



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ingeniería Química

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral
para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ingeniería Química

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONGELACIÓN SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE SISTEMAS
ELABORADOS CON PROTEÍNAS DEL SUERO**

Ing. Qca. Bárbara Erica del Valle Meza

I N T E C



Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química

Director: Dra. Amelia C. Rubiolo

Codirector: Dra. Roxana A. Verdini

Miembros del Jurado: Dra. Ana Pilosof

Dra. Alicia Califano

Dr. Julio Deiber

2009

Meza, Bárbara Erica del Valle

Estudio del efecto de la congelación sobre las características físicas y químicas de sistemas elaborados con proteínas del suero. - 1a ed. - Santa Fe : el autor, 2009. 213 p. : il. ; 30x21 cm.

ISBN 978-987-05-6417-1

1. Ingeniería Química. 2. Tesis de Doctorado. I. Título
CDD 660

ISBN 978-987-05-6417-1



9 789870 564171

*A Juan Manuel
y a mi mamá María*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Amelia Rubiolo y a mi codirectora Roxana Verdini por todo el tiempo que dedicaron para poder hacer realidad este trabajo, por la buena predisposición que siempre tuvieron para solucionar los problemas que surgieron en el camino y, sobre todo, por la orientación que siempre trataron de brindarme.

A todos mis compañeros del Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología. Especialmente a Daniel De Piante Vicin por su por su fiel compañerismo y buena predisposición para ayudarme a realizar los ensayos fisicoquímicos y reológicos.

Al INTEC por haberme permitido disponer de los medios necesarios para realizar mi labor. Al CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción de Científica y Tecnológica de la Argentina por la beca y los subsidios otorgados a los proyectos que posibilitaron el desarrollo de este trabajo de tesis.

A los miembros del Jurado por su participación y buena predisposición.

A Beatriz Argüello y a Patricia Scipioni por haberme iniciado en el mundo de la investigación.

A mi compañero de la vida Juan Manuel por elegirme todos los días para compartir este camino, por su amor infinito y por despertar en mí las ganas de ser mejor cada día.

A mis padres por haberme dado la vida y por haberme enseñado a luchar por mis sueños. A mi mamá María por todo su amor incondicional y a mi papá Ricardo por cuidarme siempre desde el cielo.

RESUMEN

Las proteínas del suero proveniente del proceso de elaboración de quesos se caracterizan por poseer propiedades funcionales específicas y un elevado valor nutricional, condiciones que favorecen su utilización en la elaboración de sistemas alimentarios. El proceso de congelación (congelación, almacenamiento del producto congelado y descongelación) es un tratamiento ampliamente utilizado para conservar tanto ingredientes como alimentos elaborados. No obstante, la formación de cristales de hielo puede afectar la calidad de estos productos. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de Tesis fue estudiar el efecto del proceso de congelación sobre las características físicas y químicas de sistemas alimentarios (suspensiones y un queso blando magro) elaborados con proteínas del suero.

Por un lado, se estudiaron suspensiones de proteína del suero con 5 y 9% p/v de proteína total (correspondiente a un rango de concentración semidiluido) que fueron tratadas térmicamente a 70,0, 72,5, 75,0 y 77,5 °C y luego sometidas al proceso de congelación. Se analizó el contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados y se determinó la cinética global de desnaturización-agregación. Las propiedades reológicas de las suspensiones sin tratamiento térmico y con un contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados del 60%, fueron estudiadas por medio de ensayos oscilatorios realizando barridos de frecuencia dentro de la región de viscoelasticidad lineal.

Por otro lado, se estudiaron quesos blandos magros elaborados con proteínas del suero que fueron sometidos al proceso de congelación junto con quesos refrigerados, que se tomaron como control, a distintos tiempos de maduración. Con el objetivo de evaluar las propiedades fisicoquímicas se determinaron los contenidos

de humedad, las concentraciones de sal, los valores de pH, los contenidos de proteína total, los contenidos de proteína en la fracción soluble a pH 4,6 y se calculó el índice de maduración. Las propiedades reológicas de los quesos se analizaron mediante ensayos oscilatorios, realizando barridos de frecuencia dentro de la región de viscoelasticidad lineal.

En las suspensiones de proteína del suero, el proceso de congelación produjo cambios en el contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados y en las constantes de reacción de desnaturalización-agregación solamente en las suspensiones tratadas a 72,5 °C. Este fenómeno se debió posiblemente al efecto de la crioconcentración que pudo ocasionar cambios en la estructura de los agregados proteicos. Los espectros mecánicos de las suspensiones presentaron un comportamiento similar al de los coloides cristalinos. El análisis de los parámetros del modelo de Ley de Potencia ($G' = a\omega^x$ y $G'' = b\omega^y$) evidenciaron que G'' fue más influenciado por las condiciones experimentales estudiadas (contenido de proteína total, tratamientos térmicos y proceso de congelación) que G' , debido principalmente a los cambios observados en el parámetro y . La aplicación del Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a las suspensiones de proteínas del suero pudo realizarse únicamente en algunas condiciones experimentales y en un rango acotado de temperaturas (30 a 50 °C), indicando que dichas suspensiones se comportan como materiales termorreológicamente simples en esta zona del espectro mecánico.

En los quesos blandos magros elaborados con proteínas del suero, el proceso de congelación produjo cambios solamente en los valores de pH e índice de maduración, en donde los valores correspondientes a los quesos congelados fueron

mayores al de los quesos refrigerados. El aumento en el índice de maduración evidenció que el proceso de congelación produjo un aumento en el grado de proteólisis de los quesos. Los espectros mecánicos de los quesos presentaron un comportamiento similar al de los sólidos viscoelásticos. Los resultados provenientes del análisis de los parámetros del modelo de Ley de Potencia ($G'=a\omega^x$ y $G''=b\omega^y$) demostraron que los quesos presentaron una dependencia de G' y G'' con el tiempo de maduración. Los valores de los parámetros a y b disminuyeron mientras que los valores de los exponentes x e y aumentaron, relacionándose con una disminución en el grado de estructuración de la red de caseína de los quesos durante la maduración. El proceso de congelación afectó únicamente a los valores del parámetro a , en donde los quesos congelados presentaron menores valores en comparación a los quesos refrigerados. Este fenómeno fue atribuido a la posible deshidratación local de las proteínas que provoca la ruptura de la estructura del queso luego de la descongelación. El Principio de Superposición Tiempo-Temperatura pudo aplicarse en el rango de bajas temperaturas (10 a 30 °C), indicando que en esta zona los quesos se comportan como materiales termorreologicamente simples. Además, pudo aplicarse satisfactoriamente el modelo Maxwell con 5 y 6 elementos a las curvas maestras obtenidas, indicando que el comportamiento viscoelástico de los quesos analizados puede representarse por medio de este modelo, pudiéndose utilizar además para predecir funciones viscoelásticas lineales.

ÍNDICE

Capítulo 1	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. El suero como subproducto de la elaboración de quesos.....	2
1.2. Las proteínas del suero.....	3
1.3. Propiedades funcionales de las proteínas del suero.....	5
1.4. Productos comerciales a base de proteínas del suero.....	7
1.5. Utilización de proteínas del suero en la elaboración de quesos.....	10
1.6. La congelación de alimentos.....	14
Capítulo 2	
OBJETIVOS	17
Capítulo 3	
FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	20
3.1. Suspensiones de proteínas del suero.....	21
3.1.1. Estados conformacionales de las proteínas del suero y su relación con la desnaturalización y la agregación.....	21
3.1.2. Suspensiones de proteína del suero que contienen proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados y cinética global de desnaturalización-agregación.....	24
3.2. Quesos elaborados con proteínas del suero.....	30
3.2.1. Cambios fisicoquímicos y estructurales experimentados durante la maduración de quesos.....	30
3.2.2. Quesos elaborados con proteínas del suero y cambios experimentados durante la maduración.....	34
3.3. Reología y reometría de sistemas alimentarios.....	38
3.3.1. Comportamiento reológico de suspensiones de proteína del suero.....	45
3.3.2. Comportamiento reológico de quesos.....	48
3.3.3. Principio de Superposición Tiempo-Temperatura.....	50
3.3.4. Aplicación del Principio de Superposición Tiempo-Temperatura en sistemas alimentarios.....	56
3.3.5. El modelo de Maxwell.....	58
3.4. Congelación de sistemas alimentario.....	63
3.4.1. Congelación de suspensiones de proteína del suero.....	63
3.4.2. Congelación de quesos.....	64

Capítulo 4	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
4.1. Estudio de suspensiones de proteínas del suero.....	68
4.1.1. Concentrado de proteína del suero	68
4.1.2. Análisis fisicoquímico del WPC.....	68
4.1.3. Preparación de suspensiones de WPC.....	69
4.1.4. Análisis del contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados de las suspensiones de WPC.....	70
4.1.4.1. Tratamientos térmicos y congelación.....	70
4.1.4.2. Determinación del contenido de proteína soluble a pH 4,6 y de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados.....	71
4.1.4.3. Cinética global de desnaturización-agregación de las proteínas del suero.....	73
4.1.5. Análisis de las propiedades reológicas de las suspensiones de WPC.....	74
4.1.5.1. Suspensiones de WPC.....	74
4.1.5.2. Ensayos reológicos.....	75
4.1.5.3. Determinación de los parámetros reológicos.....	76
4.1.5.4. Determinación de los tiempos característicos de relajación.....	76
4.2. Estudio de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero.....	76
4.2.1. Quesos.....	76
4.2.2. Almacenamiento y congelación de los quesos.....	77
4.2.3. Toma de muestra.....	77
4.2.4. Análisis de las propiedades fisicoquímicas de los quesos durante la maduración.....	79
4.2.4.1. Contenido de humedad.....	79
4.2.4.2. Valores de pH.....	79
4.2.4.3. Concentración de sal.....	79
4.2.4.4. Proteína total.....	79
4.2.4.5. Nitrógeno en la fracción soluble a pH 4,6.....	80
4.2.4.6. Índice de maduración.....	81
4.2.5. Análisis de las propiedades reológicas de los quesos durante la maduración.....	81
4.2.5.1. Muestras de queso.....	81
4.2.5.2. Ensayos reológicos.....	81
4.2.5.3. Determinación de los parámetros reológicos.....	82
4.2.5.4. Cinética de decaimiento de los parámetros reológicos.....	82
4.3. Caracterización del comportamiento reológico de los sistemas alimentarios en estudio.....	83
4.3.1. Aplicación del Principio de Superposición Tiempo-Temperatura.....	83
4.3.2. Utilización del modelo de Maxwell.....	84
4.4. Análisis estadístico.....	84

Capítulo 5	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	86
5.1. Efecto del proceso de congelación sobre el contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados y sobre las propiedades reológicas de suspensiones de proteína del suero.....	87
5.1.1. Contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados.....	87
5.1.1.1. Análisis del contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados	87
5.1.1.2. Cinética global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero.....	91
5.1.1.2.1. Orden de reacción.....	91
5.1.1.2.2. Constantes de reacción.....	93
5.1.1.2.3. Dependencia de las constantes de reacción con la temperatura.....	95
5.1.1.3. Estimación del contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados	96
5.1.2. Propiedades reológicas.....	98
5.2.2.1. Región de viscoelasticidad lineal.....	98
5.1.2.2. Análisis descriptivo de los espectros mecánicos.....	98
5.1.2.3. Parámetros reológicos.....	107
5.1.2.4. Tiempos característicos de relajación.....	110
5.2. Efecto del proceso de congelación sobre las propiedades fisicoquímicas y reológicas de queso blando magro elaborado con proteínas del suero.....	114
5.2.1. Propiedades fisicoquímicas.....	114
5.2.1.1. Contenido de humedad.....	114
5.2.1.2. Valores de pH.....	116
5.2.1.3. Concentración de sal.....	118
5.2.1.4. Proteína total.....	119
5.2.1.5. Índice de maduración.....	121
5.2.2. Propiedades reológicas.....	123
5.2.2.1. Región de viscoelasticidad lineal.....	123
5.2.2.2. Análisis descriptivo de los espectros mecánicos.....	125
5.2.2.3. Parámetros reológicos.....	128
5.2.2.4. Cinética de decaimiento del parámetros reológico a	130
5.2.3. Correlaciones entre propiedades fisicoquímicas y parámetros reológicos.....	131
5.3. Caracterización del comportamiento reológico de los sistemas alimentarios en estudio	134
5.3.1. Principio de Superposición Tiempo-Temperatura.....	134
5.3.1.1. Suspensiones de WPC.....	134
5.3.1.2. Queso blando magro elaborado con proteínas de suero.....	143
5.3.2. Modelo de Maxwell.....	147

Capítulo 6	
CONCLUSIONES.....	151
NOMENCLATURA.....	155
APÉNDICES	166
BIBLIOGRAFÍA.....	189

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. El suero como subproducto de la elaboración de quesos

La Argentina exhibe una larga tradición en la elaboración y el consumo de productos lácteos, siendo su producción en los últimos años de aproximadamente 1.500.000 toneladas/año. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), nuestro país fue el noveno productor mundial de quesos en el año 2004, con una participación del 2,3%. En términos de volumen, el 32% de la leche procesada por la industria argentina en 2007 fue utilizada para la elaboración de quesos, con una producción de alrededor de 467.000 toneladas/año ([SAGPyA, 2007](#)).

El queso surgió en la antigüedad como una forma de preservación de los nutrientes de la leche ([Fox, 1987](#)). El proceso de elaboración de quesos está compuesto por varias etapas, entre ellas la coagulación. Durante la misma puede obtenerse un subproducto conocido como suero. El suero de quesería se caracteriza por ser un producto de elevado pH, una gran demanda biológica de oxígeno y un alto contenido de agua, condiciones que favorecen su rápido deterioro. Por lo tanto, el mismo no puede ser eliminado por las industrias queseras como efluente sin tratamiento previo debido a los problemas de contaminación ambiental que puede ocasionar. Sin embargo, cuando el suero es sometido a tratamientos biológicos pueden presentarse una serie de dificultades como por ejemplo, la inactivación de los microorganismos debido a la alta concentración de lactosa y a la presencia de proteínas solubles.

El suero de quesería posee aproximadamente el 95% de la lactosa, el 25% de las proteínas y el 8% de la materia grasa presentes en la leche ([Smithers y Copeland,](#)

1997). La presencia de estos valiosos nutrientes motivó, desde la antigüedad, la reutilización del suero para diferentes propósitos siendo su uso tradicional la alimentación de ganado porcino. Hoy en día en el mundo, las industrias lácteas se encuentran interesadas en el desarrollo y la aplicación de tecnologías que permitan la separación y acondicionamiento de los nutrientes de alta calidad presentes en el suero. De esta forma, los mismos pueden ser utilizados como ingredientes en la producción de alimentos, mejorando los beneficios económicos del proceso de elaboración de quesos.

1.2. Las proteínas del suero

Entre los componentes del suero que presentan mayor valor nutricional se encuentran las proteínas. Se denominan proteínas del suero a aquellos compuestos nitrogenados que permanecen solubles en el suero de la leche luego de haberse producido la precipitación isoelectrica de las caseínas a pH 4,6 (de Wit, 1981). Estas proteínas tienen estructura y propiedades diferentes a las caseínas, ya que no están asociadas a las micelas y además son susceptibles a la desnaturalización y/o agregación por calor.

Las principales proteínas del suero son la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina, las inmunoglobulinas y la albúmina sérica bovina. También se encuentran presentes algunas fracciones proteicas menores tales como la proteasa peptona, la lactoferrina, el caseinomacropéptido y varias enzimas. En la Tabla 1.1 se detallan algunas de las propiedades fisicoquímicas de las principales proteínas del suero.

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas de las principales proteínas presentes en el suero de la leche (Bryant y McClements, 1998).

Proteína	Porcentaje [%]	Punto isoelectrico	Peso molecular [kD]	Temperatura de desnaturalización [°C]
β -lactoglobulina	60,0	5,2	18,4	78
α -lactoalbúmina	22,0	4,8-5,1	14,2	62
Inmunoglobulinas	9,1	5,5-6,8	15,0-96,0	72
Albúmina sérica bovina	5,5	4,8-5,1	60,0	64

La β -lactoglobulina es la proteína que se encuentra en mayor proporción, siendo aproximadamente el 60% del total de las proteínas del suero (correspondiente a una concentración de 2,0 a 4,0 g/L). A temperatura ambiente y a pH neutro existe como dímero pero, a altas temperaturas o a valores extremos de pH, se disocia en monómeros. Contiene 162 residuos de aminoácidos, siendo 5 de ellos residuos de cisteína que consisten en dos uniones disulfuro intramoleculares uniendo los residuos 66-160 y 106-119 o 121 y un grupo SH no reactivo en el residuo 121 o 119, respectivamente. Los residuos no reactivos pueden facilitar la polimerización de las proteínas para formar enlaces disulfuro covalentes intermoleculares durante los tratamientos térmicos a altas temperaturas (de la Fuente y col., 2002b).

