

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL  
MEDI NATURAL

CARACTERIZACIÓN DEL CUAJADO DE LA LECHE MEDIANTE LA  
TÈCNICA NO DESTRUCTIVA DE ANÁLISIS DE IMAGEN DE  
PATRONES LÁSER. EFECTO DEL CONTENIDO EN GRASA.

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

AUTORA: CAROLINA YA XI ZHANG

TUTOR: RAÚL GRAU MELÓ

DIRECTOR EXPERIMENTAL: SAMUEL VERDÚ AMAT

**CURSO ACADÉMICO: 2019-2020**

**VALENCIA, JULIO 2020.**



## **CARACTERIZACIÓN DEL CUAJADO DE LA LECHE MEDIANTE LA TÉCNICA NO DESTRUCTIVA DE ANÁLISIS DE IMAGEN DE PATRONES LÁSER. EFECTO DEL CONTENIDO EN GRASA.**

### **Resumen:**

Durante el proceso de elaboración del queso, el cuajado se produce de una forma dinámica, siendo las características finales dependientes de la materia prima y de las características en la que se dé durante la etapa. Debido a ello, en el presente trabajo se planteó la utilización de una técnica no destructiva de análisis de imagen de patrones láser para la caracterización en continuo de la etapa de cuajado, así como de la estabilidad de la cuajada formada, en función de la materia grasa presente en la materia prima. Además, se hizo uso de métodos tradicionales destructivos e invasivos como la determinación de la viscosidad, de la textura y de la sinéresis con fin de poder relacionar los cambios de imagen con los cambios fisicoquímicos del cuajado.

Para llevar a cabo el estudio, se utilizó cuatro tipos de leche de vaca: entera, semidesnatada, semidesnatada sin lactosa y desnatada. El proceso de elaboración se llevó a cabo de igual forma para todas las leches, 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 el viscosímetro, y un estudio mediante medidas textales (extrusión inversa), sinéresis y análisis de imagen al final del cuajado y tras su estabilización por frío durante 1 y 4 días. Una vez obtenidos los datos se procedió a su estudio estadístico y a la correlación de los datos.

Los resultados han mostrado cómo el análisis de patrones de dispersión láser permite caracterizar la textura durante la etapa de cuajado y tras su estabilización por frío en el que presenta una estrecha relación con los estudios fisicoquímicos realizados. Así este permitió discriminar en función de la leche utilizada, describiéndose el cuajado en función de esta.

**PALABRAS CLAVE:** cuajado, viscosidad, textura, queso, difracción láser

**Autora:** Zhang, Carolina

**Tutor:** Grau Meló, Raúl

**Director Experimental:** Verdú Amat, Samuel

**Valencia, julio de 2020**

## **MODELING OF MILK CURDLING PHASE BY LASER BACKSCATTERING IMAGING. FAT CONTENT EFFECT**

### **Abstract:**

During the cheese making process, curdling takes place in a dynamic way, whose final characteristics dependent on the raw material and the characteristics in which it is developed during the stage. Due to this, in the present research, the use of a non-destructive laser pattern image analysis technique for the continuous characterization of the curdling stage, as well as the stability of the curd formed, depending on the fat content present in the raw material. Furthermore, traditional destructive and invasive methods were used, such as the determination of viscosity, texture and syneresis in order to be able to relate changes in the image with the physicochemical changes of the curd.

Four types of cow's milk were used to carry out the study: full-cream, semi-skimmed, semi-skimmed lactose-free and skimmed. The production process was carried out in the same way for all milks, which were set at 40 °C after adding animal rennet. The curdling was continuously studied using the imaging technique and viscometer, as well as a study was run using textural measurements (pulsation), syneresis and image analysis at the end of the curd and after cold stabilization for 1 and 4 days. Once the data was obtained, it was preceded by a statistical study and correlation of the data.

The results showed how laser scatter pattern analysis enables texture characterization during the curdling stage and after its cold stabilization in which it is closely related to the physicochemical studies performed. Thus, this allowed to discriminate according to the milk used, describing the curdling in function of it.

**KEY WORDS:** curd, viscosity, texture, cheese, laser diffraction

**Author:** Zhang, Carolina

**Academic Tutor:** Grau Meló, Raul

**Experimental Director:** Verdú Amat, Samuel

**Valencia, july 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecer especialmente a mis padres; Rosa y Audi, sin olvidarme de mi hermana Violeta. Gracias por todo lo que han hecho por mi y el apoyo diario que he recibido.

Por otra parte, a la Universidad, que me ha dado la oportunidad de estudiar, aprender, investigar y conocer a compañeros fantásticos que se han convertido en hermanos, especialmente Elena y Lía, gracias por vuestra compañía y ánimos durante estos años.

Por último, gracias a mi profesor tutor Raúl, por depositar su confianza en mi, por su ayuda, paciencia y positivismo desde el principio. Sin su ayuda nada de esto habría sido posible. Además, doy gracias a mi profesor experimental Samuel, por haber estado ahí haciendo los días más ameno. Gracias por tu ayuda y tu gran paciencia.

Gracias a todas las personas que han estado a mi lado haciendo maravillosa una de las etapas de mi vida.

| <b>ÍNDICE</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1.INTRODUCCIÓN.....                                   | 1             |
| 2. OBJETIVOS.....                                     | 2             |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS. ....                         | 3             |
| 3.1. MATERIAS PRIMAS.....                             | 3             |
| 3.1.1. LECHE.....                                     | 3             |
| 3.1.2. CUAJO.....                                     | 3             |
| 3.1.3. CLORURO CÁLCICO (CaCl <sub>2</sub> ). ....     | 3             |
| 3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. ....                 | 3             |
| 3.3. ANÁLISIS DE IMAGEN.....                          | 4             |
| 3.3.1. DISPOSITIVO DE CAPTURA DE IMAGEN.....          | 4             |
| 3.3.2. PROCESADO DE DATOS. ....                       | 5             |
| 3.4. ANÁLISIS DE TEXTURA.....                         | 6             |
| 3.5. ANÁLISIS DE LA VISCOSIDAD.....                   | 6             |
| 3.6. ANÁLISIS DE LA SINÉRESIS. ....                   | 7             |
| 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN.....      | 7             |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....                       | 8             |
| 4.1. FISICOQUÍMICOS ....                              | 8             |
| 4.1.1. ETAPA DE CUAJADO ....                          | 8             |
| 4.1.2. ESTABILIDAD DE LA CUAJADA ....                 | 9             |
| 4.2. IMAGEN ....                                      | 11            |
| 4.2.1. ETAPA DE CUAJADO ....                          | 11            |
| 4.2.2. ESTABILIDAD DE LA CUAJADA. ....                | 15            |
| 4.2.3. RELACIÓN DATOS FISICOQUÍMICOS CON IMAGEN. .... | 17            |
| 5. CONCLUSIONES.....                                  | 19            |
| 6. BIBLIOGRAFÍA.....                                  | 20            |

| <b>ÍNDICES DE TABLAS</b>  | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| TABLA 1      Composición nutricional de la materia prima utilizada  | 4             |
| TABLA 2      Valores de tiempo de los puntos de inflexión de las series.  | 14            |
| TABLA 3      Ecuaciones y valores de R <sup>2</sup> obtenidos para la relación entre la viscosidad y la dureza con los datos de imagen. | 18            |

| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> |  | <b>Página</b> |
|--------------------------|--|---------------|
| <b>FIGURA 1</b>          | Esquema del procedimiento experimental realizado.  | 4             |
| <b>FIGURA 2</b>          | A: Esquema del dispositivo de captura de imagen.   | 4             |
|                          | B: Patrón creado por el láser al atravesar la muestra.   |               |
| <b>FIGURA 3</b>          | A: Patrón de luz láser, a lo largo del tiempo de la experiencia, captado en el modelo de color RGB y posteriormente transformado hasta la escala de grises (8 bits, 255 valores de gris).  | 6             |
|                          | B: Patrón de luz láser a escala de grises con esquema de los descriptores obtenidos a partir del umbral de color entre los pixeles A <sub>1</sub> (10-79), A <sub>2</sub> (80-100), A <sub>3</sub> (101-120), A <sub>4</sub> (121-140), A <sub>5</sub> (141-160) y A <sub>6</sub> (161-250). |               |
| <b>FIGURA 4</b>          | Esquema del dispositivo del viscosímetro   | 7             |
| <b>FIGURA 5</b>          | Viscosidad durante la etapa de cuajado   | 8             |
| <b>FIGURA 6</b>          | Textura de la cuajada en el estudio de su estabilidad a los días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.   | 9             |
| <b>FIGURA 7</b>          | Sinéresis de la cuajada en el estudio de su estabilidad a los días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.   | 10            |
| <b>FIGURA 8</b>          | Relación entre la sinéresis y la textura de la cuajada en el estudio de su estabilidad a los días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.  | 10            |
| <b>FIGURA 9</b>          | Evolución de los descriptores A (pixeles 10-79), B (pixeles 80-100), C (pixeles 101-120), D (pixeles 121-140), E (pixeles 141-160) y F (pixeles 161-250) durante la etapa de cuajado.  | 12            |
| <b>FIGURA 10</b>         | Análisis de PCA a partir de los datos de imagen obtenidos durante la etapa de cuajado.   | 13            |
| <b>FIGURA 11</b>         | Esquema de la matriz de datos de imagen utilizada para el estudio de PCA inicial (A) y para el realizado solo para los 10 primeros minutos del cuajado.  | 13            |
| <b>FIGURA 12</b>         | Análisis de PCA a partir de los datos de imagen obtenidos durante los 10 primeros minutos de la etapa de cuajado. Análisis en función del tiempo (A); Primera derivada de los datos representados en la figura 11A (B).  | 14            |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>FIGURA 13</b> | Evolución de los descriptores A (tonos10-79), B (tonos 80-100), C (tonos 101-120), D (tonos 121-140), E (tonos 141-160) y F (tonos 161-250) de las cuajadas a días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.   | 16 |
| <b>FIGURA 14</b> | Análisis de PCA (A) e incremento de los valores de PC1 (B), de los datos de imagen obtenidos para las cuajadas a días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.  | 17 |
| <b>FIGURA 15</b> | Relación entre la viscosidad o dureza con los valores de la PC1 obtenidos en el estudio de la PCA para la totalidad de los datos de imagen (A y D). Relación entre la viscosidad o dureza con los valores máximos de la primera derivada de la PC1 del estudio de la PCA con los datos de imagen de los primeros 10 minutos de cuajado (B y E), así como con el tiempo en el que se dan estos valores máximos (C y F). | 18 |
| <b>FIGURA 16</b> | Relación entre la textura, sinéresis (A y C, respectivamente) o el incremento de ambos (B y D, respectivamente) con respecto a los valores de PCA o su incremento para el estudio de estabilidad de las cuajadas a días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.  | 19 |



