

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL

MONITORIZACIÓN DE LA ETAPA DE CUAJADO DE QUESO MEDIANTE LA TÉCNICA NO DESTRUCTIVA DE IMAGEN BASADA EN EL ANÁLISIS DE PATRONES LÁSER

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.

AUTORA: VICTORIA PATRICIA VICENS MIRA
TUTOR: RAÚL GRAU MELÓ
DIRECTOR EXPERIMENTAL: SAMUEL VERDÚ AMAT
CURSO ACADÉMICO: 2018-2019
VALENCIA, septiembre 2019.

MONITORIZACIÓN DE LA ETAPA DE CUAJADO DE QUESO MEDIANTE LA TÉCNICA NO DESTRUCTIVA DE IMAGEN BASADA EN EL ANÁLISIS DE PATRONES LÁSER

RESUMEN

Las características finales de un queso son, entre otros, muy dependientes de cómo se dé su cuajado. El control de esta etapa se realiza caracterizando las características finales del cuajo obtenido, pero sin tener información de cómo se genera. Es por ello que en el presente trabajo se planteó la utilización de una técnica de análisis no destructiva, basada en el análisis de patrones laser de difracción, para su caracterización. Esta técnica se basa en hacer incidir la luz coherente de un láser sobre la muestra, de forma que este láser interacciona con la matriz del alimento, generando patrones de luz que se analizarán ulteriormente mediante el uso de descriptores y variables obtenidas de estos patrones y de los píxeles que componen las imágenes. El hecho de ser un análisis en continuo es un aspecto de crucial importancia, dado que el proceso de cuajado es un proceso dinámico y continuo. Esto es posible gracias a que se trata de una técnica no destructiva, lo que supone una gran ventaja sobre las tradicionales técnicas destructivas.

Para tal fin, se formularon diferentes leches mediante la incorporación de leche en polvo a tres niveles (1%, 6% y 8%), las cuales se cuajaron a 40°C tras la adición de cuajo animal. El cuajado se estudió de forma continua utilizando la técnica de imagen y mediante medidas textales (extrusión inversa) a ciertos tiempos de cuajado.

Los resultados han mostrado el potencial de la técnica basada en el reconocimiento de patrones de dispersión láser como técnica no destructiva para la caracterización en continuo del cuajado de queso fresco dada la alta sensibilidad a los cambios que se dan en la matriz durante el cuajado. Así esta permitió discriminar en función de la leche utilizada, describiéndose el cuajado en función de esta. La evolución de los descriptores se relacionó directamente con la textura de la cuajada a cada tiempo de estudio, siendo esta relación independiente del tipo de leche utilizada. Ello permitió generar un modelo de predicción el cual se testó con cuajadas con 2 y 4 días de refrigeración, siendo los resultados muy satisfactorios, si bien estos podrían ser mejorados mediante ajustes en la técnica de captura de imágenes.

PALABRAS CLAVE: cuajado, queso, difracción laser, textura

Autora: Vicens Mira, Victoria Patricia

Tutor: Grau Meló, Raúl

Director experimental: Verdú Amat, Samuel

València, septiembre de 2019.

MONITORITZACIÓ DE L'ETAPA DE QUALLAT DEL FORMATGE MITJANÇANT LA TÈCNICA NO DESTRUCTIVA D'IMATGE BASADA EN L'ANÀLISI DE PATRONS LÀSER.

RESUM

Les característiques finals d'un formatge són, entre altres, molt dependent de com es done el seu quallat. El control d'aquesta etapa es realitza caracteritzant les característiques finals del quall obtingut, però sense tindre informació de com es genera. És per això que en el present treball es va plantejar la utilització d'una tècnica d'anàlisi no destructiva, basada en l'anàlisi de patrons laser de difracció, per a la seua caracterització. Aquesta tècnica es basa en fer incidir la llum coherent d'un làser sobre la mostra, de manera que aquest làser interacciona amb la matriu de l'aliment, generant patrons de llum que s'analitzaran ulteriorment mitjançant l'ús de descriptors i variables obtingudes d'aquests patrons i dels píxels que componen les imatges. El fet de ser una anàlisi en continu és un aspecte de crucial importància, atés que el procés de quallat és un procés dinàmic i continu. Això és possible gràcies a que es tracta d'una tècnica no destructiva, la qual cosa suposa un gran avantatge sobre les tradicionals tècniques destructives.

Per a tal fi, es van formular diferents llets mitjançant la incorporació de llet en pols a tres nivells (1%, 6% i 8%), les quals es van quallar a 40°C després de l'addició de quall animal. El quallat es va estudiar de forma contínua utilitzant la tècnica d'imatge i mitjançant mesures de textura (extrusió inversa) a certs temps de quallat.

Els resultats han mostrat el potencial de la tècnica basada en el reconeixement de patrons de dispersió làser com a tècnica no destructiva per a la caracterització en continu del quallat de formatge fresc donada l'alta sensibilitat als canvis que es donen en la matriu durant el quallat. Així aquesta va permetre discriminar en funció de la llet utilitzada, descrivint-se el quallat en funció d'aquesta. L'evolució dels descriptors es van relacionar directament amb la textura de la quallada a cada temps d'estudi, sent aquesta relació independent del tipus de llet utilitzada. Això va permetre generar un model de predicció el qual es va testar amb quallades amb 2 i 4 dies de refrigeració, sent els resultats molt satisfactoris, si bé aquests podrien ser millorats mitjançant ajustos en la tècnica de captura d'imatges.

PARAULES CLAU: quallat, formatge, difracció laser, textura.

Autora: Vicens Mira, Victoria Patricia

Tutor: Grau Meló, Raúl

Director experimental: Verdú Amat, Samuel

València, setembre de 2019.

CHEESE CURDLING MONITORING BY NON-DESTRUCTIVE IMAGE TECHNIQUE BASED ON THE ANALYSIS OF LASER PATTERNS.

SUMMARY

The final characteristics of a cheese are, among others, very dependent on how its curd is given. The control of this stage is carried out by characterizing the final characteristics of the rennet obtained, but without having information on how it is generated. That is why in the present work the use of a non-destructive analysis technique, based on the analysis of laser diffraction patterns, was proposed for its characterization. This technique is based on influencing the coherent light of a laser on the sample, so that this laser interacts with the food matrix, generating light patterns that will be analysed further by using descriptors and variables obtained from these patterns and the pixels that make up the images. The fact of being a continuous analysis is an aspect of crucial importance, since the curdling process is a dynamic and continuous process. This is possible because it is a non-destructive technique, which is a great advantage over traditional destructive techniques.

In order to that objective, different milks were formulated by incorporating powdered milk at three levels (1%, 6% and 8%), which were set at 40°C after the addition of animal rennet. The setting was studied continuously using the imaging technique and by means of textural measurements (back extrusion) at certain set times.

The results have shown the potential of the technique based on the recognition of laser dispersion patterns as a non-destructive technique for the continuous characterization of the fresh cheese curd given the high sensitivity to the changes that occur in the matrix during curdling. Thus this allowed to discriminate based on the milk used, describing the curd according to this. The evolution of the descriptors was directly related to the texture of the curd at each time of study, this relationship being independent of the type of milk used. This allowed to generate a prediction model which was tested with curds with 2 and 4 days of refrigeration, the results being very satisfactory, although these could be improved by means of adjustments in the image capture technique.

KEYWORDS: curd, cheese, laser backscatter, texture.

Author: Vicens Mira, Victoria Patricia

Academic tutor: Grau Meló, Raúl

Experimental director: Verdú Amat, Samuel

València, september, 2019.

