

# Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el “monitoreo” *online* del proceso. Avances en la Argentina

SBODIO, O.A.<sup>1</sup>; REVELLI, G.R.<sup>2</sup>

## RESUMEN

La coagulación enzimática de la leche es una etapa fundamental en la elaboración de queso. Su control *online* tiene por objeto la determinación del tiempo de coagulación, la velocidad de crecimiento de la firmeza y el apropiado tiempo de corte de la cuajada. El tratamiento térmico de la leche permite incorporar al queso proteínas del suero para incrementar su valor biológico y su rendimiento. También, numerosas investigaciones reportan el agregado de Proteínas de Suero en Polvo (WPC) en la elaboración de distintos tipos de quesos. Tratamientos diversos de las proteínas del suero son utilizados para alimentos ricos en almidones. El desarrollo de un dispositivo que cumpla con los requerimientos de fortaleza, higiene en el lugar, que no impida las operaciones de corte y agitación y que no sea destructivo, será una herramienta importante en el estudio de los efectos de las variables críticas, el control de la elaboración de queso y yogurt, y en el desarrollo de nuevos productos. Una revisión histórica muestra que desde hace varias décadas los investigadores se preocupan por obtener dispositivos basados en diferentes métodos. En la Argentina, se reportan experiencias con utilización del principio del alambre caliente. En la actualidad, se construye un dispositivo innovador que puede ser aplicado en el desarrollo de nuevos productos y en tina quesera industrial.

**Palabras clave:** leche, coagulación, enzimas, control, queso.

## ABSTRACT

*The enzymatic coagulation of the milk is a fundamental phase in the elaboration of cheese. Its control online considers object the decision of the time of coagulation, the velocity of growth of the firmness and the appropriate cutting time of the curd. The heat treatment of the milk permits to incorporate to the cheese proteins of the serum, increasing its biological value and its performance. Also, numerous investigations report the aggregate of Whey Protein Concentrate (WPC) in the elaboration of different types of cheeses. Diverse processing of the proteins of the serum are utilized for food rich in starches. The development of a device that comply with the requests of robustness, clean in place, that do not impede the operations of cut and agitation and that are not destructive will be an important tool in the study of the effects of the critical variables, the control of*

<sup>1</sup>Instituto de Tecnología de Alimentos (I.T.A.), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, 1.º de Mayo 3250, Santa Fe, Argentina. Correo electrónico: sbodio@fiq.unl.edu.ar.

<sup>2</sup>Laboratorio Integral de Servicios Analíticos (L.I.S.A.), Cooperativa Tampera y Agropecuaria Nueva Alpina Ltda., S2340ALB Ceres, Santa Fe, Argentina.

Recibido el 02 de febrero de 2012// Aceptado el 10 de julio de 2012// Publicado el 22 de agosto de 2012

*the elaboration of cheese and yoghurt, and in the development of new products. A historic review shows that for several decades the investigators worry about obtaining devices based on different methods. In Argentina, experiences utilizing the principle of the hot wire are reported. Currently, an innovative device is built that can be applied in the development of new products and in the cheese industry.*

**Keywords:** milk, coagulation, enzymes, control, cheese.

## INTRODUCCIÓN

### Coagulación enzimática

El queso es un producto lácteo que ha jugado y juega un importante rol en la nutrición humana desde hace varios siglos. Desde entonces, el principal objetivo ha sido y es hoy hacer de un producto altamente perecedero, como es la leche, otro que tenga larga vida y preserve sus nutrientes. En esencia, el queso es elaborado removiendo agua o suero de la leche permitiendo que los sólidos o cuajada puedan ser manejados de una manera controlada. La recolección de la leche es el primer paso de este proceso. El segundo paso es la producción de la cuajada y el tercero es la concentración de la misma por corte, cocinado o no, salado y maduración.

El proceso de elaboración del queso está caracterizado por dos etapas: la coagulación enzimática por acción de la quimosina de la leche, que constituye la etapa fundamental en la elaboración y resulta en la formación de un gel como consecuencia de cambios fisicoquímicos que tienen lugar en las micelas de caseínas. Esta, en combinación con un proceso determinado de fermentación (método apropiado de deshidratación) resulta en una masa que pierde proteínas solubles y obviamente agua (Hinrichs, 2001). La coagulación enzimática, puede dividirse en dos partes, una primaria (hidrólisis enzimática) y otra secundaria (agregación). Durante la etapa primaria, la k-caseína es "cortada" por la acción de la enzima en el enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>, formando una porción hidrofóbica: para k-caseína y una hidrofílica: caseinmacropéptido. Como resultado de esta acción se produce la reducción de la carga negativa neta y de la repulsión estérica. De esa manera, la micelas modificadas comienzan a ser susceptibles de agregarse (Zoon *et al.*, 1988; Walstra, 1990; Lucey, 2002). Entre las fuerzas atractivas durante la agregación predominan los puentes-Ca, las fuerzas de Van der Waals, las interacciones hidrofóbicas (Walstra, 1990; Mellema *et al.*, 1999) y puentes hidrógeno.

### Sinéresis

La otra etapa trascendente en la elaboración del queso es la sinéresis, en donde el suero es expelido de la cuajada luego del corte de la misma. A continuación, ocurre el drenaje, moldeo, presión de la masa, salado y madurado. La

sinéresis es definida como el encogimiento de un gel, que tiene lugar concomitantemente con la expulsión de líquido o separación del suero. La sinéresis espontánea es la contracción de un gel sin la aplicación de alguna fuerza externa, es relativa a la inestabilidad de la red que conforma el gel, resultando en la pérdida de la habilidad para atrapar o contener todo el suero (Walstra, 1993).

La sinéresis de la cuajada es una etapa crítica, los niveles y extensión juegan un rol fundamental en determinar la humedad, el contenido mineral y de lactosa de la cuajada drenada y aún en la del producto final (Lawrence y Gilles 1980; Pearse y Mackinlay, 1989; Daviau *et al.*, 2000). La obtención de la medida de la sinéresis puede ser utilizada para monitorear el proceso. La mayoría de las técnicas desarrolladas para medirla, pueden ser clasificadas como métodos de separación o métodos de dilución. En los métodos de separación, la cuajada y el suero son separados y se analizan la humedad de la cuajada y el volumen del suero, para obtener una medida de la sinéresis (Marshall, 1982; Johnston *et al.*, 1998). Las técnicas de dilución utilizan trazadores y de esa manera logran medir la humedad remanente en la cuajada (Zviedrans y Graham, 1981; Nilsen y Abrahamsen, 1985). Taifi *et al.* (2006), estudiaron un método no invasivo para monitorear la sinéresis utilizando una técnica ultrasónica. Sin embargo, debemos aclarar que esta experiencia determinó lo que se denomina "microsinéresis espontánea" más que la sinéresis inducida por el corte de la cuajada. Esta, observa la limitante, que podría implicar la potencial diferencia de respuesta lograda en un medio compuesto por cuajada y suero, comparada con aquella conseguida en un medio homogéneo como es un gel.

### Factores que afectan la coagulación

Entre los más importantes factores que afectan la coagulación, se destacan aquellos generales referidos a la composición de la leche (en particular su contenido en proteínas y grasa), el estado de lactación, calidad higiénica y sanitaria, etc.

Otros factores denominados críticos que caracterizan el proceso, afectan la coagulación por quimosina de la leche. La Literatura enfatiza sus efectos y su interacción (Ernstrom *et al.*, 1958; Jen y Ashworth, 1970; Kowalchuk y Olson, 1977; Dalgleish, 1983; Okigbo *et al.*, 1985a,b; Noël *et*

*al.*, 1991; Sbodio *et al.*, 1997b). En la elaboración de queso, se identifican tres variables independientes relevantes, a saber: pH de coagulación, temperatura y concentración enzimática, a las que deberíamos agregar el  $\text{CaCl}_2$  adicionado. Las interacciones entre ellas han sido estudiadas por numerosos autores y, en el medio local, por Sbodio *et al.* (1997b, 2002).