## 1.INTRODUCCIÓN.

A lo largo de los siglos, ha sido reconocida la leche como una parte vital de la dieta, permitiendo el crecimiento y la supervivencia de muchos mamíferos como seres humanos. La leche es una rica fuente de nutrientes esenciales como, caseína, proteínas del suero e inmunoglobulinas, ácido linoleico conjugado, lactosa y oligosacáridos menores como prebióticos, calcio, fósforo, vitamina D y riboflavina. Es por ello, considerado una comida completa (Singh y Gallier, 2017) en el que aproximadamente, el 43% del mercado de alimentos funcionales consiste en alimentos a base de leche (Özer y Kirmaci, 2010; Mellema y Bot, 2009; Kelly et al., 2009).

El queso, es uno de los productos derivados de la leche más consumidos en todo el mundo (FAO, 2015) en el que la etapa de elaboración más importante es el cuajado (Everard et. al., 2007). Este se puede realizar de dos formas:

1. Mediante la adición de enzimas: Provoca la transformación de las caseínas en paracaseínas en el que posteriormente insolubilizan y formarán un gel irreversible, o a través de la producción de ácidos que neutralizarían las cargas de las proteínas dando lugar a la insolubilización de esta y precipitando (Rosero, 2000).
2. Mediante la coagulación ácida: Proporciona una cuajada desmenuzable y sin cohesión alguna, permitiendo un hilado fácil de la misma, produciendo queso más poroso, poco compacto y más frágiles (Rosero, 2000; M. A. R. M., 2019).

El cuajo presenta una estructura semisólida resultante de la coagulación enzimática de la leche. Las micelas de caseína se ven modificadas por una proteólisis (De sá y Bordignon-luiz, 2010), dando lugar a estructuras altamente estables (De Kruif et al., 2012; Horne, 2002), en el que las micelas desestabilizadas se aglomeran por interacciones formando una red proteica que atrapa la grasa y la humedad.

Dentro de la estructura del gel semisólido formado durante la cuajada de la leche se pueden identificar tres fases principales:

1. Glóbulos de grasa, que para fines estructurales pueden considerarse un relleno inerte con propiedades físicas homogéneas (Horne y Banks, 2004).
2. Suero de leche líquido, también una sustancia de relleno de estructura con propiedades físicas homogéneas (Walstra et al., 2006; Yadav et al., 2015).
3. Red sólida basada en proteínas que comprende principalmente micelas de paracaseína, y suero (Akkerman, 1992; Ong et al., 2011; Hickey et al., 2015).

Tras finalizar el cuajado, el gel semisólido evoluciona durante el tiempo perdiendo suero y ganando firmeza (O'Callaghan, 2011) pero esta pérdida depende en gran medida de la materia prima, el tiempo y temperatura de cuajado además de muchos otros factores como de la

cantidad de cloruro de calcio añadido (Arango et al., 2013; Castillo et al., 2006). Estos factores influirán en la calidad del queso con pérdidas en el desuerado además de otros como es el momento de corte de la cuajada.

Es por ello interesante conocer el tipo de cuajada que se forma, permitiendo seleccionar los factores más adecuados para obtener el mejor equilibrio entre la dureza y humedad, además de una tendencia de desuerado adecuado (Castillo, 2006; Derra et al., 2018; Crespo, 2016). Para la medición del cuajado, existen múltiples métodos tanto destructivos; 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), y no destructivos que permiten la inclusión de estos sistemas de medida en la línea de producción como la técnica de retrodispersión de luz más conocida como "Light Backscatter".

La técnica conocida como "Light Backscatter" se basa en hacer incidir la luz coherente de un láser sobre la muestra, de forma que esta luz interacciona 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. Esta tecnología se ha utilizado en campos tan variados como es el campo de 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 el de los alimentos, en procesos de agricultura y alimentarios (Adebayo et al., 2016), determinación del contenido en sólidos solubles y firmeza en manzanas (Qing et al., 2008), detección de daños por frío en plátanos (Hashim et al., 2013), modelización de cambios que influyen en la calidad de manzanas (Chen et al., 2006), evolución del estado de madurez en tomate (Tu et al., 2000), caracterización de galletas con fibra (Verdú et al., 2019), etc.

## **2. OBJETIVOS.**

El objetivo general de este estudio fue evaluar la evolución del cuajado según el contenido graso de diferentes tipos de leche (entra, semidesnatada, semidesnatada sin lactosa y desnatada) mediante la técnica basada en el reconocimiento de patrones de dispersión láser.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. MATERIAS PRIMAS.

##### 3.1.1. LECHE.

Para la elaboración de la cuajada de queso se utilizaron 4 tipos diferentes de leche de vaca pasteurizada: leche entera, semidesnatada, semidesnatada sin lactosa y desnatada (Hacendado, Mercadona); y leche desnatada en polvo (Hacendado, Mercadona), cuyas composiciones, facilitadas por el fabricante, se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1:** Composición nutricional de la materia prima utilizada.

|                                 | Carbohidratos (%) | Proteínas (%) | Grasa (%) | Sal (%) | Calcio (%) |
|---------------------------------|-------------------|---------------|-----------|---------|------------|
| Leche entera                    | 4,5               | 3,1           | 3,5       | 0,13    | 0,11       |
| Leche semidesnatada             | 4,6               | 3,1           | 1,5       | 0,13    | 0,11       |
| Leche desnatada                 | 4,7               | 3,2           | 0,5       | 0,13    | 0,11       |
| Leche semidesnatada sin lactosa | 4,7               | 3,1           | 1,5       | 0,13    | 0,11       |
| Leche en polvo                  | 54,5              | 32,5          | 1         | 1,3     | 1,2        |

##### 3.1.2. CUAJO.

Para llevar a cabo el cuajado, se usó cuajo líquido de origen animal (Nievi) con un alto contenido en quimosina para un cuajado rápido y consistente.

##### 3.1.3. CLORURO CÁLCICO (CaCl<sub>2</sub>).

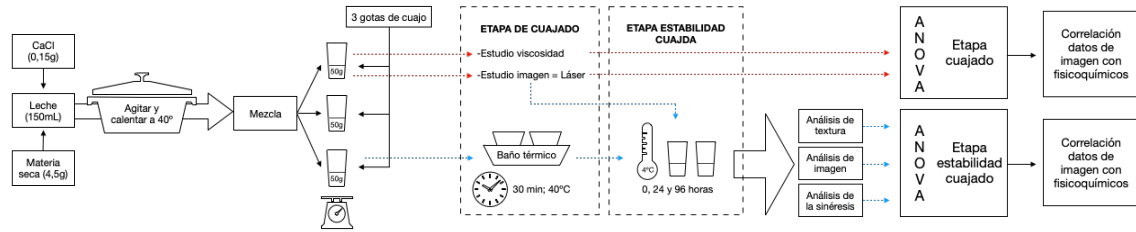
Con una finalidad de proporcionar mayor firmeza mecánica a la cuajada, se utilizó una disolución de CaCl<sub>2</sub> (3g/100mL).

#### 3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Independientemente del tipo de leche utilizada, el protocolo seguido en la experiencia fue el mismo y se muestra en la figura 1. Dicho protocolo se repitió 6 veces para cada tipo de leche lo que supuso un total de 72 muestras.

Así, para cada leche, se tomaron 150 mL que se calentaron a 40°C, adicionándose 0,15g de CaCl<sub>2</sub> y 4,5g de leche en polvo (materia seca) bajo agitación. Una vez caliente se repartió de forma alícuota 50g en envases de plástico, con un diámetro de 55mm. Manteniendo la temperatura constante se adicionaron 3 gotas de cuajo, y tras mezclar, las muestras se dividieron en dos bloques.

Por un lado, una de las tres muestras se destinó a la caracterización del cuajado mediante el láser o el viscosímetro, dándose el cuajado al mismo tiempo que se producían las mediciones. Para ello, ambos equipos estaban termostáticos a 40°C. Por otro lado, las dos muestras restantes se cuajaron en un baño termostático a 40°C durante 30 min. Estas dos muestras, junto la utilizada en las medidas con el láser, fueron utilizadas para el estudio de estabilidad de la cuajada a los 0, 24 y 96 horas. Para ello las muestras fueron introducidas en nevera a 4°C. El estudio de la estabilidad se basó en la toma de datos de imagen, textura y sinéresis.