Índice de contenidos.	Página
1.INTRODUCCIÓN	1
2.OBJETIVOS.....	1
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3.1. MATERIA PRIMA.....	3
3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	3
3.3. ANÁLISIS DE TEXTURA.....	3
3.5. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	4
3.5.1. Dispositivo de captura de imagen.....	4
3.5.2 Procesado de datos.....	5
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN.....	6
4. RESULTADOS	7
4.1. FISICOQUÍMICOS.....	7
4.1.1 Proceso de cuajado.....	7
4.1.2. Periodo de refrigeración de la cuajada.....	8
4.2. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	8
4.3 RELACIÓN ENTRE LOS DATOS DE TEXTURA Y DE IMAGEN	13
5. CONCLUSIONES	14
6. BIBLIOGRAFÍA.....	15

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Composición de la materia prima.	3
Tabla 2. Composición aproximada de las formulaciones utilizadas para la realización de las experiencias.	3
Tabla 3. Ecuaciones obtenidas en el ajuste de los datos de PC1 (ecuación 1) y descriptor Ψ_d (ecuación 2) con los datos de textura.	13

Índice de Figuras

	Página
FIGURA 1. A. Esquema del dispositivo de captura de imagen; B. Patrón creado por el láser al atravesar la muestra.	4
FIGURA 2. A. Patrón de luz láser, a lo largo del tiempo de la experiencia, captado en el modelo de color RGB. B. Patrón de luz láser convertido a escala de grises (8 bits, 255 valores de gris) con esquema de los descriptores directos relativos obtenidos a partir del área (W_0 , W_1 , W_2 , W_3 y W_4). C. Esquema ejemplo de los descriptores directos obtenidos a partir del umbral de color (Ψ_a , Ψ_c , Ψ_f).	6
Figura 3. Resultados del análisis de textura por compresión durante el proceso de cuajado del queso. Barras negras expresan error estándar con un 95% de significancia.	7
Figura 4. Resultados del análisis de textura por compresión (A) y variación de masa (B) durante el periodo de refrigeración. Las barras negras expresan un error estándar con un 95% de significancia.	8
Figura 5. Valores de PC1 para el análisis de PCA de los descriptores de imagen a tiempo 0.	9
Figura 6. Valores de la PC1 (A) y de su incremento respecto a tiempo 0 (B), para el análisis de PCA a lo largo del tiempo de cuajado.	10
Figura 7. Valores de los loadings para la PC1 (A) para el análisis de PCA a lo largo del tiempo de cuajado.	10
Figura 8. Umbralización del descriptor Ψ_d (tono de gris comprendido entre el tono 75 y 51), a cuatro tiempos de estudio del cuajado, para las muestras con 1% y 8% de leche en polvo añadida.	11
Figura 9. Evolución de alguno de los descriptores de imagen (A, B, C y D) y de sus respectivos incrementos (E, F, G y H), a lo largo del tiempo de cuajado.	12
Figura 10. Relación con los valores de textura de la PC1 (A) y del descriptor de imagen Ψ_d (B) y de sus respectivos incrementos (D y C), a lo largo del tiempo de cuajado.	13
Figura 11. Valores de textura observados frente a predichos obtenidos mediante la ecuación 1 (A) y ecuación 2 (B). Negro: valores utilizados para obtener el modelo. Amarillo, azul y naranja: valores predichos a los 2 y 4 días de refrigeración de la cuajada.	14

1.INTRODUCCIÓN

‘Se entiende por queso el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche’ (BOE, 1113/2006).

En el proceso de elaboración del queso una de las etapas más importantes es el cuajado (Everard et. al., 2007). Este se puede realizar de dos formas: mediante la adición de enzimas que provocarían la transformación de las caseínas en paracaseínas que posteriormente insolubilizarán y formarán un gel irreversible o a través de la producción de ácidos que neutralizarían las cargas de las proteínas causando la insolubilización de las mismas y precipitando (Rosero, 2000). La coagulación enzimática se utiliza, en general, en la elaboración de quesos frescos, permitiendo la obtención de un producto con alto contenido de agua y con una ligera sensación ácida, que provocan que el producto tenga una corta conservación (Crespo, 2016). Por otra parte, la coagulación ácida da una cuajada desmenuzable y sin cohesión alguna, permitiendo un hilado fácil de la misma, produciendo quesos más porosos, poco compactos y más frágiles (Rosero, 2000) (M. A. R. M., 2019).

En el proceso de cuajado intervienen una gran cantidad de factores que influyen sobre este. Desde la materia prima, tiempo de cuajado, cloruro cálcico añadido (Arango y Castillo, 2018), temperatura de cuajado (Castillo et. al., 2006), etc. La variación de estos factores afectará al momento de corte de la cuajada, además de variar la humedad, rendimiento, calidad del queso, pérdidas en el desuerado... Dependiendo de los parámetros de cuajado que se empleen se obtendrán productos finales diferentes: una finalización y corte temprano de la cuajada puede provocar una pérdida excesiva de suero, afectando a la consistencia del producto final. En cambio, si se realiza de forma tardía se puede generar un gel excesivamente firme, incapaz de desuerar y que acumula una alta cantidad de agua, provocando un aumento negativo en la dureza del producto, ya que éste no viene acompañado de un aumento de calidad del queso (Castillo, 2006) (Derra et. al., 2017). En cuanto a la materia prima, las proteínas son el componente más influyente en su composición química. Provoca la variación de la firmeza en el producto y varía el tiempo necesario para obtener un cuajado adecuado (Dussualt-Chouinard et. al., 2019.) (Gregersen et. al., 2016.). Estas, además, se ven afectadas por el pH del producto, ya que provoca una variación en la red de proteínas: si el pH está cerca del punto isoeléctrico se favorece una red compacta gracias a las fuertes fuerzas iónicas e hidrófobas, mientras que un pH superior genera repulsión entre los agregados proteicos que provoca un aumento en la humedad del producto, además de un gel más elástico y menos compacto (Ramírez y Vélez, 2012).

Es por ello importante caracterizar el tipo de cuajada que se forma, permitiendo seleccionar los factores más adecuados que ofrezcan un equilibrio adecuado entre dureza y humedad, además de una tendencia de desuerado adecuada (Castillo, 2006) (Derra et. al., 2017)

(Crespo, 2016). Existen multitud de métodos de medición del cuajado que se pueden clasificar según la propiedad química o física medida: mecánicos, mediante reómetros con cuerpo suspendido (ViscoLite) o realizando un análisis de perfil de textura (TPA), con técnicas concretas como Formagraph, Vatímer o métodos online, como el Gelograph (Castillo, 2006) (O'Callaghan et. al., 2002). En la actualidad se buscan métodos de análisis no destructivos, los cuales permiten la inclusión de estos sistemas de medida en la línea de producción. Según la propiedad más interesante a medir, se pueden encontrar sistemas eléctricos, basados en la variación de la conductividad; sistemas térmicos, como el alambre caliente (Hot Wire) con el cual Sbodio y Revelli, 2012, consiguieron detectar cambios en el proceso de cuajado de un queso a los diez minutos, entre otros. La mayor amplitud se encuentra en las técnicas ópticas: desde técnicas basadas en colorimetría (Castillo, 2006) hasta las basadas en absorbancia, transmitancia o reflectancia de la luz (O'Callaghan et. al., 2002). Dentro de este último conjunto de técnicas destaca la técnica mediante NIR, capaz de predecir contenidos en grasa, proteína y humedad (Fagan et. al., 2008) o la técnica de retrodispersión de luz, utilizada en este estudio. Esta técnica, más conocida como "Light Backscatter" se basa en hacer incidir la luz coherente de un láser sobre la muestra, de forma que este láser interactúa con la matriz del alimento, generando patrones de luz que se analizarán posteriormente mediante el uso de descriptores y variables obtenidas de estos patrones y de los píxeles que componen las imágenes. En este proceso, la luz transmitida puede ofrecer información sobre la estructura y morfología del producto junto con los fotones retrodispersos que han interactuado con los componentes internos (Verdú et. al., 2019). Esta tecnología se ha utilizado en campos tan variados como es la medicina, para la determinación del volumen y de la concentración de hemoglobina (Tycko *et al.*, 1985), la odontología, para la detección de caries (Darling et al., 2006) o la astrofísica, para la determinación de pequeñas partículas procedentes de rocas espaciales (Maconi *et al.*, 2018), así como últimamente en alimentos para la determinación de sólidos solubles y firmeza en manzanas (Qing et. al., 2008), detección precoz de la descomposición de cítricos (Lorente et. al., 2013), en productos cárnicos, como el estudio realizado por Li et. al., 2016, para la evaluación de la frescura en carne de cerdo o incluso caracterización de galletas con fibra (Verdú et al., 2019).

Por tanto, la aplicación de la técnica de retrodispersión de luz para la caracterización en continuo del cuajado de leche podría ser interesante dado que nos podría aportar información rápida y de forma sencilla que podría ser utilizada para un mejor entendimiento y caracterizado de los posteriores quesos.

2.OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es evaluar la capacidad de la técnica basada en el reconocimiento de patrones de dispersión láser en continuo para la caracterización de la etapa de cuajado de queso.

Como objetivo específico se persigue determinar la evolución textural del cuajado del queso fresco para lo que se testarán formulaciones de leche en las que se incorporarán diferentes niveles de leche en polvo desnatada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIA PRIMA.

Para la elaboración de la cuajada de queso se utilizó leche de vaca entera fresca (Hacendado) y leche desnatada en polvo (Hacendado) cuyas composiciones, según declaran las empresas que las elaboran, se muestran en la Tabla 1. Además, también se utilizó cuajo de origen animal de la marca Nievi, así como una disolución de CaCl (3g/100mL).