### Desnaturalización térmica de las proteínas del suero

La consideración del tema adquiere singular relevancia en función de que las modificaciones que sufren las proteínas del suero luego del tratamiento térmico hacen posible su incorporación en diferentes productos, particularmente en quesos frescos y yogurt.

Después del calentamiento de la leche, las proteínas del suero, en particular,  $\beta$ -lactoglobulinas y  $\alpha$ -lactoalbúmina sufren cambios estructurales. En la  $\beta$ -lactoglobulinas se exponen los grupos SH (etapa inicial) y éste puede formar puentes disulfuros con otras proteínas, especialmente con la  $\kappa$ -caseína y  $\alpha_{s2}$ -caseína, iniciando un proceso de polimerización irreversible. Este paso inicial, en principio, se creyó que era solamente de naturaleza física pero es al final una interacción covalente (Hill, 1989; Jang y Swaisgood, 1990). La  $\alpha$ -lactoalbúmina, que en principio no puede iniciar un proceso de polimerización debido a la ausencia de grupos SH libres, después del calentamiento forma agregados, debido a los puentes disulfuros, con la  $\beta$ -lactoglobulinas (Mulvihill y Donovan, 1987). Numerosos investigadores reportaron la influencia de la desnaturalización térmica de las proteínas solubles sobre la propiedad de coagular enzimáticamente. Particularmente, la unión de las proteínas del suero a la superficie de la micela, que por impedimento estérico, producen una inapropiada agregación (Singh y Waungana, 2001; Vasbinder y De Kruijff, 2003a; Vasbinder *et al.*, 2003b; Donato *et al.*, 2007). A pesar de esta situación, el uso del tratamiento térmico ofrece importantes ventajas tales como el aumento del rendimiento y del valor nutritivo del queso (Kethireddipalli *et al.*, 2010). El tratamiento térmico rutinario al que es sometida la leche antes del proceso de elaboración de queso, corresponde a una pasteurización (72 °C, 16 segundos o 63-65 °C, 30 minutos). Ahora bien, el tratamiento a temperaturas superiores a 70 °C por varios minutos, resulta en importantes cambios fisicoquímicos de los constituyentes de la leche. Entre los más trascendentes, desde el punto de vista de la coagulación por acción de la quimosina se destacan: desnaturalización de las proteínas del suero y agregación de las mismas, interacción de las proteínas del suero con las micelas de caseína y cambios en la distribución del calcio entre las fases micelar y sérica (Hinrichs, 2001). Específicamente, la incapacidad de coagular apropiadamente de la leche tratada térmicamente puede ser explicada por la desnaturalización de las proteínas del suero y su unión con la  $\kappa$ -caseína, lo cual vía repulsión estérica inhibe o dilata la fase primaria (hidrólisis) y prolonga el tiempo de coagulación. Por otra parte, la pérdida de calcio soluble en el suero debido a la precipitación sobre las micelas de caseína como fosfato de calcio in-

soluble, también prolongan el tiempo de coagulación (Van Hooydonk, *et al.*, 1987). Además, las proteínas del suero desnaturalizadas son altamente hidratadas y obstruyen la sinéresis por lo que se produce menor drenaje de suero durante el proceso de elaboración de queso (Lucey y Gorry, 1994). Por consiguiente, al retener más suero con el correspondiente contenido de lactosa se modifica el proceso de acidificación de la cuajada. Recientemente, en nuestro país, fueron reportadas importantes modificaciones que el tratamiento térmico moderado de la leche (70 °C, 10 minutos) produce sobre el tiempo de coagulación, el voltaje y la producción de suero (Sbodio *et al.*, 2010).

### Contenido de cloruro de sodio y coagulación

El contenido de NaCl de la leche, observa influencia sobre las propiedades de la coagulación. El mismo, varía entre 17 y 28 mM/kg de leche (Walstra y Jenness, 1984). En la Cuenca Lechera Central de la República Argentina, esta variación es más amplia (Sbodio *et al.*, 1989). Zannier *et al.* (2002), mostraron que la variación en leche de vacas tomadas individualmente observaron un rango comprendido entre 17,40 y 42,83 mM de NaCl.

A través del uso de diferentes metodologías, numerosos trabajos muestran la influencia de altas concentraciones de NaCl en la leche sobre la propiedad de coagular enzimáticamente. Algunos autores, sostenían que la tensión de la cuajada no era afectada por la adición de hasta 500 mM de NaCl (Grufferty y Fox, 1985). Sin embargo, Jen y Ashworth (1970), reportaron que cuando se agregaron hasta 100 mM la tensión se incrementaba, mientras disminuía marcadamente a concentraciones más altas. Como ambos trabajos medían la tensión de la cuajada 30 minutos después del agregado de la enzima es posible que los dispares resultados hayan sido influenciados por la dependencia del tiempo de coagulación, más que por la concentración de NaCl. Zoon *et al.* (1989), con la utilización de un reómetro (Den Otter Rheometer), informaron que luego de la adición del coagulante y del NaCl, a pH 6,65 y tiempo de coagulación constante,  $G'$  (módulo de almacenamiento) no observaban diferencias significativas. Sin embargo, a tiempo de coagulación constante y adición de hasta 200 mM de NaCl,  $G'$  se incrementó a pH 6,65. Por el contrario, a concentración constante de enzima, esto fue observado solamente hasta 100 mM de NaCl. A más altas concentraciones se retarda la formación del gel. Recientemente, Udabage *et al.* (2001) mostraron que la adición de NaCl incrementa el módulo de almacenamiento.

En nuestro país, en un estudio realizado utilizando el método del alambre caliente para monitorear el proceso de la coagulación, Sbodio *et al.* (2006), mostraron que el tiempo de coagulación y el  $t_{\max}$  fueron significativamente afectados por la concentración de quimosina a contenidos de NaCl comprendidos entre 17,3 y 39,1 mM. El estudio multifactorial, mostró que la influencia más significativa sobre el tiempo de coagulación y  $t_{\max}$  fue la concentración enzimática y, en menor medida, la concentración final de NaCl. También se observó que, a medida que aumenta la concentración

de NaCl, aumentan el tiempo de coagulación y el  $t_{\max}$ . El máximo voltaje es también afectado en el rango de 17,3 a 39,1 mM de NaCl. El estudio fue realizado en el rango de variación del contenido de NaCl en la leche que se produce en el área central de nuestro país (Zannier *et al.*, 2002).

### Coagulación ácida

La formación de geles de proteínas de leche también es un paso crucial en la elaboración de yogurt. Este, es formado por la fermentación lenta de la lactosa y produce ácido láctico. El desarrollo del mismo es promovido por bacterias termófilas: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. La fermentación bacteriana convierte la lactosa en ácido láctico, el cual reduce el pH de la leche, decreciendo desde 6,7 a 4,6. Cuando la leche es tratada a altas temperaturas, la gelación tiene lugar entre pH 5,4 y 5,2. Con el descenso del pH se desordenan las propiedades estructurales internas de las micelas de caseína, debido a la solubilización de fosfato de calcio micelar (Dalgleish y Law, 1989). A medida que las caseínas se aproximan a su punto isoeléctrico (pH 4,6) se reduce la carga neta, lo que hace disminuir la repulsión electrostática entre los grupos cargados, incluyendo los residuos de fosfoserina que se exponen cuando el fosfato de calcio micelar es solubilizado. La atracción electrostática aumenta la atracción proteína-proteína que también se incrementa a través de interacciones hidrofóbicas (Lucey, 2004; Lee y Lucey, 2010).