La α -lactoalbúmina es la segunda proteína que se encuentra en mayor proporción y representa cerca del 20% del total de las proteínas del suero (correspondiente a una concentración de 1,0 a 1,7 g/L). Contiene 123 residuos de aminoácidos con 4 uniones disulfuro intramoleculares uniendo los residuos 6-120, 28-111, 1-77 y 73-91. Aunque es susceptible a la desnaturalización por tratamiento

térmico, el alto grado de renaturalización que posee es el responsable de su aparente resistencia al calor (de la Fuente y col., 2002b).

Las inmunoglobulinas representan aproximadamente el 9% del total de las proteínas del suero (correspondiente a una concentración de 0,6 a 1,0 g/L). Son un grupo complejo de proteínas que incluyen la IgG1, IgG2, IgA e IgM y que cumplen una importante función en la transmisión de la inmunidad a través del calostro desde la madre a las crías recién nacidas (Kilara, 2004).

La albúmina sérica bovina constituye aproximadamente el 6% del total de las proteínas del suero (correspondiente a una concentración de 0,1 a 0,5 g/L). Esta proteína es idéntica a la albúmina sérica aislada de la sangre humana (Kilara, 2004). Contiene 583 residuos de aminoácidos con 17 uniones disulfuro intramoleculares y un solo grupo sulfidrilo libre en el residuo 34.

1.3. Propiedades funcionales de las proteínas del suero

Las proteínas del suero se caracterizan por tener propiedades funcionales específicas, tales como gelificación, retención de agua, solubilidad, emulsificación, espumado y espesamiento (de Wit y col., 1988, Ennis y Mulvihill, 2000).

Gelificación. Las suspensiones de proteínas del suero en estado nativo poseen la capacidad de formar geles cuando son sometidas a tratamientos térmicos por encima de los 70 °C. Las condiciones del medio (concentración de proteína, pH, fuerza iónica) y la presencia de componentes no proteicos, como los agentes reductores, influyen la capacidad de gelificación de estas proteínas.

Retención de agua. Los geles formados a partir de las suspensiones de proteínas del suero poseen una alta capacidad de retención de agua, contribuyendo significativamente a la textura de los alimentos a los cuales son adicionadas como ingrediente.

Solubilidad. Las proteínas del suero en su estado nativo son solubles dentro del rango de pH comúnmente utilizado en la elaboración de alimentos (3,5 a 7,0). No obstante, su solubilidad puede decrecer a medida que la concentración de sal aumenta debido al fenómeno de *salting out*. Además, dichas proteínas pierden solubilidad cuando son sometidas a tratamientos térmicos por encima de los 70 °C debido al fenómeno de desnaturalización y/o agregación. En este caso, el grado de insolubilización dependerá de la temperatura, tiempo, pH y concentración de minerales (especialmente calcio) presentes en las suspensiones durante el calentamiento.

Emulsificación y espumado. Las suspensiones de proteínas del suero poseen una gran capacidad para producir emulsiones y espumas estables. No obstante, esta propiedad se verá influenciada por factores tales como la concentración de proteína, el grado de desnaturalización y/o agregación, la fuerza iónica y la presencia de lípidos.

Espesamiento. La viscosidad de las suspensiones de proteínas del suero en estado nativo decrece a temperaturas entre los 30 y 65 °C, presentando un valor mínimo alrededor de su punto isoeléctrico (pH 4,5). Sin embargo, la viscosidad de estas suspensiones se incrementa notablemente a temperaturas superiores a los 70 °C debido a la desnaturalización y/o agregación de las proteínas.

Además, las proteínas del suero se caracterizan por poseer un elevado valor nutricional, debido a que posee altos contenidos de lisina, triptófano y aminoácidos azufrados que conforman una importante proporción de aminoácidos esenciales, es decir aquellos que no son producidos por el organismo.

Todas estas características permiten que las proteínas del suero puedan ser utilizadas como suplemento alimentario o como ingrediente en la elaboración de alimentos.

1.4. Productos comerciales a base de proteínas del suero

Los productos en polvo a base de proteínas del suero que se comercializan comúnmente son los aislados (WPI) y los concentrados (WPC). Estos productos difieren tanto en la materia prima de origen como en el proceso de elaboración y consecuentemente en su composición (McDonough y col., 1974; Morr, 1985; de Wit y col., 1986; Morr y Foegeding, 1990; Huffman, 1996). Los WPC tienen porcentajes de proteína que varían entre 30% y 85%, mientras que los WPI tienen contenidos de proteína mayores al 90%. El proceso de elaboración de los WPI posee mayor cantidad de etapas e implica costos energéticos elevados, por esta razón los WPI tienden a ser utilizados en aplicaciones más específicas que los WPC (Bryant y McClements, 1998).

La mayoría de las empresas lácteas de nuestro país se dedican a la concentración y secado de proteínas del suero, ya sea utilizando la capacidad de las plantas productoras de leche en polvo o empleando plantas exclusivamente diseñadas

para la producción de suero. Las principales empresas productoras de proteínas del suero en polvo en el país son Mastellone Hnos S.A., SANCOR C.U.L., Molfino Hnos. S.A., Milkaut S.A., Verónica S.A. y Sucesores de Alfredo Williner S.A. La primera está radicada en Buenos Aires, la segunda está distribuida en el país con varias plantas en las provincias de Santa Fe y Córdoba, mientras que las cuatro últimas están localizadas exclusivamente en Santa Fe. Argentina se encuentra entre los principales países productores y exportadores de proteínas del suero en polvo. En el período comprendido entre los años 1996 y 2005 se registró un marcado aumento de las exportaciones de este producto, siendo Brasil el principal país de destino. En el año 2007, la exportación de proteínas del suero en polvo constituyó cerca del 14% del total de los productos lácteos exportados (SAGPyA, 2007). Los productos más comercializados en el mercado interno son los WPC que poseen un contenido de proteína entre 35% y 40%.

En el caso específico del WPC con un 35% de proteína (WPC35), las etapas de elaboración se describen a continuación.

Filtración y centrifugación. El suero que se extrae de las tinas de elaboración de quesos se lo somete a una filtración para eliminar restos de cuajada y a una centrifugación para eliminar parte de la grasa residual. El suero purificado se enfría a 5 °C y se lo almacena en tanques de acero inoxidable aislados.

Pasteurización y concentración. El suero almacenado se pasteuriza por medio de un proceso HTST (alta temperatura-corto tiempo) y se concentra por ultrafiltración hasta una concentración aproximada de 11% a 15 % de sólidos totales.

El subproducto obtenido se enfría hasta una temperatura de 8 °C y luego se almacena en tanques.

Evaporación y secado. El subproducto almacenado se concentra por medio de evaporación al vacío hasta llegar a una concentración de sólidos totales del 45% y luego se seca por medio de un sistema *spray*. El contenido de humedad de las partículas obtenidas se ajusta haciéndolas pasar por un vibrofluidificador, obteniéndose de este modo el WPC35 final que se envasa para su almacenamiento y posterior comercialización.

Específicamente, existen productos en polvo patentados a base de proteínas del suero (Simplese[®], Dairy-Lo[™]) que fueron desarrollados con el objetivo de imitar algunas propiedades funcionales propias de la grasa en los alimentos a los cuales son adicionados (Singer, 1996). En general, consisten en concentrados de proteínas del suero con contenidos de proteína entre 35% y 54%, en donde las proteínas fueron previamente desnaturalizadas por medio de tratamientos térmicos controlados. En el caso específico del Simplese[®], luego de la desnaturalización por calor a temperaturas entre 90 y 120 °C durante tiempos que pueden variar entre 5 min a 4 s, el concentrado es sometido a un proceso mecánico de microparticulación. Dicho proceso consiste en la aplicación de tensiones de corte utilizando intercambiadores de calor de placas (5000 a 40000 s⁻¹) u homogeneizadores de alta presión (750 a 1000 bars). De este modo, se obtienen agregados proteicos esféricos y uniformes de un diámetro medio de 1 μm (Singer y col., 1988).

1.5. Utilización de proteínas del suero en la elaboración de quesos

Como se mencionó anteriormente, las proteínas del suero pueden ser utilizadas como suplemento alimentario o como ingrediente en la elaboración de diversas variedades de alimentos. Algunos ejemplos que se pueden mencionar son los productos de alto valor agregado como alimentos para infantes, alimentos para deportistas, helados y quesos (Rodríguez, 1998; Welty y col. 2001; Pereyra González y col., 2003; Banks, 2004; Delgado Andrade y col., 2006).

La elaboración de quesos es esencialmente un proceso de deshidratación donde la grasa y las caseínas de la leche se concentran hasta 10 veces a expensas de la eliminación de las proteínas del suero, la lactosa y las sales minerales. La incorporación de proteínas del suero en la elaboración de quesos tiene por objetivos mejorar el valor nutricional y la textura de los productos, además de la eficiencia económica de la producción. Esto se debe a que por medio de ésta técnica, se incrementa el porcentaje y la calidad de las proteínas presentes, se otorgan propiedades funcionales específicas a los quesos y se aumenta la capacidad de retención de agua de la cuajada (Hinrichs, 2001).

Las etapas principales involucradas en la elaboración de quesos tradicionales son selección y pre-tratamiento de la leche, acidificación, coagulación, desuerado, moldeado, prensado, salado y maduración (Fox, 1987).

Selección y pre-tratamiento de la leche. La leche seleccionada debe ser de alta calidad tanto microbiológica como química. Además, debe ser pasteurizada para evitar riesgos sanitarios y lograr un queso de calidad más uniforme.

Acidificación. Consiste en un desarrollo progresivo de la acidez durante las primeras 24 hs. La misma es una etapa clave en la elaboración del queso debido a que la actividad del coagulante y la sinéresis dependen del valor de pH alcanzado. Esta etapa se produce por el agregado del fermento (bacterias productoras de ácido láctico seleccionadas) a la leche pasteurizada, siendo los más utilizados el *Lactococcus lactis* subesp *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp *cremoris*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus* spp.

Coagulación. Se basa en la precipitación de las caseínas de la leche para formar un gel ya sea por medio de coagulación ácida, por un efecto combinado de acidificación y calentamiento o por coagulación enzimática. En el último caso, se utiliza un coagulante que contiene mayoritariamente quimosina (cuajo) que produce la hidrólisis selectiva de la κ -caseína en el enlace Phe(105)-Met(106), formando la para- κ -caseína y los glicomacropéptidos. Luego, se produce la agregación de las micelas de caseína en presencia de calcio a temperaturas mayores de 20 °C para formar el coágulo (Fox, 1987).

Desuerado, moldeado, prensado y salado. Para producir el desuerado o sinéresis, se corta el coágulo formado y se obtiene de esta forma la cuajada que posteriormente se coloca en moldes y en algunos casos en una prensa antes del salado. El método más frecuentemente utilizado para el salado de los quesos consiste en la inmersión en salmuera luego del moldeado. Durante dicho proceso, el NaCl difunde desde la salmuera hacia la matriz acuosa del queso y el agua difunde hacia la superficie del queso. Debido a que este fenómeno es relativamente lento, se observa un perfil no uniforme de la concentración de NaCl al finalizar la etapa de salado

(Geurts y col., 1974). La sal determina la actividad de agua, ejerce control sobre el crecimiento microbiano y la actividad enzimática y además define el desarrollo del aroma y sabor de los quesos (Guinee, 2004).

Maduración. En esta etapa se experimentan la mayoría de los cambios en las propiedades fisicoquímicas y estructurales del queso que le otorgarán a cada variedad su *flavor* y textura característicos. Estos cambios se llevan a cabo mediante complejas series de reacciones bioquímicas como la lipólisis, la hidrólisis de la lactosa y la hidrólisis de las caseínas (proteólisis) y por medio de procesos difusivos como por ejemplo el de la sal. La maduración puede durar desde algunos meses hasta incluso años dependiendo de la variedad de queso. Por este motivo, la temperatura y el tiempo de maduración actúan como reguladores de las transformaciones químicas y físicas que ocurren en el queso, contribuyendo de este modo a las características del producto final.

Las tecnologías desarrolladas con el objetivo de incorporar proteínas del suero en la elaboración de quesos consisten en la modificación de algunas de las etapas involucradas en el proceso de elaboración tradicional descritas anteriormente. Dichas modificaciones dependerán del tipo de queso y de la textura deseada (Hinrichs, 2001).

Recirculación del suero. El suero proveniente de la elaboración de los quesos se concentra por medio de ultrafiltración, se le realiza un tratamiento térmico en condiciones controladas y se lo incorpora a la leche junto con el cuajo o después de la etapa de acidificación con el fermento (Hinrichs, 2001).

Proceso Thermoquark®. La leche que será destinada a la elaboración de quesos se trata térmicamente a alta temperatura para lograr la desnaturalización y/o agregación de las proteínas del suero y se concentra por medio de centrifugación (Hinrichs, 2001).

Proceso Centriwhey®. El suero proveniente de la elaboración de quesos se trata a altas temperaturas y se lo acidifica para producir la precipitación de las proteínas. Este precipitado es incorporado a la leche que se empleará en la elaboración del queso (Bylund, 1995; Punidades y col., 1999).

Incorporación de productos comerciales a base de proteínas del suero. Se incorpora a la leche ingredientes a base de proteínas del suero (Simplese®, Dairy-Lo™) que se comercializan como aditivos imitadores de grasa y que son utilizados para la elaboración de quesos magros.

En los quesos magros, la disminución del contenido de grasa causa defectos texturales, funcionales y sensoriales. La grasa aporta suavidad a la textura y contribuye al *flavor* de los quesos tradicionales. En los quesos magros las caseínas juegan el rol más importante en el desarrollo de la textura. Por este motivo, esta variedad de quesos suele presentar una estructura más firme y gomosa en comparación con la de un queso tradicional (Mistry, 2001). De esta forma, el uso de aditivos imitadores de grasa en el proceso de elaboración de quesos magros es una estrategia útil para mejorar su textura (Rodríguez, 1998; Mistry, 2001; Banks, 2004). Esto se debe a que cuando estas partículas de agregados de proteínas del suero se insertan dentro de los poros de la red de caseína, se comportan de manera similar a

los glóbulos de grasa otorgando la sensación de lubricidad y cremosidad (Singer, 1996; Rodríguez, 1998; Banks, 2004).

Todas las metodologías descriptas anteriormente tienen en común que las proteínas del suero incorporadas se encuentran en estado desnaturalizado o formando agregados, debido a que de esta forma las mismas podrán interactuar con las caseínas y quedarán retenidas en la matriz del queso (Baldwin y col., 1986).

De acuerdo al Código Alimentario Argentino (CAA, 2006), no existen condiciones vigentes que regulen la incorporación de proteínas del suero en la elaboración de quesos.

1.6. La congelación de alimentos

El proceso de congelación (congelación, almacenamiento del producto congelado y descongelación) es un tratamiento que ha sido tradicionalmente utilizado en la conservación de una gran variedad de ingredientes y alimentos elaborados.

El fundamento básico de este proceso se basa en la disminución de la temperatura del producto (generalmente entre -20 y -30 °C), produciendo un cambio de fase que solidifica el agua libre durante el proceso. La formación de hielo genera un incremento en la concentración de sólidos solubles, provocando una disminución en la actividad de agua del producto (Blond y Le Meste, 2004). De esta forma, se inhibe la actividad microbiana y enzimática generando un estado de latencia y se

disminuye la velocidad de las reacciones bioquímicas, logrando un aumento en el tiempo de la vida útil del alimento.

El proceso de congelación ha sido investigado como un posible método para conservar suspensiones de proteínas del suero concentradas (Bhargava y Jelen, 1995) y fue sugerido por muchos autores como alternativa para extender la vida útil de quesos (Lück, 1977). En este último caso, resulta interesante la posibilidad de utilizar dicho proceso como método para prolongar la vida útil de quesos blandos que poseen cortos períodos de maduración, pudiéndose fomentar su exportación a lugares distantes en estado congelado.

No obstante, la utilización de este método de conservación produce modificaciones tanto químicas como físicas en los alimentos. En algunos casos, dichas modificaciones pueden disminuir la calidad de los productos mientras que en otros casos pueden mejorarla.

Las modificaciones químicas están relacionadas con el grado de redistribución de los solutos dentro del producto debido a la formación de hielo con la remoción progresiva del calor. El hielo se forma primero en la superficie del alimento, generando un frente móvil que se desplaza desde la periferia hacia el centro del producto. Debido a que la fase hielo consiste en agua pura, los solutos presentes en la fase acuosa (iones, azúcares y ácidos) son desplazados desde el frente de hielo móvil y forman regiones de mayor concentración localizadas frente a la interfase agua-hielo y entre los cristales de hielo (Reid y Yan, 2004). Este fenómeno de crioconcentración, está asociado a cambios en el pH, la fuerza iónica y la presión osmótica que puede producir desnaturalización y/o agregación de las proteínas,

destrucción de membranas celulares, cambios en la textura y en las propiedades reológicas de los productos congelados. Las modificaciones físicas están directamente relacionadas con la formación del hielo, ya que el aumento del volumen producido por el cambio de fase afecta mecánicamente la estructura de los alimentos (Reid y Yan, 2004).

En las suspensiones de proteína del suero sometidas al proceso de congelación, las proteínas pueden interactuar y agregarse para formar estructuras que permanecen estables luego de la descongelación, otorgando una textura característica a las suspensiones que posibilita su utilización en determinados alimentos (Lawrence y col., 1986; Tamaki y col., 1991).