Tabla 1. Composición de la materia prima.

	Carbohidratos (%)	Proteínas (%)	Grasa (%)	Sal (%)	Calcio (%)
Leche entera	4,5	3,1	3,5	0	0,11
Leche en polvo	54	33	1	1	

3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Con la finalidad de obtener diferentes cuajadas (tabla 2), en la experiencia se diseñaron tres tipos de formulaciones en las que se incrementó la cantidad de extracto seco (E. S.), adicionando leche en polvo al 1%, 6% y 8%.

El procedimiento fue común para todas las fórmulas. En primer lugar, se calentaron, hasta los 42°C, 150 ml de leche entera fresca bajo agitación, a la cual se le adicionó la leche en polvo en la proporción definida y 0,15 gramos de cloruro cálcico. La mezcla se repartió en cantidades de 50g por envase, siendo estos de plástico y con un diámetro de 55mm. Una vez atemperado, se adicionaron dos gotas de cuajo, y tras mezclar, las muestras se conservaron a 40°C durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, se sometieron a un baño de hielo durante cuatro minutos y posteriormente se almacenaron quince minutos en nevera. Antes de los ensayos, se atemperaron, sin llegar a perder parte del frío, durante cinco minutos a temperatura ambiente.

Tabla 2. Composición aproximada de las formulaciones utilizadas para la realización de las experiencias.

	Carbohidratos	Proteínas	Grasas	Sal	Calcio	E. S. inicial (%)
1%	5	3,4	3,48	0,14	0,11	12,12
6%	7,47	4,89	3,35	0,2	0,10	16,02
8%	8,46	5,49	3,3	0,22	0,10	17,58

3.3. ANÁLISIS DE TEXTURA.

La textura de la cuajada fue caracterizada mediante el texturómetro 'TA-TX2 texture analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK) y el ensayo Back extrusion, basado en la penetración sobre la muestra de un cilindro a velocidad y fuerza constantes (5 m/s y 10 N), el cual mide la

resistencia que opone el producto al mismo. Este cilindro aplica tensión compresiva en la superficie de la cuajada, mientras que los bordes del mismo aplican un esfuerzo cortante (Perrot et. al., 2011). Los parámetros que se obtuvieron fueron: fuerza máxima y trabajo. Los análisis se realizaron durante la etapa de cuajo a los 5, 10, 20 y 30 minutos, así como a los 2 y 4 días de permanencia en refrigeración. Para cada punto de análisis se realizaron 6 repeticiones a cada formulación estada.

3.4. PERIODO DE REFRIGERACIÓN DE LA CUAJADA.

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de la cuajada, una vez obtenida se introdujo en nevera a 4°C, evaluándose el suero liberado a los 2 y 4 días. Para ello, y tras un atemperado de 10 minutos, se volteó sobre una malla perforada, evaluándose la diferencia de pesada.

3.5. ANÁLISIS DE IMAGEN.

3.5.1. Dispositivo de captura de imagen.

El dispositivo estaba formado por una webcam (Logitech), un láser de alineación rojo de punto que emite luz coherente a 650nm, con una potencia de 50mW y con una placa de Petri como soporte transparente de la muestra. Con la finalidad de mantener la muestra a 40°C, se instaló una doble camisa la cual termostató la misma durante el tiempo de cuajado (Figura 1A).

Durante todo el tiempo de cuajado de la leche, entre los 30 y 45 minutos, la webcam capturó en continuo imágenes RGB de los patrones de luz generados por el láser (Figura 1B) al atravesar la muestra, que se dispuso en la zona central. La distancia de la cámara respecto al láser fue de 23cm, mientras que la muestra se encontraba a 9cm del mismo. Esta distancia fue escogida con el objetivo de obtener la máxima información posible. Estas disposiciones fueron similares a las descritas por Verdú et. al., (2019).

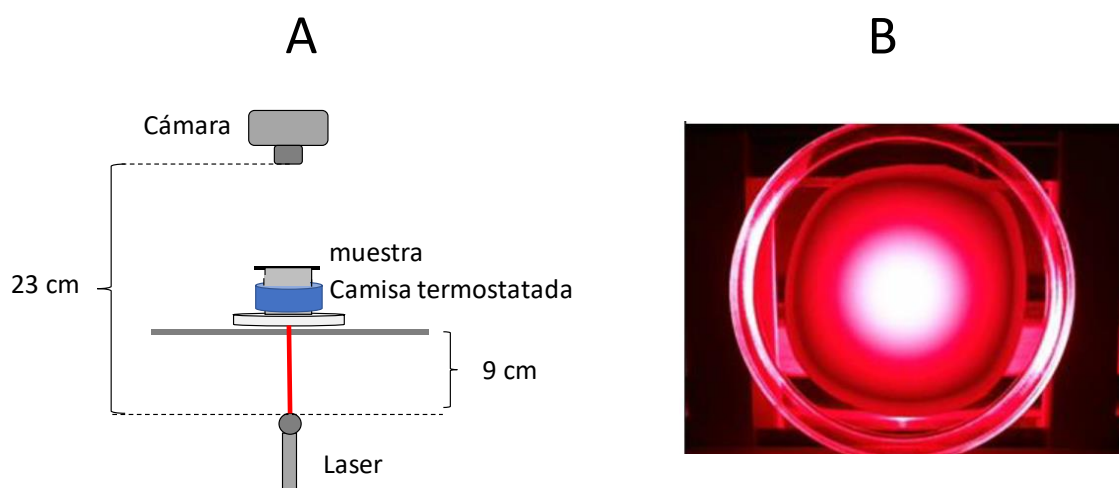


FIGURA 1. A. Esquema del dispositivo de captura de imagen; B. Patrón creado por el láser al atravesar la muestra.

3.5.2 Procesado de datos

Tras la captura, recogida y agrupación de imágenes se realizó el análisis de patrones de dispersión láser característicos (figura 2), estudiando entre otros el pico máximo de intensidad generado en el centro de la muestra y los anillos generados diametralmente, así como la relación entre ellos.

Para realizar este procesado se utilizó un software desarrollado por el grupo de trabajo (Verdú et. al., 2019) y se obtuvieron los descriptores que caracterizan las imágenes siguiendo el siguiente esquema:

1. Selección de la zona de interés y recorte.

2. Conversión a escala de grises: Con la finalidad de reducir el volumen de información de las imágenes estas se convierten de RGB a escala de grises (8 bits, 255 valores de gris).

3. Fragmentación: A partir de las diferentes zonas de la morfología del patrón láser se delimitan con diferentes valores de gris (explicado a continuación), midiéndose el número de píxeles. La figura 2B es, a modo de ejemplo, un patrón de láser capturado. En las imágenes se muestra un patrón de difracción típico, en el cual se genera un pico de intensidad máxima en el centro, conocido comúnmente como el disco Airy, con anillos concéntricos cuyo tamaño aumenta después de que su intensidad disminuya. Estos anillos se conocen por ser interferencias constructivas y destructivas. Este patrón sigue las propiedades reportadas en otros estudios, donde esta técnica fue utilizada para estudiar diferentes matrices de alimentos (Adebayo et al., 2016; Mollazade et al., 2013; Verdú et al., 2019). Los descriptores de imagen que se desarrollaron fueron delimitados a partir de la morfología visual, dividiéndose en dos grupos (directos y relativos) según su procedimiento de extracción. Los primeros representan los valores absolutos de las áreas del patrón láser (Figura 2C) y se definen como:

- A: recoge el área de píxeles correspondiente al patrón de luz completo.

- Ψ_a , Ψ_b , Ψ_c , Ψ_d , Ψ_e y Ψ_f : recoge el área correspondiente al patrón de luz completo, tomando únicamente la información de la escala de gris comprendida entre los valores de 255-151, 150-101, 100-76, 75-51, 50-36 y 35-0, respectivamente.

Los descriptores relativos (Figura 2B) representan la parte proporcional de la totalidad del área de píxeles establecida a diferentes niveles:

- W0, W1, W2 y W3: recoge el área producida por el 20, 40, 60 y 80% de la altura del patrón de luz.

- W4: recoge el diámetro dado por la altura máxima del patrón de luz.