Predominan dos tipos de yogurt: el firme "set-type" y el batido. El primero, es formado en su propio envase a medida que las bacterias lácticas fermentan la lactosa en ácido láctico dando una estructura de gel continua. En el caso de yogurt batido, es fermentado en grandes tanques, luego batido y bombeado al envase dando una textura viscosa (Tamime y Robinson, 1999). Uno de los problemas en su elaboración es la separación de suero ("wheying-off"), que es la aparición de suero en la superficie del gel, un defecto común durante el almacenamiento de productos fermentados como el yogurt. En general, los fabricantes tratan de evitar esta separación aumentando el contenido de sólidos de la leche, sometiendo la leche a un tratamiento térmico o agregando estabilizantes (gelatina, pectina, almidones, concentrado de proteínas de suero o gomas). Las propiedades reológicas del gel ácido son afectadas por la composición de la leche, tiempo y temperatura de tratamiento térmico, tipo y cantidad de fermento, temperatura de fermentación y si corresponde a un gel batido o no.

En los últimos años, numerosos autores estudiaron el uso de proteínas desnaturadas, como ingredientes, en la formulación de yogurt (Rabiey y Britten, 2009a; Matumoto-Pintro *et al.*, 2011), las características reológicas de yogurt producido con la adición de proteínas nativas de suero (Guggisberg *et al.*, 2007), la optimización de las propiedades reológicas de yogurt probiótico suplementado con proteínas de leche (Marafon *et al.*, 2011) y la adición de hidrolizados de proteínas de suero (Rabiey y Britten, 2009b) sobre las propiedades reológicas de un gel ácido.

### Agregado de proteínas del suero a otros productos

Para minimizar la retención de agua por parte de las proteínas del suero, éstas fueron modificadas por extrusión (a temperaturas moderadas) de manera de facilitar su uso en alimentos que contienen almidón con el propósito de aumentar la retención de los niveles de nutrientes (Onwulata *et al.*, 2010).

Varios autores estudiaron las consecuencias de agregar suero concentrado, con sus diferentes tratamientos, entre algunos ejemplos se destacan: la elaboración de queso gouda usando Centri-whey Process (Berg Van Den, 1979), o suero concentrado (Zoon y Hols, 1994), o suero en quesos de pasta semidura (Santoro y Faccia, 1996), quesos frescos usando proteínas de suero "particuladas" (Steffl, 1999) y, más recientemente, suplementación de la leche para elaborar queso con proteínas de suero desnaturadas (Maubois *et al.*, 2002).

### Experiencias en el área de producción de la Cuenca Lechera Santafesina

En el Área Central de la República Argentina, numerosos estudios reportan la composición y calidad de leche, sus limitaciones, y la presencia en la misma de niveles indeseables de diversos componentes (Sbodio *et al.*, 1985, 1989, 1997a, 1999a,b; Minetti *et al.*, 1995; Revelli *et al.*, 2004, 2011; Valtorta *et al.*, 2002, 2008). A partir de la década del 90, Sbodio *et al.* (1997b), utilizando una geometría apropiada acoplada a un reómetro, estudiaron la interacción simultánea del pH (5,6-6,8) adición de  $\text{CaCl}_2$  (100-300 mg/L), temperatura (30-40 °C) y concentración enzimática (0,02-0,05 UR/mL de leche), sobre la firmeza y el tiempo de coagulación. El análisis de superficies de respuestas permitió concluir que el desarrollo de la firmeza estaba relacionado a la disminución del pH y el aumento de la temperatura y, que en las condiciones experimentales impuestas, los máximos de firmeza se obtuvieron en un estrecho intervalo de pH y temperatura.

Posteriormente, Sbodio *et al.* (2002), utilizando un diseño rotacional central y un sensor desarrollado por el grupo de trabajo que usa el método del alambre caliente, concluyen que las óptimas condiciones para lograr la máxima firmeza de la cuajada resultan en 0,0278 UR/mL de leche de concentración enzimática, 35 °C de temperatura y 6,60 de pH. El mismo diseño fue utilizado para medir la influencia de la temperatura, pH y cantidad de enzima coagulante sobre geles formados por la acción combinada de enzimas y glucono- $\delta$ -lactona. Las respuestas  $t_{\max}$ ,  $D_{\max}$  y  $T_{\max V}$  fueron medidas por el método propuesto anteriormente. Para alcanzar pH 5,8 en 60 minutos, se utilizaron diferentes concentraciones de glucono- $\delta$ -lactona. La utilización de coagulante bovino, mostró que los principales efectos, en orden de importancia, fueron producidos por la concentración enzimática, el pH y la temperatura. En cambio, el uso de proteasa de origen microbiano observó que el orden de los efectos fueron la concentración enzimática, temperatura y pH. A partir de los modelos obtenidos para  $t_{\max}$  (tiempo en

el que se produce el cambio de signo de la derivada) y  $D_{\max}$  (voltaje máximo) se puede concluir que la concentración enzimática es la variable de mayor influencia positiva. Los máximos voltajes "firmeza"  $T_{\max V}$  (tiempo en el que se alcanza el máximo voltaje) fueron influenciados significativamente por la temperatura y la concentración enzimática de origen bovino y microbiano. La leche entera coagulada con ambos coagulantes, alcanzaron el máximo voltaje al mismo tiempo (Sbodio *et al.*, 2005).

Pauletti *et al.* (2005), estudiaron el desuerado de geles producido por acción de enzimas coagulantes y glucono- $\delta$ -lactona. El experimento, concluye que la concentración de la enzima, la temperatura de floculación y el pH inicial afectan significativamente el tiempo de floculación y la velocidad del desuerado.

Sbodio *et al.* (2010), con un dispositivo similar al utilizado por Hori (1985) determinaron que un moderado tratamiento térmico de la leche (70 °C, 10 minutos) produce niveles de desnaturalización del 20% en las proteínas del suero, y que la recuperación de la coagulación a pH 6,4 y 400 mg/L de leche de  $\text{CaCl}_2$  adicionado, constituyen condiciones apropiadas para obtener queso cuartirolo, sin perder la aceptación del consumidor y con un significativo aumento del 8,9% en el rendimiento.

#### Objetivos del desarrollo de un dispositivo para controlar la coagulación

El desarrollo de un novedoso dispositivo que permita el "monitoreo" *online* y que cumpla con todos los requerimientos de fortaleza, de capacidad para determinar el tiempo de coagulación, la velocidad de crecimiento de la cuajada, el tiempo en el que se alcanza la máxima firmeza, el tiempo óptimo de corte y que probablemente controle y evalúe la microsinéresis, será una herramienta esencial para estudiar la influencia de las variables críticas que caracterizan la coagulación enzimática y ácida. También, a nivel académico hará posible el estudio de las variaciones de la materia prima, la presencia de componentes indeseables como ocurre con la prevalencia en el área de altas concentraciones de sales solubles y proteólisis por acción de flora indeseable. A bajo costo de inversión y de manera simple, permitirá el análisis de la influencia de diferentes agregados a la leche en la elaboración de queso y de yogurt sin necesidad de recurrir a tecnología altamente costosa como la reometría. En síntesis, la utilización de un sensor que usa el principio del alambre caliente abre un importante panorama en el estudio de diferentes alternativas en la elaboración de nuevos desarrollos y productos tanto en el agregado de aditivos espesantes en leche homogeneizada, como en yogures inoculados con bacterias probióticas, en la búsqueda de mejorar quesos con fermentos característicos (fundamentalmente en quesos frescos y otros como pategrás y queso azul). Se considera, que estos métodos resultarán muy útiles aún con la desventaja de producir limitada información sobre las propiedades reológicas.