En los quesos, la formación de hielo puede causar la ruptura de la estructura proteica y el daño celular de las bacterias, provocando liberación de enzimas proteolíticas al medio que aumentan la velocidad de maduración (Verdini y col., 2002, Gravier y col., 2004). Específicamente en los quesos magros, la ruptura de la estructura casearia producida por el proceso de congelación podría contribuir a mejorar su textura, disminuyendo la firmeza característica de estos quesos.

Capítulo 2

OBJETIVOS

El aprovechamiento del suero procedente de la elaboración de quesos tiene una especial importancia económica para las industrias lácteas de nuestro país. Por este motivo, existe un gran interés en la realización de investigaciones que permitan ampliar los conocimientos referidos a las propiedades fisicoquímicas y reológicas de las proteínas del suero que pueden ser utilizadas como ingrediente en la elaboración de alimentos. No obstante, el interés también se extiende a la realización de estudios dedicados a caracterizar el comportamiento fisicoquímico y reológico de alimentos elaborados con proteínas del suero, en particular aquellos que posean un alto valor agregado como es el caso de los quesos. Esto se debe a que cada alimento constituye una matriz altamente compleja que tendrá un comportamiento propio y que no estará dado necesariamente por la suma del comportamiento de cada uno de sus ingredientes.

El proceso de congelación es uno de los métodos de conservación de ingredientes y de alimentos procesados más ampliamente utilizados por ser relativamente simple de realizar, pero la formación de cristales de hielo puede producir modificaciones en las condiciones del medio que afectan la calidad de los productos. Debido a este fenómeno, resulta motivo de interés el estudio de los efectos producidos por el proceso de congelación sobre las propiedades fisicoquímicas y reológicas tanto de ingredientes como de productos elaborados con proteínas del suero.

Por lo tanto, el objetivo general de esta Tesis fue:

Estudiar el efecto del proceso de congelación sobre las características físicas y químicas de sistemas alimentarios (suspensiones y un queso blando magro) elaborados con proteínas del suero.

Además, los objetivos específicos fueron:

- ✓ Estudiar el efecto del proceso de congelación sobre el contenido de proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados (mediante estudios cinéticos) y sobre las propiedades reológicas (mediante barridos de frecuencia dentro de la región de viscoelasticidad lineal) de suspensiones de proteínas del suero.
- ✓ Estudiar el efecto del proceso de congelación sobre las propiedades fisicoquímicas (contenido de humedad, pH, concentración de sal, proteína total e índice de maduración) y reológicas (mediante barridos de frecuencia dentro de la región de viscoelasticidad lineal) de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero.
- ✓ Caracterizar el comportamiento reológico de los sistemas alimentarios en estudio teniendo en cuenta los efectos producidos por el proceso de congelación, mediante la aplicación del Principio de Superposición Tiempo-Temperatura y del modelo de Maxwell.

Capítulo 3

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Suspensiones de proteínas del suero

3.1.1. Estados conformacionales de las proteínas del suero y su relación con la desnaturalización y la agregación

La funcionalidad de las proteínas del suero se encuentra determinada por la naturaleza de su estructura molecular y por las interacciones que pueden producirse entre las mismas. Algunos tipos de interacciones moleculares que gobiernan el estado conformacional y, por lo tanto, la desnaturalización y la agregación de las proteínas del suero en medio acuoso son las fuerzas de van der Waals, las interacciones hidrofóbicas, las interacciones electrostáticas, las uniones puente hidrógeno, las fuerzas de hidratación, las uniones disulfuro y la entropía configuracional (Bryant y McClements, 1998).

En medio acuoso, las proteínas del suero pueden existir en estado nativo o desnaturalizado. En su estado nativo, dichas proteínas poseen una conformación relativamente compacta, globular y organizada mientras que en su estado desnaturalizado poseen una conformación más aleatoria y desordenada. Por ejemplo, la fuerzas hidrofóbicas son algunas de las fuerzas responsable del estado nativo de la molécula de proteína del suero y la entropía configuracional es una de las fuerzas que favorece el estado desnaturalizado de la misma. Esta última está asociada a un gran número de estados conformacionales que una proteína desnaturalizada puede adoptar en relación a su estado nativo.

Las proteínas del suero adoptan una determinada conformación dependiendo de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura, composición del

solvente, etc.) que influirán en el delicado balance que existe entre las fuerzas intervinientes. Por ejemplo, a temperaturas relativamente bajas (menores a 65 °C) puede predominar las fuerzas hidrofóbicas favoreciendo el estado nativo, mientras que a temperaturas más elevadas puede prevalecer la entropía configuracional que favorece el estado desnaturalizado. Cada proteína del suero posee una temperatura característica de desnaturalización. Por ejemplo, en la β -lactoglobulina la desnaturalización ocurre por encima de los 78 °C mientras que en la α -lactoalbúmina, la misma se produce a temperaturas superiores a los 62 °C (Bryant y McClements, 1998).

A su vez, las proteínas del suero pueden formar agregados o permanecer como moléculas individuales en solución dependiendo de las condiciones del medio. A bajas temperaturas y a valores de pH superiores a su punto isoeléctrico, las proteínas del suero en estado nativo existen como moléculas individuales cargadas eléctricamente con sus sitios hidrofóbicos localizados en su interior. Estas moléculas no se agregan debido a que poseen repulsiones electrostáticas relativamente elevadas entre ellas. Cuando dichas proteínas son tratadas térmicamente por encima de su temperatura de desnaturalización se despliegan parcialmente permitiendo la exposición de los sitios activos no polares. En ausencia de sal, las proteínas del suero desnaturalizadas pueden permanecer separadas debido a la elevada repulsión electrostática. En cambio, cuando la concentración de sal se incrementa, dicha repulsión disminuye permitiendo la formación de uniones hidrofóbicas en cada punto de la superficie de la molécula. Este fenómeno permite la formación de agregados que a su vez pueden interaccionar entre sí por medio de uniones disulfuro inter e

intra moleculares (Bryant y McClements, 1998). Cuando la concentración de proteína supera un valor crítico, los agregados de proteínas del suero pueden formar una red tridimensional que posee una gran capacidad de retención de agua denominada gel. En cambio, a concentraciones por debajo de este valor crítico, los agregados pueden permanecer solubles en las suspensiones (Figura 3.1).

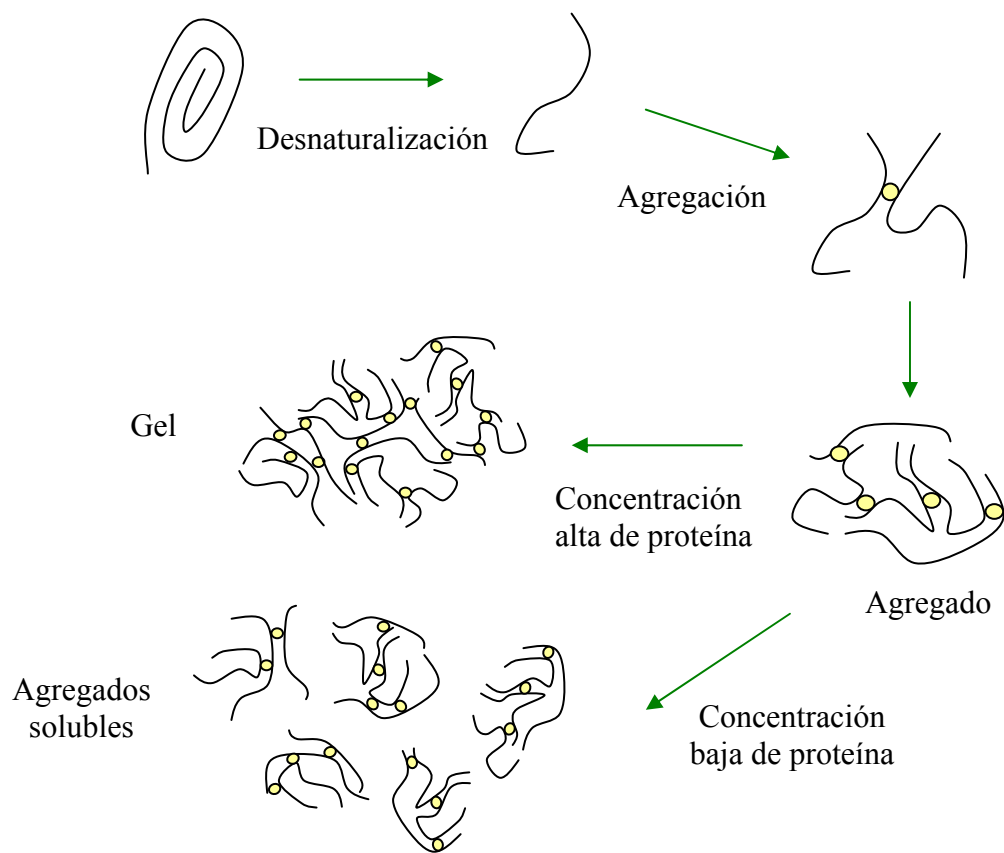


Figura 3.1. Esquematización de la desnaturalización y la agregación de las proteínas del suero cuando son tratadas térmicamente. Modificado de [Aguilera \(1995\)](#).

3.1.2. Suspensiones de proteína del suero que contienen proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados y cinética global de desnaturalización-agregación

Las suspensiones de proteína del suero que contienen agregados solubles, o dicho de otro modo proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados (PDA), pueden ser utilizadas como ingrediente en la elaboración de alimentos debido a que poseen propiedades funcionales específicas. Tanto [Vardhanabhuti y Foegeding \(1999\)](#) como [Mleko y Foegeding \(1999\)](#) han estudiado la posibilidad de utilizar esta clase de suspensiones como agente espesante, debido a que poseen una viscosidad similar a las soluciones de hidrocoloides. Además, otros estudios publicados indican que las suspensiones de proteínas del suero que contienen PDA tienen la capacidad de gelificar a temperatura ambiente por medio de la adición de NaCl o CaCl₂ ([Kulmyrzaev y col., 2000](#); [Bryant y McClements, 2000a](#)) o luego de la disminución del pH ([Abd El-Salam y El-Etriby, 1996](#)).

El contenido de PDA que poseen las suspensiones de proteína del suero puede ser cuantificado por medio de la precipitación isoeléctrica a pH 4,6. Esta metodología fue utilizada por diversos grupos de investigación para estimar el grado de desnaturalización y/o agregación de las proteínas del suero ([Li-Chan, 1983](#); [Morr, 1990](#); [Law y Leaver, 1997](#); [Anandharamakrishnan y col., 2008](#); [Meza y col., 2009](#)). Dicha técnica consiste en la separación a pH 4,6 de dos fracciones: una soluble (que se corresponde con el contenido de proteína del suero en estado nativo) y otra insoluble (correspondiente al contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados). Luego, el contenido de proteína total en la fracción soluble puede

determinarse por medio de algún método analítico como por ejemplo Kjeldahl (Morr, 1990) o por medición espectrofotométrica (Giroux y Britten, 2004). De esta forma, el contenido de PDA se estima por diferencia entre el contenido de proteína total y el contenido de proteína cuantificado en la fracción soluble a pH 4,6 (Morr, 1990; Meza y col., 2009).

Se ha publicado que, durante la separación de las fracciones soluble e insoluble, los parámetros relacionados con la etapa de centrifugación (velocidad y tiempo) pueden producir diferencias en los porcentajes de proteínas que permanecen en cada fracción. Roufik y col., (2005) analizaron las fracciones solubles a pH 4,6 de diferentes muestras de WPC por medio de cromatografía de exclusión por tamaño de alta eficiencia y encontraron que un porcentaje correspondiente a una fracción de los agregados de proteína del suero permaneció soluble a pH 4,6. Los autores observaron que cuando se incrementó la velocidad de centrifugación (20.000 a 48.000g) y el tiempo (15 a 45 min), el porcentaje de agregados que permaneció en la fracción soluble disminuyó pero no desapareció. Por lo tanto, los autores concluyeron que puede ser habitual la presencia de un pequeño porcentaje de agregados de proteína del suero que permanezcan en la fracción soluble a pH 4,6. No obstante como se mencionó anteriormente, esta metodología fue ampliamente utilizada por diversos grupos de investigación.

La variación del contenido de PDA en sistemas alimentarios, como por ejemplo en leche, fue investigada por diversos autores. Law y Leaver (1997) analizaron el efecto de la concentración de proteína sobre la desnaturalización de las proteínas del suero en muestras de leche descremada tratada térmicamente a 80 °C

durante 0,5, 5, 10, 15 y 20 min. Los autores estudiaron la variación del contenido de PDA determinada en base a la pérdida de la solubilidad de las proteínas del suero a pH 4,6. Además, [Law y Leaver \(2000\)](#), estudiaron el efecto del pH (5,2 a 8,8) sobre la desnaturalización de las proteínas del suero en leche descremada. Para la realización de este trabajo, las muestras de leche se trataron térmicamente a 80 °C durante diferentes tiempos (0,5 a 20 min) y entre los análisis realizados se evaluó la variación del contenido de PDA determinada también en base a la pérdida de solubilidad a pH 4,6.

Para la obtención de suspensiones de proteína del suero que contienen PDA se deben realizar tratamientos térmicos en condiciones controladas de concentración de proteína, temperatura y tiempo de calentamiento. Dichas variables del proceso pueden ser relacionadas por medio de una constante cinética de desnaturalización y/o agregación. De esta forma, un determinado contenido de PDA puede predecirse y estimarse conociendo los modelos matemáticos y las constantes de reacción. Se han publicado numerosos trabajos dedicados a estudiar las cinéticas de desnaturalización y de agregación de las proteínas del suero en diferentes medios, tales como leche, permeado de queso, WPC, WPI y proteína aislada mediante la medición de la disminución en el tiempo de la concentración de la β -lactoglobulina tomada como proteína de referencia ([de Wit, 1990](#); [Hines y Foegeding, 1993](#); [Anema y McKenna, 1996](#); [Hoffman y van Mil, 1997](#); [Law y Leaver, 1997](#); [Verheul y col., 1998](#); [Chen y col., 1998](#); [Le Bon y col., 1999b](#); [Anema, 2000](#); [Law y Leaver, 2000](#); [Tolkach y col., 2005](#)).

En todos los casos, la descripción matemática de las cinéticas de desnaturalización y de agregación se ha obtenido por medio de la integración de la siguiente ecuación de reacción:

$$-\frac{dC}{dt} = k_n C^n \quad 3.1$$

$$\left(\frac{C}{C_0}\right)^{(1-n)} = 1 + (n-1)k_n C_0^{(1-n)} t = 1 + (n-1)k t \quad 3.2$$

donde n es el orden de reacción, k_n es la constante de reacción, C es el contenido de proteína que varía con el tiempo t , C_0 es el contenido inicial de proteína y k es la constante aparente de reacción calculada como el producto de la constante de reacción verdadera (k_n) y una función del contenido inicial de proteína ($C_0^{(1-n)}$).

Cuando el orden de reacción es igual a 1, la integración de la Ecuación 3.1 queda expresada de la siguiente forma:

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k_1 t \quad 3.3$$

donde k_1 es la constante de reacción para un orden igual a uno.

Además, la dependencia de las constantes de reacción con la temperatura puede describirse por medio de la ecuación de Arrhenius:

$$k_n = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad 3.4$$

$$\ln(k_n) = \ln(A) + \left(-\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) \quad 3.5$$

donde A es un factor de frecuencia, E_a es la energía de activación, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta.

En la reacción de desnaturalización de la β -lactoglobulina, existe un equilibrio reversible entre las moléculas en estado nativo y desnaturalizado que sigue una cinética de orden 1. Durante la misma se produce la exposición de los grupos tiol que se encontraban en el interior de la molécula de proteína, volviéndose reactivos (de la Fuente y col., 2002b). En la reacción de agregación, se produce la reacción irreversible entre dos moléculas de β -lactoglobulina desnaturalizada que sigue una cinética de orden 2. La reacción global de desnaturalización-agregación posee un orden que se encuentra entre 1 y 2, dependiendo de la relación existente entre las velocidades de reacción de cada uno de los dos pasos (Verheul y col., 1998).

Teniendo en cuenta que la β -lactoglobulina es la proteína que se encuentra en mayor proporción, a menudo se acepta que sus características dominan el comportamiento de las suspensiones de proteína del suero (de la Fuente y col., 2002b). Sin embargo, la reacción global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero puede verse afectada por las concentraciones relativas de cada una de las proteínas presentes. Por ejemplo, la cinética de agregación de la β -

lactoalbúmina depende de la concentración de α -lactoglobulina que se halle presente en el medio (Van Mil y Roef, 1993, Dalgleish y col., 1997).

Se han encontrado escasos trabajos dedicados a estudiar la cinética global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero teniendo en cuenta la contribución de todas las proteínas. Patel y col. (1990) obtuvieron dicha cinética mediante la utilización de calorimetría diferencial de barrido. Los autores analizaron suspensiones con un 10% de WPC producidos a partir de sueros provenientes de la elaboración de quesos Cheddar con diferentes porcentajes de grasa. El pH natural de las suspensiones fue de 6,34 a 6,38 y el rango de temperatura analizado fue de 60 a 90 °C. Los autores obtuvieron un orden de reacción que varió entre 1,3 y 1,5 y una energía de activación en el rango de 217 a 251 kJ/mol.

