 samples were dried with the critical point method under CO₂ using a Bal-Tec CPD
5 020 critical point dryer (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). Dried specimens were
6 fractured with a razor blade, mounted on stubbs and sputter coated with gold ions
7 (300 Å at 1200 V and 10 mA) in a JEOL model JFC-1100 ion sputtering device
8 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan), and examined by SEM in a JEOL JSM-T220A scanning
9 electron microscope, operated at 15 or 20 kV.

10

11 *2.7. Statistical analysis*

12

13 One-way ANOVA with Dunnett's Multiple Comparison Test (p<0.05) was
14 carried out to identify the differences between the control batch with the other
15 batches (SPSS 12.0S version 12.0.1 for Windows, 2003).

16

17

18 **3. Results and discussion**

19

20 *3.1. Whey cheese yields and dry matter recovery*

21

22 Table 2 shows the effects of the addition of ovine cheese whey and *Sorelho*
23 powders on yield, adjusted yield and dry matter recovery of the experimental whey
24 cheeses. The control whey cheeses showed a yield of 5.3%; this result was lower than
25 the typical yield of whey cheeses (6%) reported by Pintado et al. (2001). The lower
26 heating temperature used in our work and the fact that no ovine milk was added could
27 have influenced the differences observed.

1 In general, the addition of UF retentate and MF retentate powders increased whey
2 cheese yields as they were significantly higher than the control batch at the three
3 levels of incorporation with MFRP 0.20, and only significantly higher when 1 or
4 1.5% of the rest of whey powders or 1.5% *Sorelho* powders were used. The yields
5 increased proportionally with the levels of incorporation of the powders.

6 The adjusted yield results allowed us to eliminate the effect of the variation in
7 water content of the whey cheeses. The values were also higher in whey cheeses with
8 added powders than in the control batch but there were no significant differences
9 when *Sorelho* powders were incorporated. A similar pattern was observed in the
10 results of dry matter recovery. It is clear that, if a dry ingredient is added to a product,
11 the yield or the adjusted yield should increase. However, when whey powders were
12 incorporated, the increases in dry matter recovery were higher than those expected
13 even with a full retention of the dry ingredients added; this did not happen in the
14 same proportion when *Sorelho* powders were used. The higher increase in yields and
15 dry matter recovery in batches with added whey powder compared to the *Sorelho*
16 ones could be due to the higher proportion of β -lactoglobulin in the former, but also
17 to the higher relation β -lactoglobulin/ α -lactalbumin (5/1 in whey powders and 1/1 in
18 *Sorelho* powders, approximately; Díaz *et al.*, 2004). β -lactoglobulin is the main
19 protein in the composition of whey cheeses (Pintado, Lopes da Silva & Malcata,
20 1996) and it forms aggregates in higher proportion than α -lactalbumin in
21 concentrated whey even at lower temperatures than those used in whey cheese
22 production (Anand, Brody, Ward & Landry, 1998). The protein added probably
23 interacted with the proteins of the whey and the milk added; it is also possible that the
24 additional amount of β -lactoglobulin was associated with the residual fat globule
25 membranes, effect described by other authors in whole milk during heating

1 (Dalglish & Banks, 1991; Houlihan, Goddard, Nottigham, Kitchen & Maters, 1992).
2 These interactions may explain the increased yields in batches with added whey
3 powder in relation to the control batch, mainly when whey powders were used.

4 The higher yields of the MFRP 0.20 batches in relation to the UFRP ones cannot
5 be attributed to the true protein and β -lactoglobulin contents of the powders (Table 1).
6 It may be due to fact that the MFRP 0.20 product is the by-product obtained from
7 thermocalcic aggregation during the clarification procedure of the whey, so it is
8 expected that phospholipoproteins be concentrated in this product (the objective of
9 pre-treatment; Fauquant, Vieco, Brule & Maubois, 1985), together with a certain
10 amount of the main whey proteins. It might be possible for these proteins to interact
11 in a different way with other components of the whey/milk mixture during whey
12 cheese manufacture than UFRP proteins. This would allow for their retention in
13 higher amounts, as can be observed in dry matter recoveries. MFRP 0.65 batches
14 showed yields similar to those for UFRP, although this product had a lower protein
15 concentration. It is also possible that the different nature of the proteins after
16 thermocalcic aggregation affected the yields more than the protein content.

17

18 3.2. *Dry matter content*

19

20 Table 2 also shows the dry matter contents of the whey cheeses at 1, 3 and 6 days
21 after coagulum formation. The dry matter increased with time in all batches due to
22 drainage. In general, the whey cheeses manufactured with the addition of whey or
23 *Sorelho* powders showed lower dry matter content than the control batch at day 1,
24 mainly when high concentrations were added. This effect tends to disappear with time
25 in batches with added *Sorelho* powder and for the lowest concentration in batches

1 with added whey powder. This coincides with the higher yields observed in these
2 batches. Although several components were retained in the whey cheeses (according
3 to the dry matter recovery results), water was probably the main compound that the
4 proteins of the powder retained, at least for the first 24 hours after coagulation.

5

6 *3.3. Strength*

7

8 The strength of the whey cheeses at 1, 3 and 6 days after coagulum formation are
9 shown in table 2. The strength tends to increase between day 1 and 6 of refrigeration
10 in all the products probably due to the increase of dry matter in the whey cheeses.
11 Changes were not observed in the strength of the products with the addition of the
12 powders. It is important to remark that the higher retention of water caused by the
13 addition of retentate powders did not influence the texture of the whey cheeses.

14

15 *3.3. Colour*

16

17 The L, a and b values of whey cheeses at 1, 3 and 6 days after coagulum
18 formation are shown in Table 3. The L values tended to decrease and the b values to
19 increase throughout refrigeration time for all the batches of whey cheeses. The
20 influence of the days of refrigeration on the a values was not clear. The decrease in
21 the L values may be explained by the loss of water. The whey cheeses manufactured
22 with ultrafiltration and microfiltration retentate powders showed lower values of L
23 than the control whey cheeses mainly in whey cheeses with high levels of added
24 powders. This observation may be explained by the content of dry matter in the whey
25 cheeses, with the lowest values in control whey cheeses and the highest values in the

1 whey cheeses with higher levels of added powders. In general, the whey cheeses
2 manufactured with ultrafiltration and microfiltration retentate powders showed higher
3 a values than control whey cheeses. No effect of the retentate powders was observed
4 in b values.

5

6 *3.4. Microstructure*

7

8 SEM micrographs (1,500 magnifications, Fig. 1) show different structures for
9 each sample of whey cheese, although in most of them (except SMFRP 0.20 added
10 batches), similar aggregates to those observed in whey protein gels of ovine (Díaz *et*
11 *al.*, 2004) or bovine origin (Verheul & Roefs, 1998; Vardhanabhuti, Foegeding,
12 McGuffey, Daubert & Swaisgood, 2001) are found. However, the size of these
13 aggregates and the presence of pores or of other structures show differences among
14 the experimental whey cheeses. Control batch (Fig. 1, first micrograph) and MFRP
15 0.65 added batches have a microstructure formed by a network of small aggregates of
16 different sizes (more compact in control than in MFRP 0.65 whey cheeses) and large,
17 smooth structures of 20 μm or more incrustated in this network.

18 The microstructure of UFRP (Fig. 1, second micrograph) and MFRP 0.20 (Fig. 1,
19 third micrograph) batches are only formed by aggregates having a similar appearance
20 to thermal whey protein gels. These aggregates are more homogeneous in size in
21 MFRP 0.20 batches in comparison with UFRP ones. Some pores can also be observed
22 in both samples.

23 Whey cheeses with SUFRP additions have a microstructure similar to the control
24 batch, with heterogeneous aggregates and smooth structures, and with no pores.
25 SMFRP 0.65 (Fig. 1, fourth micrograph) also shows this appearance, although

1 aggregates are smaller and more homogeneous and compact than in the other whey
2 cheeses. However, the structure of aggregates has almost disappeared in SMFRP 0.20
3 batches and the large, smooth structures predominate in these whey cheeses.

4 The small aggregates that constitute the main structure in most of the whey
5 cheeses are probably formed by whey proteins, although some caseins from the milk
6 added can be included in the structures, interacting with whey protein as has been
7 suggested for yoghurts fortified with WPC (Remeuf, Mohammed, Sodini & Tissier,
8 2003). The smooth structures are not due to the addition of the experimental powders
9 and they may be formed by whey proteins interacting in a more disordered way than
10 the proteins which generate the small aggregates. This effect might be related to the
11 amount of soluble protein and its denaturation state: these structures are specially
12 abundant in batches with added *Sorelho* powder, products that contain a low
13 proportion of soluble protein (Table 1). Nevertheless, they do not appear in UFRP
14 and MFRP 0.20 whey cheeses; these powders contained a high proportion of soluble
15 β -lactoglobulin and a low quantity of denatured proteins.

16

17 **4. Conclusions**

18

19 The addition of ovine whey protein concentrates and clarification by-products on
20 the manufacture of whey cheeses is very interesting since it allows for an increase in
21 yield without affecting the strength of the products. The increase in the yields was not
22 only due to the retention of water but also of other milk components. The yields were
23 influenced by the contents of protein, β -lactoglobulin and phospholipoproteins and
24 the relation β -lactoglobulin/ α -lactalbumin of the powders. Hence, the addition of
25 powders obtained from ovine cheese whey could be more useful than powders

1 obtained from deproteinized whey (*Sorelho*). Finally, some colour parameters (L and
2 a values) and the microstructure of the whey cheeses can be influenced by the
3 addition of the powders.

4

5 **Acknowledgements**

6

7 This work was supported by the “Consellería de Educación e Ordenación
8 Universitaria da Xunta de Galicia” (XUGA26202B97). Funding for author C.D.P.
9 was provided by a Ph.D. fellowship (BD19672/99) issued within the framework
10 “PRAXIS XXI”, administered by JNICT, Portugal. Our thanks to Dr. JoDee
11 Anderson for the linguistic support she provided.

12

13 **References**

14

15 Anand, K., Brody, E., Ward, G., & Landry, J. (1998). Custom denaturation of whey
16 proteins: thermal effects. *IDF (Special Issue)*, 9804, 101-115.

17

18 Dalglish, D. G., & Banks, J. M. (1991). The formation of complexes between serum
19 proteins and fat globules during heating of whole milk. *Milchwissenschaft*, 46, 75-78.

20

21 Díaz, O., Pereira, C. D., & Cobos, A. (2004). Functional properties of ovine whey
22 protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese
23 manufacture by-products. *Food Hydrocolloids*, 18, 601-610.

24

25 Díaz, O., Pereira, C. D., & Cobos, A. (2005). Rheological properties and
26 microstructure of heat-induced gels of ovine whey protein concentrates obtained from
27 clarified cheese whey. *Milchwissenschaft*, in press.

- 1
2 Fauquant, J., Vieco, E., Brule, G., & Maubois, J. L. (1985). Clarification des
3 lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matiere grasse résiduelle. *Le*
4 *Lait*, 65, 1-20.
5
6 Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy*
7 *Journal*, 11, 495-503.
8
9 Houlihan, A. V., Goddard, P. A., Nottigham, S. M., Kitchen, B. J., & Maters, C .J.
10 (1992). Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk
11 components on heating whole milk. *Journal of Dairy Research*, 59, 187-195.
12
13 Morr, C. V. (1992). Whey utilization. In J.G. Zadow, *Whey and lactose processing*
14 (pp. 133-155). London: Elsevier Science Publishers.
15
16 Pereira, C. D., Díaz, O., & Cobos, A. (2002). Valorization of by-products from ovine
17 cheese manufacture: clarification by thermocalcic precipitation/microfiltration before
18 ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 12, 773-783.
19
20 Pintado, M. E., Lopes da Silva, J. A., & Malcata, F. X. (1996). Characterization of
21 Requeijão and technological optimization of its manufacturing process. *Journal of*
22 *Food Engineering*, 30, 363-376.
23
24 Pintado, M. E., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2001). Review: technology,
25 chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology*
26 *International*, 7, 105-116.
27
28 Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I., & Tissier, J. P. (2003). Preliminary
29 observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and
30 physical properties of stirred yogurt. *International Dairy Journal*, 13, 773-782.
31

-
- 1 Vardhanabhuti, B., Foegeding, E. A., McGuffey, M. K., Daubert, C. R., &
2 Swaisgood, H. E. (2001). Gelation properties of dispersions containing polymerized
3 and native whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 15, 165-175.
4
- 5 Verheul, M., & Roefs, S. P. F. M. (1998). Structure of whey protein gels, studied by
6 permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*, 12,
7 17-24.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

1
2
3
4

Table 1

Chemical and protein composition (g 100 g⁻¹ powder) of ovine cheese whey and *Sorelho* powders.

Mean values and standard deviation (\pm) (n=3). Adapted from Pereira et al. (2002) and Díaz et al. (2004).