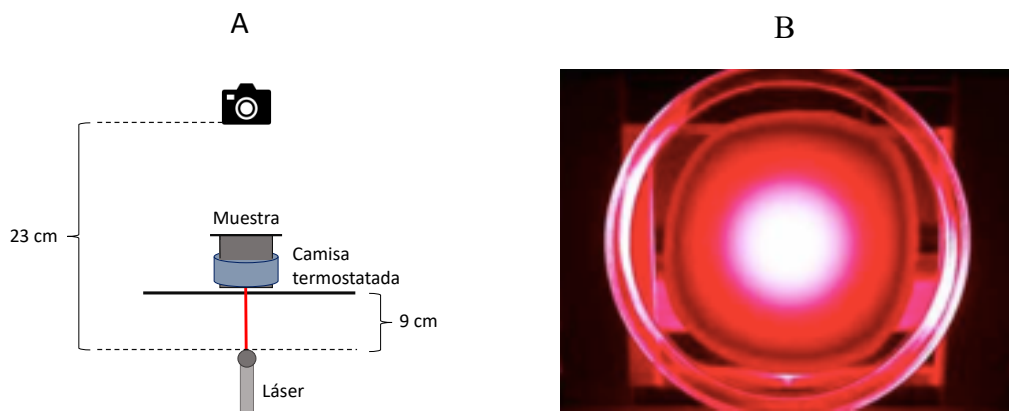
**Figura 1:** Esquema del procedimiento experimental realizado.

### 3.3. ANÁLISIS DE IMAGEN.

#### 3.3.1. DISPOSITIVO DE CAPTURA DE IMAGEN.

El dispositivo está constituido por dos elementos fundamentales: una webcam (Logitech), que capturó en continuo imágenes RGB (Rojo, Verde, Azul) de los patrones generados por el láser (figura 2B) durante todo el tiempo de cuajado, así como de imágenes al final del cuajado y tras mantenerlo en refrigeración durante 1 y 4 días. El segundo elemento del equipo es un láser rojo de punto de alineación que emite luz coherente a 650nm, con una potencia de 50 mW. Tanto la cámara como el laser se sitúan en la vertical con la muestra.

La distancia de la cámara respecto al láser fue de 23cm, mientras que la muestra se encontraba a 9cm del mismo (figura 2A). 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).



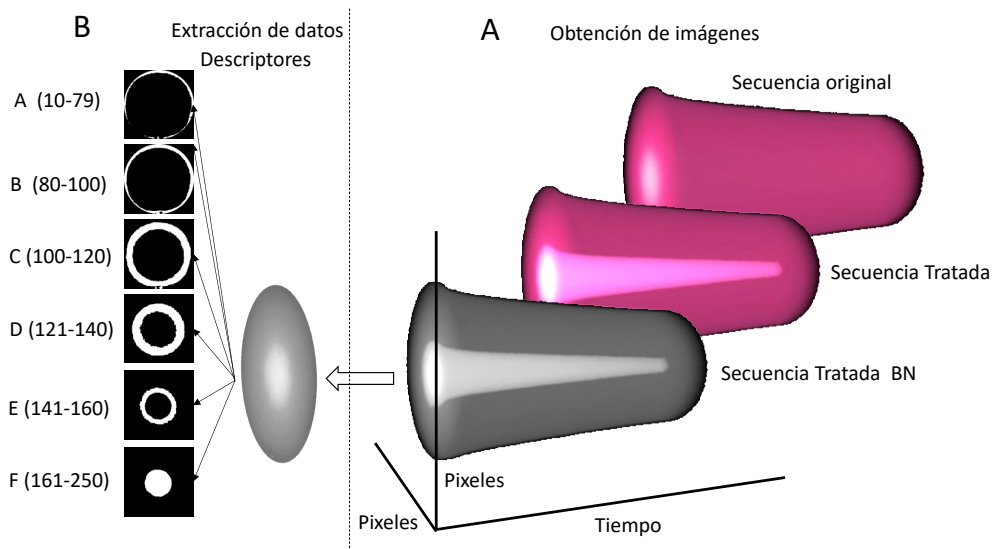
**Figura 2:** A. Esquema del dispositivo de captura de imagen; B. Patrón creado por el láser al atravesar la muestra.

### 3.3.2. PROCESADO DE DATOS.

Tras la captura, recogida y agrupación de imágenes se realizó el análisis de patrones de dispersión láser característicos (figura 3), 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 (figura 3A): 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 donde el 0 representa el negro y el 255 el blanco).
3. Fragmentación y obtención de los descriptores: En la figura 3A y B, a modo de ejemplo se muestra un patrón de láser capturado y su procesado hasta obtener los descriptores. Así la imagen muestra un patrón de difracción típico, en el cual 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 entre el láser y la muestra. 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 y se obtuvieron mediante el recuento del número de píxeles comprendidos entre dos tonos de gris. Así se obtuvieron 6 descriptores:  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ ,  $A_5$  y  $A_6$ , los cuales recogen, el número de píxeles en la escala de gris comprendida entre los tonos 10-79, 80-100, 101-120, 121-140, 141-160 y 161-250 respectivamente.



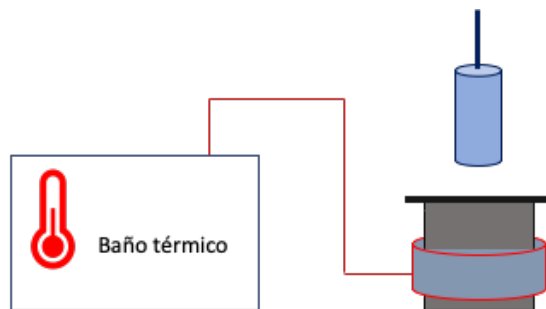
**Figura 3:** A. Patrón de luz láser, a lo largo del tiempo de la experiencia, captado en el modelo de color RGB y posteriormente transformado hasta la escala de grises (8 bits, 255 valores de gris). B. Patrón de luz láser a escala de grises con esquema de los descriptores obtenidos a partir del umbral de color entre los tonos A (10-79), B (80-100), C (101-120), D (121-140), E (141-160) y F (161-250).

### 3.4. ANÁLISIS DE TEXTURA

La textura de la cuajada fue caracterizada mediante el método back-extrusión. Está basado en la penetración sobre la muestra de un cilindro a una velocidad y fuerza constante (5m/s y 10N), 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 evaluados fueron fuerza máxima positiva y negativa, y área de trabajo positiva y negativa.

### 3.5. ANÁLISIS DE LA VISCOSIDAD

Dado que la textura mediante el método back-extrusión solo es aplicable cuando la muestra presenta una mínima consistencia y en aras a evaluar esta antes de esta mínima consistencia se determinó también la viscosidad de la leche durante su cuajado. Para dicha determinación se utilizó un viscosímetro (Fungilab; "Alpha series L model rotational viscosimeter") con una camisa termostatada conectada a un baño térmico para mantener la muestra a una temperatura de 40°C (figura 4). Este proceso nos permitió determinar como cambiaba la viscosidad durante el cuajado de los diferentes tipos de leches. Para ello se utilizó un husillo cilíndrico de acero inoxidable (Fungilab; "Stainless Steel Spindles L1") con una velocidad de giro de 60 rpm, en el que la viscosidad de la misma fue mediada en mPa·s (Frentz, 1965; Marcais, 1965; McMahon y Brown, 1982; Gervais y Vermeire, 1983; Richardson *et al.*, 1971).



*Figura 4: Esquema del dispositivo del viscosímetro.*

### **3.6. ANÁLISIS DE LA SINÉRESIS.**

La sinéresis espontánea es la contracción de un gel sin la aplicación de una fuerza externa. Es relativa a la inestabilidad de la red que conforma el gel, resultando en la pérdida de la habilidad para atrapar o contener todo el suero (Walstra, 1993).

Esta se calculó por diferencia de peso al evaluarse la cantidad de suero que desprendió la cuajada de las diferentes leches tras conservarlas durante 1 y 4 días en refrigeración.

### **3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN.**

Los resultados obtenidos del análisis de textura, sinéresis, viscosidad y de los datos procedentes del análisis estadístico multivariante de los datos de imagen, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza ANOVA, evaluándose si tenían diferencias significativas entre las diferentes leches. Para ello se utilizó el software Statgraphics XVII versión 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).

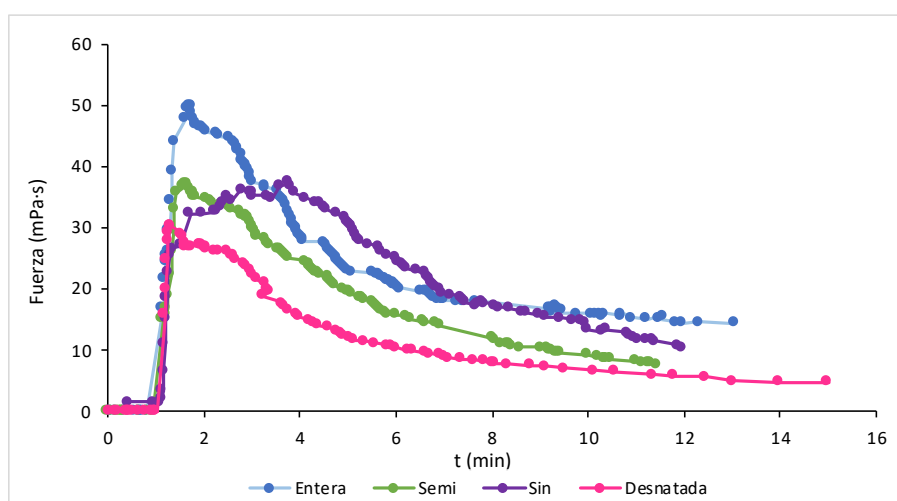
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. FISICOQUÍMICOS

#### 4.1.1. ETAPA DE CUAJADO

Una vez realizado los estudios y analizados, se observó como en un corto periodo de tiempo incrementó la viscosidad del cuajado de las muestras (figura 5). Este incremento exponencial tan rápido se dio de forma similar en todas las leches y pudo deberse a la adición de cuajo en exceso, causando un cuajado rápido con un incremento de la fuerza cortante. Este incremento de fuerza similar para todas las leches también estaría ligado al contenido de proteína añadida con la leche en polvo desnatada, donde las caseínas influyen principalmente en el rendimiento del cuajado (Guo et al., 2004), y es la que forma la matriz estructural de la cuajada reteniendo la grasa y el agua (Lucey y Kelly, 1994) dando lugar a picos de fuerza más altos.