#### Antecedentes históricos. Métodos para monitorear la coagulación

Desde hace más de un siglo, el quesero utiliza un método subjetivo conocido como el "dedo del quesero" o el test del cuchillo. El quesero hace un ligero corte con su dedo o cuchillo para ver si el corte es limpio y si es exudado un suero claro, esto indica que el coágulo debe ser cortado. También provee una señal de la firmeza del gel.

Ahora bien, desde 1932 comenzaron a utilizarse técnicas de mediciones objetivas para el monitoreo continuo de las propiedades de los geles. Los primeros, midieron los cambios de viscosidad durante la agregación de las micelas usando varios tipos de viscosímetros (Holter, 1932; Scott Blair y Oosthuizen, 1961).

Berridge (1952), determinó el tiempo de floculación de las micelas a través de la observación visual de la agregación rotando un tubo.

Las imágenes de microscopía electrónica se usaron para indicar la extensión de la agregación y coagulación (Hossettler *et al.*, 1955; Green *et al.*, 1978).

Hardy y Fanni (1981), aplicaron fotometría de reflexión utilizando un colorímetro Hunterlab y la desviación de la luz fue observada con anterioridad a la coagulación.

La leche expuesta a una suave sobre presión en un tubo en U y la firmeza leída en un capilar, fue propuesta por Scott Blair y Burnett (1958).

En la leche sometida a una fuerza torsional, la respuesta del gel es monitoreada por varios tipos de sensores (Burnett y Scott Blair, 1963). Los métodos tromboelastográficos o lactodinamográficos, consisten en el movimiento de un cuerpo suspendido y sumergido en la muestra de leche (Frentz, 1965; Marçais, 1965; McMahon y Brown, 1982; Gervais y Vermeire, 1983). Un alambre en forma de T unido a un viscosímetro le permitió a Richardson *et al.* (1971) monitorear la viscosidad. Por entonces, Steinholt (1973), utilizó un instrumento como el Instron Universal Testing Machine, para evaluar el proceso.

La medida de la conductividad eléctrica durante la coagulación, fue propuesta por Tsouli *et al.* (1975). Posteriormente, Dejmeck (1989), midió los cambios de conductividad eléctrica durante la coagulación en comparación con medidas de viscosidad.

A través de la medida de la presión (manometría) se mide la oscilación hidráulica y la presión transmitida a la leche a través de un sensor (Vanderheiden, 1976). El sistema mecánico de Vanderheiden, es conocido como el Curd Firmness Tester (CFT). Bynum y Olson (1982), encontraron que su uso en controlar la firmeza al momento del corte podría mejorar la recuperación de grasa y caseína. Garnot *et al.* (1982), utilizaron el dispositivo para determinar la influencia de los niveles de caseína sobre el tiempo de corte del coágulo.

También, la utilización de una fuente de luz a diferentes longitudes de onda denominada reflectancia difusa (Ustunol *et al.*, 1991).

La geometría oscilatoria, es considerada un método no destructivo y para ello se utiliza un reómetro para aplicar ondas de oscilación sinusoidal (Tokita *et al.*, 1982; Bohlin *et al.*, 1984).

La utilización de luz o reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR). Un desarrollo de esas características es el Gelograph (Anonymous, 1983; O'Callaghan *et al.*, 2000).

El método del alambre caliente es una metodología no destructiva. Hori, (1985) observó los cambios de la viscosidad durante la coagulación enzimática, y demostró que el aumento de viscosidad de un fluido es proporcional a la elevación de la temperatura del alambre. En Argentina, Sbodio *et al.* (2002), utilizaron la misma metodología y pudieron determinar condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de quimosina para establecer el tiempo de corte. En sus conclusiones, consideran que un método objetivo y no destructivo en el monitoreo de la formación del coágulo y la metodología de superficies de respuestas, pueden ser recomendados para optimizar la coagulación de la leche.

Un dispositivo que utiliza un sistema mecánico, denominado Vatimer, fue diseñado por Richardson *et al.* (1985) y corresponde al uso de un sensor de oscilación vertical. Años después, Riddell-Lawrence y Hicks (1988), usaron una versión modificada para investigar el efecto de la firmeza sobre el rendimiento quesero.

El test de oscilación es un dispositivo rectangular que oscila hacia arriba y abajo. La resistencia mecánica ejercida por el gel es monitoreada continuamente mediante un equipo Instron Universal Testing Machine (Van Hooydonk *et al.*, 1986).

El monitoreo de los cambios en el índice refractométrico de la leche durante la coagulación, fue estudiado por Korolczuk y Maubois (1988).

Horne y Davidson (1990,) al utilizar espectroscopía de difusión observaron que la movilidad molecular de la dispersión disminuye a medida que la leche comienza a coagular, resultando en un incremento del tiempo de relajación.

La microscopía de campo oscuro incrementa el contraste de la imagen en comparación con una luz estándar, de esa forma se observa la coagulación (Ruettimann y Ladisch, 1991).

El uso de ultrasonido de alta frecuencia, mayores a 1 MHz (Benguigui *et al.*, 1994). Wade y Beattie (1999), aplicaron a la muestra un campo eléctrico alternativo.

La espectroscopía de fluorescencia fue utilizada por Herbert *et al.* (1999), para monitorear la fluorescencia que emiten los residuos de triptofano durante la coagulación.

El ultrasonido de baja frecuencia, en el rango de 50 a 100 Hz, fue usado por Nassar *et al.* (2001).

Los instrumentos que más desarrollo y utilización comercial han tenido corresponden a aquellos denominados métodos del alambre caliente (Hot Wire Method) y aquel que utiliza luz en el infrarrojo cercano. Con el uso del principio del método del alambre caliente, el Optiset fue instalado en más de 100 tinas queseras en los primeros años de la década del 90. Se señaló entonces, que el sistema mejora la

calidad y la consistencia. El otro sistema, muy utilizado comercialmente, consiste en dirigir luz infrarroja a la leche, a través de un cable de fibra óptica (Fibre-optic Reflectance). Los primeros dos sistemas utilizaron tecnología CoAgulite, fueron instalados en 1993 en Kentucky (USA).

Fagan *et al.* (2007a,b), presentaron un sensor "Novel Light Backscatter" para el monitoreo continuo *online* de la coagulación y la sinéresis, con el objeto de mejorar el control del contenido de humedad de la cuajada. La tecnología propuesta muestra, no solamente su utilidad para controlar la coagulación y la sinéresis, sino también que podría ser empleada en el control de la humedad de la cuajada, las pérdidas de grasa y el rendimiento de la cuajada, mejorando el control del proceso durante la elaboración de queso (Fagan *et al.*, 2008). Taifi *et al.* (2006), usando un método ultrasónico no intrusivo estudiaron la caracterización de la sinéresis y de la firmeza de un gel lácteo.

La utilización de sensores en el infrarrojo cercano *online* se usan para predecir respuestas esenciales en la sinéresis, por ejemplo rendimiento de suero, grasa y sólidos en suero y el contenido de humedad en la cuajada (Fagan *et al.*, 2008). Mateo *et al.* (2009), reportaron la validación de un sensor de la sinéresis en el rango de la composición de la leche y de los parámetros del proceso. Al medir la impedancia eléctrica, Li *et al.* (2010), pudieron caracterizar el proceso de coagulación de la leche de soja, de singular importancia en la elaboración del tofu. En la actualidad, un novedoso sistema basado en el uso de la reflexión en el infrarrojo cercano (NIR), es propuesto para la determinación automática del tiempo de corte (Lyndgaard *et al.*, 2012).