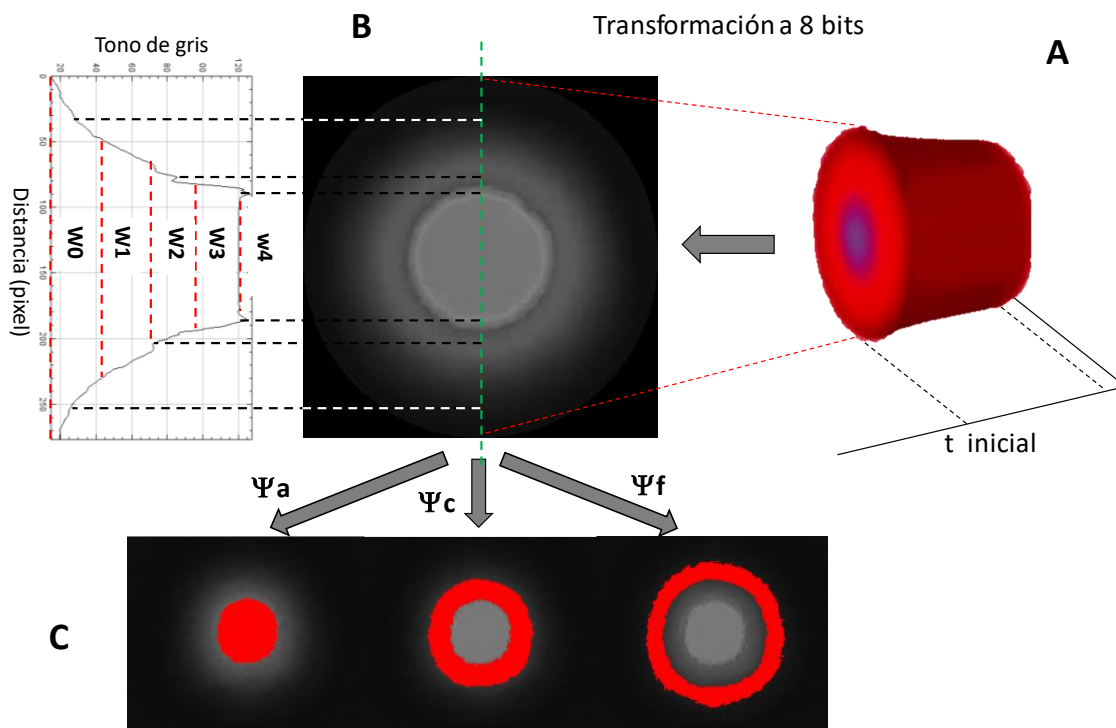


FIGURA 2. A. Patrón de luz láser, a lo largo del tiempo de la experiencia, captado en el modelo de color RGB. B. Patrón de luz láser convertido a escala de grises (8 bits, 255 valores de gris) con esquema de los descriptores directos relativos obtenidos a partir del área (W0, W1, W2, W3 y W4). C. Esquema ejemplo de los descriptores directos obtenidos a partir del umbral de color (Ψ_a , Ψ_c , Ψ_f).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN.

Los resultados obtenidos del análisis de textura y desurado se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza ANOVA evaluándose el factor formulación. Para ello se utilizó el software Statgraphics XVII version 17.2.04. y se consideró un valor de $p < 0,05$ estadísticamente significativo para los análisis.

A consecuencia de la gran cantidad de datos obtenidos a partir de los descriptores generados en el análisis de las imágenes, estos se procesaron mediante el análisis multifactorial de Componentes Principales (PCA) reduciendo la dimensionalidad, comparándose la varianza recogida y la agrupación espontánea de las muestras. El PCA es un método estadístico multivariado usado generalmente para reducir la dimensionalidad de un conjunto de variables cuantitativas para obtener un número reducido de nuevas variables llamadas componentes principales (PC) que son el resultado de la combinación lineal de algunas de las variables originales. Para realizar este estudio se usó la herramienta PLS Toolbox 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, USA), una extensión en el ambiente computacional R2012a (The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA).

4. RESULTADOS

4.1. FISICOQUÍMICOS.

4.1.1 Proceso de cuajado

El análisis de los valores de textura (figura 3) mostró como en el transcurso del tiempo de cuajado las muestras fueron incrementando su dureza (Arango y Castillo, 2018), siendo este incremento más acusado para las muestras con un 8% de leche en polvo añadida. Así, mientras que en las muestras con un 1% añadido el incremento fue siendo asintótico a partir de los 5 minutos, las muestras con un 6% lo hicieron a partir de los 20 minutos, mientras que en las del 8% el incremento se mantuvo constante hasta el final del periodo de cuajado (30 minutos). De esta forma las muestras con el 8% añadido presentaron una dureza de un 22% y 62% mayor que las muestras al 6% y 1% respectivamente, mientras que las del 6% lo fueron un 51% con respecto a las de 1%

La incorporación de la leche en polvo desnatada provocó un incremento en la dureza de las muestras, el cual podría quedar reflejado en el primer análisis de textura que se realiza a los 5 minutos. Si bien, el diferente comportamiento que presentan las muestras a partir de este punto estaría ligado al incremento en la proteína añadida con la leche en polvo desnatada ya que las principales características de la leche que influyen sobre el rendimiento en el cuajado son los contenidos de caseína y grasa (Guo et al., 2003), y esta última no se añadió. La caseína es la que forma la matriz estructural de la cuajada al retener la grasa y el agua, (Lucey y Kelly, 1994), si bien otros autores como Guo et al. (2003) también encontraron relación con el contenido de proteína total (Crespo, 2016). Estudios (Veith y Reynolds, 2004) en los que se varió el contenido de proteína de diferentes formulaciones mediante la adición de proteínas del suero concentradas, se concluyó que a mayor porcentaje de proteína añadida, se produce un gel con mayor firmeza y mayor capacidad de retención de agua, viéndose favorecido en caso de que ésta fuera desnaturalizada, ya que se incorpora al gel de una forma insoluble permitiendo que la red tridimensional se forme y precipite antes.

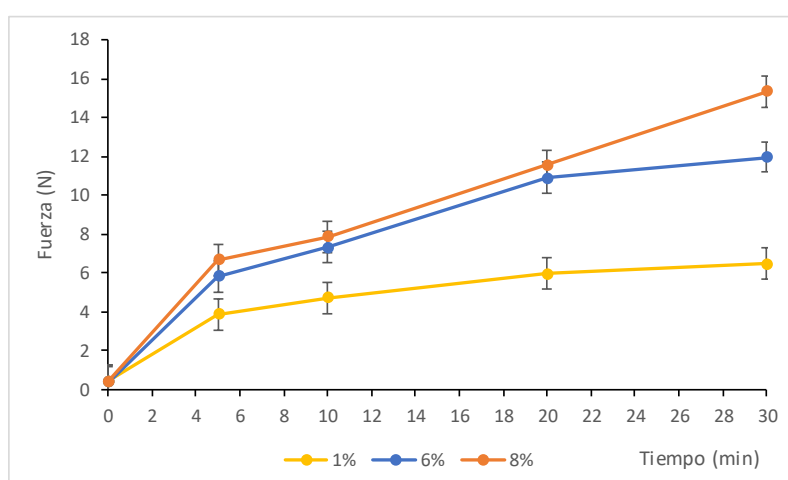


Figura 3. Resultados del análisis de textura por compresión durante el proceso de cuajado del queso. Barras negras expresan error estándar con un 95% de significancia.

4.1.2. Periodo de refrigeración de la cuajada.

El análisis de textura de las muestras a los 2 y 4 días de permanencia de la cuajada en refrigeración no mostró un efecto claro de las variables tanto por cien de leche en polvo añadida y tiempo de reposo (figura 4A). Durante este tiempo, las muestras no tuvieron una variación significativa de la textura, si bien en todas ellas se produjo un incremento de la fuerza máxima a los dos días, para posteriormente volver a los valores de fuerza iniciales. En cambio, la variación de masa (figura 4B), que se obtiene al separar el suero generado por la sinéresis de la cuajada, evidenció ciertos cambios estadísticos. Si bien para las cuajadas con una incorporación del 6 y 8% en leche en polvo no existieron cambios a los 2 y 4 días, es decir no apareció sinéresis, para las muestras con 1% sí existieron, siendo a los 4 días de un 1.6%. Como se ha mencionado anteriormente, la mayor presencia de proteína genera cuajadas más duras y con mayor capacidad para retener el agua.