Ovine cheese whey	UFRP *	(\pm)	MFRP 0.65	(\pm)	MFRP 0.20	(\pm)
Moisture	11.23	(0.32)	11.01	(1.05)	9.71	(2.68)
Total nitrogen	5.65	(0.58)	2.98	(0.13)	5.05	(0.72)
Fat	0.36	(0.03)	0.47	(0.10)	0.42	(0.11)
Ash	26.70	(0.01)	28.06	(1.12)	25.41	(3.73)
Calcium	0.65	(0.03)	0.90	(0.11)	0.88	(0.23)
Chloride	9.28	(0.26)	12.57	(0.64)	11.78	(1.52)
True protein	32.58	(4.74)	16.39	(0.36)	29.64	(1.60)
α -Lactalbumin	5.83	(0.55)	2.35	(0.24)	4.63	(0.38)
β -Lactoglobulin	23.81	(3.77)	11.78	(1.24)	19.75	(0.79)
Bovine serum albumin	0.88	(0.58)	0.52	(0.08)	0.27	(0.15)
NPNC	2.18	(0.28)	1.49	(0.37)	1.86	(0.23)
Sorelho	SUFRP *	(\pm)	SMFRP 0.65	(\pm)	SMFRP 0.20	(\pm)
Moisture	10.54	(0.39)	8.68	(0.50)	8.79	(2.67)
Total nitrogen	4.56	(0.90)	2.69	(0.32)	3.45	(0.70)
Fat	0.44	(0.07)	0.49	(0.02)	0.52	(0.14)
Ash	27.24	(0.33)	29.83	(0.21)	27.69	(1.29)
Calcium	0.71	(0.21)	0.86	(0.03)	0.75	(0.35)
Chloride	15.12	(0.56)	15.07	(0.50)	14.17	(0.62)
True protein	25.38	(6.15)	15.90	(1.32)	19.99	(3.83)
α -Lactalbumin	6.02	(1.89)	3.09	(0.94)	5.17	(1.02)
β -Lactoglobulin	7.60	(1.26)	3.91	(1.83)	4.11	(0.54)
Bovine serum albumin	0.58	(0.36)	0.82	(0.18)	0.63	(0.21)
NPNC	2.65	(0.96)	1.41	(0.07)	1.95	(0.34)

NPNC: non protein nitrogen components.

* For abbreviation definition, see Section 2

Table 2
 Effect of addition of ovine cheese whey and *Sorelho* powders on yields, dry matter recovery, dry matter content and strength of whey cheeses.
 Mean values and standard deviation (\pm) (n=4) except control (n=12)

Whey cheeses	Yield (%)	Adjusted yield (%)	Dry matter recovery (%)	Dry matter (%)			Strength (g)		
				Day 1	Day 3	Day 6	Day 1	Day 3	Day 6
Control	5.30 (0.78)	5.42 (0.89)	14.22 (2.33)	30.62 (1.59)	31.65 (2.42)	36.55 (4.73)	111.7 (32.10)	186.5 (81.24)	280.1 (137.9)
UFRP **									
0.5%	6.64 (0.72)	6.08 (0.26)	16.03 (0.68)	27.70 (2.70)	31.69 (3.61)	36.25 (4.48)	114.7 (19.62)	219.5 (90.30)	324.0 (141.6)
1.0%	8.15*(1.31)	7.47*(1.22)	19.78*(3.23)	27.56 (2.14)	28.56 (0.50)	33.14 (4.34)	108.0 (32.50)	217.5 (65.45)	260.2 (139.1)
1.5%	8.79*(1.08)	7.74*(0.97)	20.58*(2.59)	26.51*(2.45)	28.52 (1.27)	31.20 (4.07)	81.25 (24.59)	180.7 (81.62)	253.5 (175.5)
MFRP 0.65									
0.5%	5.67 (0.27)	5.58 (0.15)	14.71 (0.38)	29.56 (0.66)	30.46 (0.45)	35.83 (6.84)	133.5 (13.52)	210.2 (72.69)	317.2 (181.1)
1.0%	6.95*(1.22)	7.03 (1.31)	18.61*(3.46)	30.38 (2.36)	31.42 (2.23)	35.31 (5.49)	115.0 (23.24)	183.5 (95.06)	315.2 (175.9)
1.5%	7.84*(1.23)	7.42*(1.10)	19.74*(2.91)	28.44 (1.00)	29.37 (1.40)	32.91 (5.15)	88.50 (21.30)	163.7 (79.34)	218.5 (146.2)
MFRP 0.20									
0.5%	7.15* (0.93)	7.12*(1.17)	18.76*(3.08)	29.78 (1.92)	30.48 (2.02)	34.28 (4.14)	127.0 (40.46)	203.2 (55.93)	283.5 (138.2)
1.0%	8.69* (0.59)	7.58*(0.76)	20.06*(2.02)	26.23*(3.04)	29.32 (1.49)	32.69 (5.53)	114.0 (34.13)	202.7 (51.49)	283.5 (141.3)
1.5%	9.62* (0.36)	9.15*(0.65)	24.35*(1.72)	28.55 (1.69)	30.66 (1.86)	32.64 (5.29)	122.2 (13.40)	190.7 (66.40)	283.0 (163.7)
SUFRP **									
0.5%	6.62 (1.43)	6.65 (1.23)	17.52 (3.25)	30.31 (1.63)	33.34 (1.07)	36.19 (6.81)	106.5 (47.91)	188.5 (62.01)	250.2 (111.9)
1.0%	6.54 (1.04)	6.49 (1.45)	17.17 (3.84)	29.53 (2.28)	31.69 (1.94)	36.85 (3.58)	104.5 (11.36)	175.2 (61.60)	229.7 (98.04)
1.5%	7.08*(0.78)	6.74 (1.02)	17.93 (2.72)	28.47 (1.94)	31.28 (3.00)	35.24 (6.28)	97.25 (20.20)	168.0 (64.59)	269.5 (168.6)
SMFRP 0.65									
0.5%	6.08 (0.62)	6.45 (1.01)	16.99 (2.66)	31.70 (2.07)	32.75 (1.90)	39.08 (6.66)	96.25 (20.06)	203.0 (109.4)	312.7 (239.1)
1.0%	6.44 (0.54)	6.23 (0.87)	16.49 (2.31)	29.03 (3.19)	32.13 (1.20)	38.02 (6.22)	111.7 (34.01)	185.7 (83.31)	264.0 (168.6)
1.5%	7.04*(0.14)	6.65 (0.52)	17.69 (1.38)	28.34 (2.31)	29.69 (1.73)	35.29 (4.35)	120.5 (22.17)	160.0 (53.30)	246.0 (103.6)
SMFRP 0.20									
0.5%	5.05 (0.51)	5.14 (0.72)	13.55 (1.90)	30.68 (4.17)	33.77 (2.66)	35.79 (4.35)	106.5 (52.13)	190.2 (119.5)	260.0 (157.9)
1.0%	6.38 (0.17)	5.84 (0.35)	15.48 (0.92)	27.49 (0.94)	31.33 (1.70)	35.21 (1.72)	114.5 (63.16)	182.2 (56.73)	246.2 (100.6)
1.5%	7.26*(0.39)	6.85 (0.72)	18.23 (1.91)	28.30 (2.38)	31.07 (1.18)	33.99 (3.81)	73.25 (49.49)	147.5 (88.26)	197.2 (148.2)

* Means differ significantly ($p < 0.05$) from control

** For abbreviation definition, see Section 2

Table 3
Effect of addition of ovine cheese whey and *Sorelho* powders on colour coordinates of whey cheeses.
Mean values and standard deviation (\pm) (n=4) except control (n=12)

Whey cheeses	L			a			b		
	Day 1	Day 3	Day 6	Day 1	Day 3	Day 6	Day 1	Day 3	Day 6
Control	94.85 (0.78)	94.05 (0.81)	94.33 (0.54)	-3.03 (0.34)	-2.88 (0.38)	-3.30 (0.27)	10.53 (0.46)	11.19 (0.64)	11.86 (0.78)
UFRP **									
0.5%	94.09 (0.92)	93.10 (1.54)	92.95 (0.48)	-2.70 (0.38)	-2.67 (0.37)	-2.54*(0.11)	10.46 (0.58)	10.62 (0.16)	11.19 (0.91)
1.0%	93.74 (0.55)	92.69 (1.07)	92.72 (0.49)	-2.50 (0.41)	-2.50 (0.42)	-2.66*(0.20)	10.81 (0.57)	10.71 (0.40)	10.81 (0.58)
1.5%	93.06*(0.38)	92.26*(0.78)	91.34*(0.74)	-2.59 (0.45)	-2.55 (0.34)	-2.59*(0.40)	11.25 (0.80)	11.35 (0.52)	11.80 (0.64)
MFRP 0.65									
0.5%	93.90 (0.21)	93.35 (0.59)	92.61 (1.70)	-2.71 (0.60)	-2.54 (0.16)	-2.87 (0.27)	10.36 (1.06)	10.11 (0.32)	10.92 (0.63)
1.0%	92.55*(0.90)	92.72 (0.84)	92.05*(0.60)	-2.40 (0.57)	-2.40 (0.31)	-2.67*(0.37)	10.20 (1.16)	10.45 (0.57)	10.67 (0.73)
1.5%	92.85*(1.38)	92.80 (0.87)	92.25*(1.29)	-2.46 (0.53)	-2.41 (0.26)	-2.82 (0.31)	10.85 (0.81)	10.87 (0.41)	11.42 (0.46)
MFRP 0.20									
0.5%	94.75 (0.38)	94.20 (0.83)	93.66 (1.16)	-2.60 (0.49)	-2.72 (0.05)	-2.95 (0.11)	10.89 (1.01)	10.42 (0.54)	11.15 (0.83)
1.0%	93.56 (0.64)	93.39 (0.78)	92.85 (0.80)	-2.62 (0.45)	-2.48 (0.39)	-2.78*(0.24)	9.98 (0.68)	9.99*(0.40)	10.92 (0.53)
1.5%	93.92 (0.44)	93.44 (0.53)	93.00 (0.74)	-2.71 (0.42)	-2.51 (0.33)	-2.76*(0.30)	10.30 (0.94)	10.52 (0.61)	10.91 (0.30)
SUFRP **									
0.5%	94.15 (1.08)	93.49 (1.35)	93.85 (0.72)	-2.86 (0.33)	-2.81 (0.33)	-2.88 (0.10)	10.64 (0.72)	10.94 (1.24)	11.44 (1.31)
1.0%	94.07 (0.50)	93.11 (0.99)	92.64 (0.55)	-2.55 (0.51)	-2.69 (0.40)	-2.85 (0.23)	9.99 (0.84)	10.92 (0.86)	11.55 (0.82)
1.5%	93.71 (0.62)	93.25 (0.46)	92.46 (0.59)	-2.51 (0.50)	-2.44 (0.33)	-2.80*(0.12)	10.54 (0.59)	10.81 (0.23)	11.57 (0.97)
SMFRP 0.65									
0.5%	94.20 (0.94)	93.79 (1.55)	90.93*(3.98)	-2.79 (0.73)	-2.71 (0.31)	-2.95 (0.48)	10.20 (1.06)	10.61 (0.52)	12.44 (1.37)
1.0%	94.47 (0.39)	94.09 (0.89)	93.21 (0.64)	-2.87 (0.59)	-2.70 (0.16)	-3.13 (0.35)	10.38 (1.01)	10.89 (0.67)	11.84 (0.75)
1.5%	93.30*(0.97)	93.70 (0.44)	93.31 (0.87)	-2.85 (0.71)	-2.78 (0.87)	-3.00 (0.40)	11.00 (1.26)	11.02 (0.80)	11.60 (0.46)
SMFRP 0.20									
0.5%	94.97 (0.26)	94.56 (0.53)	94.40 (1.01)	-3.02 (0.45)	-2.96 (0.17)	-3.16 (0.22)	11.01 (0.64)	11.25 (0.13)	11.89 (0.37)
1.0%	94.34 (0.54)	93.05 (1.68)	93.50 (0.88)	-2.76 (0.36)	-2.76 (0.43)	-2.98 (0.15)	10.64 (0.25)	11.60 (0.92)	12.14 (1.48)
1.5%	93.87 (0.78)	93.01 (1.30)	93.52 (0.59)	-3.12 (0.37)	-2.89 (0.51)	-3.16 (0.18)	11.29 (0.42)	11.30 (0.78)	11.78 (1.13)

* Means differ significantly ($p < 0.05$) from control

** For abbreviation definition, see Section 2

FIGURE CAPTION

Fig. 1. Scanning electron micrographs of control whey cheese and those containing added ovine whey powders. From the top to the bottom: Control; UFRP added whey cheese; MFRP 0.20 added whey cheese; SMFRP 0.65 added whey cheese.