Los fenómenos de desnaturalización y agregación de las proteínas del suero pueden ser afectados por las concentraciones de las sales minerales y de la lactosa presentes en el medio. Por un lado se ha publicado que el calcio aumenta la susceptibilidad de las proteínas del suero a la desnaturalización, ya que este mineral puede formar uniones entre péptidos adyacentes contribuyendo a la formación de agregados (de Wit, 1981; Xiong y col., 1993; Hongsprabhas y Barbut, 1997). Por otro lado, la lactosa tiene un efecto protector debido a que los azúcares tienden a mantener o incrementar la hidratación de las moléculas de proteína, contribuyendo a aumentar su estabilidad (de Wit, 1981; Bernal y Jelen, 1985; Garret y col., 1988). Además, la susceptibilidad de las proteínas del suero frente a la desnaturalización y la agregación por calor decrece cuando el contenido de sólidos totales de las suspensiones se incrementa (de Wit, 1981).

En conclusión, el comportamiento de las proteínas del suero en medio acuoso frente a un determinado tratamiento térmico dependerá de las variables del proceso (contenido de proteína total, temperatura y tiempo de calentamiento) y de la composición del producto utilizado (WPC, WPI, etc.).

3.2. Quesos elaborados con proteínas del suero

3.2.1. Cambios fisicoquímicos y estructurales experimentados durante la maduración de quesos

Durante la maduración, se experimentan la mayoría de los cambios en las propiedades fisicoquímicas y estructurales del queso que le otorgarán a cada variedad su *flavor* y textura característicos. Si bien dichos cambios dependerán del tipo de queso elaborado, en la mayoría de las variedades se observan variaciones en los valores de pH, concentración de sal, contenido de humedad y en la textura.

El pH tiene influencia en la calidad del queso debido a que afecta, entre otros parámetros, al *flavor* y a la textura (Upreti y Metzger, 2007). Por ejemplo, valores de pH menores 5,0 provocan defectos en la etapa de desuerado e incrementan la velocidad de la proteólisis (Lucey y Fox, 1993).

Los cambios en los valores de pH durante la maduración se deben en gran parte a la hidrólisis de la lactosa. Dichos cambios se encuentran determinados por un balance entre la producción de ácidos orgánicos que causa la disminución del pH y la capacidad buffer del queso que resiste esta disminución. Las bacterias lácticas fermentan la lactosa residual formando ácidos orgánicos de cadena corta solubles en

agua que por disociación liberan H^+ y aniones, causando una disminución en el pH. La capacidad buffer del queso está relacionada con los constituyentes proteicos e inorgánicos (ácidos débiles, bases complejos de iones metálicos) presentes en los quesos (Lucey y Fox, 1993).

Otro de los procesos que ocurre durante la maduración es la variación en la concentración de sal en el queso. La misma determina la actividad de agua, ejerce control sobre el crecimiento microbiano y la actividad enzimática y define el desarrollo del aroma y sabor del queso. Además la concentración de sal junto con el valor de pH y el nivel de calcio, poseen un efecto en la hidratación de la para-caseína que determina la capacidad de absorción de agua de la red de caseína, la tendencia a la sinéresis y las características texturales y reológicas de los quesos (Guinee, 2004).

Geurts y col. (1974) citado por Guinee (2004) propusieron que la penetración de sal dentro del queso y la consiguiente migración de agua hacia el exterior del mismo puede ser descripta como un proceso netamente difusivo. Durante la maduración, la sal difunde hasta alcanzar un valor de concentración uniforme en todo el queso. Las moléculas de NaCl y H_2O se mueven en respuesta a sus respectivos gradientes de concentración, pero la velocidad de difusión es mucho menor que la correspondiente a la solución pura. Este fenómeno se debe por un lado a que el agua presente en el queso se encuentra dentro de una red de proteínas que contiene glóbulos de grasa y sólidos disueltos y por otro lado a que parte del agua se encuentra ligada a las proteínas, no encontrándose disponible para la difusión. Además, el tiempo que transcurre en efectuarse dicho fenómeno variará dependiendo

de las características propias de cada queso, de la geometría y de las dimensiones del mismo.

Como puede observarse, la textura y el *flavor* del queso durante la maduración se encuentran influenciados por las modificaciones producidas en las propiedades fisicoquímicas anteriormente mencionadas. No obstante, la proteólisis es el fenómeno que se encuentra más relacionado a los cambios en la textura del queso, debido principalmente a la hidrólisis de las caseínas y a la disminución de la actividad acuosa que se produce por un aumento en la cantidad de grupos carboxilo y aminoácidos que pueden unirse a las moléculas de agua (Sousa y col., 2001). Además, durante la proteólisis se produce la formación de péptidos y aminoácidos libres que contribuyen a la formación del sabor y aroma característico del queso.

La actividad proteolítica en el queso durante la maduración se encuentra determinada por el tipo y cantidad de enzima del coagulante residual presente, la presencia de proteasas nativas de la leche, la concentración de sal, el contenido de humedad, la temperatura de almacenamiento y los cambios experimentados en el pH (Lawrence y col., 1987).

En la mayoría de los quesos, la hidrólisis inicial de las caseínas durante la maduración comienza por medio de la acción de la enzima del coagulante residual (quimosina) y en menor grado por una enzima nativa presente en la leche (plasma), produciendo la formación de péptidos grandes (insolubles en agua) e intermedios (solubles en agua). La quimosina tiene su principal actividad sobre la α_1 -caseína y β -caseína, produciendo α_1 -I-caseína y β -I-caseína. La plasma actúa

principalmente sobre la α_{s2} -caseína y la β -caseína (Fox y McSweeney, 1996). Posteriormente, los péptidos intermedios son degradados por medio de la acción de las proteasas provenientes del fermento inicial (*Lactococcus* spp., *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus* spp.). Por último, las peptidasas que se encuentran también presentes en el fermento inicial producen la formación de péptidos pequeños y aminoácidos que contribuye a la formación del *flavor* del queso (Sousa y col., 2001).

Las propiedades fisicoquímicas y estructurales que son utilizadas para evaluar la calidad de los quesos y que son modificadas durante la maduración, pueden ser medidas de manera objetiva mediante análisis químicos y físicos (determinación de pH, determinación de la concentración de sal, cuantificación del grado de proteólisis, determinación de propiedades viscoelásticas lineales, etc.), pudiéndose corroborar en muchos casos a través de ensayos sensoriales subjetivos.

En el caso específico del grado de proteólisis, varios autores han estudiado diversos métodos que permiten no solo la cuantificación, sino también la identificación de los compuestos resultantes partiendo de una separación de las fracciones nitrogenadas (Rank y col., 1985; Law, 1987; Fox, 1989; Fox y McSweeney, 1996; Singh y col., 1994). El método más utilizado para la separación de estas fracciones se basa en la solubilidad de los distintos compuestos en diversos solventes. Por ejemplo, en la fracción soluble en agua a pH 4,6 se extraen los péptidos pequeños y medianos. La relación entre el porcentaje de nitrógeno de la fracción soluble en agua a pH 4,6 y el porcentaje de nitrógeno total del queso, conocida como índice de maduración, es utilizado para evaluar el grado de

proteólisis primaria en los quesos. Existen otras técnicas complementarias como la electroforesis o la cromatografía que permiten separar y en algunos casos identificar los compuestos presentes en las fracciones obtenidas (Sousa y col., 2001).

3.2.2. Quesos elaborados con proteínas del suero y cambios experimentados durante la maduración

Se han encontrado en la literatura numerosos trabajos dedicados a estudiar la utilización de las proteínas del suero en la elaboración de quesos blandos y semi duros como Mozzarella (Roupas y Mead, 2001; Mead y Roupas, 2001), Saint Paulin, queso tipo Noruego-Suizo y Gouda (Abrahamsen, 1979), Cheddar (Brown y Ernstrom, 1982; Banks y col., 1987; Law y col., 1994; Rao y Renner, 1988) y diversas variedades de quesos magros en donde se adicionaron proteínas del suero que se desnaturizó y/o que formó agregados (Simplese[®], Dairy-Lo[™]) como imitadores de grasa (Fenelon y Guinee, 1997; Ma y col., 1997, Romeih y col., 2002; Zalazar y col. 2002; Kavas y col., 2004; Koca y Metin, 2004; Sahan y col., 2008).

En todos los casos, la concentración de proteínas del suero de los quesos una vez finalizada su elaboración es relativamente baja. Si se adiciona demasiada cantidad de estas proteínas a la leche que se utilizará para la elaboración de queso, el producto final puede desarrollar un sabor a suero atípico durante la maduración y retendrá demasiada agua. De esta manera, para obtener quesos de buena calidad la cantidad de proteínas del suero que debe adicionarse a los mismos se encuentra limitada por las especificaciones de contenido humedad y características texturales de cada tipo de queso (Hinrichs, 2001). Los trabajos publicados indican que la

adición del producto a base de proteínas del suero (WPC, Simplesse[®], Dairy-Lo[™], etc) se realiza en un 1% (Sanchez y col., 1996), 0,1 a 0,4% (Mead y Roupas, 2001), 2,5 a 10% (Abrahamsen, 1979) y 1 a 1,5% (Haque y col., 2007) por peso de leche.

Durante la maduración, los quesos elaborados con proteínas del suero pueden experimentar cambios que no son observados en los quesos tradicionales. Por este motivo, se recomienda el agregado de proteínas del suero sólo en quesos que tienen un corto período de maduración para evitar cualquier efecto indeseable que pueda ocurrir debido a la presencia de éstas proteínas (Punidades y col., 1999). Si bien se han encontrado publicaciones dedicadas a estudiar los cambios en las propiedades fisicoquímicas y texturales durante la maduración de numerosas variedades de quesos elaborados con proteínas del suero, los resultados hallados son contradictorios.

Abrahamsen (1979) estudió tres variedades de queso elaborados con dichas proteínas. Por un lado, publicó que durante la maduración de un queso Saint Paulin se observó que la proporción de nitrógeno soluble a pH 4,6 a nitrógeno total disminuyó cuando se incrementó la cantidad de proteínas del suero adicionada. Sin embargo, no observó diferencias significativas en las propiedades organolépticas de dichos quesos en comparación con un queso control. Por otro lado, este autor también publicó resultados referidos a un queso tipo Noruego-Suizo elaborado con proteínas del suero en donde, luego de un período de maduración de 3 meses, observó una pequeña disminución en el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 y una pequeña influencia negativa sobre las propiedades organolépticas en comparación con un queso control. Abrahamsen (1979) publicó además que en un

queso Gouda se observó que el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 disminuyó cuando se incrementó el contenido de proteínas del suero, no afectándose significativamente la firmeza del queso a causa de la incorporación de estas proteínas.

Brown y Ernstrom (1982) elaboraron un queso Cheddar utilizando un WPC obtenido por ultrafiltración y tratado térmicamente. Los autores observaron que dichos quesos presentaron valores de pH más bajos que los quesos control. Este resultado se debió a un crecimiento acelerado de los microorganismos durante la maduración, producto del mayor contenido de nitrógeno libre y de lactosa presentes en el suero adicionado y al elevado contenido de humedad final del queso. Sin embargo, el queso control y el que contenía proteínas del suero no presentaron diferencias significativas en el *flavor* y en la textura.

Santoro y Faccia (1996) estudiaron la proteólisis de quesos blandos suplementados con proteínas del suero madurados durante 5, 20, 60 y 90 días. Los quesos fueron elaborados con un WPC tratado térmicamente durante 5 minutos a 90 °C que fue adicionado a la leche en una relación volumétrica 1/9. Los autores no observaron diferencias significativas en el *flavor* y en la textura de los quesos elaborados con proteínas del suero en comparación con quesos control. La β -lactoglobulina desnaturalizada retenida en la cuajada en estado libre (no unida a la caseína) no fue alterada al final de la maduración.

Romeih y col. (2002) analizaron el efecto de la incorporación de Simplese[®] en la composición, la proteólisis y en las características sensoriales y texturales de quesos White-Brined magros. Los resultados publicados indican que en un período

de maduración de 90 días, los quesos elaborados con Simplese[®] presentaron un mayor grado de proteólisis en comparación con los quesos control. No obstante, la cinética de degradación de la α_{S1} -caseína y la β -caseína y la evolución del perfil de péptidos (determinado por medio de cromatografía líquida de fase reversa) no fueron afectados por la incorporación de Simplese[®].

Kavas y col. (2004) estudiaron el efecto de la incorporación de varios imitadores de grasa, entre ellos Simplese[®] y Dairy-Lo[™], sobre las propiedades químicas, físicas y sobre los atributos sensoriales de un queso White-Picked magro. El grado de proteólisis durante un período de maduración de 90 días fue determinado por medio de la medición del contenido de nitrógeno en la fracción soluble en agua a pH 4,6. Los autores no observaron diferencias significativas en el grado de proteólisis ni en los valores de pH de los quesos elaborados con proteínas del suero en comparación con un queso control.

Haque y col. (2007), estudiaron la influencia del agregado de imitadores de grasa a base de proteínas del suero que se desnaturalizó y/o que formó agregados (Simplese[®], Dairy-Lo[™]) en quesos Cheddar magros durante un período de maduración de 6 meses. Se observó que los quesos con proteínas del suero presentaron menores contenidos de nitrógeno soluble a pH 4,6 en comparación con los quesos control, indicando un menor grado de proteólisis.

Sahan y col. (2008) analizaron los cambios en la composición química, la proteólisis, la lipólisis y la textura en quesos Kashar bajos en grasa elaborados con Simplese[®]. Los autores observaron que durante la maduración, el contenido de proteína en la fracción soluble en agua a pH 4,6 y en la fracción soluble en ácido

tricloroacético aumentó significativamente. No obstante, dichos valores fueron menores a los obtenidos en los quesos control sin el agregado de Simplese[®], indicando un menor grado de proteólisis.

En conclusión, los fenómenos que ocurren durante la maduración dependerán del tipo de queso, de la naturaleza de las proteínas del suero adicionadas (WPC, Simplese[®], Dairy-Lo[™], etc) y de las condiciones de almacenamiento, haciéndose necesario estudiar cada caso en particular.

3.3. Reología y reometría de sistemas alimentarios

La reología estudia la deformación y el flujo de los materiales fluidodinámicamente complejos (Walters, 1975) y la reometría es el conjunto de técnicas experimentales empleadas con el objetivo de determinar las propiedades reológicas de los materiales. Específicamente en la reología de alimentos, los materiales de estudio constituyen tanto los ingredientes como los productos alimenticios elaborados (Steffe, 1996).

Las propiedades reológicas empíricas o subjetivas son utilizadas en la industria de alimentos con diferentes propósitos como por ejemplo para el control de la calidad, la correlación con propiedades sensoriales y la caracterización de productos alimenticios con estructura muy compleja, no homogénea y no isotrópica (frutas, verduras, etc.). Algunas propiedades reológicas empíricas determinadas usualmente en alimentos son la dureza, la adhesividad, la cohesividad, la fracturabilidad y la grumosidad.

Las propiedades reológicas fundamentales son utilizadas en las ecuaciones constitutivas o de estado para modelar y predecir el comportamiento reológico de los productos, para diseñar procesos y equipos de la industria alimentaria y para inferir sobre la microestructura de los alimentos. Algunas propiedades reológicas fundamentales determinadas usualmente en alimentos son los módulos elástico y viscoso, la viscosidad intrínseca y la viscosidad elongacional.

En reometría, uno de los flujos utilizados para realizar las mediciones es el flujo de corte estacionario o transitorio, como por ejemplo el oscilatorio. Este último se caracteriza por ser una función periódica que varía en el tiempo y tener especial aplicación en el estudio del comportamiento reológico de alimentos viscoelásticos. La representación de un ensayo realizado por medio de reometría dinámica con una geometría plato-plato se ilustra en la Figura 3.2. El plato superior se mueve con una velocidad que varía en el tiempo, existiendo un flujo de corte oscilatorio con una frecuencia ω .

Cuando el movimiento del plato superior es $L \sin(\omega t)$, la deformación oscilatoria aplicada al material que se encuentra dentro de la celda posee la siguiente expresión (Walters, 1975):

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \tag{3.6}$$

donde γ_0 representa la amplitud de la deformación.

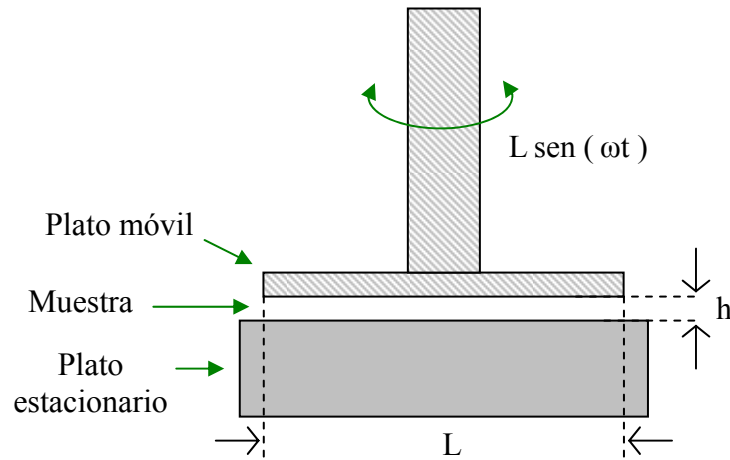


Figura 3.2. Representación de un ensayo realizado por medio de reometría dinámica con una geometría plato-plato.