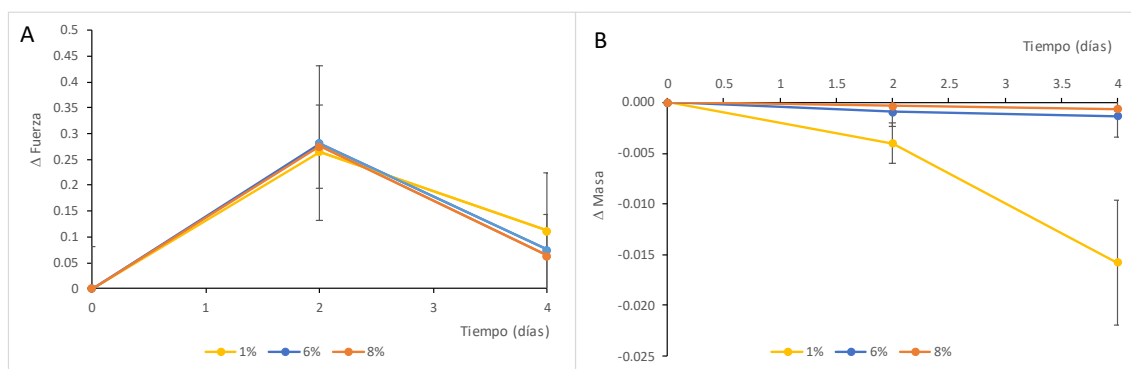


Figura 4. Resultados del análisis de textura por compresión (A) y variación de masa (B) durante el periodo de refrigeración. Las barras negras expresan un error estándar con un 95% de significancia.

4.2. ANÁLISIS DE IMAGEN.

Dado que en la técnica de difracción láser planteada, el láser atraviesa la muestra formando un patrón de luz que posteriormente es analizado, y puesto que cada matriz de las tres leches utilizadas era diferente al haberseles añadido diferentes cantidades de leche en polvo desnatada, el primer estudio de los descriptores de imágenes obtenidos fue el de evaluar a tiempo 0 la incidencia sobre el patrón de luz de los diferentes niveles de leche añadida. En la figura 5 se muestran los valores promedio y el error estándar de los valores de la componente principal 1 (PC1 = 53.47%) del análisis de PCA realizado con los descriptores de imagen obtenidos. Esta mostró una agrupación espontánea de las muestras las cuales se pudieron catalogar en función del nivel de leche en polvo añadida. Como se observa, existieron diferencias significativas entre la media de los valores de PC1 para las tres leches, reflejando el efecto de la leche añadida sobre la respuesta láser. Este resultado esperado tuvo que ser tenido en cuenta en el posterior análisis de los resultados (cuajado), más aun cuando este no fue lineal (mayor diferencia entre incorporar 6 o 8% de leche que entre 6 y 1%).

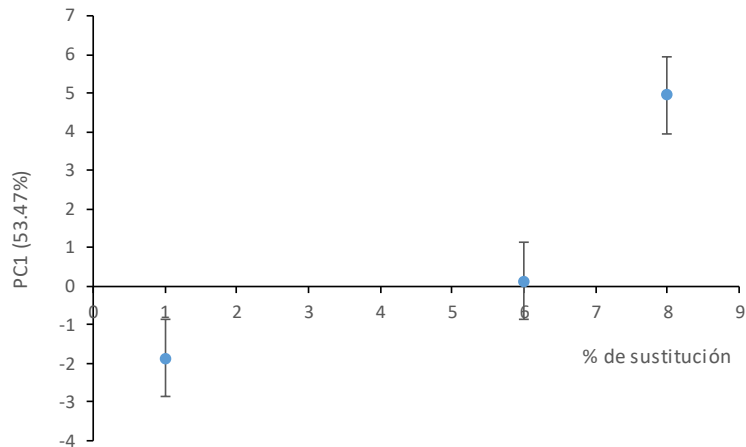


Figura 5. Valores de PC1 para el análisis de PCA de los descriptores de imagen a tiempo 0.

Una vez realizado el análisis de PCA para la totalidad de los descriptores a lo largo del tiempo de cuajado estudiado (figura 7A), dos fueron las componentes principales que mostraron la mayor varianza (PC1 = 69,82; PC2 = 14,36), siendo la PC1 la que mostró una agrupación espontánea de las muestras las cuales pudieron ser catalogadas en función del nivel de leche en polvo añadida. Como se observa en la figura 6A, en la que se muestra el promedio de los valores de la PC1 para cada tipo de leche, a tiempo 0 se evidenció el efecto materia, descendiendo asintóticamente los valores de la PC1 a lo largo del tiempo de cuajado de forma similar para los tres tipos de leches. En cambio, cuando se representó la diferencia del valor de la PC1, a cada tiempo, con respecto a su valor inicial (figura 6B), se observó como la variación fue diferente para cada muestra. Los valores de PC1 que menos variaron a lo largo del tiempo de cuajado fueron los de la leche con un 8% de leche en polvo añadida, seguida de la que llevaba un 6% y finalmente la de 1%.

En base a este resultado, el patrón de luz láser generado y captado por la cámara, varió en menor medida para las muestras con un 8% de leche en polvo añadida, sufriendo su máxima variación para las muestras con un 1%. Este resultado inicialmente parece lógico dado que la incorporación de la leche en polvo hizo que la textura de la leche se hiciese más “viscosa” y por tanto el cambio hasta conseguir una textura “semisólida/gel” fuese menor a mayor cantidad de leche en polvo añadida. Este incremento en la textura de la leche a tiempo 0, como consecuencia de la incorporación de la leche en polvo, no quedó reflejado en el análisis de textura realizado (figura 3) debido a la menor sensibilidad del análisis utilizado. Para ello se tendría que haber utilizado otro método reológico que sí lo fuese. Por otro lado, hubiera cabido esperar que la mayor variación la sufriese el cuajado de la leche con un 8% de leche en polvo añadida, dada que es la leche con mayor variación de textura.

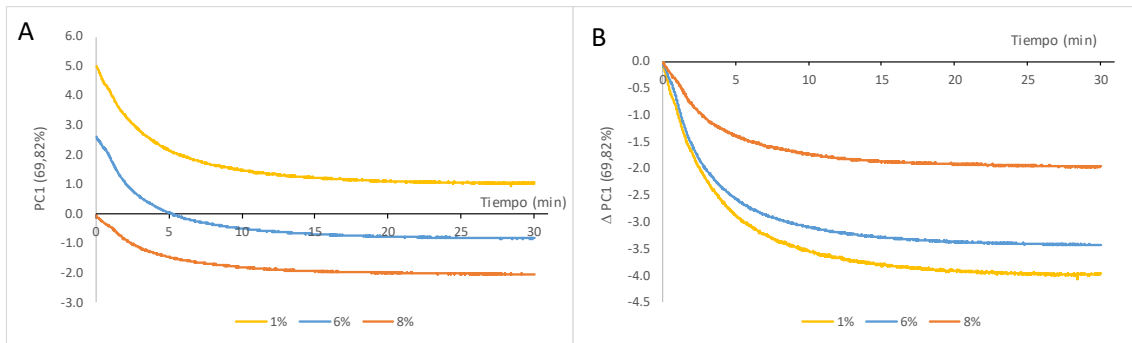


Figura 6. Valores de la PC1 (A) y de su incremento respecto a tiempo 0 (B), para el análisis de PCA a lo largo del tiempo de cuajado.

Con la finalidad de evaluar qué descriptores fueron los que aportaron mayor peso a la componente 1, se evaluaron los loadings para esta (figura 7). El valor del loading se obtiene a partir del valor inicial y el valor final del PCA, obteniéndose así un cociente de variación que refleja el nivel de evolución del descriptor. Se escogió como valor significativo 0,35 por ser aquel que despreciaba los descriptores con menos información. Como se observa, los descriptores que más peso aportaron fueron el área máxima (A) y los descriptores directos que comprendían tonos de gris entre el 100 y 76 (Ψ_c), 75 - 51 (Ψ_d) y 50 - 36 (Ψ_e). Además también los fueron, en menor medida, los descriptores directos Ψ_c (tonos de gris entre 150 y 101) y Ψ_f (tonos de gris entre 35 y 0) y el indirecto W3 (80% de la altura del patrón de luz). En la figuras 9A, 9B, 9C y 9D se muestran a modo de ejemplo A, Ψ_c , Ψ_d y Ψ_f , respectivamente. Además en la figuras 9E, 9F, 9G y 9H se muestran la variación de los mismos con respecto a su valor a tiempo 0.