### Avances en el desarrollo de un dispositivo en Argentina

Desde hace seis años, en el marco de un proyecto CAI+D Especial (Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina), un grupo de investigación bajo la dirección del Profesor Titular Bqco. Oscar A. Sbodio, del área de estudios fisicoquímicos del Instituto de Tecnología de Alimentos (FIQ-UNL), conjuntamente con profesionales de la electrónica (Laboratorio de Electrónica, INTEC-CCT-CONICET, Santa Fe, Argentina) están desarrollando un novedoso dispositivo. El mismo, tiene como principal objetivo su utilización en tina quesera industrial. Para su logro, se propusieron cumplir con todos los requerimientos de fortaleza, pulido sanitario, lavado en el lugar (CIP: clean in place), tratamiento con vapor (SIP: steam in place), que no sea destructivo, que no sea removido en las operaciones características de elaboración y, fundamentalmente, que permita el monitoreo de las respuestas esenciales, a saber: Tiempo de Coagulación ( $T_c$ ), tiempo en el que se produce el cambio de signo de la derivada ( $t_{max}$ ), Velocidad de Crecimiento del Voltaje ( $dV/dt$ ) ("firmeza") y Voltaje Máximo ( $V_{max}$ ) ("firmeza máxima").

Para el desarrollo del prototipo se realizaron los siguientes pasos:

1. Elección y diseño de un termoelemento para la construcción de la sonda térmica.

2. Elección de un dispositivo de medición de temperatura por termorresistencia de platino.
3. Elección del electrodo de medición de pH.
4. Elección del electrodo ión selectivo de medición de actividad  $\text{Ca}^{+2}$  específico.
5. Diseño, desarrollo y construcción de la electrónica asociada para proveer de corriente continua ultra constante a la sonda. Medición de la variación de la resistencia de la misma, sumado a la medición de temperatura del medio, del pH y del  $\text{Ca}^{+2}$  específico, sus relaciones para el monitoreo y el control de las variables, que a la vez pueda funcionar "standalone" y se pueda comunicar con el medio para enviar los datos a un sistema central de manera de permitir el manejo y la toma de decisiones en forma remota.
6. Desarrollo de un programa de aplicación (software) que pueda aprender en función de los datos que recibe, a determinar el tiempo de coagulación, la velocidad de crecimiento del voltaje, el máximo voltaje, el tiempo en que se alcanza el mismo, el tiempo de corte de la cuajada y una posible estimación de la microsinéresis.

Para dar cumplimiento a los pasos 1 y 2, se trabajó con la opción que utiliza un termoelemento de platino bobinado sobre cerámica de manera que el alambre pueda dilatarse libremente. El alambre se encuentra bobinado en espiral y ubicado dentro de pequeños taladros pasantes realizados en cerámica, lo que le da algunos grados de libertad para su dilatación. El análisis de sus dimensiones permitió la elección de la vaina protectora. Sumergido en leche, el termoelemento fue excitado con el paso de una corriente continua elevada (200 mA o más) para usarlo como calefactor y medir la variación de la resistencia entre sus extremos a través de la medición de la diferencia de potencial. El calentamiento del termoelemento durante el cambio de estado al momento de la coagulación, nos permite medir los cambios de voltaje en función del tiempo.

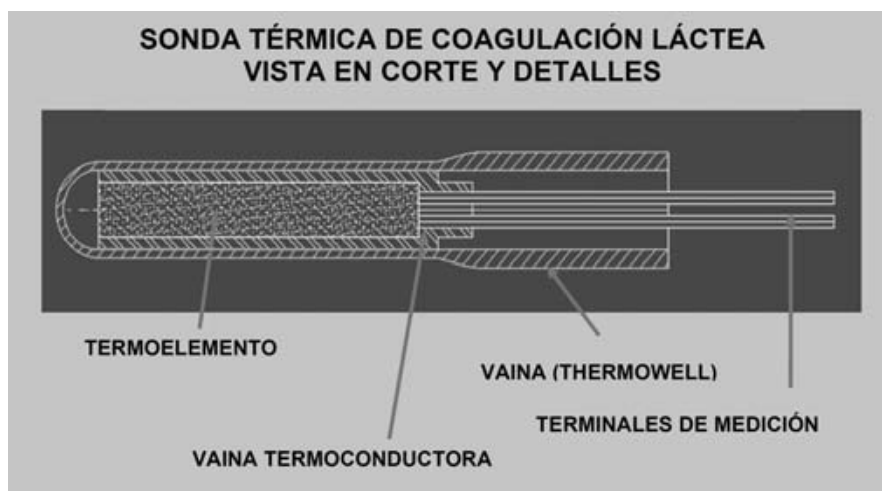
La termorresistencia seleccionada fue alojada en una vaina de protección apropiada que cumple con las normas establecidas para su uso en alimentos, tanto las 74-03 de la organización 3 A como las del EHEDG (European Hygienic Engineering and Design Group). La vaina (thermowell), de acero inoxidable 316 L con electropolido, permite su higiene en el lugar (CIP) y posee un espesor delgado, de manera de evitar los retardos en la información. Corresponde al modelo TW810 de Intempco Controls Ltd. de Canadá.

La figura 1, muestra un corte esquemático de la sonda desarrollada. No se dan detalles de los distintos componentes en virtud de que el prototipo está en trámite de patentamiento.

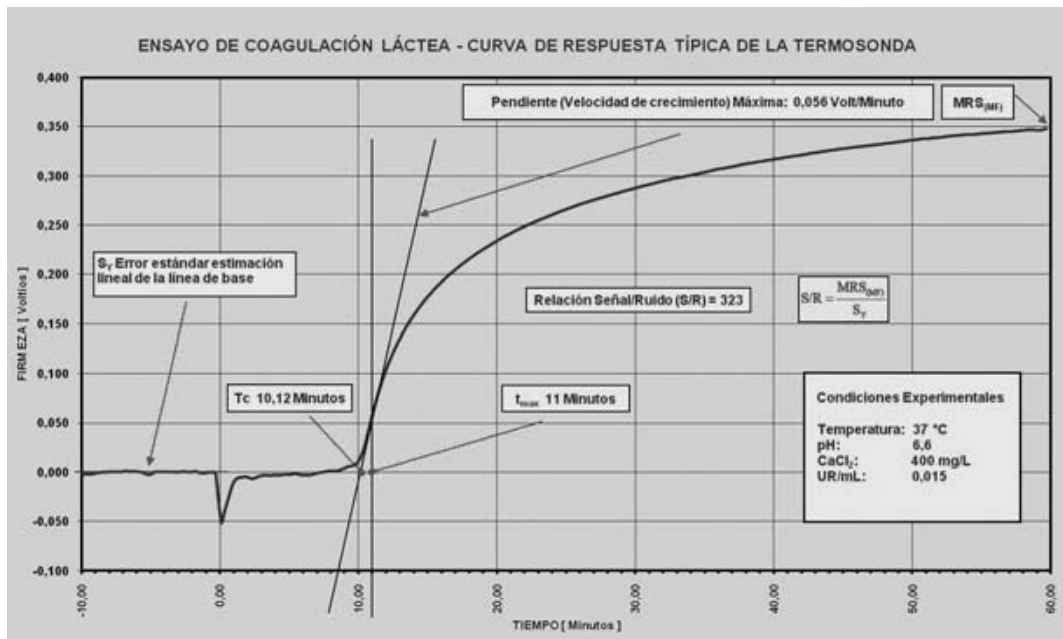
Los primeros ensayos, con el desarrollo a escala piloto, se realizaron utilizando leche descremada reconstituida (10,45%). Las respuestas obtenidas de voltaje en función del tiempo, se ilustran en la figura 2. El Tiempo de Coagulación ( $T_c$ ), el Tiempo en el que se produce el cambio de signo de la derivada ( $t_{max}$ ), la Velocidad de Crecimiento del Voltaje ( $dV/dt$ ) ("firmeza") y el Voltaje Máximo ( $V_{max}$ ) ("firmeza máxima"), observan excelentes repetibilidades. El ruido de la señal es muy bajo y por consiguiente la relación señal/ruido del voltaje muestra niveles porcentuales no significativos.

