



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ***MONITORIZACIÓN DE LA FASE DE FERMENTACIÓN DEL YOGUR MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN DE PATRONES LÁSER COMO TÉCNICA NO DESRUPTIVA: CARACTERIZACIÓN DE LECHE DE VACA, CABRA Y OVEJA***

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y  
CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: Sara Izquierdo Nieto

TUTOR/A ACADÉMICO: Jose M. Barat

COTUTOR/A: Raúl Grau

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Samuel Verdú Amat

*Curso Académico: 2016/2017*

**VALENCIA, febrero de 2018**

# **MONITORIZACIÓN DE LA FASE DE FERMENTACIÓN DEL YOGUR MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN DE PATRONES LÁSER COMO TÉCNICA NO DESTRUCTIVA: CARACTERIZACIÓN DE LECHE DE VACA, CABRA Y OVEJA.**

Izquierdo Nieto, S.; Verdú Amat, S.<sup>1</sup>; Grau, R.<sup>1</sup>; Barat, J.M.<sup>1</sup>

## **RESUMEN.**

En la actualidad, la mejora en la calidad de los productos es una necesidad para poder afrontar las nuevas exigencias que impone el mercado global. Las crecientes tendencias hacia la garantía de calidad e inocuidad de estos exigen la implementación de sistemas automatizados avanzados para reemplazar los sistemas tradicionales que son menos confiables y eficientes. En el presente trabajo se estudió la monitorización de la fermentación del yogur a través del análisis de imagen de patrones láser generados a través de la interacción de este con la matriz del alimento. La aplicación se llevó a cabo sobre leche de vaca, cabra y oveja. Las imágenes obtenidas durante todo el proceso fueron procesadas para la extracción posterior de datos. Por otra parte, las muestras fueron analizadas fisicoquímicamente (pH y textura) en los mismos puntos de captura de imagen con el objetivo de correlacionar posteriormente ambos bloques de datos. El análisis de los datos de imagen se llevó a cabo mediante técnicas estadísticas multivariantes, en base a las cuales se corroboró que la variabilidad recogida por los patrones láser analizados, estaban directamente relacionados con los cambios de la matriz del alimento durante el proceso (evolución del pH y textura). Así pues, cuando se realizaron estudios de regresión para modelizar los parámetros fisicoquímicos en base a los datos de imagen, se obtuvieron coeficientes de correlación satisfactorios para cada parámetro fisicoquímico en vaca, ligeramente en oveja, aunque no en cabra. Esta diferencia fue debida a las diferentes propiedades de las proteínas de cabra frente a las de vaca y oveja, las cuales se sitúan en comportamientos más similares bajo estas condiciones de procesado. Por lo tanto, los resultados mostraron que la técnica consiguió capturar información de forma rápida y no destructiva sobre el estado interno de la matriz de yogur durante el proceso, mostrando a su vez un efecto significativo de la naturaleza de la materia prima.

## **RESUM.**

En l'actualitat, la millora en la qualitat dels productes és una necessitat per a poder afrontar les noves exigències que imposa el mercat global. Les creixents tendències cap a la garantia de qualitat i innocuïtat d'aquests exigeixen la implementació de sistemes automatitzats avançats per a reemplaçar els sistemes tradicionals que són menys confiables i eficients. En el present treball es va estudiar el monitoratge de la fermentació del iogurt a través de l'anàlisi d'imatge de patrons làser generats a través de la interacció

---

<sup>1</sup>Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Dto. Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, s/n 46022 Valencia.

del mateix amb la matriu de l'aliment. L'aplicació es va dur a terme sobre llet de vaca, cabra i ovella. Les imatges obtingudes durant tot el procés van ser processades per a l'extracció posterior dades. D'altra banda, les mostres van ser analitzades fisicoquímicament (pH i textura) en els mateixos punts de captura d'imatge amb l'objectiu de correlacionar posteriorment tots dos blocs de dades. L'anàlisi de les dades d'imatge es va dur a terme mitjançant tècniques estadístiques multivariantes, sobre la base de les quals es va corroborar que la variabilitat arrellegada pels patrons làser analitzats estaven directament relacionats amb els canvis de la matriu de l'aliment durant el procés (evolució del pH i textura). Així doncs, quan es van realitzar estudis de regressió per a modelitzar els paràmetres fisicoquímics sobre la base de les dades d'imatge, es van obtenir coeficients de correlació satisfactoris per a cada paràmetre fisicoquímic en vaca, lleugers en ovella, encara que no en cabra. Aquesta diferència va ser deguda a les diferents propietats de les proteïnes de cabra enfront de les de vaca i ovella, les quals se situen en comportaments més similars sota aquestes condicions de processament. Per tant, els resultats van mostrar que la tècnica va aconseguir capturar informació de forma ràpida i no destructiva sobre l'estat intern de la matriu de iogurt durant el procés, mostrant al seu torn un efecte significatiu de la naturalesa de la matèria primera.

#### **ABSTRACT.**

Nowadays, the improvement in the quality of the products is need to be able to face the new requirements imposed by the global market. The growing trends towards the quality assurance, and the safety of these demands the implementation of advanced automated systems in order to replace traditional systems, which are less reliable and efficient. The monitoring of yogurt fermentation was studied through the image analysis of laser patterns generated through the interaction of the same with the food matrix. Cow's, goat's and sheep's milks were tested. Destructive physic-chemical analyses were done after capturing images during the processes to study the relationships between data blocks. The analysis of the image data was carried out by means of multivariate statistical techniques, based on which it was corroborated that the variability collected by the laser patterns analyzed, were directly related to the changes of the food matrix during the process (pH evolution and texture). Thus, when regression studies were conducted to model the physicochemical parameters based on the image data, satisfactory correlation coefficients were obtained for each physicochemical parameter in cow and sheep, but not in goat. This difference was due to the different properties of goat proteins compared to those of cow and sheep, which are more similar in behavior under these processing conditions. Therefore, the results showed that the technique managed to capture information quickly and non-destructively on the internal state of the yogurt matrix during the process, showing in turn a significant effect on the nature of the raw material.

**PALABRAS CLAVE:** Yogur, análisis de imagen, láser, fermentación, leche, textura.

## 1. INTRODUCCIÓN.

En la Unión Europea, la principal actividad de la industria manufacturera es la industria alimentaria, representando el 14,6% de las ventas y un valor superior a los 1.244.000 millones de euros. (Food Drink Europa, 2014-2015). En España la industria agroalimentaria se posiciona en primer lugar en la rama industrial, desempeñando un papel fundamental en el conjunto de los sectores económicos. Es una pieza esencial en la cadena alimentaria, ya que se sitúa como eslabón intermedio, aportando valor añadido a la producción primaria y siendo el principal consumidor del sector agrario. Se encuentra en continua innovación, reinventándose y adaptándose a las nuevas tecnologías y costumbres y a las constantes exigencias de los consumidores, siendo partícipe de su día a día a través de algo tan necesario como la alimentación.

Dentro de la industria alimentaria, el sector lácteo es aquel que elabora productos procedentes de la leche. Son varios los tipos de productos finales que se incluyen en el sector, destacando la fabricación de leche envasada para consumo, quesos, yogur, mantequilla, helados y postres lácteos. Del total de las empresas que constituyen la industria alimentaria en España, en el periodo 2014/2015, el 5,5 % pertenecía a este sector, el cual desempeña un puesto clave dentro de la dieta mediterránea (MAPAMA. 2014/2015).

En la familia de los lácteos, se define al yogur como el producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada y otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche (BOE, 271/2014). Este producto, ha sido elaborado durante miles de años, con el propósito inicial de alargar la vida útil de la leche (Tamime y Robinson, 2007), dónde se le atribuían propiedades curativas y medicinales, especialmente para dolencias digestivas. Ofrece un considerable aporte nutricional, siendo una excelente fuente de macro y micronutrientes, contiene proteínas de alta calidad, carbohidratos digeribles, Ca, Mg, P y vitamina B<sub>12</sub> entre otros. Su composición única ofrece beneficios adicionales sobre la salud, como la reducción del riesgo de padecer diabetes de tipo II (Chen et al., 2014; O'Connor et al., 2014; Diaz-López et al., 2015) y la prevención de enfermedades cardiovasculares (ECV) (Astrup, 2014). En los últimos años, su comercialización ha experimentado grandes cambios, creando un mercado ampliamente segmentado que ofrece una variedad de productos tales como edulcorados, aromatizados, bajos en grasa, bebibles, probióticos y otros yogures con propiedades funcionales para la salud.