Para todas las leches, tras alcanzarse el pico máximo de fuerza en el proceso de la cuajada se dio un descenso dando lugar a dispersiones, en las cuales fueron causadas por las partículas de gel dispersas por el suero tras la rotura del gel como por el giro del husillo en el interior de la cuajada formada.



**Figura 5:** Viscosidad durante la etapa de cuajado

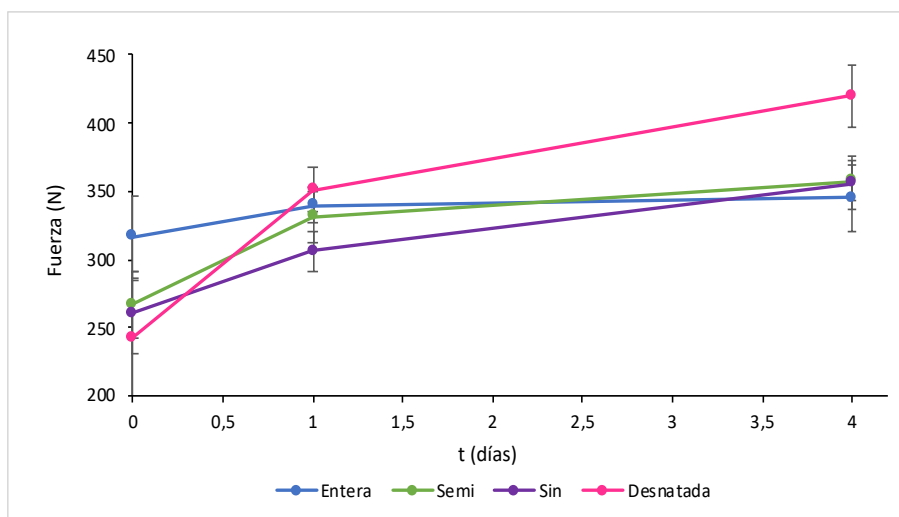
Si bien la velocidad de cuajado fue similar para todas las leches dado el exceso de cuajo y proteína, como hemos mencionado, si se observó como en función de la cantidad de grasa que presentaba la materia prima de las muestras, hubo una relación con el valor del esfuerzo máximo, presentando una fuerza mayor la leche entera (50,1 mPa·s en el minuto 1,72) y un mínimo la leche desnatada (30,4 mPa·s en el minuto 1,31). Por otro lado, las dos leches semidesnatadas presentaron un pico máximo de unos 36 mPa·s, si bien el tiempo empleado fue diferente para cada una de ellas. En el caso de la leche semidesnatada este se dio en el minuto 1,62 y en el 3,82 para la semidesnatada sin lactosa. Para esta última, el comportamiento fue



ligeramente diferente ya que la fuerza máxima se dio durante un lapso de tiempo mayor (del minuto 1,71 al 3,82) a la vez que también se observó una mayor dispersión en los ensayos.

#### 4.1.2. ESTABILIDAD DE LA CUAJADA

Una vez finalizada la cuajada y su refrigeración durante 1 y 4 días, se procedió al análisis de su textura y sinéresis. Así se observaron cambios significativos de la textura (Figura 6), siendo inicialmente dependiente de la materia prima, ya que las diferentes leches obtuvieron diferentes durezas.



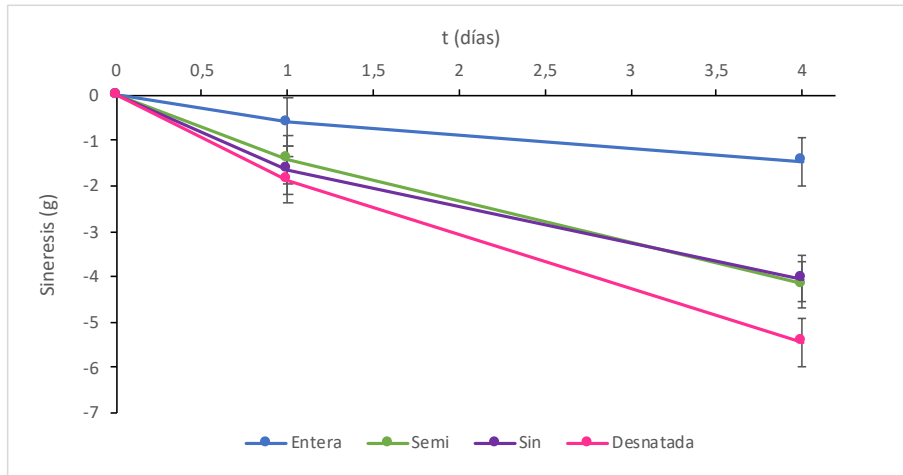
**Figura 6:** Textura de la cuajada en el estudio de su estabilidad a los días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración. (Barras negras verticales muestran error estándar).

La leche entera mostró una dureza significativamente superior al resto de las leches tras finalizar el cuajado, y durante el transcurso del tiempo fue la que menos evolucionó, es decir mostró más estabilidad. Sin embargo, la leche desnatada fue la que mostró mayor cambio de textura, siendo ésta, al cabo de los 4 días, estadísticamente mayor al resto de las muestras. Por otro lado, las dos leches semidesnatadas tuvieron una dureza ligeramente superior a la desnatada, aunque estadísticamente fueron iguales, evolucionando ambas de manera similar, dando lugar tras los cuatros días de estabilización por frío, una misma dureza sin diferencia estadísticas entre ellas e igual a la de la leche entera.

La sinéresis está afectada por varios factores tanto internos como es la composición química de la propia leche (Guo et al., 2012), como externos como son las condiciones ambientales (Law y Tamime, 2010). Además, la sinéresis también está afectada por las circunstancias propias del proceso de elaboración, pero es la presencia de calcio libre, el cual provoca la unión de la caseína en la red proteica de la cuajada uno de los factores más influyentes (Walstra, 1990).

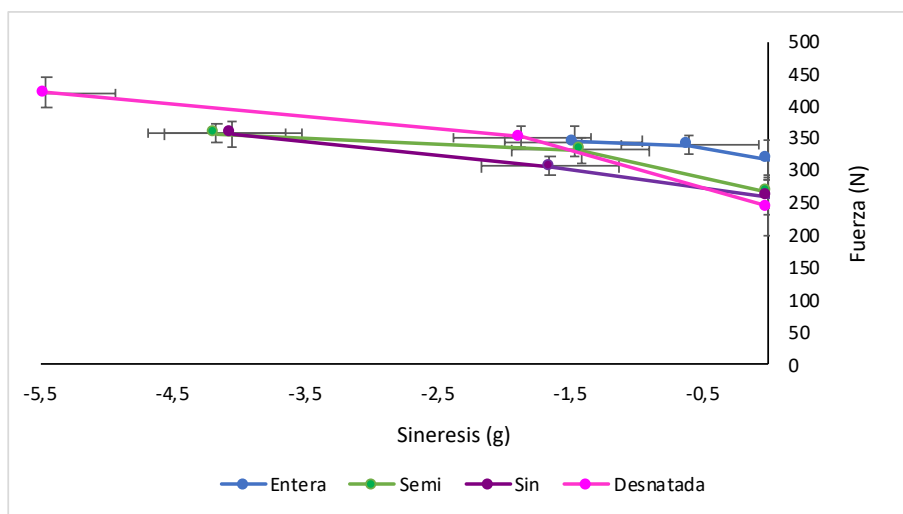
En la figura 7 se muestran los resultados de la sinéresis de las muestras. Como se observa, la pérdida de peso de la leche desnatada, tras 1 y 4 días en refrigeración, fue la mayor, mientras que la menor fue para la leche entera. Las leches semidesnatadas tuvieron un

comportamiento intermedio entre ambas. Teniendo en cuenta que el experimento ha sido llevado a cabo en las mismas condiciones ambientales y con el mismo proceso de elaboración, observamos que cuanto más grasa presenta el tipo de leche menos pérdidas por sinéresis sufre lo que reflejaría una cuajada más estable (Panthi et al., 2019; Guo et al., 2004; Veith y Reynolds, 2004).



**Figura 7:** Sinéresis de la cuajada en el estudio de su estabilidad a los días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.

En la figura 8 se muestra la relación entre la variación de textura y la pérdida de peso por sinéresis. Como se observa, existe una relación directa entre el incremento en la sinéresis y el de la textura la cual es independiente del tipo de leche utilizada, si bien como se ha comentado, las leches con mayor proporción de grasa (si la proporción de proteína es elevada como es nuestro caso al añadir lecho en polvo) menor es la fracción de volumen de suero liberado (Panthi et al., 2019) como ocurre con la leche entera.



**Figura 8:** Relación entre la sinéresis y la textura de la cuajada en el estudio de su estabilidad a los días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.