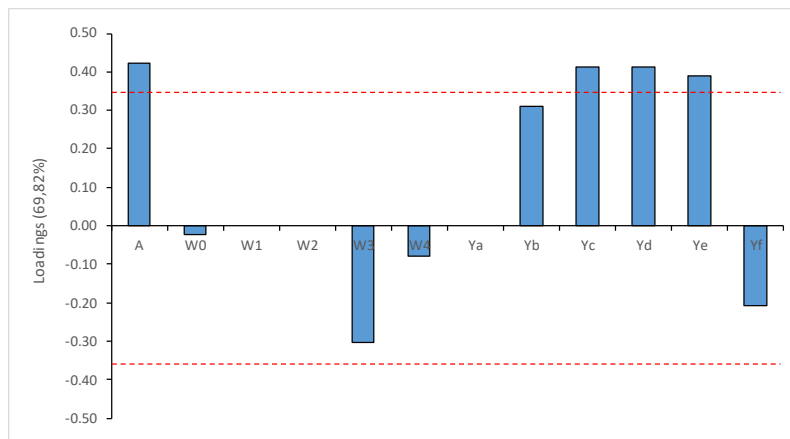


Figura 7. Valores de los loadings para la PC1 (A) para el análisis de PCA a lo largo del tiempo de cuajado.

Como se puede observar en la figura 9A y 9E, el descriptor A evolucionó de forma similar a como lo hizo la componente principal, siendo el mayor cambio sufrido por este descriptor el dado por el cuajado de la leche con un 1% de leche en polvo añadida, mientras que la leche con un 8% añadido fue la que menor variación le generó. Además, en comparación con la evolución de la PC1, para este descriptor la evolución para las muestras 6% y 1% fue más similar. En cambio, para el descriptor Ψ_d (tono de gris comprendido entre el tono 75 y 51) la variación fue inversa, siendo la muestra que más lo cambió, durante el cuajado, aquella con un 8% de leche

en polvo añadida, y la que menos la del 1%. La figura 8 muestra la umbralización (en rojo) del descriptor Ψ_d para las muestras con 1% y 8% añadido. Como se puede observar a tiempo 0, el descriptor tiene un valor absoluto mayor para las muestras con un 1% añadido, como se aprecia en la figura 9C, pero en cambio durante el tiempo de cuajado la variación es mayor para las muestras con un 8% añadido, al igual que se aprecia en la figura 9G.

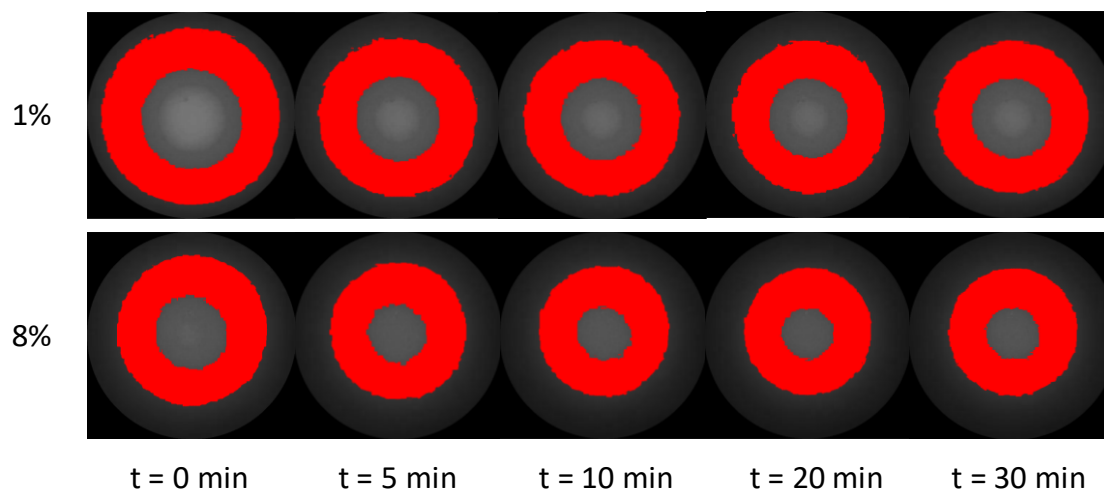


Figura 8. Umbralización del descriptor Ψ_d (tono de gris comprendido entre el tono 75 y 51), a cuatro tiempos de estudio del cuajado, para las muestras con 1% y 8% de leche en polvo añadida.

El descenso en los descriptores se dio como consecuencia de la opacidad que la muestra fue adquiriendo con el transcurso del cuajado, al pasar de un estado líquido o uno semisólido/gel que impidió el paso del haz de luz.

Si bien el descriptor Ψ_c (tono de gris comprendido entre el tono 100 y 76) tuvo gran peso en el modelo (figura 7), este mostró saturación en el caso de la cuajada con un 8% de leche añadida (figura 9B y 9F). En las figuras se aprecia, para esta leche, una evolución horizontal y constante. Esta saturación también se observó, y en mayor medida, para el descriptor Ψ_b (tono de gris comprendido entre el tono 150 y 101), en la que tanto las muestras con un 8% como con un 6% se saturaron. Si bien, la mayor saturación la mostró el descriptor Ψ_a (tono de gris comprendido entre el tono 250 y 151), en el que todas las muestras estuvieron saturadas y por ello no aportó peso en el modelo PCA. En el caso del descriptor Ψ_f (tono de gris comprendido entre el tono 35 y 0) también se observó el fenómeno de saturación. Como podemos observar en la figura 9D, las muestras con un 8% añadido presentaron el mismo valor inicial al que llegaron a los 2.5 minutos las muestras con un 6% añadido y a los 20 minutos las muestras con un 1%, no evolucionando a partir de este punto.

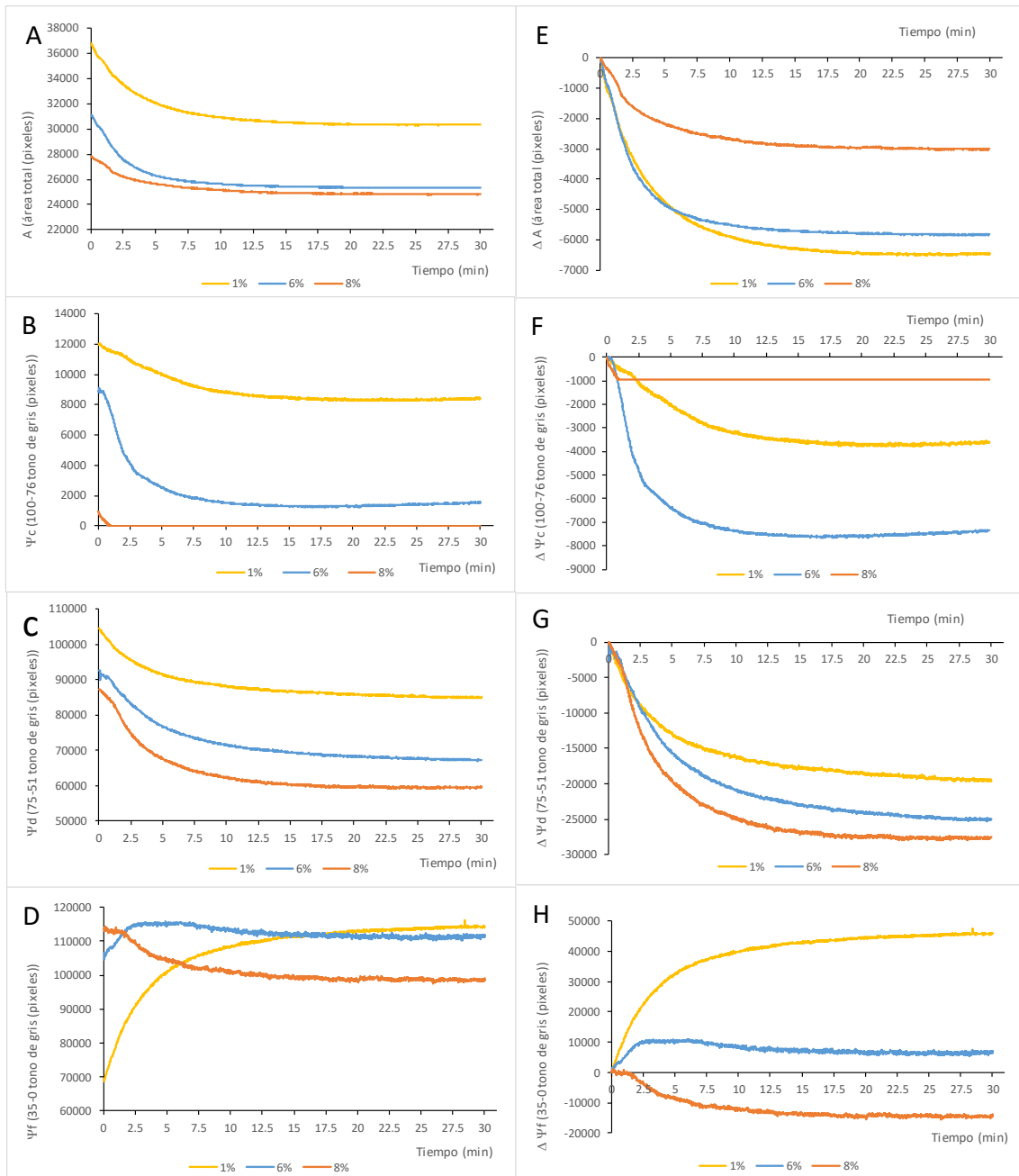


Figura 9. Evolución de alguno de los descriptores de imagen (A, B, C y D) y de sus respectivos incrementos (E, F, G y H), a lo largo del tiempo de cuajado.