Por otra parte, en la actualidad, existe cada vez un mayor interés por garantizar la seguridad y calidad de los alimentos de consumo humano. La mejora de la calidad de los productos y el aumento de la competitividad de las empresas es una necesidad para poder afrontar las nuevas exigencias que impone el mercado mundial. Las crecientes tendencias hacia la garantía de calidad e inocuidad de estos alientan la implementación de sistemas automáticos de control de procesos para reemplazar los sistemas tradicionales que son menos confiables y eficientes. El desarrollo de tecnologías en línea que permitan estimar la composición y estructura de la

materia prima de manera rápida y sin comprometer la integridad del producto supone una gran ventaja para la industria. La aplicación de métodos rápidos, precisos y fiables para evaluar la calidad y seguridad de los alimentos fomenta el desarrollo de técnicas no destructivas (ElMasry et al., 2011). Las nuevas tecnologías rápidas y no destructivas permiten inspeccionar y monitorizar un proceso industrial midiendo variables de interés, a veces complejas, de modo rápido y sin necesidad de alterar o destruir la muestra. Entre estas tecnologías se encuentran la visión artificial, a partir del cual se realiza el análisis de imágenes visibles (Jackman et al., 2008; 2009a), imágenes hiperespectrales (Gamal y Da-Wen, 2010), rayos X (Frisullo et al., 2010) y modelización 3D (Uyar y Erdoğdu, 2009; Kim et al., 2008). Aunque gran parte de estas aún estén en periodo de desarrollo, hasta el momento son numerosas las puertas que se abren para el sector. Este tipo de técnicas permiten medir desde variables físicas visibles por el humano hasta otras de naturaleza quimiométrica, como la concentración de un determinado compuesto (la cantidad de grasa, de agua, de azúcares, etc.). El uso de análisis de imagen es una herramienta de gran utilidad por tratarse de un análisis no destructivo, pudiéndose valorar un producto in situ a pie de línea sin necesidad de tocarlo. El cambio en las propiedades físicas o químicas del producto durante el proceso provoca una variación en la señal que es medible tras aplicar técnicas de tratamiento y análisis estadístico. Son pocos los estudios recientes que se pueden encontrar sobre técnicas no destructivas para el control del procesamiento del yogur. Algunos ejemplos son la monitorización de la fermentación de yogur utilizando lenguas electrónicas, (Wei et al., 2017), métodos de impedancia acústica (Meng et al., 2011) o una combinación de NIR y narices electrónicas (Navrátil et al., 2004). En este caso, se exploran los fenómenos de interacción entre la luz y la matriz durante el procesado, concretamente los cambios generados en el patrón de difracción de la luz (láser) tras atravesar la leche a lo largo de diferentes puntos del fermentado. Así pues, en el presente estudio, el objetivo es la monitorización de la evolución de la leche de vaca, cabra y oveja hasta transformarse en yogur, mediante el estudio de la variación de los patrones de difracción generados por un láser tras atravesar la matriz láctea usando análisis de imagen.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Materia prima**

Para la elaboración del yogur se utilizaron leches semidesnatadas pasteurizadas de diferentes especies: vaca (Hacendado), cabra y oveja (El Cantero de Letur), leche en polvo desnatada (Hacendado), para estandarizar la materia seca del producto hasta un 15%, e inóculo proveniente de yogures comerciales naturales (Hacendado). La composición proximal de las materias primas, facilitada por el fabricante, se recoge en la tabla 1.

**TABLA 1.** Composición nutricional de las leches utilizadas en la elaboración del yogur expresada por 100 g.

Nutrientes	Leche en polvo	Leche de vaca	Leche de cabra	Leche de oveja
Proteínas	33,0 g	3,0 g	3,3 g	5,2 g
Grasas	1,0 g	1,5 g	1,6 g	1,9 g
Carbohidratos	54,0 g	4,6 g	4,5 g	5,5 g
Calcio	1,200 g	0,114 g	0,145 g	0,218 g

## 2.2 Preparación de yogur

El protocolo de elaboración de yogur utilizado se basó en estudios previos de otros autores (Bruzzone et al., 2012; Wei et al., 2016; Lee y Lucey, 2010), con algunas adaptaciones. En primer lugar, se adicionó el inóculo comercial de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a cada leche (4% m/m) y se adicionó la cantidad leche en polvo (hasta estandarizar la materia seca total a un 15% en función de la leche utilizada). Una vez mezcladas las materias primas, se homogeneizaron durante un tiempo aproximado de 5 minutos, en una placa calefactora y agitadora a 500 rpm hasta alcanzar los 46°C. Tras alcanzar la temperatura, se envasaron 50 g de la muestra en recipientes comerciales de yogur (H= 65 mm; Ø = 55 mm). Una vez pesados se introdujeron en la una cámara para llevar a cabo la fermentación, que se realizó en condiciones controladas de humedad relativa (90%) y temperatura (46°C), durante 210 minutos, que fue el tiempo necesario para alcanzar un pH de 4,6, el cual se establece en la legislación como límite para considerar yogur al producto (BOE, 271/2014). Se realizaron cuatro repeticiones de cada leche con cuatro lotes diferentes.

## 2.3 Análisis de pH

Las medidas de pH se realizaron con un pH-meter BASIC 20+ de la casa CRISON, en intervalos de 30 minutos, desde tiempo 0 hasta pH 4,6 (210 minutos) a temperatura de fermentación, realizando 3 medidas de pH por cada tiempo de análisis.

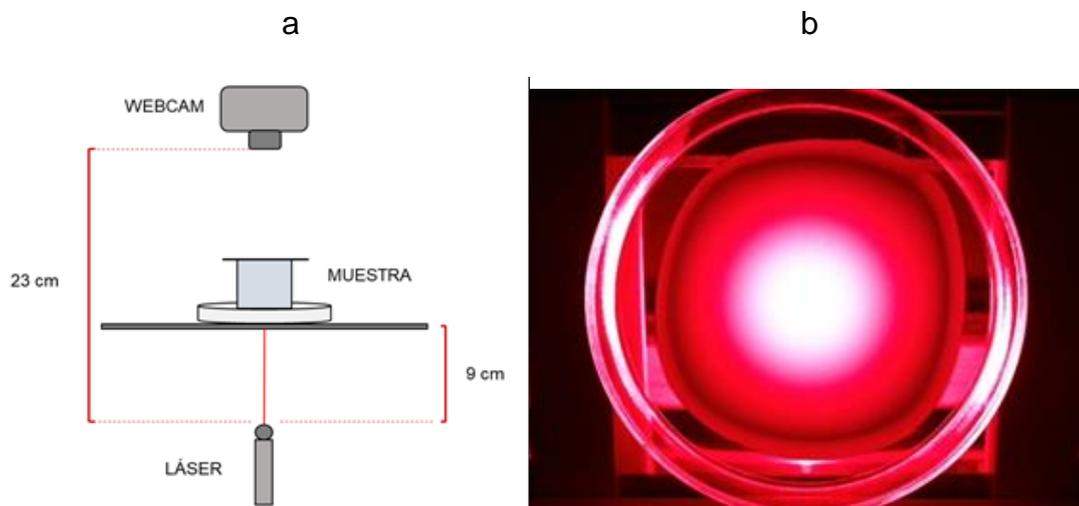
## 2.4 Análisis de textura

La textura del yogur fue caracterizada mediante el método back-extrusion descrito por varios autores (Patrignani et al., 2007; Pereira et al., 2003; Staffolo et al., 2004). La experiencia se realizó en un analizador de textura TA-TX2 texture analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK), equipado con una célula de carga de 25 kg. El software utilizado para el análisis de datos fue Exponent (Stable Micro Systems Ltd, version 6.1.11.0) y los parámetros evaluados fueron: pico máximo positivo, pico máximo negativo, área positiva y área negativa.