## CONCLUSIÓN

La presente revisión muestra en detalle el proceso de la coagulación enzimática, ácida y el comportamiento de las proteínas solubles sometidas o no a tratamiento térmico. También, la posibilidad de su incorporación en la elaboración industrial de queso y yogurt. Los investigadores se preocupan desde hace décadas en el desarrollo de dispositivos que permitan el "monitoreo" *online* de la coagulación de la leche, utilizando diversos métodos de funcionamiento. En la actualidad, los dos principios que prevalecen refieren a la utilización de la reflexión de la luz en el infrarrojo y al del alambre caliente. En Argentina, investigadores de



**Figura 1.** Corte esquemático del sensor.



**Figura 2.** Respuestas de voltaje en función del tiempo (coagulograma) para leche descremada reconstituida al 10,45%.

la Universidad Nacional del Litoral y el INTEC-CCT-CONICET desarrollaron un sensor que cumple con los requerimientos para su utilización en tina industrial. Es decir, tiene la fortaleza suficiente, no es destructivo, puede ser higienizado en el lugar, no interfiere con las operaciones de corte y agitación y cumple con los requerimientos sanitarios. Las primeras pruebas en el laboratorio y en planta piloto son positivas. Su funcionamiento es simple y su construcción de bajo costo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANONYMOUS. 1983. Gelograph for measurement of milk gel's formation and hardening. *North European Dairy J.* 49 (5), 114-115.
- BENIGUI, L.; EMERY, J.; DURAND, D.; BUSNEL, J.P. 1994. Ultrasonic study of milk clotting. *Lait.* 74 (3), 197-206.
- BERG VAN DEN, G. 1979. Increasing cheese yield by inclusion of whey proteins. *The Netherlands Milk and Dairy Journal.* 33, 210-211.
- BERRIDGE, N.J. 1952. An improved method of observing the clotting of containing rennin. *J. Dairy Res.* 19, 328-329.
- BOHLIN, L.; HEGG, P.; LJUSBERG-WAHREN, H. 1984. Viscoelastic properties of coagulation milk. *J. Dairy Sci.* 67, 729-734.
- BURNETT, J.; SCOTT BLAIR, G.W. 1963. A speed-compensated torsionmeter for measuring the setting of milk by rennet. *J. Dairy Ind.* 28 (3), 220-223.
- BYNUM, D.G.; OLSON, N.F. 1982. Influence of curd firmness at cutting on cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. *J. Dairy Sci.* 65, 2281-2290.
- DALGLEISH, D.G. 1983. Coagulation of renneted bovine casein micelles: dependence on temperature, calcium ion concentration and ionic strength. *J. Dairy Res.* 50, 331-339.
- DALGLEISH, D.G.; LAW, A.J.R. 1989. pH-induced dissociation of bovine casein micelles. II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *J. Dairy Res.* 56, 727-735.
- DAVIAU, C.; PIERRE, A.; FAMELART, M.H.; GOUEDRANCHE, H.; JACOB, D.; GARNIER, M.; MAUBOIS, J.L. 2000. Characterisation of whey drainage kinetics during soft cheese manufacture in relation with the physicochemical and technological factors, pH and renneting, casein concentration and ionic strength of milk. *Lait.* 80, 417-432.
- DEJMEK, P. 1989. Precision conductometry in milk renneting. *J. Dairy Res.* 56, 69-78.
- DONATO, L.; GUYOMARCH, H.F.; AMIOT, S.; DALGLEISH, G.D. 2007. Formation of whey protein/k-casein complexes in heated milk: Preferential reaction of whey protein with k-casein in the casein micelles. *International Dairy Journal.* 17, 1161-1167.
- ERNSTROM, C.A.; PRICE, W.V.; SWANSON, A.M. 1958. Effects of reducing rennet and adding calcium chloride on the manufacture and cutting cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 41, 61-67.
- FAGAN, C.C.; LEEDY, M.; CASTILLO, M.; PAYNE, F.A.; O'DONNELL, C.P.; O'CALLAGHAN, D.J. 2007a. Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *Journal of Food Engineering.* 83, 61-67.
- FAGAN, C.C.; CASTILLO, M.; PAYNE, F.A.; O'DONNELL, C.P.; LEEDY, M.; O'CALLAGHAN, D.J. 2007b. Novel Online sensor technology for continuous monitoring of milk coagulation and whey separation in cheesemaking. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8836-8844.
- FAGAN, C.C.; CASTILLO, M.; O'DONNELL, C.P.; O'CALLAGHAN, D.J. 2008. Online prediction of cheese making indices using backscatter of near infrared light. *International Dairy Journal.* 18 (2), 120-128.
- FRENTZ, R. 1965. Application de la thrombélustographie de Hartert a l'étude de la coagulation du lait. *Lait.* 45, 489-508.
- GARNOT, P.; RANK, T.C.; OLSON, N.F. 1982. Influence of protein and fat contents of ultrafiltered milk on rheological properties of gels formed by chymosin. *J. Dairy Sci.* 65, 2267-2273.
- GERVAIS, A.; VERMEIRE, D. 1983. A critical study and improvement of the cheese curd torsionmeter. *Journal of Texture Studies.* 14, 31-45.