Derivando la Ecuación 3.6 con respecto al tiempo se puede obtener la velocidad de

deformación $\dot{\gamma}$:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \dot{\gamma} = \frac{d(\gamma_0 \text{ sen}(\omega t))}{dt} \quad 3.7$$

$$\dot{\gamma} = \gamma_0 \omega \text{ cos}(\omega t) \quad 3.8$$

Si γ_0 es muy pequeña para considerar que el material se comporta dentro de la zona de respuesta lineal, la tensión de corte producida es:

$$\tau = \tau_0 \text{ sen}(\omega t + \delta) \quad 3.9$$

donde τ_0 representa la amplitud de la tensión de corte y δ es el ángulo de fase entre la deformación impuesta y la tensión de corte producida.

Dividiendo τ_0 y γ_0 se obtiene el módulo complejo ($|G^*|$) que representa la resistencia total del material a la deformación aplicada cuando es considerado un sólido elástico:

$$|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \quad 3.10$$

Si se dividen ambos miembros de la Ecuación 3.9 por la amplitud de la deformación γ_0 se obtiene:

$$\frac{\tau}{\gamma_0} = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \text{sen}(\omega t + \delta) \quad 3.11$$

$$\tau = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \cos(\delta) \gamma_0 \text{sen}(\omega t) + \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \text{sen}(\delta) \frac{1}{\omega} \gamma_0 \omega \cos(\omega t) \quad 3.12$$

$$\tau = \left[\left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \cos(\delta) \right] \gamma + \left[\left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \text{sen}(\delta) \frac{1}{\omega} \right] \dot{\gamma} \quad 3.13$$

De esta manera, la tensión de corte se encuentra determinada por la siguiente expresión:

$$\tau = G' \gamma + \eta' \dot{\gamma} \quad 3.14$$

$$G' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \cos(\delta) \quad 3.15$$

$$\eta' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \text{sen}(\delta) \frac{1}{\omega} \quad 3.16$$

donde G' es el módulo elástico que representa la energía almacenada por ciclo de deformación cuando el material es considerado un sólido elástico y η' es la viscosidad dinámica, que representa la energía cedida en forma de calor por ciclo de deformación considerando al material como un fluido viscoso (Steffe, 1996).

La tensión de corte puede expresarse además de la siguiente forma:

$$\tau = G' \gamma + \frac{G''}{\omega} \dot{\gamma} \quad 3.17$$

$$G'' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right) \text{sen}(\delta) \quad 3.18$$

donde G'' es el módulo viscoso que representa la energía cedida en forma de calor por ciclo de deformación considerando al material como un sólido elástico.

Teniendo en cuenta las Ecuaciones 3.10, 3.15 y 3.18 pueden obtenerse otras expresiones para G' y G'' :

$$G' = |G^*| \cos(\delta) \quad 3.19$$

$$G'' = |G^*| \text{sen}(\delta) \quad 3.20$$

De esta manera, $|G^*|$ puede expresarse como un número complejo:

$$G^* = G' + iG'' \quad 3.21$$

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad 3.22$$

Para un ensayo oscilatorio, la representación de G' , G'' y $|G^*|$ en el plano complejo se encuentra representada en la Figura 3.3.

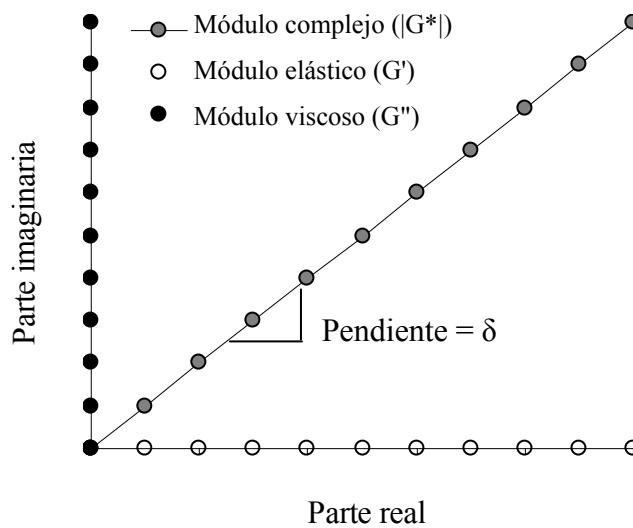


Figura 3.3. Diagrama representativo de los módulos complejo, elástico y viscoso en el plano complejo (Schramm, 2000).

Otras relaciones útiles que permiten evaluar el comportamiento viscoelástico de un material son las siguientes:

$$\frac{G''}{G'} = \frac{\sin(\delta)}{\cos(\delta)} = \tan(\delta) \quad 3.23$$

$$|\eta^*| = \frac{|G^*|}{\omega} \quad 3.24$$

donde $|\eta^*|$ es la viscosidad compleja que describe la resistencia total a fluir que posee un material que es considerado un fluido viscoso y la $\tan(\delta)$ es un valor adimensional que compara la cantidad de energía cedida durante un ciclo de deformación con la energía almacenada en dicho período (Ferry, 1970).

Las funciones determinadas por medio de reometría dinámica dependerán de la frecuencia de deformación aplicada. De esta forma, el modelo de Ley de Potencia puede utilizarse para describir la dependencia de G' y G'' con la frecuencia (Steffe, 1992):

$$G'(\omega) = a \omega^x \quad 3.25$$

$$G''(\omega) = b \omega^y \quad 3.26$$

donde ω es la frecuencia de oscilación, los coeficientes a y b representan las magnitudes de G' y G'' respectivamente a una dada frecuencia (1 rad/s) y los exponentes x e y representan la velocidad de variación de los módulos con la frecuencia. Winter y Chambon (1896), quienes analizaron la evolución de las propiedades viscoelásticas de sistemas poliméricos entrecruzados, llegaron a la conclusión de que en el punto donde se forma una red tridimensional, denominado punto gel, se cumple que $x=y$. Un exponente x cercano a cero indica que G' no varía con la frecuencia, representando el comportamiento de un sólido viscoelástico, como por ejemplo un gel (Resch y Daubert, 2002). La matriz de un gel tiene la

característica de poseer un alto grado de estructuración, por este motivo ejerce una gran resistencia a la deformación que se pone en evidencia con una menor velocidad de variación de los módulos con la frecuencia.

El modelo de Ley de Potencia es la expresión matemática más sencilla capaz de predecir el comportamiento viscoelástico de los materiales. El mismo fue utilizado por numerosos autores en diferentes sistemas alimentarios, como por ejemplo quesos (Diefes y col., 1993; Subramanian y col., 2006), suspensiones y geles de proteínas del suero (Resch y Daubert, 2002; Lizarraga, y col., 2006; Meza y col., 2009).

3.3.1. Comportamiento reológico de suspensiones de proteína del suero

Las propiedades reológicas de los polímeros y de los agregados está relacionada con el tamaño la forma de las moléculas (Vardhanabhuti y Foegeding, 1999). Por este motivo, una de las variables que condicionará el comportamiento reológico que presentarán las proteínas del suero cuando se encuentran en medio acuoso será su estado conformacional.

Por un lado, debido a que las proteínas del suero en estado nativo son relativamente pequeñas y presentan una conformación compacta y organizada, las soluciones que las contienen presentan baja viscosidad. Por otro lado, las proteínas del suero en estado desnaturalizado poseen una conformación más aleatoria y desordenada. Los agregados que se forman a partir de ellas poseen una forma más asimétrica y una fracción volumétrica efectiva mayor que la de las proteínas del suero en estado nativo. De esta forma, las soluciones que contienen agregados de

proteínas del suero solubles, o dicho de otro modo PDA, presentan una mayor viscosidad (Bryant y McClements, 1998; Vardhanabhuti y Foegeding, 1999; Mleko y Foegeding, 1999).

El comportamiento reológico de suspensiones de proteínas del suero ha sido investigado por diversos autores.

Ikeda y col. (2001) estudiaron el comportamiento reológico de suspensiones de β -lactoglobulina (concentración de 0,01 a 7% de proteína en 0,1 mol/dm³ de ClNa) y de suspensiones de WPI (concentración de 0,1 a 10% de proteína en 0,1 mol/dm³ de ClNa), realizando ensayos de fluidez y dinámicos a 20 °C. En las suspensiones de β -lactoglobulina, los autores observaron que los valores de viscosidad presentaron una fuerte dependencia con la velocidad de deformación, mostrando un comportamiento pseudoplástico. Además, los espectros mecánicos de dichas suspensiones presentaron un comportamiento predominantemente sólido (donde G' fue mayor a G''). En las suspensiones de WPI, se observó el mismo comportamiento pseudoplástico obtenido con las suspensiones de β -lactoglobulina, pero los espectros mecánicos obtenidos evidenciaron un comportamiento similar al de las soluciones semidiluidas, en donde G'' es mayor a G' a bajos valores de frecuencia.

Ikeda y Nishinari (2001a) estudiaron el comportamiento reológico de suspensiones de diversas variedades de proteínas globulares, entre ellas de β -lactoglobulina (1% de proteína), Albúmina Sérica Bovina (1% de proteína) y α -lactoalbúmina (5% de proteína), mediante reometría dinámica y rotacional. En las suspensiones de β -lactoglobulina y de Albúmina Sérica Bovina, se observó un comportamiento pseudoplástico y los espectros mecánicos presentaron un

comportamiento predominante sólido en el rango de frecuencias estudiado (0,1 a 100 rad). Las suspensiones de α -lactoalbúmina presentaron un comportamiento similar al de un fluido newtoniano, mientras que los barridos de frecuencia no pudieron obtenerse debido a que la respuesta obtenida estuvo por debajo del nivel de sensibilidad del reómetro.

Lizarraga, y col. (2006) estudiaron, por medio de ensayos oscilatorios y rotacionales, el comportamiento reológico de suspensiones de proteína del suero en un rango de concentraciones de 2,0 a 32,0% de sólidos totales preparadas a partir de un WPC con 80% de proteína total. Los autores observaron que todas las suspensiones presentaron un comportamiento pseudoplástico y que las suspensiones con 32,0% de WPC presentaron un comportamiento tixotrópico. Además, los espectros mecánicos fueron similares a los de una solución de polímero concentrada.

Se han encontrado escasos trabajos dedicados a analizar el comportamiento reológico de suspensiones de proteínas del suero que contienen PDA. Vardhanabhuti y Foegeding (1999) analizaron el comportamiento reológico de este tipo de suspensiones por medio de ensayos rotacionales. Su objetivo fue comparar la viscosidad de estas muestras con el de suspensiones de carbohidratos utilizados habitualmente como agentes espesantes en alimentos. Para ello utilizaron suspensiones con diferentes concentraciones de proteína (8, 9, 10 y 11%) preparadas a partir de un WPI. El tratamiento térmico fue realizado a 80 °C durante diferentes tiempos (1, 3 y 9 h). Los autores observaron que las suspensiones analizadas presentaron un comportamiento comparable al de las suspensiones de carbohidratos. De la misma forma, Mleko y Foegeding (1999) estudiaron el comportamiento de

suspensiones de proteína del suero que contenían PDA obtenidas a partir de un tratamiento térmico realizado en dos etapas (80 °C durante 56-59 min y 80 °C durante 1,5 h). Para la preparación de las mismas se utilizó un WPI y los ensayos reológicos fueron realizados mediante reometría rotacional. Las suspensiones presentaron un comportamiento tixotrópico, pseudoplástico y en algunos casos dilatante y reopéctico.

3.3.2. Comportamiento reológico de quesos

En términos físicos, el queso es un material viscoelástico que puede ser considerado como una red de proteínas (caseínas) embebida en una fase dispersa compuesta por glóbulos de grasa, sales minerales y agua (Subramanian y Gunasekaran, 1997a y b). El agua está parcialmente ligada a las proteínas y el resto se encuentra en forma libre junto con las sales llenando los intersticios entre la red de caseínas y la grasa.

El comportamiento reológico de distintas variedades de queso ha sido extensamente estudiado por diversos autores por medio de ensayos oscilatorios (Diefes y col., 1993; Rosemberg y col., 1995; Ustunol y col., 1995; Ak y Gunasekaran, 1996; Subramanian y Gunasekaran, 1997a y b; Brown y col., 2003; Subramanian y col., 2003, Graiver y col., 2004, Subramanian y col., 2006). No obstante, las diferencias existentes en las etapas del proceso de elaboración que originan la diversidad de quesos pueden producir variaciones particulares en su estructura y, por lo tanto, en su comportamiento reológico.

Se han encontrado escasos trabajos dedicados a estudiar el comportamiento reológico de quesos elaborados con proteínas del suero por medio de la determinación de propiedades reológicas fundamentales.

Zalazar y col. (2002) estudiaron el comportamiento viscoelástico de un queso Cremoso Argentino bajo en grasa elaborado con Dairy-Lo™ al final del período de maduración (20 días), realizando barridos de frecuencia (0,1 a 9,6 Hz) a 30 °C. Los autores analizaron los valores de G' , G'' y $|G^*|$ y llegaron a la conclusión que el comportamiento reológico de los quesos no fue afectado por la adición de Dairy-Lo™ en comparación con un queso control.

Ma y col. (1997) analizaron el comportamiento reológico de un queso Cheddar bajo en grasa elaborado con Dairy-Lo™ a los tres meses de almacenamiento, realizando barridos de frecuencia en el rango de 0,05 a 20 Hz a una temperatura de 20 °C. Los autores analizaron estadísticamente los valores de G' y G'' a 0,05, 0,7 y 10 Hz y concluyeron que los quesos elaborados con Dairy-Lo™ presentaron valores de G' y G'' menores al de un queso control

En la mayoría de los trabajos publicados, se estudiaron los cambios en las propiedades reológicas empíricas durante la maduración (dureza, adhesividad, cohesividad, fracturabilidad, gomosidad y *chewines*) de varios tipos de quesos magros elaborados con proteínas del suero tales como Simplese® y Dairy-Lo™ (Fenelon y Guinee, 1997; Romeih y col., 2002; Kavas y col., 2004; Koca y Metin, 2004; Sahan y col., 2008).

Como se explicó anteriormente, durante la maduración se producen modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de los quesos debido

principalmente a la hidrólisis de la lactosa, la proteólisis y a la difusión de sal y de agua. Estas modificaciones producen alteraciones en la estructura del queso. De esta forma, las correlaciones entre ensayos físicoquímicos y reológicos han sido utilizadas por diversos autores como herramientas útiles para comprender la relación entre la estructura y la reología del queso.

Bertola y col. (1992) estudiaron la maduración de quesos Tybo Argentino y encontraron que los parámetros reológicos se correlacionaron linealmente con el contenido de nitrógeno soluble en agua a pH 4,6, con el contenido de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético y con la concentración de α_1 -caseína.

Verdini y Rubiolo (2002) analizaron los cambios texturales durante la maduración de un queso Port Salut Argentino en diferentes zonas de muestreo y obtuvieron una buena correlación entre el módulo elástico de equilibrio, la concentración de sal, el contenido de humedad y el índice de maduración.

Gravier y col. (2004) estudiaron el comportamiento reológico de quesos Mozzarella con bajo contenido de humedad refrigerados y congelados. Los autores encontraron que altos valores de contenidos de nitrógeno soluble en agua a pH 4,6 y en ácido tricloroacético se correlacionaron linealmente con bajos valores de G' y G'' durante la maduración.

3.3.3. Principio de Superposición Tiempo-Temperatura

El Principio de Superposición Tiempo-Temperatura es un procedimiento de ajuste empírico basado en conceptos teóricos desarrollado por Williams, Landel y Ferry en 1955 (Ferry, 1970). Dicho principio se basa en la existencia de una

correlación entre el tiempo de respuesta del material y la temperatura la cual se realizan las mediciones a una determinada frecuencia.

Dentro de las teorías propuestas basadas en el modelo *bead-spring*, que describen el comportamiento de soluciones diluidas de moléculas flexibles, existe la teoría de Rouse y la de Zimm. A partir de estas teorías, se puede calcular la energía disipada y almacenada en una deformación oscilatoria y, por lo tanto, se pueden conocer la viscosidad y el módulo complejo. Tanto la teoría de Rouse como la de Zimm generan idénticos resultados dentro del comportamiento viscoelástico lineal, siempre que las interacciones hidrodinámicas sean despreciables (Ferry, 1970).

Las componentes del módulo complejo para una solución diluida de un polímero homogéneo pueden expresarse de la siguiente manera:

$$G'(\omega) = nKT \sum_{p=1}^N \frac{\omega^2 \lambda_p^2}{1 + \omega^2 \lambda_p^2} \quad 3.27$$

$$G''(\omega) = \omega \eta_s + nKT \sum_{p=1}^N \frac{\omega \lambda_p}{1 + \omega^2 \lambda_p^2} \quad 3.28$$

donde n es el número de moléculas de polímetro por cm^3 , K es la constante de Boltzmann, η_s es la viscosidad del solvente, T es la temperatura, ω es la frecuencia y λ_p es un tiempo de relajación genérico. Además $nKT=cRT/M$, donde c es la concentración y M es el peso molecular.