Las muestras fueron analizadas en un envase comercial de yogur de 125 g, utilizando un disco de extrusión ( $\varnothing = 35$  mm), funcionando a una velocidad de ensayo fija de  $1,0 \text{ mm s}^{-1}$ , a una profundidad del 90% de la altura de la muestra (30 mm). Para ello se analizaron dos muestras de cada tiempo (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210), realizando dos repeticiones de cada una. Para cada uno de los tiempos, previo al ensayo las muestras fueron atemperadas a  $4^{\circ}\text{C}$  en frigorífico.

## 2.5 Dispositivo de captura de imagen

El sistema se instaló dentro de una cámara de humedad y temperatura controlada, de la casa Mas Baga. El dispositivo estaba formado por una webcam (Logitech), un láser diodo de alineación rojo de punto, que emite luz coherente a  $650 \text{ nm}$ , con una potencia de  $50 \text{ mW}$  y una placa de Petri como soporte transparente de la muestra. Los elementos se anclaron con soportes metálicos fijados a la estructura de la cámara. Los elementos se dispusieron según se muestra en la figura 1a, donde la webcam capturó imágenes RGB (en formato .bmp) de los patrones de luz formados por el láser (figura 1b) al atravesar la muestra, dispuesta en la zona central. La captura de imagen se realizó durante el proceso de fermentación en intervalos de 15 minutos, desde el minuto 0 hasta el 210. En cada momento de captura de imagen el láser era automáticamente activado y desactivado posteriormente para no influir en el proceso. Se capturaron tres imágenes a cada tiempo.



**FIGURA 1.** a. Esquema del dispositivo de captura de imagen; b. Patrón creado por el láser al atravesar la muestra.

### 2.5.1 Análisis de información

El procesado de las imágenes y extracción de la información se llevó a cabo mediante el análisis de la evolución de los patrones capturados en cada

imagen. Para ello se aislaron las zonas de cambio de los patrones a diferentes tiempos mediante su comparación con el patrón a tiempo 0. Tras el aislamiento de dichas zonas se procedió a obtener la frecuencia de píxeles en cada valor de color (0-255) para cada canal RGB (rojo, verde y azul) en forma de histogramas, los cuales se utilizaron como espectros para el posterior análisis estadístico multivariante.

Cada bloque de imágenes correspondiente a una fermentación dada se procesó siguiendo los siguientes pasos:

1. Selección y recorte de la región de interés (patrón láser).
2. Fragmentación de las imágenes en sus tres canales de color RGB: obtención de los patrones generados en cada capa de color (rojo, verde y azul) de la imagen original.
3. Aislamiento de las zonas de cambio de las imágenes de cada canal: obtención de las imágenes “diferencia” tras restar a todo el bloque de imágenes capturadas durante el proceso ( $t_{15\text{min}} \dots t_{210\text{min}}$ ) la imagen de  $t_0$ .
4. Obtención de histogramas: cálculo de las frecuencias de píxeles en cada valor de color para cada canal (desde negro hasta rojo puro, verde puro y azul puro).
5. Organización de los datos: al final del proceso cada imagen “diferencia” generó tres histogramas (rojo, verde y azul) de 255 datos cada uno, que dispuestos en serie formaron espectros de 765 variables.

## 2.6 Análisis estadístico

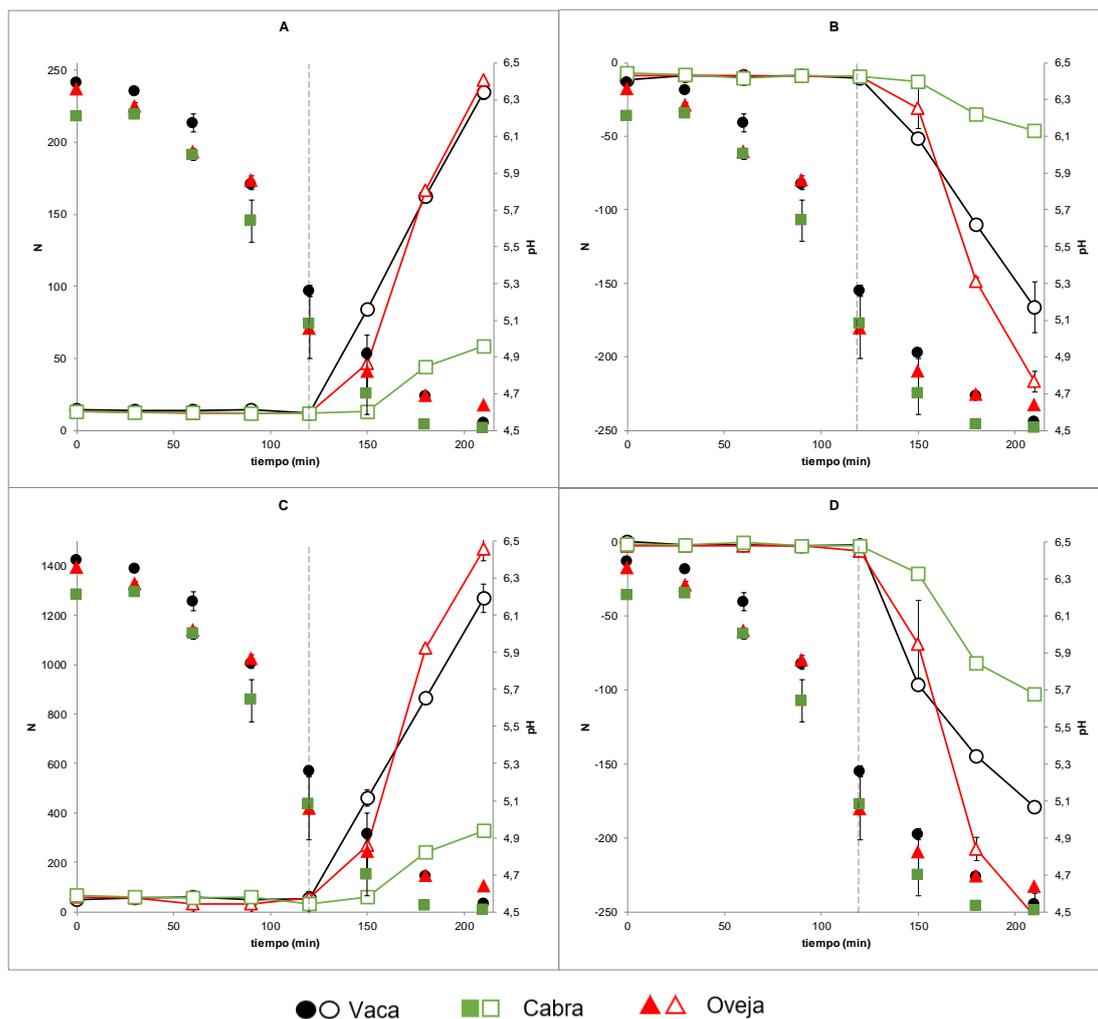
Se realizó un análisis de varianza ANOVA simple del pH, así como de los parámetros analizados en textura, para observar si existían diferencias significativas entre el pH de los distintos tipos de leche. El software utilizado fue Statgraphics Centurion XV.I versión 16.01.0017. Se consideró el valor de  $p < 0,05$  estadísticamente significativo para todos los análisis. Los datos de imagen se exploraron mediante la utilización del Análisis de Componentes Principales (PCA) con el objetivo de reducir la dimensionalidad de la matriz de datos y detectar patrones de interés dentro del objetivo del experimento. El análisis de la dependencia entre la matriz de datos de imagen y los resultados fisicoquímicos se llevó a cabo mediante regresiones utilizando el análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) y Support Vector Machines (SVM). La bondad del análisis fue expresada por la suma cuadrática de los errores (RMSE) y el R cuadrado del ajuste ( $R^2$ ) entre los valores observados y los predichos. Para la realización del estudio, los datos fueron filtrados mediante un filtrado ortogonal y posteriormente estandarizados mediante un autoescalado. Estos estudios fueron llevados a cabo por medio de la herramienta PLS Toolbox 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, USA), una extensión en el ambiente computacional R2012a (The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Fase de fermentación de la leche