## 4.2. IMAGEN

### 4.2.1. ETAPA DE CUAJADO

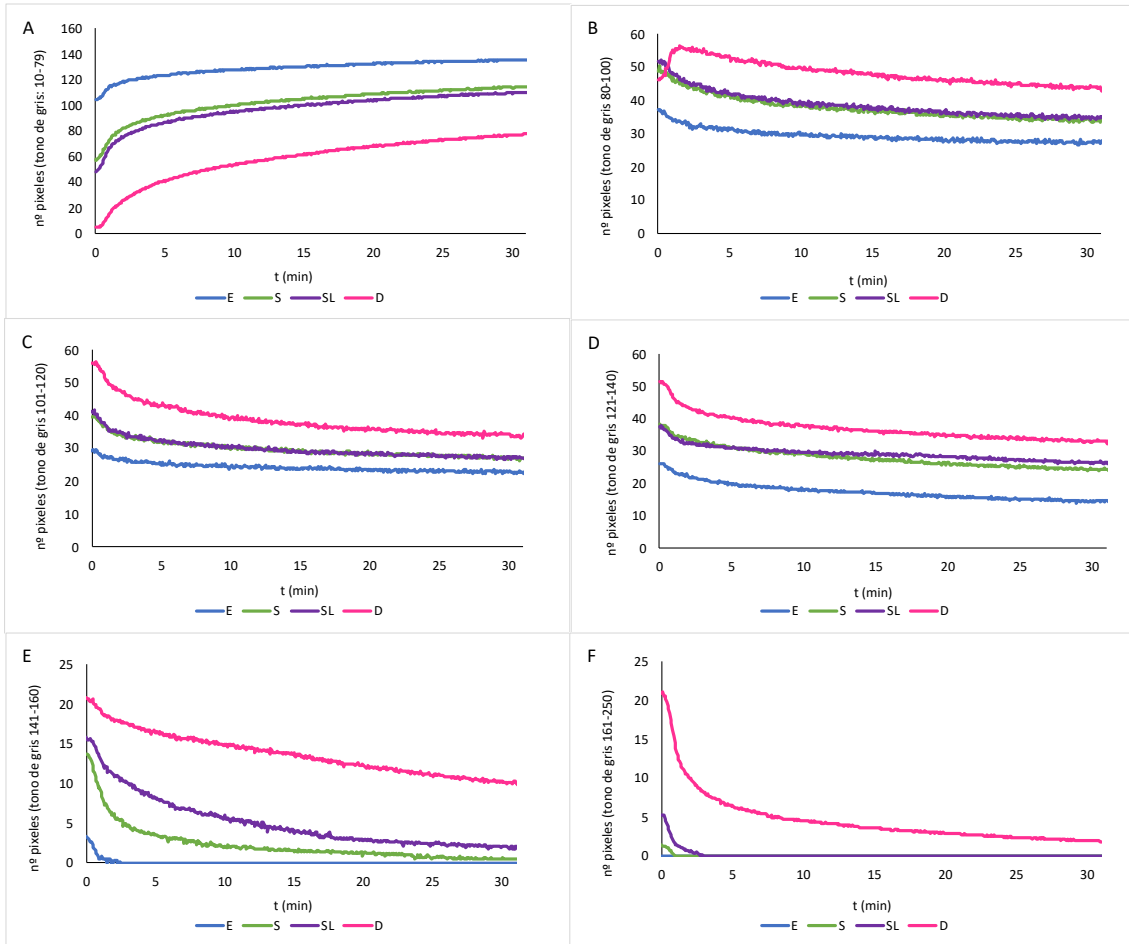
Con la técnica de difracción láser, la luz de este atravesó la muestra formando un patrón de luz el cual fue capturado en continuo a lo largo de la etapa de cuajado de la leche, caracterizando la evolución de la etapa. Una vez obtenidas las imágenes y transformada a tonos de grises se segmentaron entre los intervalos de tono de gris 10-79, 80-100, 101-120, 121-140, 141-160 y 161-250, obteniéndose los descriptores A, B, C, D, E, y F respectivamente. La figura 9 muestra la evolución de estos durante todo el periodo de estudio del cuajado.

En una primera visualización de los descriptores, se observa como desde tiempo 0 existe una diferenciación entre las leches, en mayor o menor medida en función del descriptor, diferenciación que se mantiene a lo largo del tiempo de estudio. Este resultado estaría mostrando como la técnica es capaz de diferenciar ya las leches que se utilizan en el estudio, diferencias que se siguen manteniendo durante el cuajado.

Si analizamos cada uno de los descriptores, observamos como el descriptor A (rango de tono de gris 10-79), a diferencia del resto de los descriptores B, C, D y F, experimenta un incremento del número de píxeles en todas las leches. El descriptor A representa aquellos tonos más cercanos al negro y por tanto nos indicaría que con el transcurso del cuajado la cantidad de tonos oscuros van incrementando. Esto sería debido a la evolución de la textura de las muestras a lo largo del tiempo, en el que pasan de un estado líquido a uno semisólido/gel, dependiendo del contenido graso que presentan las muestras. De esta forma, las muestras serían más opacas al haz de luz, es decir, impedirían el paso de la luz, provocando un aumento de número de píxeles en los tonos oscuros, e inversamente un descenso en el número de píxeles de los descriptores más hacia los claros (Figura 9B, C, D, E y F). Además, si nos fijamos en el orden de las leches en los diferentes descriptores, observamos como para el descriptor A nos encontramos la leche entera en la parte superior (mayor número de píxeles) y la desnatada en la inferior (menor número), quedando situadas las semidesnatadas en la zona central. En cambio, para el resto de los descriptores, este orden es inverso. Esta ordenación de las muestras vendría dada también por la permisividad de la leche a ser atravesada por el haz de luz. La leche entera (con mayor cantidad de grasa) sería la que presentaría una mayor dificultad al paso del haz de luz, siendo la desnatada la que lo facilitaría. Esto hace que el número de tonos más oscuros (descriptor A) sea mayor para la leche entera (paso de menos luz), mientras que la de tonos más luminosos (resto de descriptores) para la leche desnatada.

Esta evolución de los descriptores en función de como el cuajado se va generando, es decir, la variación de los tonos de gris en función de opacidad que van tomando las muestras, se describe muy bien en los descriptores E y F. Estos descriptores representan los tonos más luminosos. Para el descriptor E, en el caso de la leche entera, el número de píxeles son pocos y a nada que avanza el cuajado, rápidamente desaparecen, mientras que, para el resto de las leches, se produce un descenso, pero sin llegar a cero. En el caso del descriptor F (tonos más claros que los de E), la leche entera a tiempo 0 ya no presenta píxeles (opaca totalmente a este

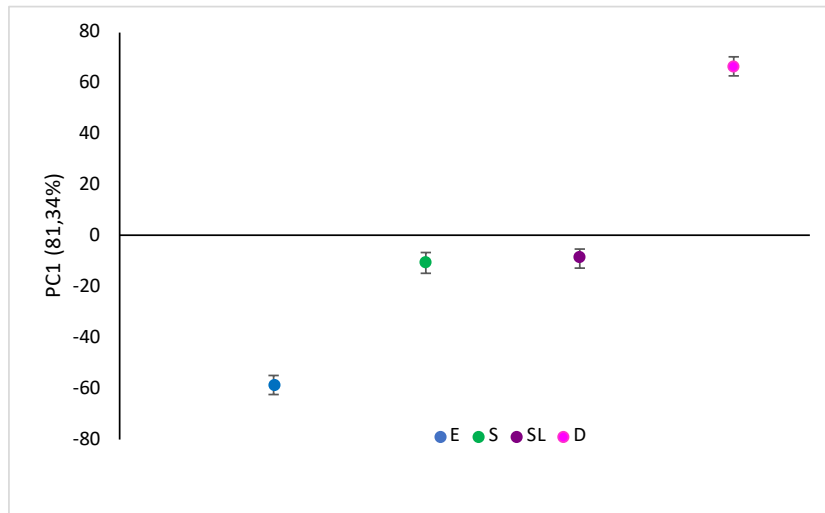
rango de tonos de gris), mientras que las semidesnatadas aun presentan algunos, si bien rápidamente desaparecen, evolucionando solo la leche desnatada.



**Figura 9:** Evolución de los descriptores A (tonos 10-79), B (tonos 80-100), C (tonos 101-120), D (tonos 121-140), E (tonos 141-160) y F (tonos 161-250) durante la etapa de cuajado.

Dado el número diferentes de píxeles de cada tono observados para las leches y la evolución de estos con el cuajado, se procedió a realizar un análisis de PCA con la totalidad de la información de las imágenes. El estudio pretendía mostrar si con la información de la evolución de los descriptores con el tiempo, se puede discriminar entre los 4 tipos de cuajados. En la figura 10 se muestra el valor promedio y el error estándar de los valores de la componente principal 1 (PC1 = 81,34%) del análisis de PCA realizado con los descriptores de imagen obtenidos anteriormente. Solo se muestra la componente 1, dado que el resto de componentes no presentó ninguna asociación espontánea que se pudiese relacionar con parámetros y variables estudiadas.

Como se muestra (figura 10), se produjo una agrupación espontánea de las muestras la cual se pudo catalogar en función del tipo de leche utilizada. Como se puede observar, existieron diferencias significativas entre los tres tipos de leche siendo iguales las dos leches semidesnatadas, una de ellas sin lactosa. Este resultado cuantificaría lo observado en los descriptores, en los que se evidenciaba el efecto del tipo de leche sobre la respuesta láser y del cuajado a lo largo del tiempo de estudio.



**Figura 10:** Análisis de PCA a partir de los datos de imagen obtenidos durante la etapa de cuajado.

Con la finalidad de poder profundizar en la información aportada por los descriptores a fin de caracterizar el cuajado para cada una de las leches, se procedió al estudio de los primeros 10 minutos, dado que los principales cambios en los descriptores aparecen en estos. Para ello se volvió a realizar un análisis de PCA con los datos de imagen, pero en este caso la matriz de datos se estableció de diferente forma. En la figura 11 se muestra un esquema de las matrices de datos utilizadas en ambos estudios de PCA.

| A                 |   | B                                  |                   |
|-------------------|---|------------------------------------|-------------------|
| $E_1$             | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $E_1 t1$                           | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |
| $E_2$             | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $E_1 t2$                           | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |
| $E_3$             | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $E_1 t3$                           | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| $E_{n+1}$         | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $E_{n+1 t=10 \text{ min}}$         | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |
| $Semi_1$          | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $Semi_1 t1$                        | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |
| $Semi_2$          | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $Semi_1 t2$                        | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |
| $Semi_3$          | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $Semi_1 t3$                        | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| $Semi_{n+1}$      | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $Semi_{n+1 t=10 \text{ min}}$      | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| .                 | .   | .                                  | .                 |
| $Desnatada_{n+1}$ | $A1_{t1} A1_{t2} A1_{t3} A1_{tn+1} \dots A6_{tn+1}$ | $Desnatada_{n+1 t=10 \text{ min}}$ | A1 A2 A3 A4 A5 A6 |

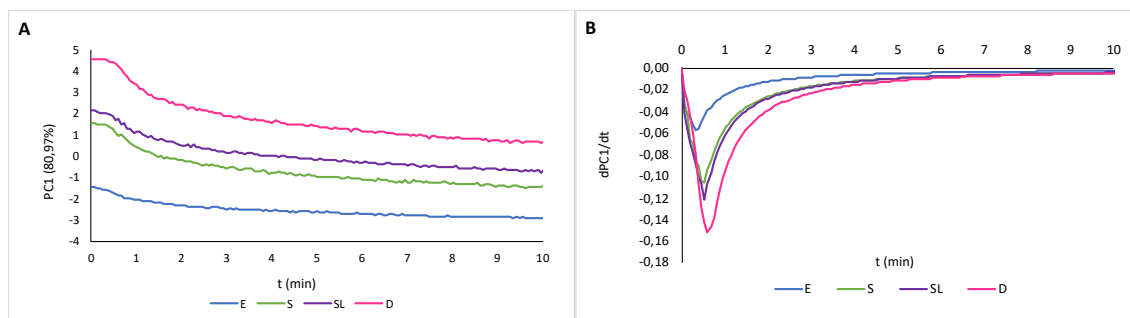
**Figura 11:** Esquema de la matriz de datos de imagen utilizada para el estudio de PCA inicial (A) y para el realizado solo para los 10 primeros minutos del cuajado.