En el caso de los descriptores relativos (W_0 , W_1 , W_2 , W_3 y W_4), el comportamiento fue muy similar al observado para los descriptores directos. Es por ello que en sucesivos estudios se plantea el reducir la exposición a la luz de la cámara, a fin de reducir la saturación de los descriptores y de esta forma aumentar el número de descriptores que aporten información al modelo PCA. El incremento en el número de descriptores puede aumentar la diferenciación observada en la evolución de la PC1 a lo largo del cuajado para las tres leches estudiadas y por tanto poderlas caracterizar mejor.

En esta experiencia, solo cuatro descriptores no presentaron ningún tipo de saturación a lo largo del estudio (A, Ψ_d , Ψ_e y W_3), lo que podría dificultar el estudio de la posible relación

existente entre la evolución del patrón laser y la textura. Los descriptores con saturación no presentan cambios a lo largo del estudio y por tanto, no aportan información sobre cambios que pudiesen darse.

4.3 RELACIÓN ENTRE LOS DATOS DE TEXTURA Y DE IMAGEN

Una vez analizados los datos de imagen se procedió a evaluar su posible relación con los datos de textura obtenidos. La figura 10A y 10B muestran, respectivamente, dicha relación con la componente PC1 obtenida en el análisis de PCA de los datos de imagen, así como para el descriptor Ψ_d . Como se aprecia para ambos, existió una relación similar independientemente del nivel de leche en polvo añadida. Así, cuando la relación se realizó teniendo en cuenta la variación de ambos con respecto a sus valores iniciales (figuras 10C y 10D), los tres modelos (uno por cada tipo de leche cuajada) se ajustaron a un único modelo el cual pudo ser ecuacionado, obteniéndose las respectivas ecuaciones (Tabla 3). Estas ecuaciones muestran la directa relación existente entre los valores de PC1 y del descriptor Ψ_d con la textura, independientemente del efecto materia prima.

Tabla 3: Ecuaciones obtenidas en el ajuste de los datos de PC1 (ecuación 1) y descriptor Ψ_d (ecuación 2) con los datos de textura.

Descriptor	Ecuación	R ²	
PC1	$Y = 0,41947 * \exp(- 1.01616 * x)$	0,988	(1)
Ψ_d	$Y = 0,95833 * \exp(- 0,0000977204 * x)$	0,955	(2)

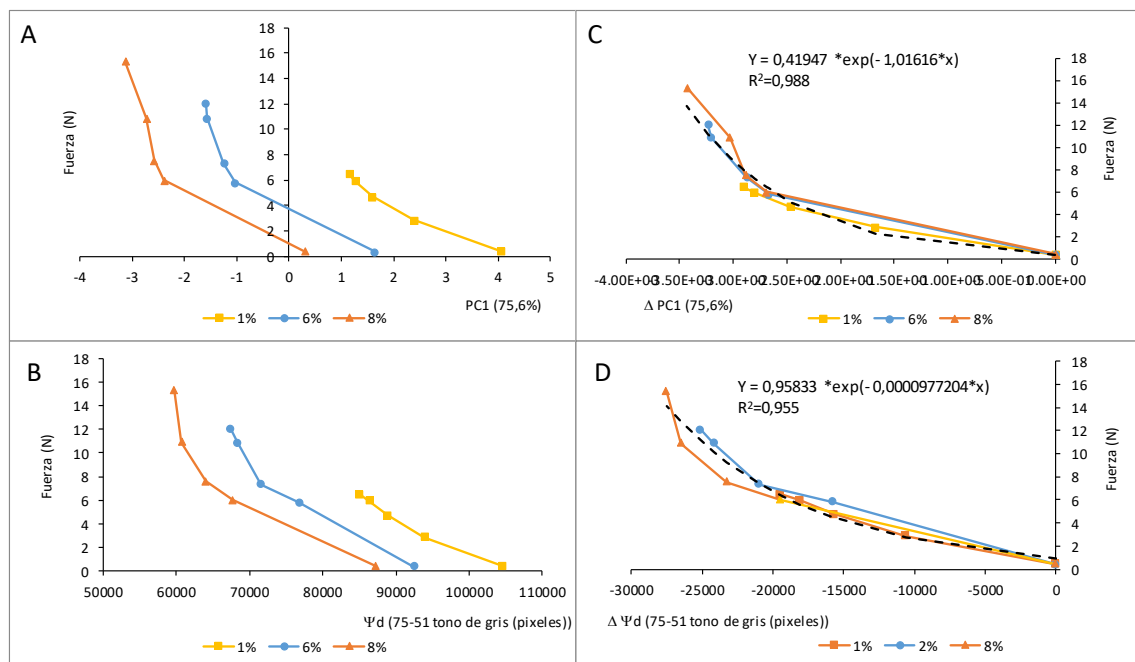


Figura 10. Relación con los valores de textura de la PC1 (A) y del descriptor de imagen Ψ_d (B) y de sus respectivos incrementos (D y C), a lo largo del tiempo de cuajado.

Dada esta directa relación observada entre los valores de PC1 o del descriptor Ψ_d con los datos de textura, independientemente del factor materia prima, se procedió a predecir los datos de textura de las muestras almacenadas durante 2 y 4 días. Para ello, los datos de imagen para los días 2 y 4 se procesaron utilizando el modelo PCA anteriormente generado, obteniendo

así las componentes PC1 para ambos días. Una vez obtenidos, estos fueron incorporados a la ecuación 1, generándose los valores de textura teóricos para estos dos días. La figura 11A muestra los valores observados (medidos mediante el análisis de textura) frente a los predichos con la ecuación 1. En negro, se han representado los valores utilizados para obtener el modelo de la ecuación 1 (provenientes del estudio de cuajado) y en colores los generados con la ecuación 1 para los días 2 y 4. Como se observa, los valores utilizados para construir el modelo fueron predichos con bastante fiabilidad, así como para los días 2 y 4.

En el caso del descriptor Ψ_d , a los valores para los días 2 y 4 se les calculó la diferencia con respecto al día 0 y estos valores obtenidos fueron incorporados en la ecuación 2, generándose los valores de textura teóricos que se muestran en colores en la figura 11B. Como se observa, en este caso también los valores de textura teóricos predichos fueron bastante similares a los reales obtenidos por el análisis, mostrando la bondad del modelo.

Este resultado pone de manifiesto cómo la agrupación espacial generada por el PCA inicial, y cuyo componente principal 1 que se mostró en la figura 6, está muy marcada por los descriptores Ψ_d y Ψ_e (tono de gris entre 75 y 35). Es por ello que ambos modelos de predicción (mediante la componente principal 1 o el descriptor Ψ_d) han dado resultados de predicción similares. Es decir, la PC1 está generada fundamentalmente por el descriptor Ψ_d y Ψ_e (ambos con información muy similar) y por tanto no puede aportar más información que estos dos descriptores. Es por ello que una modificación en el proceso de captura de imágenes que conllevara una reducción de la saturación, podría hacer que el número de descriptores que aportasen información al modelo PCA fuese mayor, lo que podría mejorar el modelo de predicción e incluso expresar diferentes fases dentro del proceso de cuajado.