En la figura 2 se representa la evolución del pH y los resultados del estudio de textura frente al tiempo (min). La tabla 2 muestra los resultados del análisis de la varianza para los diferentes tiempos del proceso. El pH de origen de cada leche (tiempo 0) fue similar, aunque se obtuvieron diferencias significativas para la leche de cabra. El menor pH para la leche de cabra se mantuvo durante el proceso completo, aunque a tiempo final (220 min) todas las leches presentaron pH sin diferencias significativas, el cual determina la transformación en yogurt. En cuanto a las cinéticas de evolución del pH, se pudo observar cómo estas siguieron un mismo patrón en las tres leches, experimentando el cambio más pronunciado en el minuto 120 (Wei et al., 2017; Nöbel et al., 2016).

En los análisis de textura, todas las leches tuvieron un comportamiento constante hasta alcanzar los 120 minutos, correspondiente a un pH  $\approx$  5,3, en los que se experimentó un ascenso pronunciado del pico máximo positivo (figura 2A) y el área positiva (figura 2C), observándose como las leches de vaca y oveja tuvieron un comportamiento similar, mientras que la leche de cabra fue la que más se diferenció del resto, presentando menor resistencia. Las figuras 2B y 2D, correspondientes a los parámetros de pico máximo negativo y área negativa respectivamente, al igual que en las figuras anteriores, tuvieron un comportamiento similar hasta alcanzar los 120 min, observándose más diferencias entre leches, siendo el valor mínimo el de oveja y el mayor el de cabra. En este caso, a diferencia de los parámetros positivos comentados con anterioridad, la leche de vaca y oveja sí presentaron diferencias significativas al final del proceso, siendo mayores los valores para oveja. Por lo tanto, el incremento de resistencia a partir de 120 minutos en el caso de la oveja podría deberse a fenómenos diferentes al de la generación de una estructura "sólida" de la matriz (menor cuajado), puesto que presenta mayor adherencia. Esta adherencia significativamente alta en la oveja podría haber generado mayor resistencia también en la fracción del ensayo de compresión, debido al mayor contacto con las paredes del recipiente.



**FIGURA 2.** Representación del pH (símbolos rellenos) y variables obtenidas a partir del análisis de textura back extrusión (símbolos huecos) en la fase de fermentación de los diferentes tipos de leche (vaca, cabra y oveja). A: pico máximo positivo, B: pico máximo negativo, C: área positiva y D: área negativa.

Las diferencias observadas se deben en gran medida a las particularidades bioquímicas de los componentes de cada materia prima en función de su origen. En concreto, las caseínas suelen generar bastante variabilidad en procesos como este. Estas son las proteínas mayoritarias de la leche, son insolubles a pH 4,6 y representan el 80% del total de proteínas. Existen cambios en su composición y estructura debido a que están constituidas por 4 subunidades proteicas, denominadas  $\alpha$ -s1,  $\alpha$ -s2,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas (Schlimme y Buchheim, 2002), y estas a su vez presentan diferencias según su origen. Estas diferencias influyen principalmente en la formación del coágulo durante la fase de fermentación, la cual se ocasiona cuando las micelas de caseína se encuentran a un pH cercano a 4,6, produciéndose una asociación en forma de cadenas o conglomerados formando una estructura tridimensional en la que el suero queda atrapado (Mottar et al., 1989; Kalab et al., 1975; Robinson

et al., 1986). A pH altos (>5,4), las micelas de caseína mantienen su estado nativo (100- 250 nm), pero cuando el pH alcanza valores de  $\approx 5,1$ , (donde se observan los cambios en la figura 2), las partículas sufren disociaciones parciales formando subpartículas de menor tamaño (30- 40 nm), y cuando se alcanza un pH en el rango 4,3-4,8, las partículas de caseína forman grandes conglomerados que atrapan la grasa y el suero, y que son responsables de la viscosidad del producto (Parnell-Clunies et al., 1988). En el caso de la leche de cabra, incluso a una concentración igual de caseína que la leche de vaca y de oveja, presenta una estructura más inestable y un gel susceptible a rotura debido principalmente a las diferencias entre la distribución de las caseínas (Remeuf y Lenoir, 1986; Agnihotri y Prasad, 1993; Park et al., 2007; Domagala, 2009), siendo que la leche de cabra contiene una menor proporción de  $\alpha$ -caseína, la cual tiene relación con la dureza del gel. Esto podría explicar la diferencia del comportamiento de la leche de cabra, la cual, aun alcanzando el mismo pH que las demás, presenta una textura poco consistente.

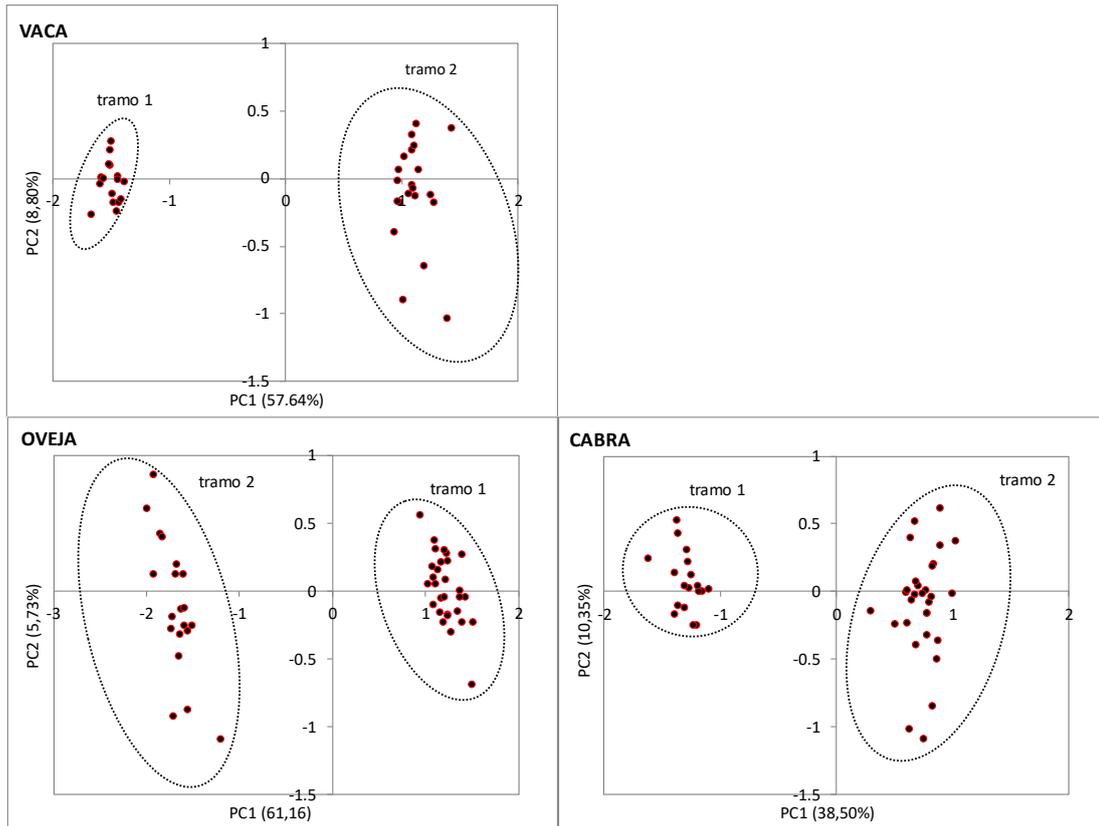
**TABLA 2.** Análisis de la varianza ANOVA simple.