- GREEN, M.L.; HOPPS, D.G.; MORANT, S.V.; HILL, V.A. 1978. Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk. II. Process of gel assembly. *J. Dairy Res.* 45, 413-422.
- GRUFFERTY, M.B.; FOX, P.F. 1985. Effect of added NaCl on some physicochemical properties of milk. *Irish J. Food Sci. Technol.* 9, 1-9.
- GUGGISBERG, D.; EBERHARD, P.; ALBRECHT, B. 2007. Rheological characterization of set yoghurt produced with additives of native whey protein. *International Dairy Journal.* 17, 1353-1359.
- HARDY, J; FANNI, J. 1981. Application of reflection photometry to the measurement of milk coagulation. *J. Food Sci.* 46, 1956-1957.
- HERBERT, S.A.; RIAUBLANC, A.; BOUCHET, B.; GALLANT, B.J.; DEFFOUR, E. 1999. Fluorescence spectroscopy investigation of acid or rennet induced coagulation milk. *J. Dairy Sci.* 82, 2056-2062.
- HILL, A.R. 1989. The  $\beta$ -lactoglobulin-k-casein complex. *Canadian Inst. Food Science and Technology Journal.* 22 (2), 120-123.
- HINRICH, J. 2001. Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal.* 11, 495-503.
- HOLTER, H. 1932. Über die Labwirkung. *Biochem. Zeitschr.* 255, 160-168.
- HORI, T. 1985. Objective measurements of the process of curd formation during rennet treatment of milks by the hot wire method. *J. Food Sci.* 50, 911-917.
- HORNE, D.S.; DAVIDSON, C.M. 1990. The use of dynamic light-scattering in monitoring rennet curd formation. *Milchwissenschaft.* 45, 712-715.
- HOSTETTLER, H.; STEIN, J.; IMHOF, K. 1955. Die bestimmung des gerinnungspunktes bei der labgerinnung der milch. *Milchwissenschaft.* 6, 196-205.
- JANG, H.D.; SWAISGOOD, H.E. 1990. Disulfide bond formation between thermally denatured  $\beta$ -lactoglobulin and k-casein in casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73, 900-904.
- JEN, J.J.; ASHWORTH, U.S. 1970. Factors influencing the curd tension of rennet coagulated milk. *Salt balance. J. Dairy Sci.* 53, 1201-1206.
- JOHNSTON, K.A.; LUCKMAN, M.S.; LILLEY, H.G.; SMALE, B.M. 1998. Effect of various cutting and stirring conditions on curd particle size losses of fat to the whey during Cheddar manufacture in Ost vats. *International Dairy Journal.* 8, 281-288.
- KETHIREDDIPALLI, P.; HILL, R.A.; DALGLEISH, D.G. 2010. Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. *International Dairy Journal.* 20, 838-843.
- KOROLCZUK, J.; MAUBOIS, J.L. 1988. Effect of pH, calcium concentration and temperature on the evolution of the refractometric signal produced during rennet coagulation of milk. *J. Dairy Res.* 55, 81-88.
- KOWALCHYK, A.W.; OLSON, N.E. 1977. Effects of pH and temperature on the secondary phase of milk clotting rennet. *J. Dairy Sci.* 60, 1256-1259.
- LAWRENCE, R.C.; GILLES, J. 1980. The assessment of the potential quality of young cheddar cheese. *N. Z. J. Zealand Dairy Sci. Technol.* 15 (1), 1-12.
- LEE, W.J.; LUCEY, J.A. 2010. Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 23, N.º 9, 1127-1136.
- LI, X.; TOYODA, K.; IHARA, I. 2010. Coagulation process of soymilk characterized by electrical impedance spectroscopy. *Journal of Food Engineering.* 105, 563-568.
- LUCEY, J.A. 2002. ADSA Foundation Scholar Award. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *J. Dairy Sci.* 85, 281-294.
- LUCEY, J.A. 2004. Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. General Aspects. 3rd ed. Elsevier Academic Press, London. pp. 105-122.
- LUCEY, J.A.; GORRY, C. 1994. Effect of Simplese 100 on the manufacture of low fat Cheddar cheese. In *Cheese Yield and Factors Affecting its Control* (pp. 439-447). S. I. N.º 9402. Brussels: IDF.
- LYNDGAARD, C.B.; ENGELSEN, S.B.; VAN DER BERG, F.W.J. 2012. Real-time modeling of milk coagulation using in-line near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering.* 108, 345-352.
- MACMAHON, D.J.; BROWN, R.J. 1982. Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. *J. Dairy Sci.* 65, 1639-1642.
- MARAFON, A.P.; SUMI, A.; ALCÁNTARA, M.R.; TAMIME, A.Y.; NOGUEIRA DE OLIVEIRA, M. 2011. Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. *Food Science and Technology.* 44, 511-519.
- MARCAIS, M.H. 1965. Emploi de la Thrombélástographie pour l'étude de la coagulation du lait. *Lait.* 45, 241-250.
- MARSHALL, R. 1982. An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *J. Dairy Res.* 49, 329-336.
- MATEO, M.J.; O'CALLAGHAN, D.J.; EVERARD, C.D.; FAGAN, C.C.; CASTILLO, M.; PAYNE, F.A. 2009. Influence of curd cutting programme and stirring speed on the prediction of syneresis indices in cheese making using NIR light backscatter. *LWT. Food Science Technology.* 42 (5), 950-955.
- MATUMOTO-PINTRO, P.T.; RABIEY, L.; ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M. 2011. Use of modified whey protein in yoghurt formulations. *International Dairy Journal.* 21, 21-26.
- MAUBOIS, J.L.; FAUQUANT, J.; FAMELART, M.H.; CAUSSIN, F. 2002. Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey protein and derivatives. In *Proceedings of the 3rd International Whey Conference* (pp. 59-72). Munich, Germany. American Dairy Products Institute and European Whey Products Association.
- MELLEMA, M.; LEERMARKERS, F.A.M.; DE KRUIF, C.G. 1999. Molecular mechanism of the renneting process of casein micelles in skim milk examined by viscosity and light-scattering experiments and simulated by model SCF calculations. *Langmuir.* 15, 6304-6313.
- MINETTI, M.L.; TERCERO, E.J.; SBODIO, O.A.; WEIDMANN, R.; COUTAZ, R. 1995. Proteólisis en leche de tambo. *La Alimentación Latinoamericana.* N.º 205, 61-65.
- MULVIHILL, D.M.; DONOVAN, M. 1987. Whey proteins and their thermal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Science and Technology.* 11, 43-75.
- NASSAR, G.; NONGAILLARD, B.; NOËL Y. 2001. Monitoring of milk gelation using a low-frequency ultrasonic technique. *J. Food Eng.* 48, 351-359.
- NILSEN, K.O.; ABRAHAMSEN, R.K. 1985. Difficulties in measuring the syneresis of goat milk rennet curd by dilution of an added tracer. *J. Dairy Res.* 52 (1), 209-212.
- NOËL, Y.; DURIER, C.; LEHEMBRE, N.; KOBILINSKY, A. 1991. Étude multifactorielle de la coagulation mixte du lait analysée par viscoélasticimétrie. *Lait.* 71, 15-39.
- O'CALLAGHAN, D.J.; O'DONNELL, C.P.; PAYNE, F.A. 2000. On-line sensing techniques for coagulum setting in renneted milk. *J. Food Eng.* 43, 155-165.
- OKIGBO, L.M.; RICHARDSON G.H.; BROWN, R.G.; ERNSTROM, C.A. 1985a. Effects of pH, calcium chloride and chymosin concentration on coagulation properties of abnormal and normal milk. *J. Dairy Sci.* 68, 2527-2533.