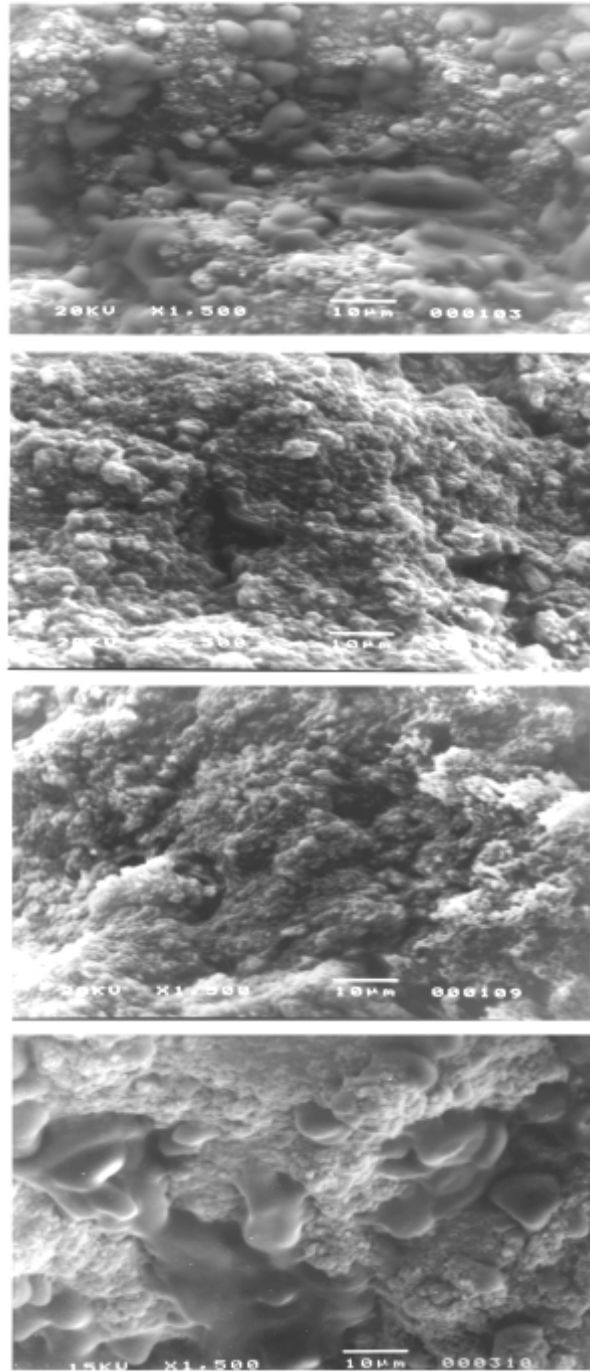


Figure 1.

III.2. DISCUSIÓN GENERAL

Como se ha señalado en el capítulo de Introducción, esta Tesis Doctoral se planteó como un estudio de la composición y propiedades funcionales de concentrados de proteínas séricas (CPS) obtenidos de subproductos de la fabricación de queso de oveja Serra da Estrela y *requeijão* (suero y *sorelho* respectivamente) y el efecto que tendría sobre los CPS obtenidos la aplicación de procesos de clarificación (precipitación termocálcica seguida de microfiltración), en los cuales además se obtendrían unos subproductos (retenidos de microfiltración) de características desconocidas hasta el momento.

En primer lugar (manuscrito I) se obtuvieron, mediante técnicas de UF, CPS tanto de suero de queso de oveja como de *sorelho* denominados UFRP y SUFRP respectivamente, con un contenido de proteína medio en cada caso de 40 y 33% sobre materia seca. Este porcentaje es relativamente bajo debido a que en el proceso no se realizó diafiltración. Consecuentemente, el contenido de cenizas (fundamentalmente cloruros) fue relativamente alto en ambos deshidratados (valores medios alrededor del 30%). El menor contenido proteico de SUFRP se debió a la baja concentración de proteína del *sorelho* (0,49 vs. 1,53% del suero de queso). Además, ambos CPS presentaron diferentes proporciones de proteínas séricas, lo cual influyó en las propiedades funcionales que se estudiaron a continuación.

Así, se observaron diferencias en la solubilidad de la proteína, tanto a pH 7 como 4 (manuscrito II). La solubilidad de UFRP (89-90%) es comparable a la de los CPS obtenidos de origen bovino por otros autores (Tabla III.1), mientras que la solubilidad de SUFRP es claramente inferior (valores medios entre 35 y 38%). Esta diferencia se puede atribuir a que el *sorelho* procede de la elaboración de un queso de suero (*requeijão*) obtenido por calentamiento intenso; este tratamiento térmico provoca una desnaturalización de proteínas séricas que hace decrecer su solubilidad (Mangino y col., 1988). Aunque muchas de estas proteínas desnaturalizadas quedan retenidas en el queso de suero, otras se pierden en el *sorelho*, quedando en el CPS correspondiente. Esta presencia de proteínas séricas desnaturalizadas en SUFRP se detectó en el análisis por HPLC de la composición proteica de los CPS. Así, mientras que en UFRP la cantidad de proteínas no identificadas por HPLC fue baja (8%), en SUFRP fue más alta (44%). Estas proteínas no identificadas, aunque parte pueden ser inmunoglobulinas,

proteosa peptonas, enzimas y proteínas de la membrana del glóbulo graso, la mayor proporción corresponde a proteínas séricas desnaturalizadas por el calor, lo cual, como se ha señalado, se reflejó en la solubilidad del producto.

Tabla III.1. Resultados obtenidos en la determinación de las propiedades funcionales de los productos experimentales de esta Tesis Doctoral y los citados por otros autores en CPS de origen bovino y ovino.

	Solubilidad (%)	Propiedades emulsionantes		Propiedades espumantes	
		EAI	ESR	FE	FS
Productos ovinos (a)					
Suero	84,8-102,9	15,8-41,5	1,8-7,4	250,5-403,5 (b)	0-12,5
Sorelho	30,5-98,3	17,1-25,9	0,47-12,9	205,0-237,5	3,9-4,0
Resultados citados por otros autores:					
CPS ovinos	102,0 (1)	0,24 (1) *			
CPS bovinos	88-100 (2)	27,6-34,4 (4)	29,2-31,8 (4)	381-925 (4)	1,1-35,4 (4)
	≥ 95 (3)	19,7-21,3 (6)	33,9-35,3 (6)	0-648 (6)	0-15,7 (6)
	93,8-98,9 (4)	0,11-0,23 (8) *	2,3-13,2 (7)	0-944 (7)	
	85-90 (5)		4,0-8,0 (8)		

(a): Incluyen todos los productos experimentales obtenidos en esta Tesis Doctoral.

(b): Resultados de las propiedades espumantes correspondientes a los productos clarificados diafiltrados.

(1): Casper y col., 1999.

(2): Schmidt y col., 1984.

(3): Karleskind y col., 1996.

(4): Vaghela y Kilara, 1996.

(5): Harper y Man Lee, 1998.

(6): Patel y Kilara, 1996.

(7): Rinn y col., 1990.

(8): Kim y col., 1989

*: Valores de absorbancia a 500 nm. Los valores obtenidos en esta Tesis Doctoral para los productos experimentales se sitúan en torno a 0,20.

En la capacidad gelificante también se observaron diferencias entre ambos CPS. Así, los CPS a partir de queso de oveja (UFRP) presentan capacidad gelificante a una concentración de deshidratado de 20 g/100 ml (manuscrito III). Por el contrario, los concentrados obtenidos a partir de *sorelho* (SUFRP) no presentan dicha capacidad gelificante (resultados no incluidos en ningún manuscrito). Estas diferencias en las propiedades gelificantes de UFRP y SUFRP se debieron probablemente al menor contenido de β -lactoglobulina en los CPS de *sorelho* (7,6%) respecto a los CPS de suero (23,8%). La explicación a las diferencias en esta proteína hay que buscarlas en que el *sorelho* es un subproducto de la producción de *requeijão*, y éste se obtiene principalmente por gelificación térmica de la β -lactoglobulina, quedando el *sorelho* con una menor proporción de ella. Respecto a la otra proteína importante del suero, la α -lactalbúmina, la proporción respecto del total de deshidratado presente tanto en UFRP como en SUFRP es

similar (alrededor del 6%). Por tanto, parece que la desnaturalización térmica induce a la formación de agregados compuestos principalmente por β -lactoglobulina, con una modesta participación de la α -lactalbúmina, como señalan Anand y col. (1998). También la alta proporción de proteínas séricas desnaturalizadas por el calor puede influir negativamente en la capacidad gelificante.

Sin embargo, ambos CPS presentaron comportamientos similares en las propiedades emulsionantes y espumantes, con valores parecidos en el índice de actividad emulsionante y en la estabilidad emulsionante y careciendo ambos de capacidad espumante (manuscrito II).

Por tanto, hasta este punto, podemos señalar que los CPS obtenidos de suero de queso de oveja y de *sorelho* presentan interesantes propiedades funcionales, sobre todo en el primer caso; así UFRP tiene alta solubilidad, capacidad emulsionante y gelificante mientras que en SUFRP, aunque la solubilidad es menor y no tiene capacidad gelificante, también presenta capacidad emulsionante. Sin embargo, ambos carecen de propiedades espumantes.

Se ha obtenido una mejora importante de las propiedades funcionales en esta Tesis Doctoral tanto en los CPS de suero como de *sorelho* con el empleo de clarificación con precipitación termocálcica seguida de microfiltración previamente a la ultrafiltración. Además dicha clarificación mejoró significativamente el posterior tratamiento de ultrafiltración. En la presente Tesis se han comparado dos membranas de microfiltración de diferente tamaño de poro (0,65 y 0,20 μm) utilizadas en la clarificación, con el fin de seleccionar la más adecuada para el proceso. En este sentido, y aunque ambas mejoran el posterior tratamiento de ultrafiltración, debido al bajo flujo de microfiltración y alto grado de retención proteica conseguido con la membrana de 0,20 μm , parece que el proceso es más adecuado realizarlo con la membrana de 0,65 μm tanto con el suero de queso de oveja como con el *sorelho* (manuscrito I); sólo con la membrana de 0,65 μm se consigue aumentar la concentración proteica de los retenidos de UF, tanto en los CPS de suero como en los de *sorelho*, con valores de 66,9 y 42,6% sobre materia seca respectivamente. Con la membrana de 0,20 μm , los retenidos de UF presentan una baja concentración proteica tanto en productos de suero como de *sorelho* (22% sobre materia seca), y menor que en los retenidos de UF convencionales. Hay que señalar también la influencia que puede tener en la concentración de proteína del deshidratado final el

que, tras el proceso de clarificación y UF, se haya realizado una diafiltración. Este tratamiento obviamente disminuye el contenido de calcio iónico (manuscrito I).

También es interesante resaltar que el proceso de clarificación no causa un descenso significativo del contenido de lípidos, lo que puede deberse a que el desnatado previo del suero y *sorelho* logra ya descender de una manera importante la cantidad de grasa del producto a tratar.

Respecto de la mejora de las propiedades funcionales con la clarificación, ésta incrementa la solubilidad proteica de los CPS, observándose unos valores en los diafiltrados (DFRP y SDFRP) superiores que en los deshidratados de UF convencionales (UFRP y SUFRP), independientemente de la membrana de MF utilizada (manuscrito II). Este aumento de la solubilidad proteica es notablemente más importante en los derivados del *sorelho*, doblando sus valores medios (88-90% vs 34-37%). Este resultado puede deberse a la retención por las membranas de MF de las proteínas insolubles presentes en el *sorelho* y que disminuían la solubilidad de SUFRP.

Las propiedades emulsionantes de los CPS no se ven mejoradas por el proceso de clarificación salvo con la membrana de 0,65 μm en el producto de *sorelho*. Sin embargo, donde sí se ve claramente la utilidad de la clarificación es en la capacidad espumante. Así, los CPS clarificados (DFRP y SDFRP) presentaron propiedades espumantes mientras que, como se señaló anteriormente, los CPS procedentes de sueros sin clarificar (UFRP y SUFRP) no tenían dicha capacidad (manuscrito II). Por tanto, parece que las membranas de MF retienen compuestos de carácter antiespumante que como se señala en el manuscrito II, pueden ser componentes proteicos de las fosfolipoproteínas, la fracción proteica que se encuentra asociada a la membrana del glóbulo graso o, en general, componentes del suero de alta masa molecular. Las propiedades espumantes mejoran más cuando la clarificación se realiza con la membrana de 0,65 μm tanto en productos de suero como de *sorelho*.

Comparando la capacidad espumante de los retenidos de diafiltración de suero y *sorelho*, éstos últimos presentan una menor capacidad lo cual se puede achacar al tratamiento térmico empleado en la elaboración del *requeijão* que desnatura proteínas, lo cual afecta adversamente a las propiedades espumantes.