Media $\pm$ DE	pH	Pico máximo positivo	Pico máximo negativo	Área positiva	Área negativa
Vaca 0	6,39 $\pm$ 0f	12,79 $\pm$ 0,16a	-8,23 $\pm$ 2,52e	5,13 $\pm$ -0,8a	-0,8 $\pm$ 0,99e
Vaca 150	4,92 $\pm$ 0,02d	84,23 $\pm$ 2,11c	-51,33 $\pm$ 3,5c	32,25 $\pm$ -96,29c	-96,29 $\pm$ 4,04c
Vaca 210	4,54 $\pm$ 0ab	234,77 $\pm$ 4,64d	-166,15 $\pm$ 17,11b	58,68 $\pm$ -178,79d	-178,79 $\pm$ 1,26b
Cabra 0	6,21 $\pm$ 0,01e	13,13 $\pm$ 0,65a	-7,14 $\pm$ 1,3e	8,23 $\pm$ -1,67a	-1,67 $\pm$ 0,04e
Cabra 150	4,7 $\pm$ 0,11c	13,13 $\pm$ 0,81a	-12,5 $\pm$ 0,73e	0,86 $\pm$ -21,73a	-21,73 $\pm$ 1,3e
Cabra 210	4,51 $\pm$ 0,01ab	58,76 $\pm$ 0,48b	-46,09 $\pm$ 1,62cd	5,16 $\pm$ -102,73b	-102,73 $\pm$ 1,11c
Oveja 0	6,36 $\pm$ 0f	13,02 $\pm$ 0,81a	-8,7 $\pm$ 1,71e	1,98 $\pm$ -2,68a	-2,68 $\pm$ 0e
Oveja 150	4,82 $\pm$ 0,1d	46,84 $\pm$ 18,98b	-30,76 $\pm$ 13,85d	132,13 $\pm$ -68,97b	-68,97 $\pm$ 29,19d
Oveja 210	4,64 $\pm$ 0bc	243,3 $\pm$ 0,73d	-216,74 $\pm$ 7a	48,44 $\pm$ -252,61e	-252,61 $\pm$ 15,44a

### 3.2 Análisis de imagen

Una vez obtenida la matriz de datos procedente de la información generada por cada una de las imágenes, se procedió a realizar el análisis estadístico de estos. Para ello inicialmente se realizó un análisis de PCA con la finalidad de observar la agrupación espontánea de los datos. Este análisis se realizó por separado para cada una de las leches (figura 3). Los resultados mostraron una reducción de la dimensionalidad de los datos a 2 variables (componente principal 1 (PC1) y 2 (PC2)) para las tres leches, así como la agrupación espontánea de las muestras en dos categorías, si bien el peso fundamental de las componentes recayó sobre la primera (57,64%, 38,50% y el 61,16%), siendo el peso para la componente 2 menor (8,80%, 10,35% y el 5,73% de la varianza total de las leches de vaca, cabra y oveja respectivamente).

El análisis de la componente 1 mostró como las dos categorías formadas correspondían a los dos tramos observados en textura. Así, el primer grupo (tramo 1) fue el formado por las muestras correspondientes a las imágenes tomadas hasta el minuto 120 (hasta pH~5,1), el cual ocurre sin cambios de textura (figura 2). El segundo grupo (tramo 2) lo formaron las muestras a partir de este tiempo, en el que se evidenciaron incrementos importantes de textura (figura 2).

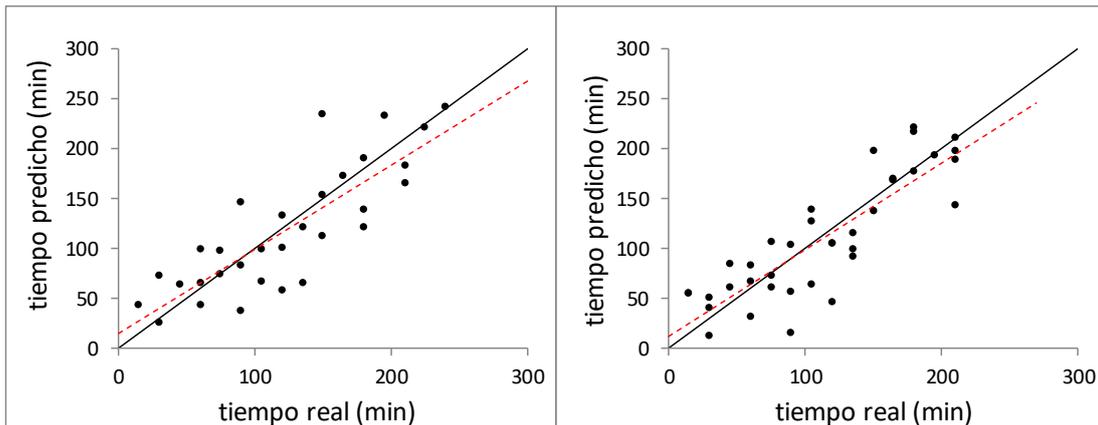


**FIGURA 3.** Análisis de componentes principales para los datos extraídos de las imágenes durante el proceso de fermentación. Las circunferencias indican los grupos de muestras pertenecientes al primer tramo (textura constante) y segundo tramo (variación de textura).

Tras el análisis de los componentes principales, y de observar que los datos de imagen sí recogen la variabilidad generada entre los tramos, se procedió a la realización de un análisis de la dependencia de los datos de imagen para testar si estos pueden cuantificar los cambios observados en la matriz, en base al tiempo de fermentación y a los cambios de pH y textura. Puesto que a pesar de que existen dos tramos diferenciados a través del tiempo, y todas las variables medidas son función de este, se realizó un estudio de correlación de la matriz de datos de imagen con el tiempo de principio a fin, incluyendo los dos tramos. Para ello, dado que los cambios en pH y textura no fueron lineales, se utilizó el método de modelización no-lineal Support Vector Machines Regression (SVM-R). En el caso del pH y de la

textura, el estudio se realizó teniendo en cuenta los dos tramos por separado y considerando las variaciones en ambos tramos como lineales. En estos casos, la modelización se realizó mediante un modelo lineal como es el PLS.

La tabla 3 muestra los valores de los coeficientes de calibración y cross-validación obtenidos en los modelos SVM-R y PLS para las variables en las que se obtuvieron valores de  $R^2$  elevados para alguna de las leches. Como puede observarse, la dependencia de los datos de imagen con el tiempo mostró valores elevados para vaca, algo menores en oveja, y muy bajos para cabra ( $R^2$  de cross-validación = 0.90, 0.74 y 0.03 respectivamente). Este resultado podría indicar una mayor variabilidad recogida por el dispositivo a lo largo del estudio de fermentación cuando se usa leche de vaca que cuando se usa de oveja o cabra, lo que estaría vinculado a mayores cambios sufridos por la matriz láctea durante dicho proceso. A modo de ejemplo, en la figura 4, se muestran los datos de tiempo predicho en base al modelo generado con los datos de imagen para vaca y oveja. Aunque la relación es buena, la presencia de residuos es relativamente alta, con lo que se puede concluir que existe una relación entre los cambios temporales y los datos de imagen, si bien ésta no es suficiente como para poder obtener un modelo predictivo.



**FIGURA 4.** Datos de tiempo predichos en base a los datos de imagen con SVM-R. Correlación de tiempo observado y predicho tras cross-validación (CV). Línea negra: ajuste teórico  $x=y$ ; línea roja punteada: ajuste de los datos reales. Izquierda: vaca, derecha: oveja.

El estudio de la dependencia de los datos de imagen con los de pH y textura, en los tramos 1 y 2 (tabla 3), mostraron como la leche de vaca fue la que tuvo los coeficientes más elevados en ambos tramos y para todas las variables. Es importante resaltar que a pesar de que en el primer tramo no se registran variaciones en la textura de la matriz, los cambios producidos hasta el comienzo de estas sí son recogidos por el dispositivo de imagen, pudiendo ser relacionados con la evolución del pH.