La única diferencia entre las estas dos teorías se encuentra en la forma de la expresión para el cálculo del tiempo de relajación. Para la teoría de Rouse presenta la siguiente forma:

$$\lambda_{p(R)} = \frac{6(\eta - \eta_s)}{\pi^2 p^2 nKT} \quad 3.29$$

$$\lambda_{p(R)} = \frac{6(\eta - \eta_s)M}{\pi^2 p^2 cRT} \quad 3.30$$

donde η es la viscosidad de la solución de polímero y p es la p -ésima contribución al tiempo de relajación. En cambio, para la teoría de Zimm la expresión del tiempo de relajación es:

$$\lambda_{p(Z)} = \frac{1,7(\eta - \eta_s)}{\tau'_k nKT} \quad 3.31$$

$$\lambda_{p(Z)} = \frac{1,7(\eta - \eta_s)M}{\tau'_k cRT} \quad 3.32$$

donde τ'_k es un coeficiente numérico cuyos primeros valores para $k=1, 2, 3$ y 4 son 4,04, 12,79, 24,2 y 37,9 respectivamente.

Para el caso de soluciones de polímeros concentradas, el número de moléculas de polímero por cm^3 es $\rho N/M$ en lugar de cN/M , donde N el número de submoléculas en una molécula y ρ es la densidad. El factor $(\eta - \eta_s)$ puede ser reemplazado por η debido a que la contribución del solvente es despreciable. De esta

forma, las ecuaciones derivadas de la teoría de Rouse para el caso de una solución de polímero concentrada se pueden expresar de la siguiente manera:

$$G'(\omega) = \left(\frac{\rho RT}{M} \right) \sum_{p=1}^N \frac{\omega^2 \lambda_{p(R)}^2}{1 + \omega^2 \lambda_{p(R)}^2} \quad 3.33$$

$$G''(\omega) = \left(\frac{\rho RT}{M} \right) \sum_{p=1}^N \frac{\omega \lambda_{p(R)}}{1 + \omega^2 \lambda_{p(R)}^2} \quad 3.34$$

Para polímeros no entrecruzados de bajo peso molecular, la relación entre el tiempo de relajación y la viscosidad se encuentra determinada por:

$$\lambda_{p(R)} = \frac{6 \eta M}{\pi^2 p^2 \rho RT} \quad 3.35$$

Como puede observarse, la contribución del soluto a los módulos elástico y viscoso esta dada por una serie de términos, cada uno de ellos proporcional a nKT , cRT/M o $\rho RT/M$. Además, cada término se encuentra asociado con un tiempo de relajación que es proporcional a $(\eta - \eta_s)M/cRT$ o $\eta M/\rho RT$. Para este caso, la constante de proporcionalidad depende de la teoría que se aplique (Rouse o Zimm), pero la misma es independiente de la temperatura.

De esta forma, se puede concluir que existen involucradas cuatro variables (η , η_s , T y c o ρ), demostrando que las ecuaciones correspondientes a los tiempos de relajación tienen la misma dependencia con la temperatura. Este fenómeno puede representarse por medio de una relación entre un tiempo de relajación genérico λ_p a

la temperatura T y un tiempo de relajación genérico λ_{p0} a una temperatura de referencia T_0 .

$$a_T = \frac{[\lambda_p]_T}{[\lambda_{p0}]_{T_0}} \quad 3.36$$

En el caso de soluciones diluidas, esta expresión posee la siguiente forma:

$$a_T = \frac{\left[\frac{(\eta - \eta_s)}{c} \right]_{T_0}}{\left[\frac{(\eta - \eta_s)}{c} \right]_T} \quad 3.37$$

En cambio, en el caso de soluciones concentradas, la Ecuación 3.36 quedará expresada de la siguiente manera:

$$a_T = \frac{\eta_{T_0} \rho_0}{\eta_0 T \rho} \quad 3.38$$

El valor de la relación a_T será menor a 1 si $T > T_0$ y mayor a 1 si $T < T_0$. La dependencia de a_T con la temperatura representa el efecto que posee la misma sobre las propiedades viscoelásticas de un determinado material.

Analizando las Ecuaciones 3.33 y 3.34, el efecto de un cambio en la temperatura desde T_0 a T puede representarse multiplicando el factor dentro del signo sumatoria por $\rho_0 T_0 / \rho T$ y multiplicando además cada tiempo de relajación (Ecuación 3.35) por a_T . Analizando la forma de esta última expresión, la misma da un resultado idéntico al que el que se obtendría al multiplicar ω por a_T . En otras

palabras, G' medida a la frecuencia ω y a la temperatura T es, excepto por una diferencia relativamente pequeña de un factor, equivalente a G' medida a la frecuencia ωa_T a la temperatura T_0 .

Se puede concluir que cada función viscoelástica, como por ejemplo G' y G'' , puede multiplicarse por el factor $\rho_0 T_0 / \rho T$ y ser graficadas en función de ωa_T :

$$G'_p = G' \left(\frac{\rho_0 T_0}{\rho T} \right) \quad 3.39$$

$$G''_p = G'' \left(\frac{\rho_0 T_0}{\rho T} \right) \quad 3.40$$

donde G'_p y G''_p son los módulos corregidos.

Este procedimiento permite una reducción de los datos a una temperatura de referencia T_0 para formar una curva maestra. Esta curva representa la dependencia de las funciones viscoelásticas con la frecuencia a una temperatura constante y permite cubrir un rango de frecuencia superior al experimental. Es necesario aclarar que la relación ρ_0/ρ difiere de la unidad solo para variaciones asociadas con la expansión o la contracción térmica a temperaturas relativamente elevadas o bajas.

Para que el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura pueda aplicarse satisfactoriamente, el mismo valor de a_T debe superponer a todas las funciones viscoelásticas. Además, las curvas deben ajustarse de manera exacta a través de un rango considerable de frecuencias. El cumplimiento de estas condiciones indica que el material analizado es termorreologicamente simple, es decir que su estructura a un

nivel físico y molecular permanece constante dentro del rango de temperatura empleado (Ferry, 1970). Por el contrario, si un material no cumple con dicho principio es considerado termorreológicamente complejo.

Diversos factores pueden contribuir a la complejidad termorreológica de un material. Entre ellos se encuentran los cambios morfológicos producidos por reacciones físicas y químicas dependientes de la temperatura, la presencia de procesos de relajación que poseen diferente dependencia con la temperatura, la presencia de una mezcla inmiscible de dos o mas componentes o la naturaleza cristalina de los materiales (Ferry, 1970).

3.3.4. Aplicación del Principio de Superposición Tiempo-Temperatura en sistemas alimentarios

El Principio de Superposición Tiempo-Temperatura fue utilizado en una amplia variedad de sistemas alimentarios. Entre ellos se destacan ingredientes como harina de soja (Yildiz y Kokini, 2001; Ashokan y Kokini, 2005), polisacáridos como gellano (Nickerson y col., 2004 a y b, Sworn y Kasapis, 1998), carragenina (Kasapis, 2001) y hasta mezclas de polivinil alcohol y gelatina utilizados para elaborar recubrimientos biodegradables (Mendieta-Taboada y col., 2008).

No obstante, los trabajos publicados dedicados a analizar la utilización del Principio de Superposición Tiempo-Temperatura en suspensiones de proteínas del suero son escasos, encontrándose únicamente estudios sobre suspensiones de Albúmina Sérica Bovina. En este caso, Ikeda y Nishinari (2000) aplicaron dicho principio a soluciones de 10% de Albúmina Sérica Bovina y obtuvieron curvas

maestras tanto de G' como de G'' en un rango de temperaturas de 10 a 40 °C. Los autores indicaron que los cambios en la temperatura por debajo de la temperatura de desnaturalización de estas proteínas no produjeron cambios significativos en la estructura de las soluciones.

En el caso específico de quesos, los resultados hallados en los trabajos publicados son contradictorios, no encontrándose información publicada sobre quesos elaborados con proteínas del suero. [Subramanian y Gunasekaran \(1997b\)](#), quienes estudiaron las propiedades viscoelásticas de quesos Mozzarella bajos en grasa y humedad, encontraron que los mismos se comportaban como un material termorreologicamente simple obedeciendo el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura en un rango de temperaturas que varió entre 10 y 70 °C. Idénticos resultados fueron publicados por [Suramanian y col., \(2006\)](#) en quesos procesados tradicionales y reducidos en grasa en un rango de temperaturas de 10 a 50 °C. No obstante,

Por otro lado, [Muliawan y Hatzikiriakos \(2007\)](#) publicaron que dicho principio pudo aplicarse satisfactoriamente en muestras de queso Mozzarella descremados a altas temperaturas (40 a 60 °C) pero no pudo ser aplicado a bajas temperaturas (25 °C). Además, se han encontrado trabajos en donde el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura no pudo aplicarse a temperaturas por encima de los 40 °C en quesos Mozarella descremados ([Udyarajan y col., 2007](#)) y bajos en humedad ([Singh y col. 2006](#)).

3.3.5. El modelo de Maxwell

Los modelos reológicos basados en analogías mecánicas, compuestos por amortiguadores y resortes, son una herramienta útil para conceptualizar el comportamiento reológico de un material en la zona de respuesta lineal. El resorte representa un sólido ideal (Ecuación 3.41), mientras que el amortiguador representa un fluido ideal (Ecuación 3.42):

$$\tau = G \gamma \quad 3.41$$

$$\tau = \eta \frac{d\gamma}{dt} \quad 3.42$$

donde τ es la tensión de corte, G es el módulo de Hooke, γ es la deformación y η es la viscosidad.

Los amortiguadores y los resortes pueden conectarse en serie y/o en paralelo con el objetivo de describir el comportamiento viscoelástico de los materiales (Schramm, 2000). Uno de los modelos basados en analogías mecánicas más populares es el modelo de Maxwell que combina un amortiguador y un resorte en serie (Figura 3.4). En este caso, la deformación total es la suma de las deformaciones en ambos elementos:

$$\gamma = [\gamma]_{\text{amortiguador}} + [\gamma]_{\text{resorte}} \quad 3.43$$

Reemplazando las Ecuaciones 3.41 y 3.42 en la 3.43 y derivando con respecto al tiempo se obtiene la ecuación de estado para este modelo:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau}{\eta} + \frac{1}{G} \left(\frac{d\tau}{dt} \right) \quad 3.44$$

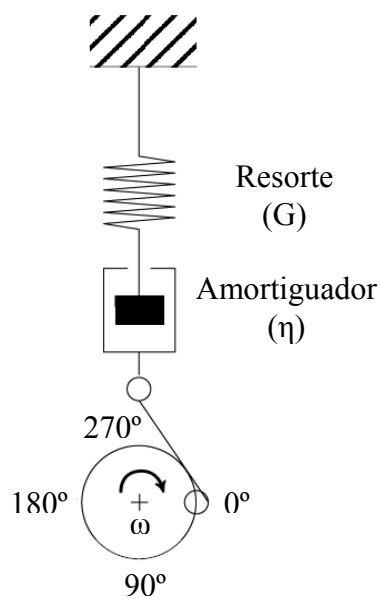


Figura 3.4. Esquema del modelo de Maxwell para un ensayo oscilatorio (Schramm, 2000).

Para un ensayo oscilatorio, se debe introducir una función sinusoidal para la deformación:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad 3.45$$

$$\frac{d\gamma}{dt} = \omega \gamma_0 \text{cos}(\omega t) \quad 3.46$$

Reemplazando las Ecuaciones 3.45 y 3.46 en la Ecuación 3.44 y reordenando se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{1}{G} \left(\frac{d\tau}{dt} \right) + \frac{\tau}{\eta} = \omega \gamma_0 \cos(\omega t) \quad 3.47$$

La Ecuación 3.47 es una ecuación diferencial ordinaria de primer orden cuya solución es la siguiente:

$$\tau = \left[\frac{G \omega^2 \lambda^2}{1 + \omega^2 \lambda^2} \right] \gamma_0 \text{sen}(\omega t) + \left[\frac{G \omega \lambda}{1 + \omega^2 \lambda^2} \right] \gamma_0 \cos(\omega t) \quad 3.48$$

$$\tau = \left[\frac{G \omega^2 \lambda^2}{1 + \omega^2 \lambda^2} \right] \gamma + \left[\frac{G \omega \lambda}{1 + \omega^2 \lambda^2} \right] \frac{1}{\omega} \dot{\gamma} \quad 3.49$$

Comparando la forma de la Ecuación 3.49 con la Ecuación 3.17 se puede llegar a la siguiente expresión para G' y G'':

$$G'(\omega) = \frac{G \omega^2 \lambda^2}{1 + \omega^2 \lambda^2} \quad 3.50$$

$$G''(\omega) = \frac{G \omega \lambda}{1 + \omega^2 \lambda^2} \quad 3.51$$

A partir de estas expresiones considerando i elementos, se obtiene el modelo de Maxwell generalizado para un fluido viscoelástico (Bird, 1977):

$$G'(\omega_j) = \sum_N^{i=1} \frac{G_i (\omega_j \lambda_i)^2}{1 + \omega_j^2 \lambda_i^2} \quad 3.52$$

$$G''(\omega_j) = \sum_N^{i=1} \frac{G_i \omega_j \lambda_i}{1 + \omega_j^2 \lambda_i^2} \quad 3.53$$

donde λ es el tiempo de relajación para el modelo de Maxwell determinado por la siguiente relación:

$$\lambda = \frac{\eta}{G} \quad 3.54$$

El tiempo de relajación λ puede interpretarse como el tiempo que toma una macromolécula para relajar cuando es sometida a una deformación (Steffe, 1996).

El modelo de Maxwell ha sido utilizado para describir los espectros mecánicos de numerosos sistemas alimentarios, entre ellos quesos (Singh y col., 2006; Subramanian y col., 2006; Muliawan y Hatzikiriakos, 2007), masa elaborada con harina de trigo (Fu y col., 1997) y geles de almidón de maíz y goma guar (Ptaszek y Grzesik, 2007).

Un espectro mecánico constituyen una “huella digital” del material, permitiendo, entre otras cosas, su caracterización desde el punto de vista microestructural. Un esquema del espectro mecánico de un fluido viscoelástico se encuentra detallado en la Figura 3.5. Puede observarse una zona denominada región terminal, en donde los valores de G'' son mayores a los de G' , indicando un

comportamiento predominantemente fluido. Luego existe otra zona intermedia, conocida como región gomosa, en donde se produce un corte entre ambos módulos y los valores de G' son mayores a los de G'' mostrando un comportamiento predominantemente sólido. Por último, se observa una zona denominada región vítrea que se encuentra caracterizada por otro corte y un incremento de ambos módulos con la frecuencia.

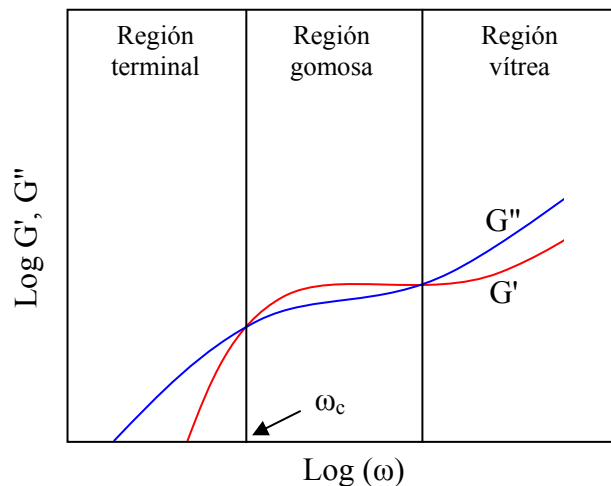


Figura 3.5. Esquema de un espectro mecánico de un fluido viscoelástico. Modificado de Wang y Cui (2005).

Al finalizar la región terminal, el punto donde $G'=G''$, la $\tan(\delta)$ es igual a 1 indicando que el comportamiento del material es tanto sólido como fluido. Este punto de corte es un criterio muy utilizado para comparar muestras y tratamientos (Steffe, 1996). De esta forma, puede calcularse un tiempo característicos de relajación (τ_c) que se encuentra definido como la inversa de la frecuencia de corte (ω_c) (Kulmyrzaev y McClements, 2000; Wientjes y col., 2000; Sopade y Halle,

2004). Algunos autores han utilizado la expresión “tiempo de relajación terminal” para definir el τ_c debido a que en el espectro mecánico, la región terminal siempre se encuentra ubicada a tiempos de relajación menores al recíproco de ω_c (Franco y col., 1997).

3.4. Congelación de sistemas alimentarios

3.4.1. Congelación de suspensiones de proteína del suero

Se han encontrado escasos trabajos dedicados a estudiar los efectos del proceso de congelación sobre las propiedades fisicoquímicas y reológicas de suspensiones de proteínas del suero.

Bhargava y Jelen (1995) analizaron el efecto producido por la congelación en algunas propiedades funcionales de suspensiones de proteínas del suero preparadas a partir de un WPC comercial con un 76,5% de proteína. Los autores observaron que la congelación no afectó significativamente las propiedades funcionales medidas en las suspensiones preparadas a pH 6,8. Sin embargo, cuando las mismas fueron preparadas a pH 5, la congelación a baja velocidad modificó ligeramente la viscosidad de las suspensiones y la fuerza de los geles.