La capacidad gelificante también mejora claramente con la clarificación en los productos derivados del suero. Así, los CPS clarificados son capaces de gelificar a una concentración de deshidratado de 5 y 10 g/100ml independientemente de la membrana de MF utilizada, mientras que sólo una concentración de 20 g/100ml es capaz de gelificar en los productos sin clarificar (manuscrito III). La explicación puede ser similar a la señalada para la capacidad espumante; es decir, la retención de compuestos como fosfolipoproteínas por la membrana de MF que disminuyan también la capacidad gelificante. Sin embargo, en este caso se puede señalar que el menor contenido de cloruros y de calcio iónico de los diafiltrados puede también influir en la mejora de la propiedad gelificante. En relación a los productos de *sorelho*, al igual que se señaló para SDFRP, los retenidos de diafiltración tampoco presentaron capacidad gelificante en ninguna de las concentraciones estudiadas (resultados no incluidos en ningún manuscrito). La causa de esta ausencia de capacidad gelificante puede deberse en parte a la baja proporción que presentan de β -lactoglobulina los productos derivados de *sorelho*, lo cual se da sobre todo en el producto clarificado con la membrana de 0,65 μm . Sin embargo, en el producto clarificado con la membrana de 0,20 μm , el contenido de β -lactoglobulina es superior al retenido sin clarificar y comparable con los diafiltrados de 0,20 μm obtenidos en productos de suero, que sí gelificaban. En este caso, puede que la presencia de proteínas séricas desnaturalizadas por el calor pueda influir negativamente en dicha capacidad gelificante.

Por tanto, en esta Tesis Doctoral, empleando tecnologías de membrana (microfiltración, diafiltración) y con la precipitación termocálcica, hemos conseguido obtener unos productos (CPS) a partir del suero de queso de oveja y del *sorelho* (suero desproteínizado) con excelentes propiedades funcionales, tanto de solubilidad, capacidad emulsionante, espumante y gelificante (sólo con el suero en este último caso) que pueden ser de gran utilidad en la elaboración de gran variedad de alimentos, recomendando el empleo en la MF de una membrana de 0,65 μm mejor que de 0,20 μm . Con el proceso tradicional de UF se obtienen también productos útiles pero carentes de ciertas propiedades como la espumante, o con ciertas limitaciones en algunas propiedades como la gelificante en los productos de suero o la baja solubilidad en los de *sorelho*. También conviene destacar que con esta técnica hemos obtenido unos subproductos, los retenidos de microfiltración, con una interesante composición y ciertas propiedades funcionales que vamos a comentar a continuación.

Los deshidratados de retenidos de microfiltración presentaron un contenido de proteína tanto en los productos de suero (MFRP) como en los de *sorelho* (SMFRP) de alrededor de 19-24% sobre materia seca, excepto los retenidos de microfiltración con membrana de 0,20 μm que tenían un contenido de 35,8% sobre extracto seco. El contenido de lípidos no presentó diferencia con el resto de deshidratados, presentando también un valor bajo (<0,6% sobre extracto seco) y el contenido de cenizas es similar al resto de productos (valores medios alrededor del 30%) siendo sólo destacable un aumento del contenido de cloruros en los retenidos de MF de los productos elaborados a partir del suero (manuscrito I).

De la composición proteica, como sucedía en los retenidos de UF convencionales y en los diafiltrados, destaca en los retenidos de MF el menor contenido de β -lactoglobulina en los productos de *sorelho* (3-5%) respecto a los CPS de suero (12-20%). También conviene recordar que, como señalamos anteriormente, las membranas de MF deben de retener ciertos componentes de carácter proteico de ciertas propiedades negativas funcionalmente hablando, como antiespumantes. A pesar de esto, los deshidratados de retenidos de microfiltración presentan propiedades funcionales interesantes.

En primer lugar, la solubilidad de la proteína en estos productos (MFRP y SMFRP) es similar a la de los deshidratados de retenidos de UF convencionales, que recordemos tenían un valor relativamente alto en los productos de suero UFRP (89-90%), pero mucho más baja en los productos de *sorelho* SUFRP (35-38%). Como comentamos, las membranas de MF probablemente retienen proteínas séricas desnaturalizadas por el calor que hacía aumentar la solubilidad en los diafiltrados de *sorelho* (SDFRP). Este hecho hace que lógicamente los retenidos de MF de *sorelho* (SMFRP) mantengan dicha baja solubilidad (30-43%).

También referíamos que los deshidratados de retenidos de UF convencionales no presentaban propiedades espumantes, mientras que los correspondientes diafiltrados sí tenían dichas propiedades al quedar retenidos por las membranas de MF compuestos de propiedad antiespumante. Lógicamente, los deshidratados de retenidos de MF no presentaron capacidad espumante.

Sí es interesante destacar el mayor índice de actividad emulsionante (EAI) que presentan los deshidratados de retenidos de MF (MFRP y SMFRP) en relación tanto a los

deshidratados de retenidos de UF convencionales (UFRP y SUFRP) como a los deshidratados de diafiltrados (DFRP y SDFRP). Este resultado entra en consonancia con lo comentado por ciertos autores (Maubois, 1984; Joseph y Mangino, 1988b) de las posibles propiedades funcionales, principalmente emulsionantes, de las fosfolipoproteínas que estarían en estos retenidos de MF. No obstante, los valores de estabilidad de la emulsión (ESR) son inferiores en MFRP y SMFRP respecto al resto de deshidratados.

Finalmente, la capacidad gelificante de los MFRP es comparable a la de los UFRP, ya que gelifican a una concentración de deshidratado de 20 g/100 ml (manuscrito III). Por tanto, a pesar de que en la membrana de MF se pueden retener ciertos componentes que dificultan la gelificación, los MFRP mantienen dicha capacidad gelificante. En este resultado puede influir que ambos MFRP presentan una relativa alta proporción de β -lactoglobulina (alrededor del 70%). En la menor capacidad gelificante de los MFRP en relación a los correspondientes diafiltrados también puede influir el menor contenido de cloruros y calcio de estos últimos. Es interesante señalar también que, a pesar del mayor contenido proteico en los retenidos obtenidos con membrana de MF de 0,20 μm en relación a la de 0,65 μm , no se han encontrado diferencias entre ambos tipos de MFRP.

Sin embargo, los SMFRP, al igual que los otros productos obtenidos de *sorelho*, no presentaron capacidad gelificante (resultados no incluidos en los manuscritos), probablemente por los mismos motivos que señalábamos en esos productos: baja proporción de β -lactoglobulina y presencia de proteínas séricas desnaturalizadas por el calor.

Por tanto, por sus propiedades funcionales, estos retenidos de MF tanto de suero como de *sorelho* pueden ser útiles en la elaboración de ciertos alimentos y por ello nos ha llevado a emplearlos en la elaboración de un alimento típico de oveja, el queso de suero *requeijão*, junto con los retenidos de UF convencionales obtenidos de suero y de *sorelho* (manuscrito IV).

Como ya se comentó, el queso de suero (requesón o *requeijão*) es una manera de aprovechar las proteínas séricas del suero de quesería obteniendo un alimento bastante apreciado en el mercado. Con la adición tanto de los retenidos de UF como de los retenidos de MF se ha pretendido que las proteínas séricas presentes en estos productos queden incorporadas al *requeijão* y además ver si es posible un mayor rendimiento de fabricación (kg de

requeijão / kg de la mezcla original x 100), sin afectar a las características propias del producto (color y textura).

La adición de los deshidratados en tres dosis (0,5, 1,0 y 1,5%) produjo un aumento del rendimiento de fabricación, siendo lógicamente mayor el incremento cuanto más proporción de deshidratado se añadió (manuscrito IV). Una parte del aumento del rendimiento se debió a la mayor incorporación de agua en el producto; sin embargo, dicho aumento en el producto final, en general, no fue significativo. Por tanto, el incremento de rendimiento, como se pudo ver calculando el rendimiento ajustado (a un contenido de extracto seco del 30%) y la recuperación de materia seca, se debió más a la incorporación de las proteínas séricas aportadas por los deshidratados y probablemente también por la mayor incorporación de proteínas incluidas en la leche de vaca y en el suero original.

De los seis productos añadidos (UFRP, MFRP de 0,65 μm y de 0,20 μm , SUFRP, SMFRP de 0,65 μm y de 0,20 μm), el mayor incremento del rendimiento se produjo con los productos de suero y, de ellos, destacaron el retenido de UF (UFRP) y sobre todo el retenido de MF con 0,20 μm (MFRP 0.20) (manuscrito IV). El mayor contenido de β -lactoglobulina soluble y la mayor relación β -lactoglobulina / α -lactalbúmina de los productos de suero probablemente hace que su incorporación sea mayor que los de *requeijão*. Esta proteína interacciona con las proteínas del suero y de la leche añadidos lo que aumenta el rendimiento.

Interesante resulta también el mayor rendimiento que proporciona la adición de MFRP 0.20 a pesar de tener algo menor proporción de β -lactoglobulina que UFRP, siendo en este caso probablemente debido a la presencia de fosfolipoproteínas en este retenido, que interaccionan, aunque de manera distinta que la β -lactoglobulina, con la mezcla de leche/suero, aumentando por tanto el rendimiento.

Con la adición de productos de *sorelho* se produjo también un aumento de rendimiento en el *requeijão*, aunque de menor importancia que con los productos de suero, lo que probablemente se debió a su inferior proporción de β -lactoglobulina.

El mayor rendimiento en la elaboración de *requeijão*, sobre todo con la adición de productos de suero, no conllevó cambios significativos en la firmeza del producto. Es interesante

remarcar que la mayor retención de agua que se consigue no influyó en la textura del producto. Donde sí se pudo ver la influencia de dicha mayor retención de agua fue en el color del producto, sobre todo provocando una menor luminosidad (manuscrito IV).

Por tanto, se puede señalar que la adición de los productos obtenidos en esta Tesis Doctoral, sobre todo a partir del suero de quesería puede ser interesante para la elaboración del requesón ya que permite aumentar el rendimiento de fabricación de una manera importante sin cambios importantes en la textura. Por supuesto, la adición de los diafiltrados también aquí obtenidos, tendría aplicación para la elaboración de quesos de suero. Otros productos donde se podrían aplicar estos deshidratados sería en los quesos, en cualquiera de las variedades elaboradas fundamentalmente con leche de oveja. En estos alimentos, como en el *requeijão*, daría lugar a un aumento del rendimiento de fabricación, pero también habría que investigar si provoca cambios en el sabor y textura del producto, como se ha señalado en quesos de vaca (Hinrichs, 2001).

De acuerdo con los resultados obtenidos en las propiedades funcionales que se han estudiado, los productos en polvo de suero y *sorelho* de oveja podrían emplearse en la elaboración de otros alimentos, tal y como se hace en la actualidad con los CPS obtenidos de suero de vaca. En la Tabla III.2 se muestra un resumen de estas propiedades, los alimentos en los que son especialmente interesantes y en los que se emplean productos comerciales de origen bovino, y los productos experimentales en polvo de oveja que podrían aplicarse igualmente en ellos.

Tabla III.2. Propiedades funcionales, fundamento y aplicaciones de los CPS bovinos comerciales (adaptado de U.S.D.E.C., 2004c) y posibles usos de los productos experimentales de origen ovino en la elaboración de alimentos.