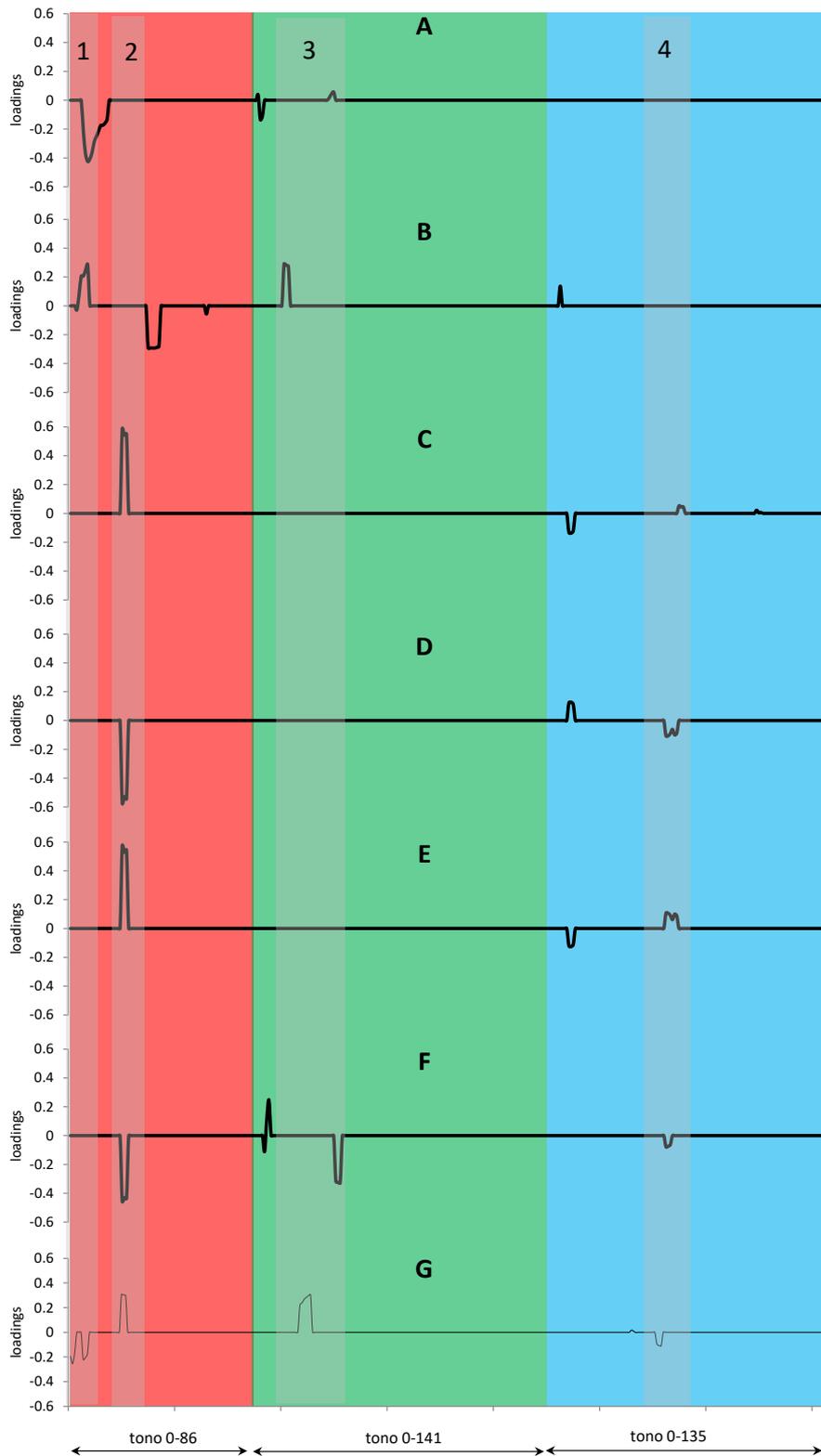
Los resultados correspondientes a las leches de cabra y oveja no fueron tan favorables como lo fue con la leche de vaca. En el caso de la leche de cabra, las únicas variables que tuvieron una buena relación con los datos de imagen fueron la fuerza máxima positiva y la fuerza máxima negativa en el

segundo tramo. La mejora de estos coeficientes con respecto a los obtenidos para el tiempo es debida a la mayor evolución de la textura en el segundo tramo, que, aunque reducida, fue recogida por el dispositivo, si bien por su poca magnitud está muy afectada por el “ruido”, el cual no influyó por igual en todos los parámetros. Por otra parte, en la leche de oveja, la variable que obtuvo la mejor relación de datos con los de imagen fue el pH en el segundo tramo y con una menor relación, pero también importante, la variable de fuerza máxima negativa. Esto determina que efectivamente se registraron cambios en este tipo de leche, aunque estos no generaron suficientes cambios en la matriz como en el caso de la vaca, lo cual ya quedó evidenciado en el estudio de textura, en la que esta fue más pegajosa que en la de vaca, mostrando por tanto un cuajado menos firme.

Con la finalidad de evaluar qué cambios en la matriz de la leche (de los analizados fisicoquímicamente a lo largo del proceso de fermentación) están influyendo en mayor medida sobre la variabilidad de las imágenes a lo largo del tiempo de estudio, se procedió a relacionar todos los loadings de los modelos desarrollados para los parámetros de textura y pH con los de tiempo (figura 5). Este estudio solo se realizó para la leche de vaca dados los buenos resultados obtenidos. Además, con la finalidad de obtener los loadings del modelo que relaciona la variabilidad de las imágenes con el tiempo, se tuvo que evaluar de nuevo dicha dependencia, pero esta vez mediante el estudio PLS, asumiendo que el comportamiento es lineal, pues a partir del estudio SVM-R realizado inicialmente (tabla 3) no se pueden obtener dichos loadings. Los resultados de la bondad del nuevo análisis mostraron un  $R^2$  de cross-validación de 0,93, similares al obtenido con el empleo del SVM-R, pero con errores cuadráticos muy superiores (tabla 3), si bien asumidos con el fin de poder obtener los loadings los cuales se muestran en la figura 5 G.

**TABLA 3.** Tabla de resultados del análisis de la dependencia con el tiempo, a lo largo del estudio, y para el pH, fuerza máxima y área positiva en los tramos 1 y 2, en los casos en los que se ha obtenido un valor elevado del R<sup>2</sup> para alguna de las leches.

		<b>Vaca</b>	<b>Cabra</b>	<b>Oveja</b>
<b>Tiempo (total-SVM-R)</b>	RMSECal	0,74	24,71	1,94
	RMSECV	18,08	84,68	28,08
	R <sup>2</sup> Cal	<b>0,990</b>	0,840	<b>0,990</b>
	R <sup>2</sup> CV	<b>0,900</b>	0,028	0,740
<b>Tiempo (total PLS)</b>	RMSECal	11,78	35,74	19,37
	RMSECV	16,98	47,62	29,52
	R <sup>2</sup> Cal	<b>0.966</b>	0,68	0,89
	R <sup>2</sup> CV	<b>0.934</b>	0,043	0,78
<b>pH (1<sup>er</sup> tramo PLS)</b>	RMSECal	0,00	0,29	0,09
	RMSECV	0,02	0,32	0,14
	R <sup>2</sup> Cal	<b>0,998</b>	0,320	0,870
	R <sup>2</sup> CV	<b>0,950</b>	0,180	0,740
<b>pH (2<sup>o</sup> tramo-PLS)</b>	RMSECal	0,00	0,02	0,01
	RMSECV	0,02	0,06	0,04
	R <sup>2</sup> Cal	<b>0,998</b>	<b>0,940</b>	<b>0,990</b>
	R <sup>2</sup> CV	<b>0,950</b>	0,520	<b>0,930</b>
<b>Fuerza máxima positiva (2<sup>o</sup> tramo PLS)</b>	RMSECal	3,05	0,30	12,13
	RMSECV	9,19	4,37	38,31
	R <sup>2</sup> Cal	<b>0,990</b>	<b>0,990</b>	<b>0,970</b>
	R <sup>2</sup> CV	<b>0,960</b>	0,830	0,790
<b>Fuerza máxima negativa (2<sup>o</sup> tramo PLS)</b>	RMSECal	2,37	0,19	2,19
	RMSECV	13,41	2,88	26,04
	R <sup>2</sup> Cal	<b>0,990</b>	<b>0,990</b>	<b>0,990</b>
	R <sup>2</sup> CV	<b>0,890</b>	0,820	<b>0,880</b>
<b>Área positiva (2<sup>o</sup> tramo-PLS)</b>	RMSECal	12,70	31,16	68,41
	RMSECV	70,30	374,61	209,50
	R <sup>2</sup> Cal	<b>0,990</b>	0,650	<b>0,967</b>
	R <sup>2</sup> CV	<b>0,900</b>	0,100	0,779
<b>Área negativa (2<sup>o</sup> tramo PLS)</b>	RMSECal	4,42	9,29	5,81
	RMSECV	11,10	109,46	70,01
	R <sup>2</sup> Cal	<b>0,980</b>	0,610	<b>0,990</b>
	R <sup>2</sup> CV	<b>0,890</b>	0,100	0,380