Una vez realizado el análisis de PCA y obtenidas las componentes principales para cada muestra, siendo muestras diferentes cada repetición de una muestra a cada tiempo (4864 muestras), estas se representaron frente al tiempo. La componente principal 1 fue aquella en la que cuando se etiquetaron los valores en función del color de la leche a la que representaban, estos describieron el comportamiento del cuajado de las leches (figura 12A). Como era de esperar, las muestras quedaron diferenciadas a tiempo 0, siendo las muestras desnatadas las

que presentaron mayores valores de PC1 y las enteras los menores. A partir de este tiempo 0, la evolución de los valores de la PC1 descendieron hasta alcanzar valores asintóticos, manteniéndose las diferencias entre las leches, si bien estas no existieron entre las dos leches semidesnatadas. Así los principales cambios para cada leche se observaron durante los primeros 5 minutos, lo que nos podría estar mostrando, según lo observado en el estudio de la viscosidad (figura 5) el final de la etapa de cuajado.

Así, y con la finalidad de incrementar los cambios observados en la evolución de la PC1 para cada tipo de leche, se calculó la primera derivada. La figura 12B muestra los resultados obtenidos durante los 10 minutos. Como se puede observar, para todas las leches se produjo un punto de inflexión muy marcado siendo este mayor para la leche desnatada ( $dPC1/dt = -0,15$ ) que para la leche entera ( $dPC1/dt = -0,06$ ) (tabla 2). Este mayor pico observado por la leche desnatada estaría ligado a lo comentado anteriormente. La leche desnatada, con menor contenido graso, permite inicialmente un mayor paso del haz de luz y por tanto puede sufrir una mayor pérdida de píxeles con su cuajado. En cambio, la leche entera, dado que inicialmente permite un menor paso de luz, con su cuajado, la variación de píxeles también es menor.

Es importante remarcar que la pendiente para llegar al punto de inflexión de cada leche es similar, por lo que la leche desnatada, con mayor valor, fue la que necesitó también de un mayor tiempo. y por el contrario la entera de menor. En el caso de las leches semidesnatadas, los tiempos fueron similares entre ellos y se situaron entre las dos primeras (Tabla 2). Esta misma pendiente estaría reflejando una misma velocidad de cuajado lo que se explicaría por un exceso de cuajo añadido, lo cual también explicaría la velocidad tan rápida con la que se dio este para las cuatro leches, como se ha comentado anteriormente.



**Figura 12:** Análisis de PCA a partir de los datos de imagen obtenidos durante los 10 primeros minutos de la etapa de cuajado. Análisis en función del tiempo (A); Primera derivada de los datos representados en la figura 11A (B).

**Tabla 2:** Valores de tiempo de los puntos de inflexión de las series.

| Leche | Tiempo (min); (s) | dPC1 / dt |
|-------|-------------------|-----------|
| E     | 0,4; 24           | -0,06     |
| S     | 0,53; 32          | -0,11     |
| SL    | 0,53; 32          | -0,12     |
| D     | 0,6; 36           | -0,15     |

#### 4.2.2. ESTABILIDAD DE LA CUAJADA.

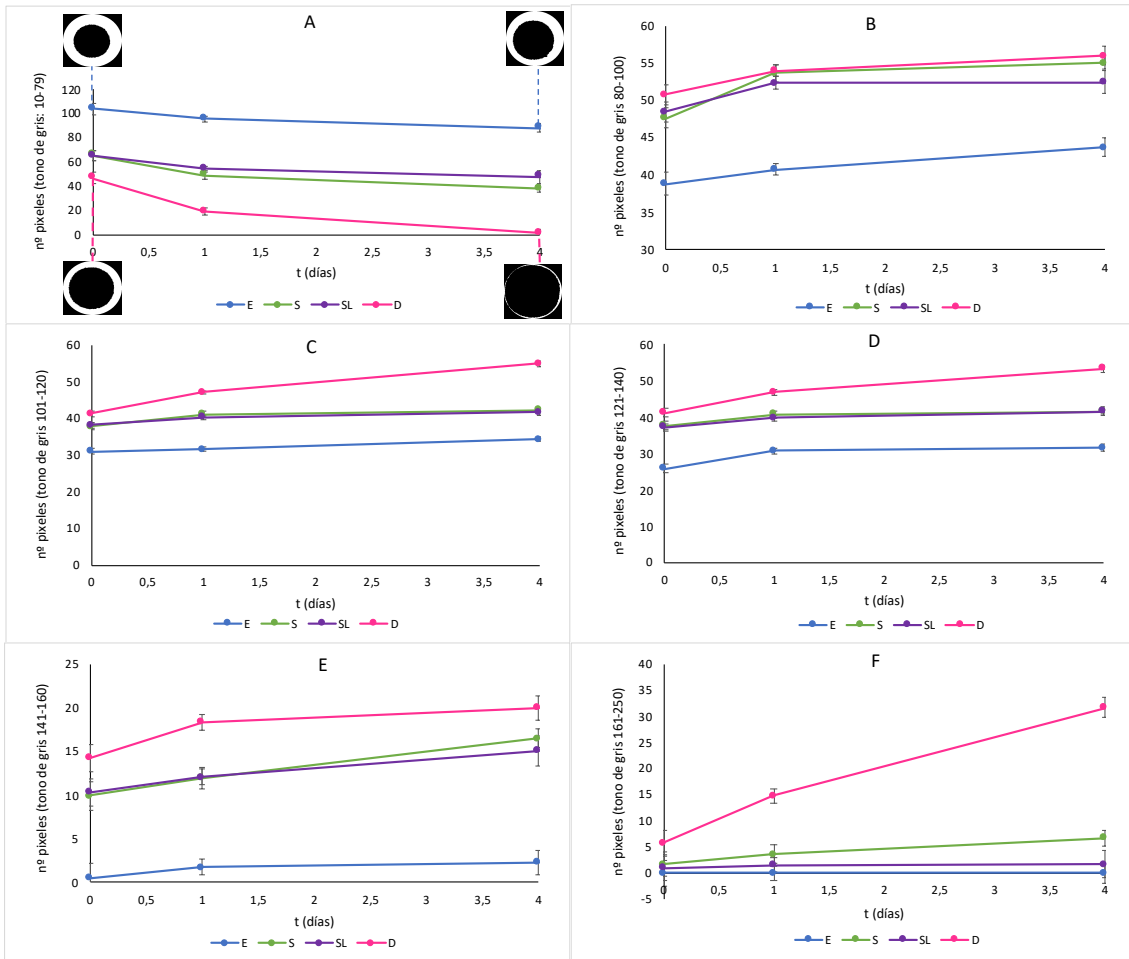
Una vez analizados los datos obtenidos mediante la técnica de imagen para la etapa de cuajado, se procedió a realizar el mismo con los datos obtenidos para las muestras en refrigeración durante 1 y 4 días, a fin de evaluar la estabilidad de la cuajada en cada una de las leches mediante la técnica de imagen.

En la figura 13 se muestra la evolución de los 6 descriptores A, B, C, D, E y F, siendo estos el número de píxeles entre los tonos de grises 10-79, 80-100, 101-120, 121-140, 141-160 y 161-250 respectivamente.

Al igual que en la etapa de cuajado (Figura 9), los descriptores B, C, D, E y F evolucionaron de forma inversa al descriptor A en el que se dio un descenso del número de píxeles a lo largo del tiempo en refrigeración para cada una de las leches analizadas. A modo de ejemplo en la figura 13A se muestra la segmentación de la imagen para la cuajada de leche entera a tiempo 0 y 4 días (arriba) y de la leche desnatada (abajo).

Así tras la finalización del cuajado (día 0), la cuajada obtenida con la leche entera sería la más opaca (mayor número de píxeles para el descriptor A y menores para el resto) y la más translúcida la obtenida con la leche desnatada. Este resultado reflejaría una cuajada más compacta obtenida con la leche entera. Según algunos estudios, a mayor contenido de proteína y grasa se generan cuajadas más duras y con mayor capacidad de retención de agua (Panthi et al., 2019).