Función	Características	Beneficios funcionales	Beneficios de mercado	Aplicaciones	Productos de suero ovino
Emulsificación	Presencia de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en las proteínas de suero	<ul style="list-style-type: none"> • Creación de emulsiones estables. Previene la coalescencia de los glóbulos grasos • Similares funciones que la yema de huevo, pero con menor contenido de colesterol • Versátil. Puede utilizarse en una gran variedad de sistemas 	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora la apariencia del producto, lo hace más atractivo para los consumidores • Un contenido más bajo de colesterol los hace más atractivos para consumidores concienciados con la salud • La utilización de suero en lugar de huevo disminuye los riesgos microbiológicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Productos cárnicos y derivados del pescado • Mezclas de helado • Productos de panadería y pastelería • Bebidas • Salsas tipo mayonesa 	Todos los productos experimentales de suero y de sorelho
	Los componentes del suero ayudan en la dispersión de la grasa de la leche y los <i>shortening</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Facilita la reducción de la grasa 	<ul style="list-style-type: none"> • Los productos bajos en grasa los hace más atractivos para consumidores concienciados con la salud 	<ul style="list-style-type: none"> • Productos lácteos • Productos de panadería y pastelería 	
Propiedades espumantes	Propiedades de superficie de las proteínas del suero	<ul style="list-style-type: none"> • Ayudan a mantener la estabilidad de las espumas • Contribuyen a incrementar el volumen de la espuma • Pueden reemplazar a la clara de huevo 	<ul style="list-style-type: none"> • Mantiene las propiedades espumantes, las cuales mejoran el atractivo visual del producto terminado, así como su sabor y textura • Utilizadas en lugar de los derivados del huevo disminuye el riesgo microbiológico 	<ul style="list-style-type: none"> • Productos de pastelería, tales como merengues y ciertos pasteles • Productos de confitería • Helados y otros postres congelados 	Productos de suero: DFRP 0.65 DFRP 0.20 Productos de sorelho: SDFRP 0.65 SDFRP 0.20
Gelificación	Los componentes del suero forman geles no reversibles bajo condiciones específicas	<ul style="list-style-type: none"> • Los geles unen grandes cantidades de agua y componentes no proteicos • Mejoran las sensaciones en la boca. Ayudan en la lubricación y proporcionan la textura cremosa y suave de la grasa 	<ul style="list-style-type: none"> • Atractivo para los consumidores concienciados con la salud mediante la creación de productos bajos en grasa con el sabor de productos convencionales 	<ul style="list-style-type: none"> • Productos cárnicos y derivados del pescado • Productos lácteos, tales como quesos procesados y yogurt • Postres, como los flanes 	Todos los productos de suero
		<ul style="list-style-type: none"> • Proporcionan firmeza a través de interacciones proteína-gluten 	<ul style="list-style-type: none"> • Mejor textura y sabor 	<ul style="list-style-type: none"> • Pasta 	

IV. CONCLUSIONES

1. La realización de la clarificación de los subproductos de la elaboración de queso de oveja y *requeijão* (suero y *sorelho* respectivamente) por precipitación termocálcica seguida de microfiltración mejora significativamente el posterior tratamiento de ultrafiltración. Es más adecuado efectuar dicha clarificación empleando una membrana de 0,65 μm de diámetro de poro que una de 0,20 μm ya que presenta mayor flujo de microfiltración y menor retención proteica, permitiendo obtener concentrados de proteínas séricas (CPS) de mayor contenido proteico que aquéllos que proceden de subproductos sin clarificar.
2. El proceso de clarificación mejora la funcionalidad de los CPS obtenidos por ultrafiltración/diafiltración tanto de los derivados de suero como de *sorelho*. Así, incrementa su solubilidad, especialmente en los de *sorelho*, hace que presenten capacidad espumante, y disminuye la concentración necesaria para producir geles por calentamiento en los productos derivados de suero. Esto último no sucedió en los derivados de *sorelho* ya que no presentaron en ningún caso capacidad gelificante.
3. El proceso de clarificación genera como subproductos unos retenidos de microfiltración que presentan también interesantes propiedades funcionales como una solubilidad, capacidad emulsionante y gelificante comparables a los de los CPS sin clarificar. Es posible su aplicación en la elaboración de alimentos como el *requeijão*, donde, al igual que los CPS sin clarificar, aumentan el rendimiento de fabricación sin modificar la textura del producto. Por su diferente composición proteica, los CPS y los retenidos de microfiltración obtenidos de suero producen mayores rendimientos que los derivados de *sorelho*.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Affertsholt, T., Nielsen, W.K. (2003). Whey processing: market development. Walk this whey. *Dairy Industries International*, december, 31-32.
- Aguilera, J.M. (1995). Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 49, 83-89.
- Alfa Laval/Tetra Pak (1995). *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Anand, K., Brody, E., Ward, G., Landry, J. (1998). Custom denaturation of whey proteins: thermal effects. En *Whey*. IDF Special Issue 9804, 101-115.
- Anónimo (2000). World dairy situation: statistics. *Bulletin of the IDF*, 355, 40-48.
- Anónimo (2005a). Milk power technology: whey. GEA Niro A/S. Acceso el 28/06/2005 en http://www.niro.com/ndk_website/niro/cmsdoc.nsf/WebDoc/ndkw5y8gfkLibrary
- Anónimo (2005b). Whey protein concentrate. Invensys APV. Acceso el 7/07/2005 en <http://www.apv.com/us/eng/industryofferings/dairy/whey/wheyproteinconcentrate/Whey+Protein+Concentrate.htm>.
- Anónimo (2005c). Ceramic membranes. Lenntech Water treatment & air purification Holding B.V.. Acceso el 12/07/2005 en <http://www.lenntech.com/ceramic-membranes.htm>
- A.O.A.C. (1996a). Fat in dried milk. *Official methods of analysis*. 16th. Ed. Vol. II. Maryland, USA.
- A.O.A.C. (1996b). Phosphorus in dried milk: colorimetric procedure. *Official methods of analysis*. 16th. Ed. Vol. II. Maryland, USA.
- Aragoza, C.J., Arguello, M., Riera, F.A., Álvarez, R. (1996). Estandarización de un pretratamiento para la eliminación de fosfolípidos del lactosuero. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, Julio/Agosto, 45-50.
- Batchelder, B.T. (1999). Electrodialysis applications in whey processing. Ionics Technical Paper. Acceso el 12/07/2005 en www.ionics.com.
- Bauby, J.J., Gestin, L., Fauquant, J., Boyaval, E., Maubois, J.L. (1990). Technologies de purification des phospholipides du lactosérum. *Process*, 1047, 29-33.
- Bazinet, L. (2005). Electrodialytic phenomena and their applications in the dairy industry: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 307-326.
- Bech, A. M. (1981). The physical and chemical properties of whey proteins. *Dairy Industries International*, 46, 25, 27, 29, 31, 33.

- Belury, M.A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22, 505-531.
- Bird, J. (1996). The application of membrane systems in the dairy industry. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 49, 16-23.
- Bjorck, L. (1992). Lactoperoxidase. En P.F. Fox, *Advanced dairy chemistry - 1: Proteins* (pp.332-338). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Blecker, C., Paquot, M., Deroanne, C. (2000). Gelling properties of whey proteins after enzymic fat hydrolysis. *Journal of Food Science*, 65, 561-563.
- Blecker, C., Paquot, M., Lamberti, I., Sensidoni, A., Lognay, G., Deroanne, C. (1997). Improved emulsifying and foaming of whey proteins after enzymic fat hydrolysis. *Journal of Food Science*, 62, 48-52, 74.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, V.-P., Maubois, J.-L., Beaufre, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94, 14930-14935.
- Borderías, A.J., Montero, P. (1988). Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 28, 159-169.
- Bosselaers, I.E., Caessens, P.W., Van Boekel, M.A., Alink, G.M. (1994). Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 905-9.
- Boutin, R. (2004). An overview and new developments. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 12. Confectionery applications for whey and lactose products* (pp. 124-126). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Bouzas, J. (1999). Whey products and lactose in confectionery applications. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Boyd, L.C., Drye, N.C., Hansen, A.P. (1999). Isolation and characterization of whey phospholipids. *Journal of Dairy Science*, 82, 2550-2557.
- Boye, J. I., Alli, I., Ramaswamy, H., Raghavan, V. G. S. (1997). Interactive effects of factors affecting gelation of whey proteins. *Journal of Food Science*, 62, 57-65.

- Bramaud, C., Aymar, P., Daufin, G. (1997). Optimisation of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of α -lactalbumin. *Lait*, 77, 411-423.
- Brans, G., Schroën, 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.
- Brew, K., Grobler, J. A. (1992). α -Lactalbumin. En P.F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Vol. I: Proteins* (pp. 191-229). London: Elsevier Science Publishers.
- Britten, M., Pouliot, Y. (1996). Characterization of whey protein isolate obtained from milk microfiltration permeate. *Lait*, 76, 255-265.
- Brody, E.P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84 (suplemento 1), S39-S46.
- Bryant, C.M., McClements, D.J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 143-151.
- Burling, H. (2003). Whey processing. Demineralization. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 2745-2751). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Burrington, K. (1999). Whey products in baked foods. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Burrington, K.J. (2004a). An overview. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 11. Beverage applications for whey and lactose products* (pp. 116-117). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Burrington, K.J. (2004b). Functional properties of whey products. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 7. Functional properties of whey products* (pp. 81-84). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.

-
- Caccavo, D., Pellegrino, N.M., Altamura, M., Rigon, A., Amati, L., Amoroso, A., Jirillo, E. (2002) Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *Journal of Endotoxin Research*, 8, 403-417.
- Casper, J.L., Wendorff, W.L., Thomas, D.L. (1998). Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *Journal of Dairy Science*, 81, 3117-3122.
- 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.
- Castillo, M., Jordán, M.J., Abellán, A., Laencina, J., López, M.B. (1996). Tecnología de aprovechamiento del lactosuero. *Revista Española de Lechería*, marzo, 24-30.
- Cayot, P., Lorient, D. (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait. Paris : Tec & Doc Lavoisier.
- Cheryan, M. (1986). Ultrafiltration handbook. Lancaster: Technomic Publishing Co.
- Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and microfiltration handbook. Lancaster : Technomic Publishing Co.
- Chianese, L., Laezza, P., Nicolai, M.A., Garro, G., D'Auria, R., Iametti, S., Bonomi, F., Orban, E., Quaglia, G.B. (1996). Chemical composition and functional properties of ovine rennet whey and deproteinized whey. *Milchwissenschaft*, 51, 569-573.
- Christiansen, K.F., Vegarud, G., Langsrud, T., Ellekjaer, M.R., Egelandsdal, B. (2004). Hydrolyzed whey proteins as emulsifiers and stabilizers in high-pressure processed dressings. *Food Hydrocolloids*, 18, 757-767.
- Christie, W.W., Noble, R.C., Davies, G. (1987). Phospholipids in milk and dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42, 6-9.
- Cohen-Maurel, E. (1990). L'utilisation de la microfiltration tangentielle dans le traitement des liquides alimentaires. *Process*, 1054, 42-49.
- Comendador, F.J., Nardo, N., Bertone, A., Maurizi, A., Quaglia, G. (1996). Effetto dell'ultrafiltrazione sulle proprietà funzionali della scotta ovina. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 47, 103-112.

- Creamer, L.K., Sawyer, L. (2003). Beta-lactoglobulin. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1932-1939). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Cuperus, F.P., Nijhuis, H.H. (1993). Applications of membrane technology to food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 277-282.
- Dalgleish, D.G., Banks, J.M. (1991). The formation of complexes between serum proteins and fat globules during heating of whole milk. *Milchwissenschaft*, 46, 75-78.
- Dalgleish, D.G., Euston, S. E., Hunt, J.A., Dickinson, E. (1991). Competitive adsorption of β -lactoglobulin in mixed protein emulsions. En E. Dickinson, *Food polymers, gels and colloids* (pp. 485-489). London: Royal Society of Chemistry.
- Dalgleish, D.G. (2004). Food emulsions: their structures and properties. En S.E. Friberg, K. Larsson, J. Sjöblom, *Food emulsions* (pp. 1-44). New York: Marcel Dekker Inc.
- Damodaran, S. (1996). Functional properties. En S. Nakai, H.W. Modler, *Food proteins, properties and characterization* (pp. 167-234). New York: VCH Publishers Inc.
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70, R54-R66.
- Damodaran, S., Anand, K. (1997). Sulfhydryl-Disulfide Interchange-Induced Interparticle Protein Polymerization in Whey Protein-Stabilized Emulsions and Its Relation to Emulsion Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3813-3820.
- Danish Institute for Food and Veterinary Research (2005). Whey, sweet, fluid. Whey, acid, fluid. Danish Food Composition Databank. FCDB n° 0515. Department of Nutrition, DIFVR, www.foodcomp.dk.
- Daufin, G., Michel, F., Labbé, J.-P., Quémerais, A., Grangeon, A. (1993). Ultrafiltration of defatted whey : improving performance by limiting membrane fouling. *Journal of Dairy Research*, 60, 79-88.
- Daufin, G., Michel, F., Merin, U. (1992). Ultrafiltration of deffated whey : influence of some physicochemical characteristics. *Australian Journal of Dairy Technology*, 47, 1-13.
- De Boer, R., Hiddink, J. (1980). Membrane processes in the dairy industry. *Desalination*, 35, 169-192.

-
- De la Fuente, M.A., Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P.A., Singh, H. (2002). Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 12, 361-369.
- De Wit, J.N. (1984). Functional properties of whey proteins in food systems. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 38, 71-89.
- De Wit, J.N. (1989). The use of whey protein products. En P.F. Fox, *Developments in dairy chemistry-4. Functional milk proteins* (pp. 323-345). Barking: Elsevier Science Publishers.
- De Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81, 597-608.
- De Wit, J.N. (2003). Dairy ingredients in non-dairy foods. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 718-727). London: Academic Press (Elsevier Science).
- De Wit, J.N., de Boer, R. (1975). Ultrafiltration of cheese whey and some functional properties of the resulting whey protein concentrate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 29, 198-211.
- De Wit, J. N., Hontelez-Backx, E., Adamse, M. (1988). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 3. Functional properties in aqueous solution. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42, 155-172.
- De Wit, J.N., Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 2701-2710.
- De Wit, J.N., Klarenbeek, G., Adamse, M. (1986). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and composition. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 41-56.
- Deeth, H.C. (1997). The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52, 44-46.
- Díaz, O., Pereira, C. D., Cobos, A. (2004). Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products. *Food Hydrocolloids*, 18, 601-610.
- Díaz, O., Pereira, C. D., Cobos, A. (2005). Rheological properties and microstructure of heat-induced gels of ovine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. *Milchwissenschaft*. En prensa (aceptado).