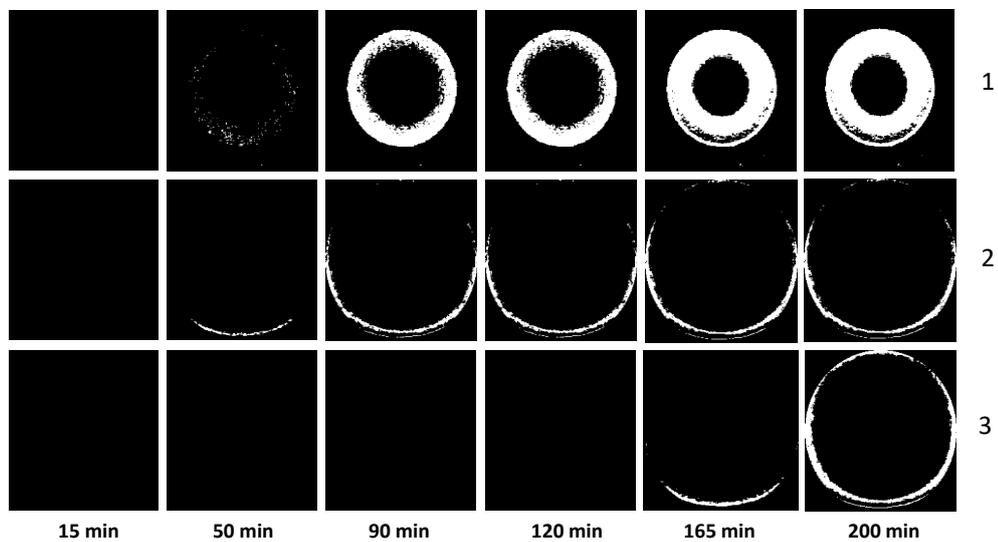
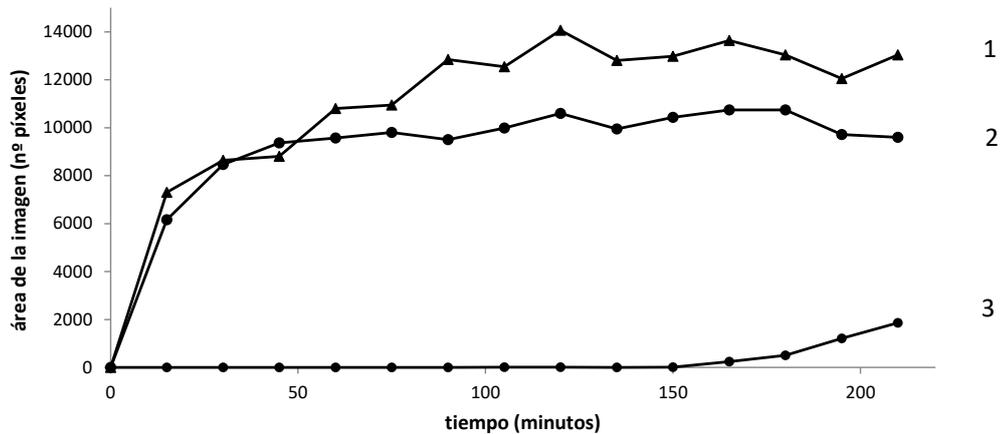


**FIGURA 5.** Espectro de loadings en los canales RGB en la leche de vaca. Los colores a lo largo del eje X, representan los tonos de los colores de los canales rojo, verde y azul respectivamente. A: pH tramo 1, B: pH tramo 2, C: fuerza máxima positiva, D: fuerza máxima negativa, E: área positiva, F: área negativa y G: tiempo.

En general, como se observa en la figura 5, el canal que más información recogió fue el canal rojo (mayor número de picos y tamaño de estos), seguido del verde y azul. Para el modelo tiempo (figura 5 G), los tonos más influyentes (franjas grises verticales 1, 2, 3 y 4 en figura 5G) fueron los primeros tonos rojos, seguidos de los tonos del 25 al 30, también del canal rojo, los tonos del 21 al 26 del canal verde y finalmente del tono del 47 al 51 del canal azul. Los primeros fueron los mismos que influyeron en gran medida en el modelo desarrollado para la evolución del pH durante el primer tramo, aunque también durante el segundo, los cuales obtuvieron  $R^2$  de cross-validación elevados (tabla 3). Los correspondientes a los tonos 25 – 30, del canal rojo, también lo fueron de los modelos relacionados con la evolución de la textura durante el segundo tramo (fuerza positiva y negativa y área positiva y negativa), mientras que los de la tercera franja, correspondientes a los tonos del 21 al 26 del canal verde lo fueron del modelo para el segundo tramo de evolución del pH. Finalmente, los tonos bajo la franja gris 4 de la figura 5G, correspondientes a los tonos 47 al 51, del canal azul, también relacionados con los modelos de textura, pero en menor peso que los aportados por el canal rojo.

Pero el estudio de estos tonos a lo largo del proceso de fermentación muestra como estos no evolucionan por igual. Para tal estudio, las imágenes se segmentaron para cada franja de píxeles comunes (franjas grises de la figura 5), calculándose el número total de píxeles de cada franja en cada imagen y representándose frente al tiempo de fermentación (figura 6).

Como se puede observar, a pesar de no presentar cambios en la textura durante el primer tramo, el área de la primera franja (1) y segunda (2) presentaron una evolución importante, observándose un incremento hasta un determinado tiempo, a partir del cual, el comportamiento es asintótico. Por otra parte, la evolución del área correspondiente a la tercera franja mantiene su valor en 0 hasta alrededor de los 150 minutos, donde empieza a presentar incremento hasta el final. Dichas áreas pueden ser observadas en la parte inferior de la figura 6, marcadas en color blanco en las imágenes binarias. Estos comportamientos revelan la diferente evolución de las diferentes zonas de la imagen, y su dependencia con los cambios en la matriz, la cual genera cambios en el patrón de luz resultado de la interacción de esta con el láser. Así pues, se demuestra que la evolución del patrón de luz en la imagen no es constante en todas sus zonas, las cuales pueden ser analizadas de forma individual para explicar y modelizar los cambios en los parámetros medidos a lo largo del tiempo. Estos cambios no resultaron tan evidentes en el caso de la oveja y cabra. Sin embargo, teniendo la constancia de que el proceso de fermentación puede ser monitorizado mediante el dispositivo utilizado, cabe esperar que, mediante la variación de algunos parámetros de este como, por ejemplo: potencia y enfoque del láser, distancia de la cámara a la muestra, intervalos de medida, etc., la monitorización de la fermentación de cabra y oveja pueda ser posible. Actualmente se están realizando pruebas con modificaciones en el dispositivo inicial para conseguir mayor sensibilidad a los cambios de estas leches y conseguir unos resultados al mismo nivel que los observados en la leche de vaca, para así obviar el efecto materia prima y conseguir un dispositivo válido para cualquier tipo de leche.