- OKIGBO, L.M.; RICHARDSON, G.H.; ERNSTROM, C.A. 1985b. Interactions of calcium, pH, temperature, and chymosin during milk coagulation. *J. Dairy Sci.* 68, 3135-3142.
- ONWULATA, C.I.; PHILLIPS, J.G.; TUNICK, M.H.; QI, P.X.; COOKE, P.H. 2010. Texturized Dairy Protein. *J. Food Sci.* 75 (2), 100-109.
- PAULETTI, M.S.; SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; COSTA, S.C. 2005. Desuerado de coágulos de leche formados por enzima coagulante y Glucono- $\delta$ -Lactona. *Cienc. Technol. Aliment.* Vol. 5 N.º 1, 35-41.
- PEARSE, M.J.; MACKINLAY, A.A. 1989. Biochemical aspects of syneresis: a review. *J. Dairy Sci.* 72, 1401-1407.
- RABIEY, L.; BRITTEN, M. 2009a. Effect of protein composition on the rheological properties of acid-induced whey protein. *Food Hydrocolloids.* 23, 973-979.
- RABIEY, L.; BRITTEN, M. 2009b. Effect of whey protein enzymatic hydrolysis on the rheological properties of acid-induced gels. *Food Hydrocolloids.* 23, 2302-2308.
- REVELLI, G.R.; SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J. 2004. Prevalencia de leucosis enzoótica bovina en la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria.* Vol. 85 N.º 4, 135-139.
- REVELLI, G.R.; SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J. 2011. Estudio y evolución de la calidad de leche cruda en tambos de la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina (1993-2009). *RIA. Revisiones.* Vol. 37 N.º 2, 128-139.
- RICHARDSON, G.H.; GANDHI, N.R., DIVATIA, M.A.; ERNSTROM, C.A. 1971. Continuous curd tension measurements during milk coagulation. *J. Dairy Sci.* 54, 182-186.
- RICHARDSON, G.H.; OKIGBO, L.M.; THORPE, J.D. 1985. Instrument for measuring milk coagulation on cheese vats. *J. Dairy Sci.* 68, 32-36.
- RIDDELL-LAWRENCE, S.; HICKS, C.L. 1988. Effect of curd firmness on stirred curd cheese yield. *J. Dairy Sci.* 72, 313-321.
- RUETTIMANN, K.W.; LADISCH, M.R. 1991. In situ observation of casein micelles coagulation. *J. Colloid Interface Sci.* 146, 276-287.
- SANTORO, M.; FACCIA, M. 1996. Degradation of the protein fraction in a cheese fortified with whey protein. *The Netherlands Milk and Dairy Journal.* 50, 61-68.
- SBODIO, O.A.; FREYRE, M.R.; ROZYCKI, V.R.; SABBAG, N.G.; WEIDMANN, P. 1985. Influence of lactation on the composition of individual cow's milk. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology.* 20, 109-116.
- SBODIO, O.A.; FREYRE, M.R.; ROZYCKI, V.R.; ZANNIER, M.S.; WEIDMANN, P. 1989. Contenido y variación mineral de leche en tambos. *Revista Argentina de Lactología.* Año II N.º 2, 51-60.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; COUTAZ, R.; ALONSO, A.G. 1997a. Descenso crioscópico de leche de tambo. *Revista Internacional del Centro de Información Tecnológica (CIT).* Vol. 8 N.º 6, 47-52.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; COUTAZ, V.R.; LUNA, J.A.; MARTINEZ, E. 1997b. Simultaneous interaction of pH, CaCl<sub>2</sub> addition, temperature and enzyme concentration on milk coagulation properties. *Food Science and Technology International.* 3, 291-298.
- SBODIO, O.A.; MINETTI, M.L.; TERCERO, E.J. 1999a. Proteólisis en leche destinada a la elaboración de queso. *Revista Internacional del Centro de Información Tecnológica (CIT).* Vol. 10 N.º 1, 109-117.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; MINETTI, M.L.; ZANNIER, M.S.; REVELLI, G.R.; SEBILLE, C. 1999b. Sodio, potasio y cloruros en leche de tambo. *Tecnología Láctea Latinoamericana.* Año 5 N.º 16, 52-56.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; COUTAZ, R.; MARTINEZ, E. 2002. Optimizing processing conditions for milk coagulation using the hot wire method and response surface methodology. *J. Food Sci.* 67 (3), 1097-1102.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; COUTAZ, V.R.; REVELLI, G.R. 2005. Propiedades de los geles lácteos formados por la acción combinada de enzimas coagulantes y Glucono- $\delta$ -Lactona. *Revista Internacional del Centro de Información Tecnológica (CIT).* Vol. 16 N.º 4, 17-25.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; COUTAZ, R.; REVELLI, G.R. 2006. Effects of rennet and NaCl concentrations on milk coagulation properties. *Cienc. Technol. Aliment.* Vol. 5 N.º 3, 182-188.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; ZANNIER, M.S.; REVELLI, G.R. 2010. Tratamiento térmico de leche: influencia del pH y CaCl<sub>2</sub> en la elaboración de queso cuartirolo. *Revista Internacional del Centro de Información Tecnológica (CIT).* Vol. 21 N.º 5, 107-116.
- SCOTT BLAIR, G.W.; BURNETT, J. 1958. Physical changes in milk caused by the action of rennet. 1. Description of apparatus for measuring rigidity module and internal viscosities, test of reliability and some observations of syneresis. *J. Dairy Res.* 25, 297-303.
- SCOTT BLAIR, G.W.; OOSTHUIZEN, 1961. A viscometric study of the breakdown of casein in milk by rennin and rennet. *J. Dairy Res.* 28, 165-173.
- SINGH, H.; WAUNGANA, A. 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal.* 11, 543-551.
- STEFFL, A. 1999. Integration von danaturierten molkenproteinen in die matrix von wiichkäse. *Dissertation, Technische Universität München, Germany.*
- STEINSHOLT, K. 1973. The use of an Instron Universal Testing instrument in studying the rigidity of milk during coagulation by rennin. *Milchwissenschaft.* 28, 94-97.
- TAIFI, N.; BAKKALI, F.; FAIZ, B.; MOUDDEN, A.; MAZE, G.D.D. 2006. Characterization of the syneresis and the firmness of the milk gel using an ultrasonic technique. *Maeas. Sci. Technol.* 17 (2), 281-287.
- TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. 1999. *Yoghurt: Science and Technology.* 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- TOKITA, M.; HIKICHI, K.; NIKÉ, R.; ARIMA, S. 1982. Dynamic viscoelastic studies on the mechanism of milk clotting process. *Biorheology.* 19, 209-219.
- TSOULI, J.; FAVRE-BONVIN, G.; POLICARD, C.; VILLE, A. 1975. Measure, par la methode conductimétrique, de l'activité enzymatique de trois variétés de présure sur lait frais de mélange et du lait reconstitué a partir de poudre dégraissée. *Lait.* 55, 289-294.
- UDABAGE, P.; MCKINNON, I.R.; AGUSTIN, M.A. 2001. Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk. *J. Dairy Sci.* 84, 1569-1575.
- USTUNOL, Z.; KICKS, C.L.; PAYNE, F.A. 1991. Diffuse reflectance profiles of eight milk-clotting enzyme preparations. *J. Food Sci.* 56, 411-415.
- VALTORTA, S.E.; LEVA, P.E.; GALLARDO, M.R.; SCARPATI, O.E. 2002. Respuestas de la producción lechera durante eventos de olas de calor en Argentina. *INTA EEA Rafaela. Anuario 2002. Producción Animal. Sistemas de Producción p.* 83.
- VALTORTA, S.E.; GALLARDO, M.R.; SBODIO, O.A.; REVELLI, G.R.; ARAKAKI, C.; LEVA, P.E.; GAGGIOTTI, M.; TERCERO, E.J. 2008. Water salinity effects on performance and rumen parameters of lactating grazing Holstein cows. *International Journal of Biometeorology.* Vol. 52 N.º 3, 239-247.
- VAN HOOYDONK, A.C.M.; BOERRIGTER, I.J.; HAGEDOORN, H.G. 1986. pH induced physico-chemical changes of casein mi-

celles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Neth. Milk Dairy J.* 40, 297-313.

VAN HOOYDONK, A.C.M.; DE KOSTER, P.M.; BOERRIGTER, I.J. 1987. The renneting properties of heated milk. *Neth. Milk Dairy J.* 41, 3-18.

VANDERHEIDEN, G. 1976. An apparatus for continuously monitoring the structural rigidity of a gel. *CSIRO Food Res. Quarterly.* 36 (1), 45-47.

VASBINDER, A.J.; DE KRUIF, C.G. 2003a. Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *International Dairy Journal.* 13, 669-677.

VASBINDER, A.J.; ROLLEMA, H.S.; DE KRUIF, C.G. 2003b. Impaired rennetability of heated milk, study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. *J. Dairy Sci.* 86, 1548-1555.

WADE, T.; BEATTIE, J.K. 1999. In situ observation of renneting by electroacoustics. *Milchwissenschaft.* 53, 490-494.

WALSTRA, P. 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73, 1965-1979.

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

WALSTRA, P.; JENNESS, R. 1984. *Química y Física Lactológica*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España. p. 37.

ZANNIER, M.S.; MINETTI, M.L.; SBODIO, O.A.; REVELLI, G.R. 2002. Contenido de sodio, potasio y cloruros en leche de vacas individuales determinados por el método del electrodo ión selectivo. *Revista Internacional del Centro de Información Tecnológica (CIT)*. Vol. 13 N.º 3, 61-67.

ZOON, P.; VAN VLIET, T.; WALSTRA, P. 1988. Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. Introduction. *Neth. Milk Dairy J.* 42, 249-269.

ZOON, P.; VAN VLIET, T.; WALSTRA, P. 1989. Rheological properties of rennet-induced milk gels. 4. The effects of pH and NaCl. *Neth Milk Dairy J.* 43, 17-34.

ZOON, P.; HOLS, G. 1994. Inclusion of whey proteins in Gouda-type cheese. In *protein and fat globule modifications by heat treatment, homogenization and other technological means for high quality dairy products* (pp. 417-420). Brussels: IDF.

ZVIEDRANS, Z.; GRAHAM, E.R.B. 1981. An improved tracer method for measuring the syneresis of rennet curd. *Aust. J. Dairy Technol.* 36, 117-120.