- Dickinson, E., Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of beta-lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 26-30.
- Dickinson, E., Tanai, S. (1992). Protein displacement from the emulsion droplet surface by oil-soluble and water soluble surfactants. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 40, 179-183.
- Doi, E. (1991). Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 1-5.
- Doucet, D., Gauthier, S.E., Foegeding, E.A. (2001). Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66, 711-715.
- Eck, A. (1990). El queso. Barcelona : Omega.
- Fauquant, J., Maubois, J.L., Pierre, A. (1988). Microfiltration du lait sur membrane mineral. *Technique Laitière & Marketing*, 1028, 21-23.
- Fauquant, J., Vieco, E., Brulé, G., Maubois, J.-L. (1985). Clarification des lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matière grasse résiduelle. *Lait*, 65, 1-20.
- FIAB (Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas) (2001). Una aproximación a la industria española de la alimentación y bebidas. Septiembre de 2001. Madrid. <http://www.fiab.es/scripts/docs/Aproximación.pdf>
- Foegeding, E. A. (1989). Molecular properties and functionality of proteins in food gels. En J.E. Kinsella, W.G. Soucie, *Food Proteins* (pp. 185-194). Champaign: American Oil Chemists' Society.
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., McGuffey, M.K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 151-159.
- Foegeding, E. A., Gwartney, E. A., Errington, A. D. (1998). Functional properties of whey proteins in forming networks. En J. R. Whitaker, F. Shahidi, A. López Munguia, R. Y. Yada, G. Fuller, *Functional properties of proteins and lipids* (pp. 145-157). Washington: ACS Symposium Series.

- Foegeding, E.A., Luck, P.J. (2003). Milk proteins: Whey protein products. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1957-1960). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Foley, J., O'Connell, C. (1990). Comparative emulsifying properties of sodium caseinate and whey protein isolate in 18% oil in aqueous systems. *Journal of Dairy Research*, 57, 377-391.
- Fox, P.F., Flynn, A. (1992). Biological properties of milk proteins. En P.F. Fox, *Advanced dairy chemistry. Vol.1.Proteins* (pp. 255-284).
- Gerdes, S.K., Harper, W.J., Miller, G. (2001). Bioactive components of whey and cardiovascular health. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Gésan, G., Daufin, G., Merin, U., Labbe, J.P., Quemerais, A. (1995). Microfiltration performance : physicochemical aspects of whey pretreatment. *Journal of Dairy Research*, 62, 260-279.
- Gésan, G., Merin, U., Daufin, G., Maugas, J.J. (1993). Performance of an industrial cross-flow microfiltration plant for clarifying rennet whey. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 47, 121-135.
- Gezimati, J., Creamer, L.K., Singh, H. (1997). Heat-induced interactions and gelation of mixtures of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1130-1136.
- Girardet, J.M., Linden, G. (1996). PP3 component of bovine milk: a phosphorylated whey glycoprotein. *Journal of Dairy Research*, 63, 333-350.
- Glass, L., Hedrick, T.I. (1976). Nutritional composition of sweet and acid type dry wheys. I. Major factors including amino acids. *Journal of Dairy Science*, 60, 185-189.
- Glover, F.A. (1985). Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry. National Institute for Research in Dairying. Reading. England. Technical Bulletin no. 5, pp. 100-119.
- Gomes, D. (2000). A gestão de efluentes líquidos no sector de lacticínios. CESE em gestão e extensão agrárias. Seminário. IPC/ESAC. Coimbra, Portugal.
- González de Llano, D., Santa-María, G. (1997). Analysis of whey proteins during ripening of Afuega'l Pitu cheese by reversed phase HPLC. *Food Science and Technology International*, 3, 445-449.

- Grandison, A.S., Lewis, M.J. (1996). Separation processes – an overview. En A.S. Grandison and M.J. Lewis, *Separation processes in the food and biotechnology industries* (pp. 1-16). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Gulbenkian, M. (1993). The potentials for improvement of traditional sheep cheese production systems in Portugal. Doctoral thesis. Department of Agriculture and Horticulture. University of Reading. United Kingdom.
- Guzmán-González, M., Morais, F., Ramos, M., Amigo, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yogurt model system. 1: Use of whey protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1117-1122.
- Haggarty, N.W. (2003). Minor proteins, bovine serum albumin and vitamin-binding proteins. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1939-1946). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Halken, S., Host, A., Hansen, L.G., Osterballe, O. (1993). Safety of a new, ultrafiltrated whey hydrolysate formula in children whey cow milk allergy: a clinical investigation. *Pediatric Allergy and Immunology*, 4, 53-59.
- Halling, P.J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 155-203.
- Hambling, S. G., McAlpine, A. S., Sawyer, L. (1992). β -Lactoglobulin. En P.F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Vol. I: Proteins* (pp. 141-190). London: Elsevier Science Publishers.
- Hambraeus, L. (1992). Nutritional aspects of milk proteins. En P.F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Vol. I: Proteins* (pp. 457-490). London: Elsevier Science Publishers.
- Haroun, S.A., Ibrahim, A.H. (2003). Whey induced-modifications in growth, photosynthetic characteristics, protein patterns and water relations of wheat seedlings. *Biotechnology*, 2, 141-153.
- Harper, W.J. (1992). Lactose and lactose derivatives. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 317-360). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Harper, W.J. (2004). Biological properties of whey components. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 6. Nutritional properties of whey, lactose and milk minerals products* (pp. 58-61). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.

- Harper, W.J., Man Lee, K. (1998). Functional properties of 34% whey protein concentrate. En *Whey*. IDF Special Issue 9804, 140-153.
- Havea, P., Singh, H., Creamer, L.K. (2001). Characterization of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. *Journal of Dairy Research*, 68, 483-497.
- Hawks, S.E., Phillips, L.G., Rasmussen, R.R., Barbano, D.M., Kinsella, J.E. (1990). Effect of processing treatment and cheese-making parameters on foaming properties of whey protein isolates. *Journal of Dairy Science*, 76, 2468-2477.
- Hawng, D.-C., Damodaran, S. (1995). Selective precipitation and removal of lipids from cheese whey using chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 33-37.
- Hiddink, J., De Boer, R., Nooy, P.F.C. (1981). Effect of various pre-treatments on the ultrafiltration of sweet cheese whey at about 55°C. *Milchwissenschaft*, 36, 657-663.
- Hill, S.E. (1996). Emulsions. En G.M. Hall, *Methods of testing protein functionality* (pp. 152-185). London: Chapman & Hall.
- Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11, 495-503.
- Hobman, P.G. (1992). Ultrafiltration and manufacture of whey protein concentrates. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 195-230). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Houlihan, A.V., Goddard, P.A., Nottigham, S.M., Kitchen, B.J., Masters, C.J. (1992). Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating whole milk. *Journal of Dairy Research*, 59, 187-195.
- Hongsprabhas, P., Barbut, S. (1999). Effect of pre-heated whey protein level and salt on texture development of poultry meat batters. *Food Research International*, 32, 145-149.
- Hsu, C.K., Kolbe, E. (1996). The market potential of whey protein concentrate as a functional ingredient in surimi seafoods. *Journal of Dairy Science*, 79, 2146-2151.
- Huang, W. L., Catignani, G. L., Swaisgood, H. E. (1999). Modification of rheological properties of whey protein isolates by limited proteolysis. *Nahrung*, 43, 79-85.
- Huffman, L.M., Harper, W.J. (1999). Maximizing the value of milk through separation technologies. *Journal of Dairy Science*, 82, 2238-2244.

- Hugunin, A. (1999). Whey products in yogurt and fermented dairy products. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Hung, S.C., Zayas, J.F. (1992). Protein solubility, water retention and fat binding of corn germ protein flour compared to milk proteins. *Journal of Food Science*, 57, 372-376, 384.
- Hvidt, A., Westh, P. (1992). Stabilization and destabilization of protein conformations. En H. Visser, *Protein interactions* (pp. 327-343). New York: VCH Publishers.
- Hwang, D.C., Damodaran, S. (1995). Selective precipitation and removal of lipids from cheese whey using chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 33-37.
- Idolo-Imafidon, G., Farkye, N.Y., Spanier, A.M. (1997). Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 663-689.
- Jameson, G.W., Lelievre, J. (1996). Effects of whey proteins on cheese characteristics. *Bulletin of the IDF*, 313, 3-8.
- Jelen, P. (1992a). Whey: composition, properties, processing and uses. En Y.H. Hui, *Encyclopedia of food science and technology* (pp. 2835-2845). New York: John Wiley & Sons (Wiley-Interscience Publication).
- Jelen, P. (1992b). Whey cheeses and beverages. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 157-193). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Jelen, P. (1998). Use of whey permeates for protein standardization of milk. En *Whey*. IDF Special Issue 9804, 227-232.
- Jelen, P. (2003). Whey processing: Utilization and products. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 2739-2745). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Jelen, P., Buchheim, W., Peters, K.-H. (1987). Heat stability and use of milk with modified casein: whey protein content in yoghurt and cultured milk products. *Milchwissenschaft*, 42, 418-421.
- Johnson, B. (2000a). U.S. whey products in snacks and seasonings. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.

- Johnson, B.R. (2000b). Whey protein concentrates in low-fat applications. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Jones, S.B., Robbins, C.W., Hansen, C.L. (1993). Sodic soil reclamation using cottage cheese (acid) whey. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 7, 51-61.
- Joseph, M.S.B., Mangino, M.E. (1988a). Contribution of milk fat globule membrane proteins to the effective hydrophobicity of whey protein concentrates. *Australian Journal of Dairy Technology*, 43, 6-8.
- Joseph, M.S.B., Mangino, M.E. (1988b). The effect of milk fat globule membrane on the foaming and gelation properties of β -Lactoglobulin solutions and whey protein concentrates. *Australian Journal of Dairy Technology*, 43, 9-11.
- Jovaní, M., Barberá, R., Farré, R. (2001). Lactoferrin and its possible role in iron enrichment of infant formulas. *Food Science and Technology International*, 7, 97-103.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F.I., Morr, C.V. (1995a). Chemical pre-treatment and microfiltration for making delipidized whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 60, 221-227.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F.I., Morr, C.V. (1995b). Gelation properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 60, 731-737.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F.I., Morr, C.V. (1995c). Foaming properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 60, 738-741.
- Karleskind, D., Laye, I., Mei, F.I., Morr, C.V., Schenz, T.W. (1996). Emulsifying properties of lipid-reduced and calcium-reduced whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 61, 54-58.
- Karman, A.H., Van Boekel, M.A.J.S. (1986). Evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 315-336.
- Keenan, T.W., Dylewski, D.P. (1995). Intracellular origin of milk lipid globules and the nature and structure of the milk lipid globule membrane. En P.F. Fox, *Advanced dairy chemistry. Vol. 2: lipids* (pp.89-130). London: Chapman & Hall.

- Keaton, J. (1999). Whey protein and lactose products in processed meats. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Keenan, W., Patton, D. (1995). The milk lipid globule membrane. En R.G. Jensen, *Handbook of milk composition*. London: Academic Press.
- Keeton, J. (2004). Whey protein and lactose products in processed meats. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 14. Processed meat and fish applications for whey and lactose products* (pp. 171-174). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Kelly, P.M. (2003). Membrane separation. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1777-1786). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Kessler, H.G. (1997). Engineering aspects of currently available technological processes. *Bulletin of the IDF*, 320, 16-25.
- Khwaldia, K., Pérez, C., Banon, S., Desobry, S., Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 239-251.
- Kiesner, C.H.R., Clawin-Radecker, I., Meisel, H., Buchheim, W. (2000). Manufacturing of α -lactalbumin-enriched whey systems by selective thermal treatment in combination with membrane processes. *Lait*, 80, 99-111.
- Kilara, A. (1984). Standardization of methodology for evaluating whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 2734-2744.
- Kilara, A., Vaghela, M.N. (2004). Whey proteins. En R.Y. Yada, *Proteins in food processing* (pp. 72-99). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Kim, Y.A., Chism, G.W. III, Mangino, M.E. (1987). Determination of the beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin of whey protein concentrates and their relationship to protein functionality. *Journal of Food Science*, 52, 124-127.
- Kim, S-H., Morr, C.V., Seo, A., Surak, J.G. (1989). Effect of whey pre-treatment on composition and functional properties of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 54, 25-29.
- Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of food proteins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219-280.