**FIGURA 6.** En la parte superior, representación gráfica del área de la imagen en píxeles frente al tiempo de las tres primeras bandas grises representadas en la figura 5. En la parte inferior, capturas de imagen de la evolución de los píxeles a lo largo del tiempo en esas mismas bandas. A: primera banda, B: segunda banda y C: tercera banda.

#### 4. CONCLUSIONES

La aplicación de la técnica de análisis de imagen de patrones láser se ha mostrado como una herramienta válida para la monitorización de la etapa de fermentación en la leche de vaca. La técnica consiguió capturar información de forma rápida y no destructiva sobre el estado interno de la matriz del yogur durante el proceso. Sin embargo, en la leche de oveja y cabra, no se obtuvieron unos resultados tan favorables como en vaca, concluyendo así la influencia de la materia prima. Cabe esperar que, en la realización de futuros estudios, mediante la modificación de algunos parámetros y ajuste del

dispositivo y nuevas herramientas de procesamiento de imagen, se obtengan resultados tan favorables como los obtenidos con la leche de vaca.

## 5. REFERENCIAS

- Agnihotri, M. K., and Prasad, V. S. S. (1993). Biochemistry and processing of goat milk and milk products. *Small Ruminant Research* **12**, 151–170.
- Astrup, A. (2014). Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **99** (5 Suppl.), 1235S.
- Bruzzone, F., Ares, G and Giménez, A. (2012). Temporal aspects of yoghurt texture perception. *International Dairy Journal* **29**, 124-134.
- Chen, M., Sun, Q., Giovannucci, E., Mozaffarian, D., Manson, J.E., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2014). Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *BMC Medicine* **12**, 215.
- Díaz-López, A., Bullo, M., Martínez-González, M.A., Corella, D., Estruch, R., Fito, M., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., García de la Corte, F.J., Ros, E., Babio, N., Serra-Majem, L., Pinto, X., Muñoz, M.A., Frances, F., Buil-Cosiales, P., and Salas-Salvado, J. (2015). Dairy product consumption and risk of type 2 diabetes in an elderly Spanish Mediterranean population at high cardiovascular risk. *European Journal of Nutrition* **55** (1), 349–360.
- Domagala, J. (2009). Instrumental texture, syneresis and microstructure of yoghurts prepared from goat, cow and sheep milk. *International Journal of Food Properties*. **12**, 605–615.
- ElMasry, G., Iqbal, A., Sun, D.-W., Allen, P., and Ward, P. (2011). Quality classification of cooked, sliced Turkey hams using NIR hyperspectral imaging system. *Journal of Food Engineering*, **103**(3), 333-344.
- Frisullo, P. (2010). A Novel Approach to Study Biscuits and Breadsticks Using X-Ray Computed Tomography. *Journal of Food Science*, **6**, 353-358.
- Gamal, E., and Sun, D., (2010). Meat Quality Assessment Using a Hyperspectral. *Imaging System. Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*. **Chap 6**. Academic Press.
- Jackman, P., Sun, D.W., Du, C.J., and Allen, P. (2009a). Prediction of beef eating qualities from colour, marbling and wavelet surface texture features using homogenous carcass treatment. *Pattern Recognition*, **42**(5), 751-763.
- Jackman, P., Sun, D.W., Du, C.J., Allen, P., and Downey, G. (2008). Prediction of beef eating quality from colour, marbling and wavelet texture features. *Meat Science*, **80**(4), 1273-1281.
- Kalab, M., Emmons, D.B., and Sargant, A.G. (1975). Milk-Gel Structure. IV. Microstructure of Yoghurts in Relation to the Presence of Thickening Agents, *Journal of Dairy Research*, **42**, 453-458.
- Kim, G.W., Do, G. S., Bae, Y., and Sagara, Y. (2008). Analysis of Mechanical Properties of Whole Apple Using Finite Element Method Based on Three-Dimensional Real Geometry. *Food Sci. Technol. Res.*, **14** (4), 329 – 336.
- Lee, W., and Lucey, J. (2010). Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **23**, 1127-1136.
- Meng, R. F., Zhou, J. W., Ye, X. Q., and Liu, D. H. (2011). On-Line Monitoring of Yogurt Fermentation Using Acoustic Impedance Method. *Applied Mechanics and Materials*, **101–102**, 737–742.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2014-2015). Informe Anual de la Industria Alimentaria Española. [Consulta: 18 de mayo de 2017]. En: [http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industriaagroalimentaria/\\_informeanualindustriaalimentaria2014-2015\\_tcm7-421229.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industriaagroalimentaria/_informeanualindustriaalimentaria2014-2015_tcm7-421229.pdf).
- Mottar, J., et al., (1989). "Effect of Heat-Induced Association of Whey Proteins and Casein Micelles on Yogurt Texture", *J. Dairy Sci.*, **72**, 2247-2256.
- Navrátil, M., Cimander, C., and Mandenius, C.F. (2004). On-line Multisensor Monitoring of Yogurt and Filmjolk Fermentations on Production Scale. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(3), 415–420.

- Nöbel, S., Ross, N.L., Protte, K., Körzendörfer, A., Hitzmann, B., and Hinrichs, J., (2016). Microgel particle formation in yogurt as influenced by sonication during fermentation. *Journal of Food Engineering* **180**, 29-38.
- O'Connor, L., Lentjes, M., Luben, R., Khaw, K.T., Wareham, N., and Forouhi, N., (2014). Dietary dairy product intake and incident type 2 diabetes: a prospective study using dietary data from a 7-day food diary. *Diabetologia* **57** (5), 909–917.
- Park, Y. W., Juarez, M., Ramos, M., and Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **68**, 88–113.
- Parnell-Clunies, E., *et al.*, (1988). Gelation Profiles of Yogurt as Affected by Heat Treatment of Milk. *J. Dairy Sci.*, **71**, 582-588.
- Patrignani, F., Iucci, L., Lanciotti, R., Vallicelli, M., Maina Mathara, J., Holzapfel, W. H., *et al.* (2007). Effect of high-pressure homogenization, nonfat milk solids, and milkfat on the technological performance of a functional strain for the production of probiotic fermented milks. *Journal of Dairy Science*, **90**, 4513–4523.
- Pereira, R. B., Singh, H., Munro, P. A., and Luckman, M. S. (2003). Sensory and instrumental textural characteristics of acid milk gels. *International Dairy Journal*, **13**, 655–667.
- Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. Boletín Oficial del Estado, de 28 de abril de 2014, núm. 102, pp. 33154- 33157. [Consulta:21 de mayo de 2017]. En: [https://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-2014-4515#analisis](https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2014-4515#analisis).
- Remeuf, F., and J. Lenoir. (1986). Relationship between the physicochemical characteristics of goat's milk and its rennetability. Pages 68–72 in Bull. IDF no. 202. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium. Renner, E. 1993. *Milchpracticum*. Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany.
- Robinson, R.K., and Tamime A.Y. (1986). The Role of Protein in Yoghurt. *Developments in Food Proteins*, B.J.F. Hudson (comp.), Londres, Elsevier, 1-35.
- Schlimme, E. y Buchheim, W. (2002). Proteínas lácteas: caseínas, proteínas del suero y proteínas minoritarias. *La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas*. Acribia. Zaragoza, Spain, 33-75.
- Staffolo, M. D., Bertola, N., Martino, M., and Bevilacqua, A., (2004). Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, **14**, 263–268.
- Tamime, A.Y., Robinson, R., (2007). *Yoghurt - Science and Technology*. Woodhead Publishing.
- Uyar, R., Erdog̃du, F., (2009). Potential use of 3-dimensional scanners for food process modeling. *Journal of Food Engineering*, **93**, 337–343.
- Wei, Z., Zhang, W., Wang, Y., & Wng, J. (2017). Monitoring the fermentation, post-ripeness and storage processes of set yogurt using voltammetric electronic tongue. *Journal of Food Engineering*, **203**, 41–52.