Lawrence y col. (1986) analizaron la utilización del proceso de congelación como método de texturización de suspensiones de proteínas del suero. Los autores elaboraron estructuras firmes y alineadas utilizando proteínas de carne de aves de corral, pero no obtuvieron iguales resultados al utilizar proteínas del suero. Las proteínas del suero en estado nativo obtenidas por ultrafiltración se agregaron en

pequeñas partículas granulares, mientras que las proteínas del suero que se desnaturalizaron y/o que formaron agregados mediante un tratamiento térmico ácido mostraron una mayor cohesividad después de la congelación y la descongelación.

Tamaki y col. (1991) patentaron un procedimiento para elaborar fibras proteicas con textura semejante al de las frutas, la carne o el pescado mediante la texturización por congelación de suspensiones de proteínas del suero que contenían proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados. Los autores propusieron diferentes condiciones de tratamiento térmico para producir la desnaturalización y/o agregación de las proteínas antes de la congelación. Entre ellas se destacan un rango de pH entre 6,5 y 8, temperaturas entre 55 y 170 °C y concentraciones de proteína total entre 5 y 50%.

3.4.2. Congelación de quesos

Se han encontrado numerosas publicaciones dedicadas a estudiar el efecto del proceso de congelación sobre diversos parámetros de calidad (físicoquímicos y reológicos) de quesos blandos. No obstante, no se hallaron estudios referidos a quesos elaborados con proteínas del suero.

Bevilacqua (1997) estudió los efectos de la velocidad de congelación y del tiempo de maduración antes de la congelación sobre la calidad de quesos Mozzarella. El autor observó que no existieron cambios en las características de los quesos sometidos a congelación rápida o lenta, siempre y cuando los mismos tuvieran una maduración previa de 14 días.

Chaves y col. (1999) estudiaron el grado de proteólisis de quesos Mozzarella congelados y descongelados lentamente y no observaron diferencias significativas con el grado de proteólisis de quesos control.

Califano y Bevilacqua (1999) publicaron que la composición de ácidos orgánicos en muestras de queso Mozzarella congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no varió respecto de las muestras control refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un mismo tiempo de maduración.

Verdini (2000) estudió la variación de los parámetros químicos y físicos durante la maduración de un queso Port Salut Argentino sometidos al proceso de congelación, considerando diferentes zonas de muestreo. El autor no observó cambios en la distribución de humedad y sal entre los quesos control y los quesos almacenados congelados. El proceso de congelación afectó significativamente la proteólisis, debido a que en los quesos almacenados congelados se observó mayor formación de aminoácidos. Los valores de los parámetros reológicos considerados (módulos asintóticos de equilibrio) de los quesos congelados no difirieron significativamente de los de los quesos control.

Kuo y Gunasekaran (2003) estudiaron el efecto de las condiciones de almacenamiento a 7 y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sobre las características de quesos Mozzarella. Los autores concluyeron que, con objetivo de obtener buenas propiedades de fusión y extensibilidad del queso, el mismo debe ser almacenado por 1 semana a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de ser congelado y almacenado durante 4 semanas a -20°C .

Graiver y col. (2004) estudiaron el efecto del proceso de congelación y posterior maduración sobre la microestructura, la degradación proteica y el

comportamiento viscoelástico de quesos Mozzarella. Los resultados fueron comparados con quesos control refrigerados. Los autores observaron que la congelación aceleró la proteólisis de los quesos durante la maduración a 10 °C luego de la descongelación. Debido a que la hidrólisis de las caseínas produjo un ablandamiento del queso, se concluyó que el período de maduración de los quesos descongelados se debe reducir una semana para que los mismos experimenten el mismo grado de maduración que los quesos sin congelar.

[Van Hekken y col. \(2005\)](#) estudiaron el efecto de la congelación por períodos prolongados (3 y 6 meses) sobre el comportamiento reológico y el grado de proteólisis de quesos blandos elaborados con leche de cabra. Los autores concluyeron que la congelación tuvo un mínimo impacto en los parámetros evaluados, sugiriendo que este método de conservación puede ser útil para prolongar la vida útil de este tipo de quesos.

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Estudio de suspensiones de proteínas del suero

4.1.1. Concentrado de proteína del suero

Para el estudio se utilizó un concentrado de proteína del suero (WPC) comercial provisto por una empresa local (Milkaut S.A., Frank, Santa Fe, Argentina).

4.1.2. Análisis fisicoquímico del WPC

El contenido total de proteína se estimó a partir del contenido de nitrógeno total determinado por el método de Kjeldahl. Para ello se pesó 0,3 g de WPC y se mineralizó en un digestor automático Büchi 430 (Büchi, Flawil, Suiza) durante 90 min con una solución de ácidos sulfúrico y orofosfórico (20+1), 5 mL de peróxido de hidrógeno de 100 vol y una pastilla de catalizador de selenio (1,5%) y sulfato de cobre en sulfato de sodio (1,5%) (Merck, Darmstadt, Alemania). Una vez enfriada la muestra, se agregó 75 ml de hidróxido de sodio 10 N y se realizó un arrastre de vapor del hidróxido de amonio en una unidad de destilación Büchi 322 (Büchi, Flawil, Suiza), el cual se tituló automáticamente con ácido sulfúrico 0,1 N con un titulador Metler DL40RC (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Suiza). El contenido de nitrógeno obtenido se multiplicó por un factor de 6,38 para expresar los resultados como contenido total de proteína láctea.

El contenido de cenizas fue determinado por ignición de 5 g de WPC en una mufla a 540 °C, mientras que para la cuantificación del contenido de humedad se utilizó un horno microondas CEM AVC 80 (CEM, Mattheus, NC, Estados Unidos) calentando 3 g de muestra a 60% de potencia hasta peso contante ([Kapoor y Metzger,](#)

2004). La determinación del contenido de grasa se realizó utilizando el método de la Standard International Dairy Federation (IDF, 1969). En todos los casos, las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

El contenido de lactosa se calculó como la diferencia entre el peso de la muestra y los contenidos de proteína, cenizas, humedad y grasa. De esta forma, el WPC utilizado presentó la siguiente composición: lactosa 48,8%, proteína 38,3%, cenizas 7,5%, humedad 3,2% y grasa 2,2%.

4.1.3. Preparación de suspensiones de WPC

Se prepararon suspensiones de WPC con contenidos de proteína total (PT) del 5 y 9% p/v (correspondiente al rango de concentración semidiluido). Estas concentraciones fueron seleccionadas para asegurar que las suspensiones en estudio presentasen un contenido de PT menor al crítico necesario para gelificar con el aumento de la temperatura (Bryant y McCllements, 2000b).

Para la preparación de las suspensiones se pesó una cantidad apropiada de WPC en tubos de vidrio (160 x 16 mm), disolviéndose en agua destilada con agitación vigorosa hasta obtener 10 mL de cada suspensión. Luego, las suspensiones obtenidas se almacenaron en heladera a 5 °C durante toda la noche para asegurar la completa hidratación del WPC y la eliminación de la espuma superficial que pudo haberse producido durante la agitación. Las suspensiones de WPC con 5 y 9% de PT presentaron un contenido de sólidos totales de 12,6 y 22,7% p/v, respectivamente. El pH inicial de las mismas de $6,4 \pm 0,1$.

4.1.4. Análisis del contenido de proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados de las suspensiones de WPC

4.1.4.1. Tratamientos térmicos y congelación

Un grupo de tubos conteniendo las suspensiones de WPC con 5 y 9% p/v de PT fueron tratados térmicamente a cuatro temperaturas (70,0, 72,5, 75,0 y 77,5 °C) utilizando un baño termostatzado con recirculación Haake DC 30/Haake W26 (Haake Instrument Inc., Paramus, Estados Unidos) durante diferentes tiempos que variaron entre 4 y 120 min dependiendo de la temperatura utilizada. Las temperaturas y los tiempos para cada tratamiento térmico fueron seleccionados con el objetivo de provocar la desnaturalización-agregación de las proteínas del suero sin producir la gelificación, obteniendo de esta forma agregados solubles en condiciones prácticas de laboratorio.

Inmediatamente después de los tratamientos térmicos, los tubos se enfriaron en agua con hielo durante 3 minutos y luego se almacenaron en heladera a 5 °C durante toda la noche. Este último procedimiento fue necesario para asegurar la completa formación de los agregados solubles, debido a que las bajas temperaturas favorecen la formación de uniones puente hidrógeno entre los agregados de proteína del suero (Vardhanabhuti y Foegeding, 1999). Estas muestras fueron denominadas suspensiones tratadas térmicamente (ST).

Un grupo de suspensiones tratadas térmicamente fueron sometidas al proceso de congelación (congelación en un freezer a -25 °C, almacenamiento a -25 °C

durante 24 h y descongelación a 20 °C). Estas muestras se denominaron suspensiones tratadas térmicamente y congeladas (ST-C).

Por otro lado, un grupo de suspensiones sin tratamiento térmico fueron almacenadas en heladera a 5 °C durante toda la noche. Estas muestras se denominaron suspensiones sin tratamiento térmico (S) y fueron utilizadas como punto inicial de las suspensiones ST. Además, otro grupo de suspensiones sin tratamiento térmico fueron almacenadas en heladera a 5 °C durante toda la noche y posteriormente sometidas al proceso de congelación. Estas muestras se denominaron suspensiones sin tratamiento térmico y congeladas (S-C) y fueron utilizadas como punto inicial para las suspensiones ST-C.

En todos los casos, los tratamientos térmicos fueron realizados por triplicado. En la Figura 4.1 se muestra un diagrama de la preparación de las suspensiones de WPC y de los tratamientos realizados.

4.1.4.2. Determinación del contenido de proteína soluble a pH 4,6 y de proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados

El contenido de proteína soluble total (PS) de las suspensiones de WPC fue determinado luego de la precipitación isoelectrica del contenido de proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados (Li-Chan, 1983; de Wit y col., 1988; de Wit, 1990; Verheul y col., 1998). El pH de las suspensiones se ajustó a $4,6 \pm 0,1$ utilizando soluciones 0,1 y 1N de HCl y NaOH. Una alícuota de cada suspensión fue centrifugada durante 30 min a 5 °C y 26.000g en una centrífuga Biofuge 28RS

(Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania). El sobrenadante se diluyó apropiadamente en buffer de disolución (EDTA 50mM, urea 8M, pH 10), midiéndose la absorbancia a 280nm correspondiente a la PS (Hudson y col., 2000; Chevalier y col. 2001; Giroux y Britten, 2004) utilizando un espectrofotómetro Genesys 5 (Milton Roy Company, Rochester, NY, Estados Unidos).

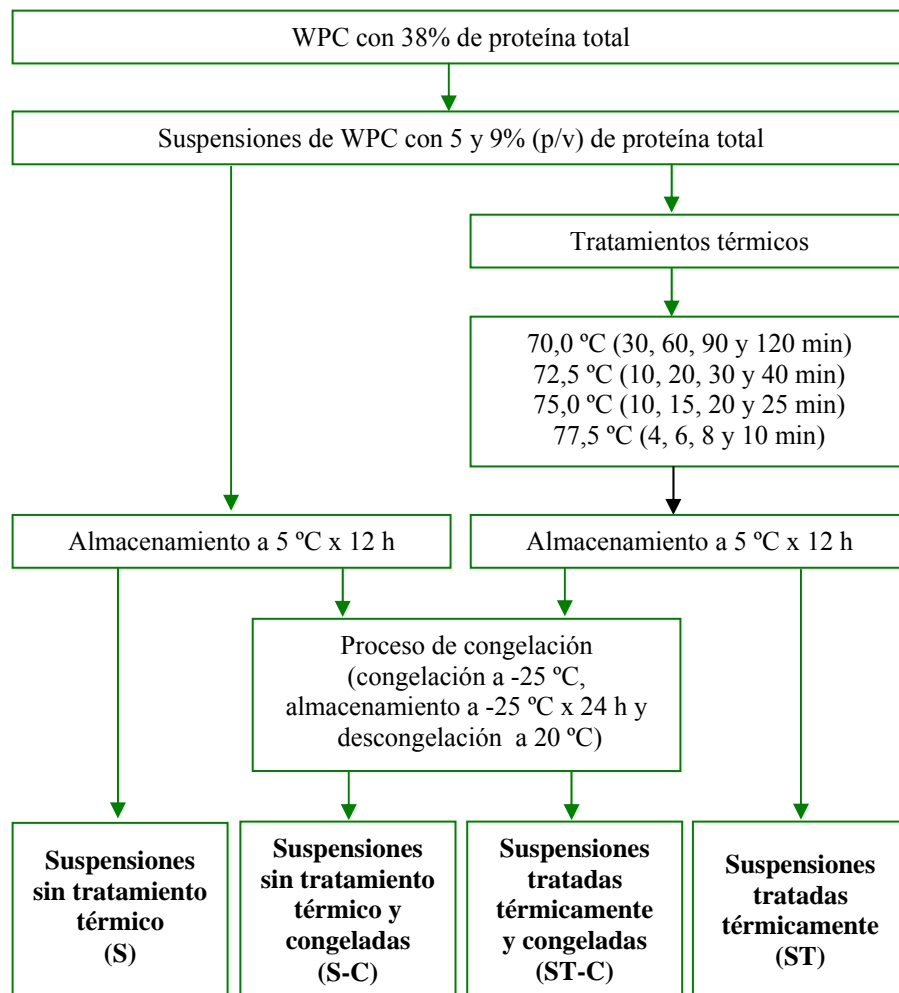


Figura 4.1. Diagrama de la preparación de las suspensiones de WPC y de los tratamientos realizados.

El contenido de proteína insoluble a pH 4,6 fue definido como la diferencia entre los contenidos de PT y PS y se utilizó para estimar el grado de desnaturalización y/o agregación de las proteínas del suero (Li-Chan, 1983; Morr, 1990; Law y Leaver, 1997; Anandharamakrishnan y col., 2008; Meza y col., 2008). De esta forma, el contenido de proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados (PDA) se estimó utilizando la ecuación propuesta por Morr (1990):

$$PDA = \frac{(PT - PS)}{PT} 100 \quad 4.1$$

4.1.4.3. Cinética global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero

La cinética global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero fue estudiada por medio de la disminución en el tiempo del contenido de PS. De esta forma, se estudió dicha cinética teniendo en cuenta la contribución de todas las proteínas.

La descripción matemática de la cinética global de desnaturalización-agregación se obtuvo por medio de la integración de la ecuación de reacción (Ecuación 3.1). En el caso de las suspensiones de WPC sometidas al proceso de congelación, la constante de reacción k_n constituye la constante cinética del proceso global que involucra los tratamientos térmicos y proceso de congelación.

Además, se analizó la dependencia de las constantes de reacción por medio de la ecuación de Arrhenius (Ecuación 3.5).

4.1.5. Análisis de las propiedades reológicas de las suspensiones de WPC

4.1.5.1. Suspensiones de WPC

Para el análisis de las propiedades reológicas de las suspensiones de WPC, se utilizaron suspensiones S, ST, S-C y ST-C. En el caso de las suspensiones ST y ST-C, se seleccionaron algunas condiciones de temperatura (72,5 y 77,5 °C) y tiempo (6 a 40 min) basados en los estudios descritos en la Sección 4.1.4.1 con el objetivo de producir 60% de agregados solubles expresados como contenido de PDA a través de dos intensidades de tratamiento térmico (Tabla 4.1). Este contenido de PDA fue seleccionado debido a que por encima del 60% pudo observarse la gelificación de las proteínas en las suspensiones con un 9% p/v de PT tratadas a 77,5 °C.

En todos los casos los tratamientos fueron realizados por triplicado. En la Tabla 4.1 se detallan los tratamientos realizados a las suspensiones de WPC utilizados para el análisis de las propiedades reológicas.

Tabla 4.1. Tratamientos realizados a las suspensiones de WPC para el análisis de las propiedades reológicas.

Muestras sin congelar	Muestras congeladas	Contenido de PT [% p/v]	Condiciones de tratamiento térmico (temperatura-tiempo)	Intensidad del tratamiento térmico
5-S	5-S-C	5	-	-
9-S	9-S-C	9	-	-
5-72,5	5-72,5-C	5	72,5 °C-15 min	Baja
9-72,5	9-72,5-C	9	72,5 °C-40 min	
5-77,5	5-77,5-C	5	77,5 °C-6 min	Alta
9-77,5	9-77,5-C	9	77,5 °C-12 min	

4.1.5.2. Ensayos reológicos

Se realizaron barridos de frecuencia en el rango de 0,01 a 10 Hz a 10,0, 20,0, 30,0, 40,0 y 50,0±0,5 °C empleando un reómetro con tensión controlada Rheostress RS80 (Haake Instrument Inc., Paramus, Estados Unidos) (Figura 4.2). La geometría utilizada fue cono-plato (diámetro: 60 mm y ángulo: 0,04 rad). Una fina capa de aceite siliconado (10 cp) fue utilizada para prevenir la evaporación de las suspensiones durante la medición. Previamente se determinó la región de viscoelasticidad lineal realizando barridos de tensión a la frecuencia máxima de 10 Hz, verificándose la relación lineal entre la tensión aplicada y la deformación obtenida en cada muestra.