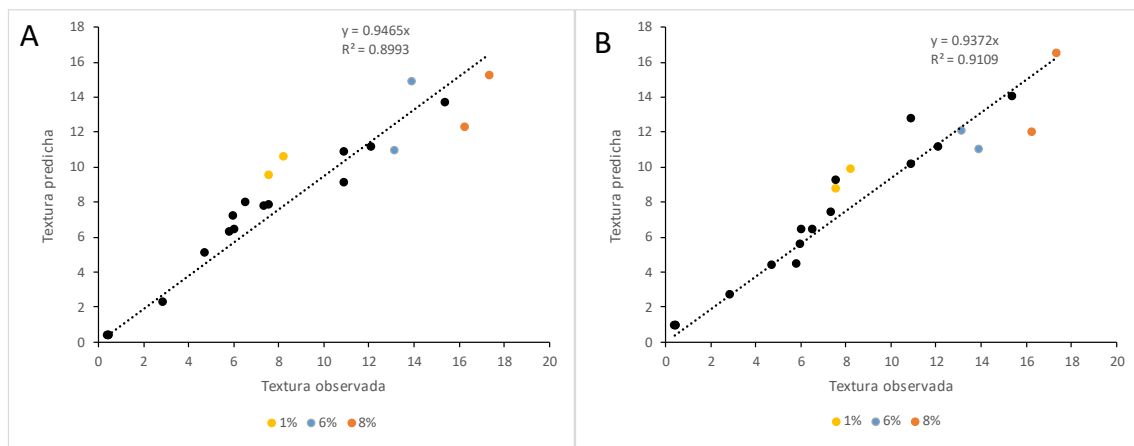


Figura 11. Valores de textura observados frente a predichos obtenidos mediante la ecuación 1 (A) y ecuación 2 (B). Negro: valores utilizados para obtener el modelo. Amarillo, azul y naranja: valores predichos a los 2 y 4 días de refrigeración de la cuajada.

5. CONCLUSIONES

El estudio realizado muestra el potencial de la técnica basada en el reconocimiento de patrones de dispersión láser como técnica no destructiva para la caracterización en continuo del cuajado de queso fresco dada la alta sensibilidad a los cambios que se dan en la matriz durante el cuajado.

La técnica ha permitido discriminar en función de la leche utilizada, describiéndose el cuajado en función de esta.

La evolución de los descriptores se ha relacionado directamente con la textura de la cuajada a cada tiempo de estudio, siendo esta relación independiente del tipo de leche utilizada. Ello ha permitido generar un modelo de predicción el cual se ha testado con cuajadas con 2 y 4 días de refrigeración, siendo los resultados muy satisfactorios si bien estos podrían ser mejorados mediante ajustes en la técnica de captura de imágenes.

Nuevos estudios son necesarios con la finalidad de mejorar la información procedente de las imágenes. Así, en el presente estudio cuatro fueron fundamentalmente los descriptores que aportaron información al modelo (A , Ψ_d , Ψ_e y W_3), si bien esta información fue muy similar. El resto de descriptores presentaron saturaciones y por tanto no aportaron mucha información al modelo, por lo que una mejora en estos descriptores podría mejorar el modelo de predicción e incluso llegar a expresar las diferentes fases que se puedan dar durante el proceso de cuajado.

6. BIBLIOGRAFÍA.

ADEBAYO, S. E., HASHIM, N., ABDAN, K., AND HANAFI, M. (2016). Application and potential of backscattering imaging techniques in agricultural and food processing—A review. *Journal of Food Engineering*, 169, 155-164.

ARANGO, O. & CASTILLO, M. (2018). A method for the inline measurement of milk gel firmness using an optical sensor. *Journal Dairy Science*, 101: 3910-3917.

BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (2006). Real Decreto 1113/2006. Normas de calidad para quesos y quesos fundidos.

CASTILLO, M. (2006). Cutting Time Prediction Methods in Cheese Making. Department of Biosystems and Agricultural Engineering, University of Kentucky, U. S. A.

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

CRESPO PÉREZ, SARA ISABEL. 2016. Efecto de la temperatura de cuajado de la leche sobre el rendimiento quesero, la composición química y la valoración sensorial de quesos frescos de cabra. MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL. Universidad Politécnica de Valencia. Página: 16.

DARLING, CYNTHIA L.; HUYNH, GIGI D. & FRIED D. (2006). Light Scattering properties of natural and artificially demineralized dental enamel at 1310 nm, *Journal of Biomedical Optics*, 11(3): 34023.

DERRA, M.; BAKKALI, F.; AMGHAR, A. & SAHSAH, H. (2017). Estimation of coagulation time in cheese manufacture using an ultrasonic pulse-echo technique, *Journal of Food Engineering*, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.08.003.

- DUSSUALT-CHOUINARD, I.; BRITTEN, M. & POULIOT, Y. (2019). Improving rennet coagulation and cheesemaking properties of reverse osmosis skim milk concentrates by pH adjustment. *International Dairy Journal*, 95: 6-14.
- EVERARD, C. D.; O'CALLAGHAN, D. J.; FAGAN, C. C.; O'DONNELL, C. P.; CASTILLO, M. & PAYNE, F. A. (2007). Computer Vision and Color Measurement Techniques for Inline Monitoring of Cheese Curd Syneresis. *Journal Dairy Science*, 90: 3162-3170.
- FAGAN, C. C.; DU, C. J.; O'DONNELL, C. P.; CASTILLO, M.; EVERARD, C. D.; O'CALLAGHAN, D. J. & PAYNE, F. A. (2008). Application of Image Texture Analysis for Online Determination of Curd Moisture and Whey Solids in a Laboratory-Scale Stirred Cheese. *Journal of food science*, 73 (6), 250-258.
- GREGERSEN, V. R. & LUCEY, J. A. (2016). Cheese: Rennet-Induced Coagulation of Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd Edition, Elsevier. p:579-584.
- GUO, M., PARK, Y., DIXON, P., GILMORE, J., KINDSTEDT, P. 2003. "Relationship between the yield of cheese (Chevre) and chemical composition of goat milk". *Small Ruminant Research*, 52: 103-107.
- LI, H., SUN, X., PAN, W., KUTSANEDZIE, F., ZHAO, J., AND CHEN, Q. (2016). Feasibility study on nondestructively sensing meat's freshness using light scattering imaging technique. *Meat science*, 119, 102-109.
- LORENTE, D.; ZUDE, M.; REGEN, C.; PALOU, L.; GÓMEZ-SANCHIS, J. Y BLASCO, J. 2013. Early decay detection in citrus fruit using laser-light backscattering imaging. *Postharvest biology and Technology*, 86: 424-430.
- LUCEY, J., KELLY, J. 1994. "Cheese yield". *Journal of the Society of Dairy Technology*, 47: 1-14.
- MACONI, G., PENTTILÄ, A., KASSAMAKOV, I., GRITSEVICH, M., HELANDER, P., PURANEN, T., ... AND MUIINONEN, K. (2018). Non-destructive controlled single-particle light scattering measurement. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 204, 159-164.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (2019). Enciclopedia de los alimentos: Queso. Consulta realizada a 18 de julio de 2019.
http://www.alimentacion.es/es/conoce_lo_que_comes/bloc/queso/default/el-queso/etapas-de-la-transformacion-de-leche-en-queso/
- MOLLAZADE, K., OMID, M., TAB, F. A., KALAJ, Y. R., MOHTASEBI, S. S., AND ZUDE, M. (2013). Analysis of texture-based features for predicting mechanical properties of horticultural products by laser light backscattering imaging. *Computers and electronics in agriculture*, 98, 34-45.
- O'CALLAGHAN, D. J.; O'DONNELL, C. P. & PAYNE, F. A. (2002). Review of systems for monitoring curd setting during cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 65-74.
- PERROT, A., MÉLINGE, Y.; ESTELLÉ, P.; RANGEARD, D. & LANOS, C. (2011). The Back Extrusion Test as a Technique for Determining the Rheological and Tribological Behaviour of Yield Stress Fluids at Low Shear Rates. *Applied Rheology*, 21(5), pp.53642

QING, Z., JI, B., AND ZUDE, M. (2008). Non-destructive analyses of apple quality parameters by means of laser-induced light backscattering imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 48(2), 215-222.

RAMÍREZ-LÓPEZ, C. Y VÉLEZ-RUIZ, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6: 131-148.

ROSETO RUGEL, C. A. (2000). Estandarización de las proporciones en la elaboración del queso Procesado usando queso Cheddar, Zamorella y cuajada ácida. Tesis correspondiente al grado académico de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras.

SBODIO, O.A.; REVELLI, G.R. (2012). Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el "monitoreo" online del proceso. *RIA*, 83, 3: 236-246.

TYCKO, D. H., METZ, M. H., EPSTEIN, E. A., AND GRINBAUM, A. (1985). Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. *Applied optics*, 24(9), 1355-1365.

VEITH, P. D. & REYNOLDS, E. C. (2004). Production of a High Gel Strength Whey Protein Concentrate from Cheese Whey. *Journal Dairy Science*, 87: 831-840.

VERDÚ, S.; BARAT, J. M. & GRAU, R. (2019). Laser backscattering imaging as a non-destructive quality control technique for solid food matrices: Modelling the fibre enrichment effects on the physico-chemical and sensory properties of biscuits. *Food Control*, 100: 278-286.