- Kinsella, J. E. (1984). Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21, 197-262.
- Kinsella, E., Whitehead, D.M. (1989). Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, 343-438.
- Kitabatake, N., Doi, E. (1993). Improvement of protein gel by physical and enzymatic treatment. *Food Reviews International*, 9, 445-471.
- Klemaszewski, J.L., Das, K.P., Kinsella, J.E. (1992). Formation and coalescence stability of emulsions established by different milk proteins. *Journal of Food Science*, 57, 366-379.
- Korhonen, H., Marnila, P. (2003). Lactoferrin. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1946-1950). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Kreider, B., Lloyd, B. (2004). Whey proteins and seniors nutrition. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Krochta, J.M., Foegeding, A. (2004). Whey products, edible films and coatings. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 15. Processed foods and snack applications for whey and lactose products* (p. 193). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Kurt, S., Zorba, O. (2005). The effects of different levels of non-fat dry milk and whey powder on emulsion capacity and stability of beef, turkey and chicken meats. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 509-516.
- Lagrange, V., Pasin, G. (2004). Whey proteins in dairy-based drinks. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 11. Beverage applications for whey and lactose products* (pp. 118-120). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Landmark, A. (1999). Soil degradation and the use of agricultural and organic industrial by products as soil amendments. Acceso el 28/06/2005 en: <http://horticulture.coafes.umn.edu/vd/h5015/99fpapers/landmark.htm>
- Langley, K.R., Green, M.L. (1989). Compression and impact strength of gels, prepared from fractionated whey proteins, in relation to composition and microstructure. *Journal of Dairy Research*, 56, 275-284.

- Lawrence, R.J. (1993). Incorporation of whey proteins in cheese. En *Factors affecting the yield of cheese*. IDF Special Issue 9301, 79-87.
- Lee, D.N., Merson, R.L. (1975). Examination of Cottage cheese whey proteins by scanning electron microscopy: relationship to membrane fouling during ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 58, 1423-1432.
- Lee, D.N., Merson, R.L. (1976). Prefiltration of cottage cheese whey to reduce fouling of ultrafiltration membranes. *Journal of Food Science*, 41, 403-410.
- Lee, K.-M. (2004). Whey, lactose and their derivatives in nutritional and sports food products. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 16. Nutritional products applications for whey products* (p. 205). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Lee, S.-Y., Morr, C.V., Ha, E.Y.W. (1992). Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. *Journal of Food Science*, 57, 1210-1213, 1229.
- Lehrsch, G.A., Robbins, C.W., Hansen, C.L. (1994). Cottage cheese (acid) whey effects on sodic soil aggregate stability. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 8, 19-31.
- Lewis, M.J. (1996). Ultrafiltration. En A.S. Grandison and M.J. Lewis, *Separation processes in the food and biotechnology industries* (pp. 97-139). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Liao, S.Y., Mangino, M.E. (1987). Characterization of the composition, physicochemical and functional properties of acid whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 52, 1033-1037.
- Li-Chan, E. (1983). Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 48, 47-56.
- Lloyd, B. (2002). U.S. whey products and child nutrition. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Lloyd, B. (2004). Whey products in infant formula/child nutrition. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 16. Nutritional products applications for whey products* (pp. 202-204). Acceso el 6/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/manuals.cfm>.

-
- Lorient, D., Closs, B., Courthaudon, J.L. (1991). Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés. *Lait*, 71, 141-171.
- Lucey, J.A., Gorry, C. (1994). Effect of Simplesse 100 on the manufacture of low fat Cheddar cheese. En *Cheese yield & factors affecting its control*. IDF Special Issue 9402, 439-447.
- Lucey, J.A., Munro, P.A., Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9, 275-279.
- Lupano, C.E., Dumay, E., Cheftel, J.C. (1992). Gelling properties of whey protein isolate: influence of calcium removal by dialysis or diafiltration at acid or neutral pH. *International Journal of Food Science and Technology*, 27, 615-628.
- Malcata, F.X. (1999). Critical issues affecting the future of dairy industry: individual contributions in the scope of a global approach. *Journal of Dairy Science*, 82, 1595-1611.
- Mangino, M.E. (1992). Properties of whey protein concentrates. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 231-270). London: Elsevier Science Publishers.
- Mangino, M.E. (1999). Whey protein concentrate usage in low fat meat. Extraordinary dairy technology fact sheet. Dairy Management Inc. Acceso el 15/07/2005 en http://www.extraordinarydairy.com/archive/fs_lowfat_meat.pdf.
- Mangino, M.E. (2003). Whey protein concentrates. Food Tecnology Courses. Ohio University. Acceso el 14/07/2005 en <http://class.fst.ohiostate.edu/FST822/lectures/WPC.pdf>.
- Mangino, M.E., Huffman, L.M., Regester, G.O. (1988). Changes in the hydrophobicity and functionality of whey during the processing of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 53, 1684-1686, 1693.
- Mangino, M.E., Liao, Y.Y., Harper, N.J., Morr, C.V., Zadow, J.G. (1987). The effects of heating during processing on the functionality of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 52, 1522-1524.
- Marnila, P., Korhonen, H. (2003). Immunoglobulins. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1950-1956). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Marshall, A.D., Daufin, G. (1995). Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairy fluids. En *Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes*. IDF Special Issue 9504, 8-35.

-
- Marshall, S.C. (1982). Studies on an inexpensive ultrafiltration system. *XXI International Dairy Congress*, 1, p. 461.
- Martínez-Hermosilla, A., Hulbert, G.J., Liao, W.C. (2000). Effect of cottage cheese whey pretreatment and 2-phase crossflow microfiltration/ultrafiltration on permeate flux and composition. *Journal of Food Science*, 65, 334-339.
- Mathur, B.N., Shahani, K.M. (1981). Ricotta cheese could be the best vehicle for whey. *Dairy Field*, 164, 110-112, 114.
- Maubois, J.L. (1984). Separation, extraction and fractionation of milk protein components. *Lait*, 64, 485-495.
- Maubois, J.L. (1997). Current uses and future perspectives of MF technology in the dairy industry. *Bulletin of the IDF*, 320, 37-40.
- Maubois, J.L., Ollivier, G. (1991). Milk protein fractionation. En *New applications of membrane processes*. IDF Special Issue 9201, 15-22.
- Maubois, J.L., Pierre, A., Fauquant, J., Piot, M. (1987). Industrial fractionation of main whey proteins. *Bulletin of the IDF*, 212, 154-159.
- McIntosh, G.H., Royle, P.J., Le Leu, R.K., Regester, G.O., Johnson, M.A., Grinsted, R.L., Kenward, R.S., Smithers, G.W. (1998). Whey proteins as functional ingredients?. *International Dairy Journal*, 8, 425-434.
- McPherson, A.V., Kitchen, B.J. (1983). Reviews of the progress of Dairy Science: The bovine milk fat globule membrane – its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. *Journal of Dairy Research*, 50, 107-133.
- McSwiney, M., Singh, H., Campanella, O. (1994). Thermal aggregation and gelation of bovine β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 8, 441-453.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8, 363-373.
- Melachouris, N. (1977). Process for recovery of whey protein having improved solution dairy using polyphosphates. US Patent 4: 43-990.
- Merin, U., Cheryan, M. (1980). Factors affecting the mechanism of flux decline during ultrafiltration of cottage cheese whey. *Journal of Food Process and Preservation*, 4, 183-198.

- Mistry, V.V., Maubois, J.L. (1993). Application of membrane separation technology to cheese production. En P.F. Fox, *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. I: General aspects* (pp. 493-522). London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Modler, H.W., Kalab, M. (1983). Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 430-437.
- Morr, C.V. (1979). Functionality of whey protein products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 14, 185-194.
- Morr, C.V. (1987a). Effect of HTST pasteurization of milk, cheese whey and cheese whey UF retentate upon the composition, physicochemical and functional properties of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 52, 312-317.
- Morr, C. V. (1987b). Fractionation and modification of whey protein in the U.S. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 212, 145-149.
- Morr, C.V. (1989). Beneficial and adverse effects of water-protein interactions in selected dairy products. *Journal of Dairy Science*, 72, 575-580.
- Morr, C.V. (1992). Whey utilization. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 133-155). London: Elsevier Science Publishers.
- Morr, C.V., Foegeding, E.A. (1990) Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, 44, 100-112.
- 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.
- Morr, C.V., Ha, E.Y.W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431-476.
- Morris, H.A., Ghaleb, H.M., Smith, D.E., Bastian, E.D. (1995). A comparison of yoghurts fortified whey nonfat dry milk and whey protein concentrates. *Cultured Dairy Products Journal*, 30, 2-4, 31.
- Mulder, M. (1991). *Basic principles of membrane technology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Muller, L.L., Harper, W.J. (1979). Effects on membrane processing of pretreatments of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 862-864.

- Mulvihill, D.M. (1992). Production, functional properties and utilization of milk protein products. En P.F. Fox, *Advanced Dairy Chemistry, Vol I: Proteins* (pp. 369-404). London: Elsevier Science Publishers.
- Mulvihill, D.M., Kinsella, E. (1987). Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. *Food Technology*, 41, 102-111.
- Mulvihill, D.M., Kinsella, E. (1988). Gelation of β -lactoglobulin: effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of the gels. *Journal of Food Science*, 53, 231-236.
- O'Connor, D.L., Masor, M.L., Paule, C., Benson, J. (1997). Amino acid composition of cow's milk and human requirements. En R.A.S. Welch, D.J.W. Burns, S.R. Davis, A.I. Popay, C.G. Prosser, *Milk composition, production and biotechnology* (pp. 203-213). Cambridge: University Press.
- Odelram, H., Vanto, T., Jacobsen, L., Kjellman, N.I. (1996). Whey hydrolysate compared with cow's milk-based formula for weaning at about 6 months of age in high allergy-risk infants: effects on atopic disease and sensitization. *Allergy*, 51, 192-195.
- Pal, D. (1993). Membrane techniques. Principles of ultrafiltration. En R. Macrae, R. Robinson and M. Sadler, *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition* (pp. 2975-2980). Orlando: Academic Press.
- Parris, N., Baginski, M.A. (1991). A rapid method for the determination of whey protein denaturation. *Journal of Dairy Science*, 74, 58-64.
- Pasin, G., Miller, S.L. (2000). U.S. Whey products and sports nutrition. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Patel, M.T., Kilara, A. (1990). Studies on whey protein concentrates – 2: Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. *Journal of Dairy Science*, 73, 2731-2740.
- Patel, P.D., Stripp, A.M., Fry, J.C. (1988). Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. *International Journal of Food Science and Technology*, 23, 57-63.

-
- Patton, S., Keenan, T.W. (1971). Relation of milk phospholipids to membranes of the secretory cell. *Lipids*, 6, 58-61.
- Paulsson, M., Hegg, P.-O., Casteberg, H.B. (1986). Heat induced gelation of individual whey proteins. A dynamic rheological study. *Journal of Food Science*, 51, 87-90.
- Pearce, K.N., Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716-723.
- Pearce, R.J. (1992). Whey protein recovery and whey protein fractionation. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 271-316). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Pearce, R.J., Dunkerley, J.A., Wheaton, T.W., Marshall, S.C., Tobin, A. (1998). A solid fat replacer for manufactured meat products based on a β -lactoglobulin-rich whey protein ingredient. En *Whey*. IDF Special Issue 9804, 181-188.
- Pearce, R.J., Marshall, S.C., Dunkerley, J.A. (1991). Reduction of lipids in whey protein concentrates – effect on functional properties. En *New applications of membrane processes*. IDF Special Issue 9201, 118-129.
- Pelegri, D.H.G., Gasparetto, C.A. (2005). Whey protein solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 77-80.
- Pereira, C.D., Díaz, O., Cobos, A. (2002). Valorization of by-products from ovine cheese manufacture: clarification by thermocalcic precipitation/microfiltration before ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 12, 773-783.
- Philippopoulos, C.D., Papadakis, M.R. (2001). Current trends in whey processing and utilization in Greece. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 14-19.
- Phillips, L.G., Schulman, W., Kinsella, J.E. (1990). pH and heat treatment effects on foaming of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 55, 1116-1119.
- Phillips, L.G., Whitehead, D.M., Kinsella, J. (1994). Structure-function properties of food proteins. San Diego: Academic Press.
- Phillips, L.G., Yang, S.T., Kinsella, J.E. (1991). Neutral salt effects on stability of whey protein isolate foams. *Journal of Food Science*, 56, 588-589.
- Pierre, A., Le Graet, Y., Daufin, G., Michel, F., Gésan, G. (1994). Whey microfiltration performance : influence of protein concentration by ultrafiltration and of physicochemical treatment. *Lait*, 74, 65-77.