Con el transcurso de los días en refrigeración, todas las cuajadas descendieron los valores del descriptor A e incrementaron los del resto de descriptores. Esto podría ser debido a la compactación de las cuajadas que evidenció la sinéresis (figura 7) y por tanto una mayor reorganización interna del sistema. Según el fenómeno físico denominado localización de Anderson, la difusión de la luz en un sistema desordenado puede llegar a detenerse (se confina) cuando el desorden alcanza un valor crítico. El proceso de scattering llevado a cabo por el elevado desorden hace que el material reduzca la transmisión de luz a través de este, reduciéndose exponencialmente el coeficiente de transmisión con el espesor de la muestra (Wiersma et al., 1997), pudiendo llegar a ser opaco. Al compactarse la cuajada reduciría su espesor y se estructuraría de forma que facilitaría el paso de luz. Además, la presencia de suero como consecuencia de la inestabilidad de la red que conforma el gel para retener agua (Walstra, 1993) favorecería aun más el paso de luz.

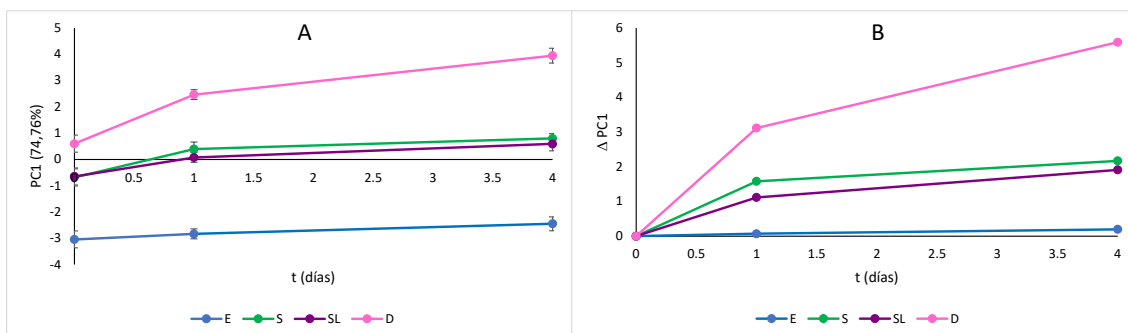


**Figura 13:** Evolución de los descriptores A (tonos 10-79), B (tonos 80-100), C (tonos 101-120), D (tonos 121-140), E (tonos 141-160) y F (tonos 161-250) de las cuajadas a días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.

La figura 14A muestra el estudio estadístico de anova con el valor promedio y el error estándar de los valores de la componente principal 1 (PC1 = 74,76%) del análisis de PCA realizado con los descriptores de imagen obtenidos para las cuajadas a día 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración. La componente 1 fue aquella que pudo ser relacionada con la evolución de las 4 cuajadas con el tiempo de permanencia en refrigeración.

Como se ha venido observando a lo largo del estudio, se evidenció el efecto materia prima. Así las muestras desnatadas fueron las que presentaron mayores valores de PC1, siendo las cuajadas de leche entera las que los tuvieron menores. Con la finalidad de eliminar este efecto se realizó el cálculo del incremento de los valores de la PC1 (figura 14B). Como se puede observar todas las leches experimentaron un incremento, siendo la leche desnatada la que lo experimentó en mayor medida frente a la entera que fue el menor. Este resultado estaría mostrando una mayor evolución de la leche desnatada frente a la entera lo cual podría estar relacionado con lo observado mediante los análisis fisicoquímicos en los que la cuajada desnatada fue la que en mayor medida aumentó su dureza (figura 6) y su sinéresis (figura 7).





**Figura 14:** Análisis de PCA (A) e incremento de los valores de PC1 (B), de los datos de imagen obtenidos para las cuajadas a días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.

### 4.2.3. RELACIÓN DATOS FISCOQUÍMICOS CON IMAGEN.

Una vez analizados los datos de imagen se procedió a evaluar su posible relación con los datos de viscosidad obtenidos en el estudio de la etapa de cuajado y de textura en el de la estabilidad de la cuajada.

Para el estudio de la etapa de cuajado se relacionaron los datos del pico máximo de viscosidad (figura 5) y de dureza máxima tras el cuajado (tiempo 0, figura 6) con los valores de la PC1 obtenida con todos los datos de imagen (figura 10). Pero además también se relacionaron los mismos con el pico máximo y tiempo en el que se dio este, para los valores de la primera derivada de la PC1 del estudio de PCA de los datos de imagen durante los 10 primeros minutos de cuajado (figura 12B).

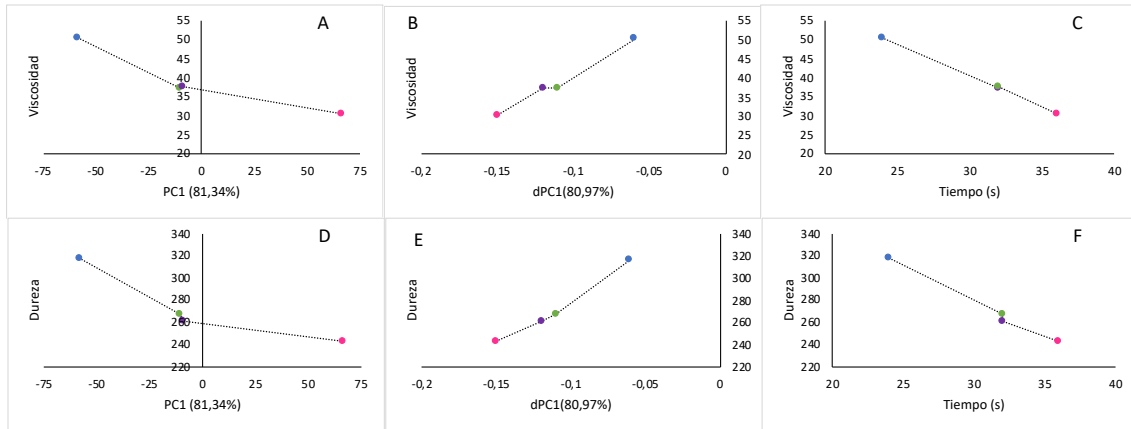
Para el estudio de la etapa de estabilidad de la cuajada se relacionaron los datos de la textura (figura 6) y de la sinéresis (figura 7), a los 0, 1 y 4 días de estudio, con los de la PC1 y su incremento obtenidos con los datos de imagen (figura 14).

#### 4.2.3.1. ETAPA DE CUAJADO.

En la figura 15 se muestra la relación existente entre los valores de viscosidad y dureza con los de imagen. Como puede observarse, en todos los casos existió una relación lineal entre los datos. Esto estaría mostrando como la evolución observada en los descriptores estaría relacionada con el cuajado de las muestras y que esta relación sería proporcional a la obtenida mediante el viscosímetro y el texturómetro, pero con la ventaja de haber realizado solo un ensayo, en continuo y sobre la misma muestra.

De los parámetros de imagen relacionados con la viscosidad y la textura, aquellos obtenidos del estudio de los 10 primeros minutos fueron los que presentaron una mayor relación. En la tabla 3 se muestran las ecuaciones y los valores de  $R^2$  del ecuacionado de las relaciones de la figura 15. Como se puede observar, tanto el valor máximo de la derivada de la PC1 como el tiempo en el que se da, tuvieron mayores valores de  $R^2$  que los obtenidos para la relación obtenida con los valores de la PC1 para toda la información de imagen. Este resultado

podría estar reflejando como el punto máximo de la derivada, y el tiempo en el que se da, podrían estar expresando el fin del cuajado y que sería a partir de este punto en el que la cuajada va estructurándose y evolucionando.



**Figura 15:** Relación entre la viscosidad o dureza con los valores de la PC1 obtenidos en el estudio de la PCA para la totalidad de los datos de imagen (A y D). Relación entre la viscosidad o dureza con los valores máximos de la primera derivada de la PC1 del estudio de la PCA con los datos de imagen de los primeros 10 minutos de cuajado (B y E), así como con el tiempo en el que se dan estos valores máximos (C y F).

**Tabla 3:** Ecuaciones y valores de R2 obtenidos para la relación entre la viscosidad y la dureza con los datos de imagen.

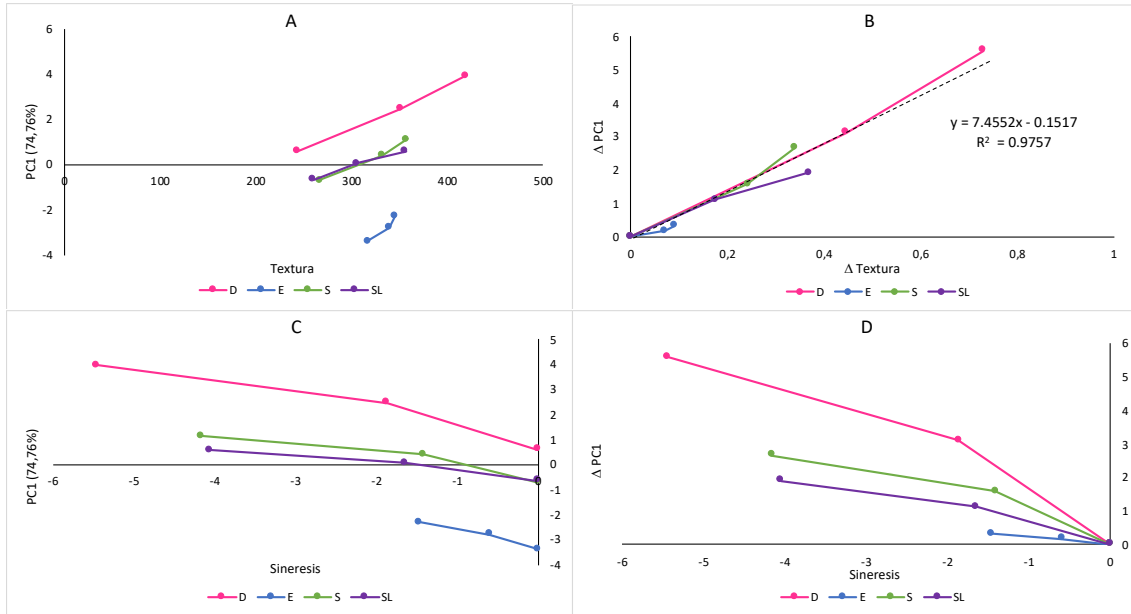
|                   |                   | Ecuación                |              |
|-------------------|-------------------|-------------------------|--------------|
| <b>Viscosidad</b> | <b>PC1</b>        | $y = -0.1501x + 38.438$ | $R^2 = 0.88$ |
|                   | <b>dPC1/dt</b>    | $y = 219.4x + 63.005$   | $R^2 = 0.98$ |
|                   | <b>Tiempo (s)</b> | $y = -1.6437x + 89.824$ | $R^2 = 0.99$ |
| <b>Dureza</b>     | <b>PC1</b>        | $y = -0.553x + 270.46$  | $R^2 = 0.80$ |
|                   | <b>dPC1/dt</b>    | $y = 841.37x + 364.6$   | $R^2 = 0.98$ |
|                   | <b>Tiempo (s)</b> | $y = -6.2834x + 466.83$ | $R^2 = 0.99$ |

#### 4.2.3.2. ESTABILIDAD CUAJADA.

En la figura 16 A y B se muestra la relación entre la textura y la PC1 (74,76%) o su incremento respectivamente. Por otro lado, en la figura 16 C y D se muestra la misma pero en este caso con la sinéresis.

Al observar la figura 15B, se aprecia como el incremento de la PC1 frente al incremento de la textura mostraron una relación lineal, independiente del tipo de leche utilizada, la cual pudo ser ecuacionada con un valor de  $R^2$  de 0.98. En cambio, si bien existió una relación entre la sinéresis y los datos de imagen, esta fue dependiente del tipo de leche.

Estos resultados estarían mostrando como la evolución de los descriptores de imagen a lo largo de los 4 días de estudio estarían relacionados con la evolución de la textura de las cuajadas y que por tanto se podría determinar la textura de estas de forma no destructiva mediante la técnica de imagen.



**Figura 16:** Relación entre la textura, sinéresis (A y C, respectivamente) o el incremento de ambos (B y D, respectivamente) con respecto a los valores de PCA o su incremento para el estudio de estabilidad de las cuajadas a días 0, 1 y 4 de permanencia en refrigeración.

## 5. CONCLUSIONES.

El estudio realizado muestra como la técnica no destructiva basada en el reconocimiento de patrones de dispersión láser generados al interactuar con la matriz del alimento permite caracterizar la evolución del cuajado de la leche aportando información en continuo de este, así como de la estabilidad de la cuajada formada. Así la técnica ha sido relacionada con la viscosidad evaluada mediante un viscosímetro y con la textura evaluada mediante un texturómetro, pero lo ha hecho aplicando una sola medición en continuo de forma no destructiva y sobre una misma muestra.

La evolución de los descriptores se ha relacionado con la textura de la cuajada a cada tiempo de estudio, siendo esta dependiente del contenido graso inicial. Ello ha permitido conocer la influencia de la grasa en el cuajado de la leche y en su textura final tras la estabilización en frío durante 1 y 4 días.

Nuevos estudios son necesarios con el fin de poder incrementar la calidad de los resultados, hacerlos más robustos y que permitan ser aplicados de un modo menos teórico. Entre otros, estudiar la información procedente de las imágenes en espacios de color como el

RGB y extraer descriptores para cada uno de los canales, modificaciones en el dispositivo o combinar diferentes técnicas de análisis de imagen.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

Adebayo, S. E.; Hashim, N.; Abdan, K.; Hanafi, M. (2016). Application and potential of backscattering imaging techniques in agricultural and food processing - a review. *Journal of Food Engineering*, 169:155-164.

Akkerman, J. C. (1992). *Drainage of curd*. Doctoral Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen.

Arango, O.; Castillo, M. (2018). A method for the inline measurement of milk gel firmness using an optical sensor. *Journal Dairy Science*, 101(5): 3910-3917.

Arango, O.; Trujillo, A. J.; Castillo, M. (2013). Influence of fat replacement by inulin on rheological properties, kinetics of rennet milk coagulation, and syneresis of milk gels. *Journal of Dairy Science*, 96: 1984-1996.

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.

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

Chen, Y. Y.; Ren, K.; Shao, X. F.; Dong, Q. L.; Pan, L. Q.; And Tu, K. (2006). Modeling apple quality changes based on laser scattering image analysis under simulated shelf life conditions. *In IV international conference on managing quality in chains-The integrated view on fruits and vegetables quality* 712 (pp. 371-380).

Crespo P.; 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, C. L.; Huynh, G.; Fried, D. (2006). Light scattering properties of natural and artificially demineralized dental enamel at 1310 nm. *Journal of Biomedical Optics*, 11(3): 034023.

De Kruif, C. G.; Huppertz, T.; Urban, V. S.; Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *In Advances in Colloid and Interface Science*, 171: 36-52.

- Derra, M.; Bakkali, F.; Amghar, A.; Sahsah, H. (2018). Estimation of coagulation time in cheese manufacture using an ultrasonic pulse-echo technique. *Journal of Food Engineering*, 216: 65-71.
- De Sá, E. M. F.; Bordignon-Luiz, M. T. (2010). The effect of transglutaminase on the properties of milk gels and processed cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2): 243–251.
- 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.
- Frentz, R. (1965). Application de la thrombélastographie de hartert a l’étude de la coagulation du lait. *Lait*. 45, 489-508.
- Gervais, A.; Vermeire, D. (1983). A critical study and improvement of the cheese curd torsionmeter. *Journal of Texture Studies*, 14: 31-45.
- Guo, L.; Van Hekken, D. L.; Tomasula, P. M.; Tunick, M. H.; Huo, G. (2012). Effect of salt on microbiology and proteolysis of Queso Fresco Cheese during storage. *Milchwissenschaft*, 67: 74-77.
- Guo, M.; Park, Y. W.; Dixon, P. H.; Gilmore, J. A.; Kindstedt, P. S. (2004). Relationship between the yield of cheese (Chevre) and chemical composition of goat milk. *Small Ruminant Research*, 52: 103-107.
- Hashim, N.; Pflanz, M.; Regen, C.; Janius, R. B.; Rahman, R. A.; Osman, A.; ... And Zude, M. (2013). An approach for monitoring the chilling injury appearance in bananas by means of backscattering imaging. *Journal of Food Engineering*, 116(1): 28-36.
- Hickey, C. D.; Auty, M.; Wilkinson, M. G.; Sheehan J. J. (2015). The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localization and their interactions during ripening - a review. *Trends Food Science Technology*, 41:135-148.
- Horne, D. S.; Banks, J. M. (2004). Rennet-induced coagulation of milk. In *cheese: Chemistry, physics and microbiology*: 47-70
- Horne, D. S. (2002). Casein structure, self-assembly and gelation. *In current opinion in colloid and interface science*, 11: 148-153.
- Kelly, P.; Woonton, B.W.; Smithers, G.W. (2009). Improving the sensory quality, shelf-life and functionality of milk. *In Functional and Speciality Beverage Technology*, (pp.170-231)

- Law, B.; Tamime, A. (2010). The fundamentals of cheese technology. *In technology of cheesemaking, 2<sup>nd</sup> edition, 484 pp.*
- Lucey, J.; Kelly, J. (1994). Cheese yield. *International Journal of Dairy Technology, 47*: 1-14.
- McMahon, D. J.; Brown, R. J. (1982). Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. *Journal of Dairy Science, 65*: 1639-1642.
- Maconi, G.; Penttilä, A.; Kassamakov, I.; Gritsevich, M.; Helander, P.; Puranen, T.; ... y Muinonen, K. (2018). Non-destructive controlled single-particle light scattering measurement. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 204*: 159-164.
- Marcais, M. H. (1965). Emploi de la thrombélastographie pour l'étude de la coagulation du lait. *Lait, 45*, 241-250.
- Mellema, M.; Bot, A. (2009). Milk-based functional beverages. In *Functional and speciality beverage technology*. Woodhead Publishing (pp.232-258).
- 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/](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.; Akhlaghian Tab, F.; Kalaj, Y. R.; Mohtasebi, S. S.; 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. (2011). Cheese: gel firmness and its measurement. *In Encyclopedia of Dairy Sciences: 2<sup>nd</sup> Edition.*
- O'callaghan, Donal 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.
- Ong, L.; Dagastine, R. R.; Kentish, S. E.; Gras, S. L. (2011). Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. *LWT - Food Science Technology, 44*: 1291–1302.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Fao. (2005) "Tema de debate: el papel de la leche y los productos lácteos en la nutrición humana". 27 de mayo de 2015.

- Özer, B.H.; Kirmaci, H.A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy technology*, 63: 1–15.
- Panthi, R. R.; Kelly, A. L.; Sheehan, J. J.; Bulbul, K.; Vollmer, A. H.; McMahon, D. J. (2019). Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 177–189.
- 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): 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.
- Richardson, G. H.; Gandhi, N. R.; Divatia, M. A.; Ern Strom, C.A. (1971). Continuous curd tension measurements during milk coagulation. *Journal of Dairy Science*, 54: 182-186.
- Rosero 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.
- Tu, K.; Jancsó, P.; Nicolaï, B.; De Baerdemaeker, J. (2000). Use of laser-scattering imaging to study tomato-fruit quality in relation to acoustic and compression measurements. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(5): 503-510.
- 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.
- Walstra, P. (1993). The syneresis of curd. In cheese: *Chemistry, physics and microbiology*. 1<sup>st</sup> edition, Elsevier, 135-177.

Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. *Journal of dairy science*. 73:1965-1979-

Walstra, P.; Wouters, J. T. M.; Geurts T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. CRC Press. Nueva York, EE.UU. (pp. 140-155).

Yadav, J. S. S.; Yan S.; Pilli S.; Kumar, L.; Tyagi R.; Suram-Palli, R. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33:756-774.

Wiersma, D. S.; Bartolini, P.; Legendijk, A.; Righini, R. (1997). Localization of light in a disordered medium. *Nature*, 390(6661), 671.