- Pierre, A., Le Graet, Y., Fauquant, J., Piot, M., Durier, C., Kobilinsky, A. (1993). Evaluation du rôle des facteurs physico-chimiques dans la clarification du lactosérum. *Lait*, 72, 405-420.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins : opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 347-356.
- Pintado, M.E., Lopes da Silva, J.A., Malcata, F.X. (1996). Characterization of Requeijão and technological optimization of its manufacturing process. *Journal of Food Engineering*, 30, 363-376.
- Pintado, M.E., Lopes da Silva, J.A., Malcata, F.X. (1999). Comparative characterization of whey protein concentrates from ovine, caprine and bovine breeds. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 32, 231-237.
- Pintado, M.E., Macedo, A.C., Malcata, F.X. (2001). Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 7, 105-116.
- Pintado, M.E., Malcata, F.X. (1999). Estudos descritivos e tecnológicos sobre Requeijão: caracterização e conservação. *Boletim de Biotecnologia*, 62, 19-26.
- Písecký, J. (2004). Spray drying in the cheese industry. IDF Symposium on cheese: Ripening, characterization & technology. 21-25 marzo. Praga. Acceso el 6/07/05 en: www.niro.com/ndk-website/niro/cmsresources.nsf.
- Pizzichini, M., Zeddita, G., Comendador, F.J., Bertone, A., Maurizi, A., Nardo, N., Quaglia, G. (1995). Recupero di sieroproteine e acqua depurata dalla scotta ovina con tecnologie di membrana. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 46, 361-379.
- Pouliot, Y., Jelen, P. (1995). Pretreatments of dairy fluids to minimize long-term membrane fouling. En *Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes*. IDF Special Issue 9504, 80-92.
- Prasad, B.K., Kumar, M., Kumar, R., Kumar, S.K., Kumar, V., Diwakar, A.P., Singh, K.R., Prasad, U. (2000). Effect of domestic wastes on the germination of maize and cowpea seeds. *Journal of Phytology Research*, 13: 191-194.
- Puvanenthiran, A., Williams, R.P.W., Augustin, M.A. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 12, 383-391.

- Qi, X.L., Holt, C., McNulty, D., Carke, D.T., Brownlow, S., Jones, G.R. (1997). Effect of temperature on the secondary structure of β -lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochemical Journal*, 324, 341-346.
- Radford, J.B., Galpin, D.B., Parkin, M.F. (1986). Utilization of whey as a fertilizer replacement for dairy pasture. *New Zealand Journal of Dairy Technology*, 21, 65-72
- Ramos, M., Juárez, M. (2003). Sheep milk. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 2539-2545). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Reif, G.D., Shahani, K.M., Vakil, J.R., Crowe, L.K. (1976). Factors affecting B-complex vitamin content of Cottage cheese. *Journal of Dairy Science*, 59, 410-415,
- Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I., Tissier, J.P. (2003). Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *International Dairy Journal*, 13, 773-782.
- Renner, E. (1992). Nutritional aspects. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 449-471). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Renner, E., Abd El-Salam, M.H. (1991). Applications of ultrafiltration in the dairy industry. London: Elsevier Applied Science.
- Riera, F.A., Álvarez, R., Argüello, M.A., Cabero, M. (1996a). Fraccionamiento y aprovechamiento de proteínas del suero lácteo. I. Propiedades físico-químicas y biológicas de las proteínas. *ILE*, abril 1996, 49-61.
- Riera, F.A., Álvarez, R., Argüello, M.A., Cabero, M. (1996b). Fraccionamiento y aprovechamiento de proteínas del suero lácteo. II. Métodos de fraccionamiento mediante tecnologías con membranas. *ILE*, junio 1996, 33-44.
- Rinn, J.-C., Morr, C.V., Seo, A., Surak, J.G. (1990). Evaluation of nine semi-pilot scale whey pre-treatment modifications for producing whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 55, 511-515.
- Robin, O., Turgeon, S., Paquin, P. (1993). Functional properties of milk proteins. En Y.H. Hui, *Dairy science and technology handbook. Vol. 1. Principles and properties* (pp. 277-353). New York: VCH Publishers Inc.

- Rodrigues, R.C., Cabral de Almeida, J.L., Pereira, C.D., Gomes, D.S., Madanelo, J.P., Oliveira, M.J., Fonseca, M.L. (2000). Queijo Serra da Estrela. Processos tradicionais e inovações tecnológicas. Cadernos de divulgação. DRABL. Coimbra, Portugal.
- Rodríguez, F., Aguado, J., Calles, J.A., Cañizares, P., López, B., Santos, A., Serrano, D. (2002). Ingeniería de la industria alimentaria. Vol. II: Operaciones de procesado de alimentos. Madrid: Síntesis.
- Rosenberg, M. (1995). Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 12-19.
- Saboya, L.V., Maubois, J.L. (2000). Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Lait*, 80, 541-553.
- Sandblom, R.M. (1974). Filtering process. Swedish Patent n. 7416257.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Vernon-Carter, E.J. (2004). Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 151-159.
- Santoro, M., Faccia, M. (1996). Degradation of the protein fraction in a cheese fortified with whey proteins. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 61-68.
- Schanbacher, F.L., Talhouk, R.S., Murray, F.A., Gherman, L.I., Willett, L.B. (1998). Milk-borne bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 8, 393-403.
- Schmidt, R.H., Morris, H.A. (1984). Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems. *Food Technology*, 38, 85-96.
- Schmidt, R.H., Packard, V.S., Morris, H.A. (1984). Effect of processing on whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67, 2723-2733.
- Schmidt, R.H., Smith, D.E., Packard, V.S., Morris, H.A. (1986). Compositional and selected functional properties of whey protein concentrates and lactose-hydrolyzed whey protein concentrates. *Journal of Food Protection*, 49, 192-195.
- Schokker, E.P., Singh, H., Creamer, L.K. (2000). Heat induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 10, 843-853.
- Shimada, K., Cheftel, J. C. (1989). Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat induced gelation of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 161-168.

- Singh, H. (2003). Functional properties. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1976-1982). London: Academic Press (Elsevier Science).
- Singh, R.P., Heldman, D.R. (2001). *Introduction to food engineering*. London: Academic Press.
- Smith, K. (2004). Production technologies. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 3. Production technologies* (pp. 20-26). Acceso el 6/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/manuals.cfm>.
- Smithers, G.W., Ballard, F.J., Copeland, A.D., de Silva, K.J., Dionysius, D.A., Francis, G.L., Goddard, C., Grieve, P.A., Graeme, H.M., Mitchel, I.R., Pearce, R.J., Register, G.O. (1996). New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 79, 1454-1459.
- Sternberg, M., Chiang, J. P., Eberts, N. J. (1976). Cheese whey proteins isolated with polyacrylic acid. *Journal of Dairy Science*, 59, 1042-1050.
- Steventon, A.J., Gladden, L.F., Fryer, P.J. (1991). A percolation analysis of the concentration dependence of the gelation of whey protein concentrates. *Journal of Texture Studies*, 22, 201-218.
- Strouts, B. (2004). An overview and latest developments. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 10. Bakery applications for whey and lactose products* (pp. 98-99). Acceso el 6/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/manuals.cfm>.
- Swaigood, H.E. (1982). Chemistry of milk proteins. En P.F. Fox, *Developments in dairy chemistry.1. Proteins* (pp. 63-110). London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Swaigood, H.E. (1996). Characteristics of milk. En O. Fennema, *Food chemistry*, 3ª ed. (pp. 842-878). New York: Marcel Dekker Inc.
- Tang, Q., McCarthy, O.J., Munro, P.A. (1995). Oscillatory rheological study of the effects of pH and salts on gel development in heated whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 62, 469-477.
- Thivend, P. (1978). Use of whey in feeding ruminants. FAO Animal Production and Health Paper 12. Acceso el 28/06/2005 en: <http://www.fao.org/DOCREP/004/X6512E/X6512E09.htm>

- Timmer, J.M.K., Van der Horst, H.C. (1998). Whey processing and separation technology: state-of-the-art and new developments. En *Whey*. IDF Special Issue 9804, 40-65.
- Tomé, D., Debabbi, H. (1998). Physiological effects of milk protein components. *International Dairy Journal*, 8, 383-392.
- Tong, L.M., Sasaki, S., McClements, D.J., Decker, E.A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1473-1478.
- Tong, P.S. (2004). Lactose and other whey products in protein standardization of milk. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 13. Dairy applications for whey and lactose products* (pp. 161-162). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Tornberg, E., Hermansson, A.M. (1977). Functional characterization of protein stabilized emulsions: effect of processing. *Journal of Food Science*, 42, 468-472.
- Trouvé, E., Maubois, J.L., Piot, M., Madec, M.N., Fauquant, J., Rouault, A., Tabard, J., Brinkman, G. (1991). Rétention de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangential. *Lait*, 71, 1-13.
- Tsuda, H., Sekine, K., Fujita, K.-I., Iigo, M. (2002). Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms - a review of experimental and clinical studies. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 131-136.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2004). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 17. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.
- U.S.D.E.C. (United States Dairy Export Council) (2004a). Whey products definition, composition, functions. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 4* (pp. 27-40). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- U.S.D.E.C. (United States Dairy Export Council) (2004b). Lactose products definition, composition, functions. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 5* (pp. 41-48). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.

- U.S.D.E.C. (United States Dairy Export Council) (2004c). Quick guide to whey and lactose products. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 9* (pp. 89-96). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Vaghela, M., Kilara, A. (1996a). Foaming and emulsifying properties of whey protein concentrates as affected by lipid composition. *Journal of Food Science*, 61, 275-280.
- Vaghela, M., Kilara, A. (1996b). Lipid composition of whey protein concentrates manufactured commercially and in the laboratory. *Journal of Dairy Science*, 79, 1172-1183.
- Van Boekel, M.A.J.S., Walstra, P. (1995). Effect of heat treatment on chemical and physical changes to milkfat globules. *IDF Special Issue*, 9501, 51-65.
- Van der Horst, H.C. (1995). Fouling of organic membranes during processing of dairy liquids. En *Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes*. IDF Special Issue 9504, 36-52.
- Vardhanabhuti, B., Foegeding, E. A., McGuffey, M. K., Daubert, C. R., Swaisgood, H. E. (2001). Gelation properties of dispersions containing polymerized and native whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 15, 165-175.
- Varunsatian, S., Watanbe, K., Hayakawa, S., Nakamura, R.(1983). Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^{+} on heat aggregation of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 48, 42-46,70.
- Verheul, M., Roefs, S. P. F. M. (1998). Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*, 12, 17-24.
- Vesper, H., Schmelz, E.-M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., Merrill, A.H. (1999). Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *Journal of Nutrition*, 129, 1239-1250.
- Vojdani, F. (1996). Solubility. En G.M. Hall, *Methods of testing protein functionality* (pp. 11-60). London: Chapman & Hall.
- Vreeker, R., Hoekstra, L.L., den Boer, D.C., Agterof, W.G.M. (1992). Fractal aggregation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 6, 423-435.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia.
- Walstra, P., Jenness, P. (1987). *Química y física lactológica*. Zaragoza: Acribia.

- Walzem, R.L. (2004). Nutritional properties of whey products. En J. Page, D. Meyer, B. Haines, V. Lagrange, A. Kenney, *Reference manual for U.S. whey and lactose products. Chapter 6. Nutritional properties of whey, lactose and milk minerals products* (pp. 53-57). Acceso el 6/07/2005 en www.usdec.org/publications/manuals.cfm.
- Walzem, R.L., Dillard, C.J., German, J.B. (2002). Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 353-375.
- Wasen, I., Lehmann, H. (1989). Procédé de déphospholipidation du petit-lait. Westfalia Separators. Brevet Fr. 2 625 649 A1.
- Wong, C. W., Seow, H. F., Husband, A. J., Regester, G. O., Watson, D. L. (1997). Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 56, 85-96.
- Yamanchi, F. (1980). Science of food proteins. Structure and role of soybean proteins. *New Food Industry*, 22, 26-44.
- Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W., Anema, S. (2002). Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, 12, 393-402.
- Young, S. (1999a). Whey products in cold pack and pasteurized processed cheese foods and cheese spreads. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Young, S. (1999b). Whey products in ice cream and frozen desserts. Applications monograph. U.S. Dairy Export Council. Arlington, U.S.A. Acceso el 14/07/2005 en <http://www.usdec.org/publications/monographs.cfm>.
- Zadow, J.G. (1992). Lactose hydrolysis. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 361-408). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Zall, R.R. (1992). Sources and composition of whey and permeate. En J.G. Zadow, *Whey and lactose processing* (pp. 1-72). Barking: Elsevier Science Publishers.
- Zayas, J.F. (1997). *Funcionalidad de proteínas en alimentos*. Berlin: Springer-Verlag.
- Zhang, Y., Brew, K. (2003). Alpha-lactalbumin. En H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox, *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1924-1932). London: Academic Press (Elsevier Science).

Zhu, H., Damodaran, S. (1994). Effects of calcium and magnesium ions on aggregation of whey protein isolate and its effect on foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 856-862.

Zydney, A.L. (1998). Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. *International Dairy Journal*, 8, 243-250.