Se obtuvieron valores de los módulos elástico (G') y viscoso (G''), viscosidad compleja ($|\eta^*|$) y ángulo de fase (δ) en el rango de frecuencias estudiado a una amplitud de tensión dependiente de la muestra. Se realizó un ensayo reológico a cada suspensión de WPC.



Figura 4.2. Reómetro con tensión controlada Rheostress RS80.

4.1.5.3. Determinación de los parámetros reológicos

La dependencia de G' y G'' con la frecuencia a $20,0 \pm 0,5$ °C fue determinada aplicando el modelo de Ley de Potencia (Ecuación 3.25 y 3.26), calculándose los valores de los parámetros a , b , x e y .

4.1.5.4. Determinación de los tiempos característicos de relajación

Utilizando los valores de los parámetros reológicos calculados a partir del modelo de Ley de Potencia (Ecuaciones 3.25 y 3.26), se estimó la frecuencia de corte (ω_c) donde $G'=G''$. Los tiempos característicos de relajación (τ_c) fueron calculados como la inversa de la ω_c (Kulmyrzaev y McClements, 2000; Wientjes y col., 2000; Sopade y Halle, 2004).

4.2. Estudio de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero

4.2.1. Quesos

Se utilizaron 25 quesos blandos magros elaborados con proteínas del suero (Simplese[®] D100, NutraSweet Co., Deerfield, Estados Unidos) recién producidos, salados y envasados al vacío en bolsas plásticas en una empresa láctea local. Los quesos fueron transportados en una conservadora con hielo desde la planta elaboradora hasta el laboratorio para asegurar el mantenimiento de la cadena de frío.

Los quesos presentaron geometría rectangular ($28,7 \pm 0,3$ por $11,6 \pm 0,3$ cm de lado y $7,4 \pm 0,2$ cm de alto) y pesaron $3,0 \pm 0,1$ kg. El contenido de grasa inicial,

determinado utilizando el método de la Standard International Dairy Federation (IDF, 1969), fue de $5,74 \pm 0,04\%$.

4.2.2. Almacenamiento y congelación de los quesos

Doce quesos blandos magros elaborados con proteínas del suero fueron almacenados a 6 °C para su maduración, denominándose quesos refrigerados (QR). Los trece quesos restantes fueron sometidos al proceso de congelación. Dicho proceso consistió en la congelación de los quesos en una cámara TABAI Comstar PR 4GM Chamber (TABAI ESPEC CORP., Osaka, Japón) a -25 °C hasta que el centro alcanzó dicha temperatura, almacenamiento del producto congelado a -25 °C durante 33 días y descongelación a 6 °C. Luego de descongelados, doce quesos fueron almacenados a 6 °C para su maduración, denominándose quesos congelados (QC).

La temperatura de los quesos durante la congelación y descongelación se midió en el centro de uno de los quesos utilizando una termocupla y un registrador de temperatura TABAI Comstar THP-18 (TABAI ESPEC CORP., Osaka, Japón).

4.2.3. Toma de muestra

Se tomaron muestras de tres quesos QR y tres quesos QC a diferentes tiempos de maduración: 1, 21, 48 y 76 días. Se obtuvieron cubos representativos de 30 mm y posteriormente láminas de 3 mm de espesor de acuerdo al esquema de muestreo ilustrado en la Figura 4.3. Las láminas obtenidas fueron envueltas en papel de aluminio para evitar su deshidratación y colocadas en recipientes herméticos Los

mismos se almacenaron en heladera a 5 °C hasta la determinación de las propiedades fisicoquímicas y reológicas.

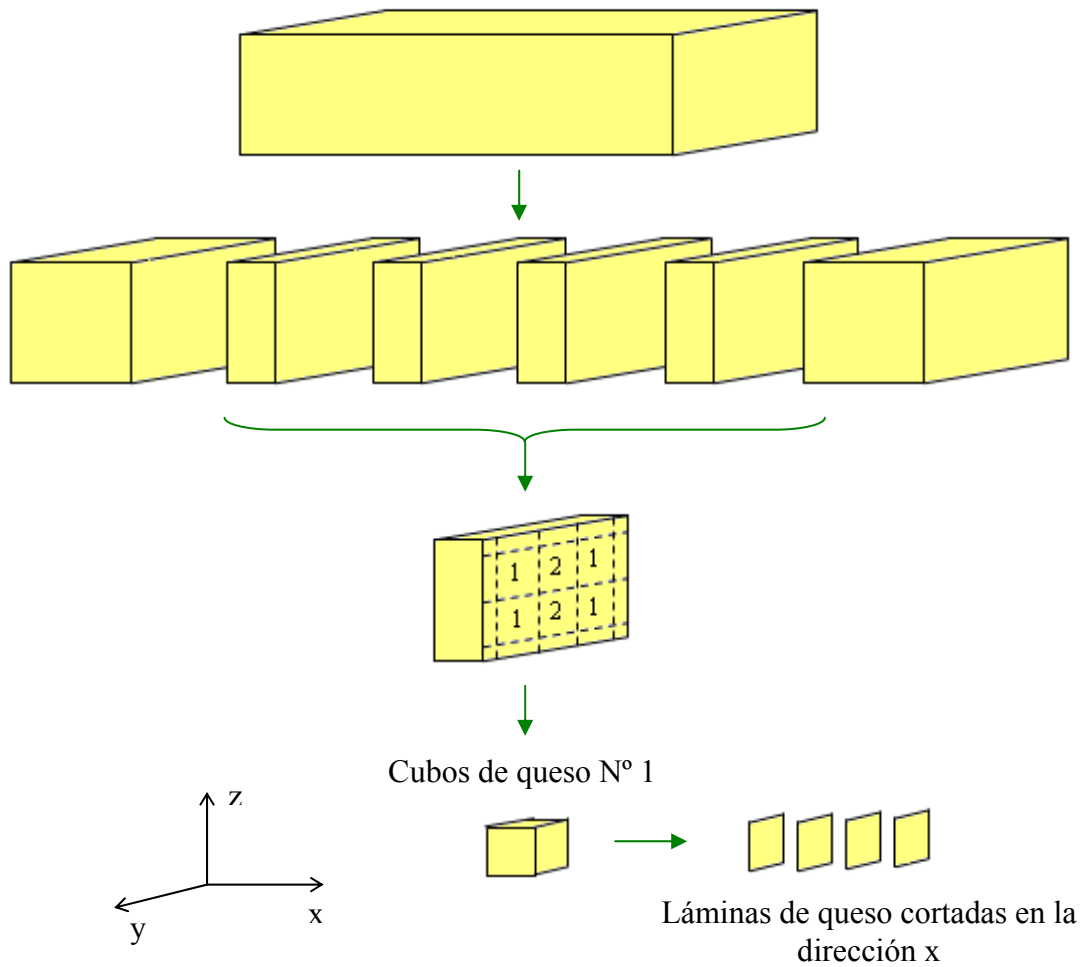


Figura 4.3. Esquema de muestreo utilizado para el estudio de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero.

4.2.4. Análisis de las propiedades fisicoquímicas de los quesos durante la maduración

4.2.4.1. Contenido de humedad

El contenido de humedad fue determinado por duplicado de acuerdo con el método [AOAC 977.11](#), calentando una lámina de queso (aproximadamente 2 g) a 60% de potencia hasta peso constante en un horno microondas CEM AVC 80.

4.2.4.2. Valores de pH

El pH se midió por duplicado en el centro de los cubos de queso con un pHímetro para alimentos sólidos (PH Spear, OAKTON Instruments, Vernon Hills, Illinois., Estados Unidos).

4.2.4.3. Concentración de sal

La concentración de sal fue determinada por duplicado mediante titulación potenciométrica de acuerdo al método propuesto por [Fox \(1963\)](#). La titulación se realizó con nitrato de plata 0,1 N utilizando un titulador automático modelo Metler DL40RC.

4.2.4.4. Proteína total

El contenido total de proteína se calculó a partir del contenido de nitrógeno total (NT) determinado por el método de Kjeldahl como se describió en la Sección

4.1.2., pesando aproximadamente 0,3 g de queso. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

4.2.4.5. Nitrógeno en la fracción soluble a pH 4,6

La extracción de la fracción nitrogenada soluble en agua fue realizada de acuerdo al procedimiento propuesto por [Kuchroo y Fox \(1982\)](#) y modificado por [Verdini \(2002\)](#). Se rallaron las láminas de queso, se pesaron aproximadamente 10 g de queso rallado y se agregaron aproximadamente 30 mL de agua destilada. La mezcla fue homogeneizada en un equipo Ultra-Turrax T25 (IKA Werke, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Alemania) durante 2 min a máxima velocidad y a temperatura ambiente, dejándola reposar 1 hs en baño a 40 °C. Posteriormente, la dispersión obtenida se llevó a pH 4,6±0,1 con HCl 1 N agitando continuamente hasta lectura estable durante 5 min y se centrifugó a 5 °C y 3.600g durante 30 min con una centrífuga Biofuge 28RS. La capa superficial de grasa fue eliminada y el sobrenadante se filtró por papel Whatman N° 42 (Whatman Int. Ltd., Maidstone, Reino Unido). El filtrado se transvasó a un matraz aforado y se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada, constituyendo la fracción nitrogenada soluble en agua a pH 4,6.

El contenido de nitrógeno total presente en esta fracción fue determinado por duplicado por el método de Kjeldahl que se describió en la Sección 4.1.2, midiendo 5 mL de filtrado.

4.2.4.6. Índice de maduración

El índice de maduración (IM) fue definido como el porcentaje de nitrógeno de la fracción soluble en agua a pH 4,6 (NS) sobre el nitrógeno total del queso (NT):

$$IM = \left(\frac{NS}{NT} \right) 100 \quad 4.2$$

4.2.5. Análisis de las propiedades reológicas de los quesos durante la maduración

4.2.5.1. Muestras de queso

Para el análisis de las propiedades reológicas, se utilizaron discos de 20 mm de diámetro obtenidas con un sacabocado a partir de las láminas de queso ilustradas en la Figura 4.3.

4.2.5.2. Ensayos reológicos

Se realizaron barridos de frecuencia en el rango de 0,01 a 10 Hz a 20,0±0,5 °C a todas las muestras de queso y a 10,0, 30,0, 40,0 y 50,0±0,5 °C a las muestras de los días 48 y 76 de maduración. En este último caso, se seleccionaron los días correspondientes a un estadio intermedio de maduración y al final del período de vida útil de este tipo de quesos.

Se empleó un reómetro con tensión controlada Rheostress RS80 y la geometría utilizada fue plato-plato (diámetro: 20 mm y distancia entre platos: 2,5 mm). Durante

las mediciones, los bordes de los discos de queso fueron cubiertos con una fina capa de aceite siliconado (100 cp) para prevenir su deshidratación.

La región de viscoelasticidad lineal fue determinada antes de cada barrido de frecuencia realizando barridos de tensión a la frecuencia máxima de 10 Hz. Se obtuvieron valores del módulo elástico (G') y viscoso (G'') y la tangente del ángulo de fase ($\tan \delta$) en el rango de frecuencias a una amplitud de tensión de 318 Pa. Cada ensayo reológico fue realizado por duplicado.

4.2.5.3. Determinación de los parámetros reológicos

La dependencia de G' y G'' con la frecuencia a $20,0 \pm 0,5$ °C fue determinada aplicando el modelo de Ley de Potencia (Ecuación 3.25 y 3.26), calculándose los valores de los parámetros a , b , x e y .

4.2.5.4. Cinética de decaimiento de los parámetros reológicos

La variación de los parámetros reológicos durante la maduración fue estudiada asumiendo una cinética de decaimiento de primer orden ([Verdini y Rubiolo, 2002](#)):

$$P(\theta) = P_0 e^{-k_0 \theta} \quad 4.3$$

donde P_0 es el valor inicial del parámetro reológico considerado, $P(\theta)$ es el parámetro reológico durante la maduración, θ es el tiempo de maduración y k_0 es la constante cinética de decaimiento.

4.3. Caracterización del comportamiento reológico de los sistemas alimentarios en estudio

4.3.1. Aplicación del Principio de Superposición Tiempo-Temperatura

Los valores de G'' a las temperaturas analizadas (10 a 50 °C) de las suspensiones de WPC y del queso blando magro elaborado con proteínas del suero, fueron superpuestos utilizando un factor de ajuste (a_T) (Nickerson y col., 2004a):

$$a_T = \left(\frac{G''}{G''_0} \right) \left(\frac{T_0 \rho_0}{T \rho} \right) \quad 4.4$$

donde G'' es el módulo viscoso y ρ es la densidad del material medidos a una temperatura absoluta T , G''_0 es el módulo viscoso y ρ_0 es la densidad del material pero medidos a una temperatura de referencia absoluta T_0 elegida convenientemente dependiendo del sistema analizado. En este caso, la corrección por variación de la densidad con la temperatura (ρ_0 / ρ) fue considerada despreciable.

Los valores de a_T hallados con la Ecuación 4.4 variaron con la frecuencia. Por lo tanto, se debió seleccionar el factor a_T que superpuso satisfactoriamente los puntos experimentales de G'' de acuerdo al procedimiento detallado en el Apéndice II. Luego, estos factores a_T seleccionados fueron utilizados para superponer los valores de G' obtenidos también a partir de los barridos de frecuencia a las temperaturas analizadas (10 a 50 °C).

Si los sistemas estudiados se comportan como materiales termorreológicamente simples, los valores de a_T que superponen las curvas de G'' hallados a partir de la Ecuación 4.4 deben también superponer con éxito las curvas correspondientes a G' .

4.3.2. Utilización del modelo de Maxwell

El modelo de Maxwell (Ecuaciones 3.52 y 3.53) fue utilizado para modelar las curvas maestras obtenidas para el queso blando magro elaborado con proteínas del suero.

4.4. Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados utilizando análisis de variancia (ANOVA). Se investigó la variación debida a los factores y se estudiaron las interacciones entre dichos factores. Cuando los efectos de los factores fue significativo ($p < 0,05$) se procedió a realizar el test de HSD Tukey para la comparación de medias (95% de nivel de confianza). En los casos en los que se presentó interacción, las comparaciones de las medias se realizaron utilizando las combinaciones de tratamientos por separado para aislar la interacción (Glantz y Slinker, 1990).

Se realizaron regresiones lineales para la determinación de la cinética de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero, de los parámetros del modelo de Ley de Potencia y de la dependencia de las constantes cinéticas con la temperatura. Además, se utilizó regresión múltiple para evaluar las relaciones existentes entre las propiedades fisicoquímicas y los parámetros reológicos considerados en el estudio de un queso blando magro elaborado con proteína del suero.

Para la obtención de los parámetros del modelo de Maxwell, se realizaron regresiones no lineales utilizando el procedimiento propuesto por [Subramanian y col. \(2006\)](#) que se describe en el Apéndice III.

El análisis estadístico fue realizado con el programa estadístico Statgraphics Plus para Windows 3.0 (Manugistics Inc., Rockville, Maryland, Estados Unidos).

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Efecto del proceso de congelación sobre el contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados y sobre las propiedades reológicas de suspensiones de proteína del suero

5.1.1. Contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados

5.1.1.1. Análisis del contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados

Los contenidos de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados (PDA) de las suspensiones de WPC se encuentran graficados en la Figura 5.1. El contenido de PDA de las suspensiones sin tratamiento térmico con un 5 y 9% p/v de PT fue de $52,8 \pm 1,5$ y $47,0 \pm 1,1\%$, respectivamente. Si bien el contenido de PDA es elevado, en bibliografía se han encontrado trabajos que informan contenidos de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados superiores al 40% en diferentes muestras de WPC. [de Wit y col. \(1983\)](#) realizaron estudios a varios WPC comerciales que presentaron contenidos de PDA entre 9 y 65%. [Morr y col. \(1990\)](#) publicaron que muestras de WPC con contenidos de proteína total entre 72 y 77% presentaron un contenido de PDA equivalente a 12 y 51% (88 y 49% de proteína soluble). Además, [Sodini y col. \(2006\)](#) observaron que el contenido de PDA de muestras de WPC con 35% de PT varió entre un 10 a un 53%.

Durante el proceso de producción del WPC se llevan a cabo diversas operaciones tales como pasteurización, concentración y secado a temperaturas relativamente elevadas ([Puyol y col., 1999](#)). Las distintas condiciones operativas empleadas en dichas operaciones explican la presencia proteína del suero

desnaturalizada-agregada en la mayoría de las suspensiones de WPC (Puyol y col., 1999; de la Fuente y col., 2002a; de la Fuente y col., 2002b; Roufik y col., 2005).

Analizando el efecto producido por los tratamientos térmicos, se observó que el contenido de PDA aumentó con el tiempo de tratamiento para todas las temperaturas (Figura 5.1). Además, el contenido de PDA fue mayor para las suspensiones con un 5% p/v de PT a todas las temperaturas. Estas observaciones pueden deberse a diferencias en el contenido de sólidos totales como se discutirá más adelante (Sección 5.1.1.2.2).

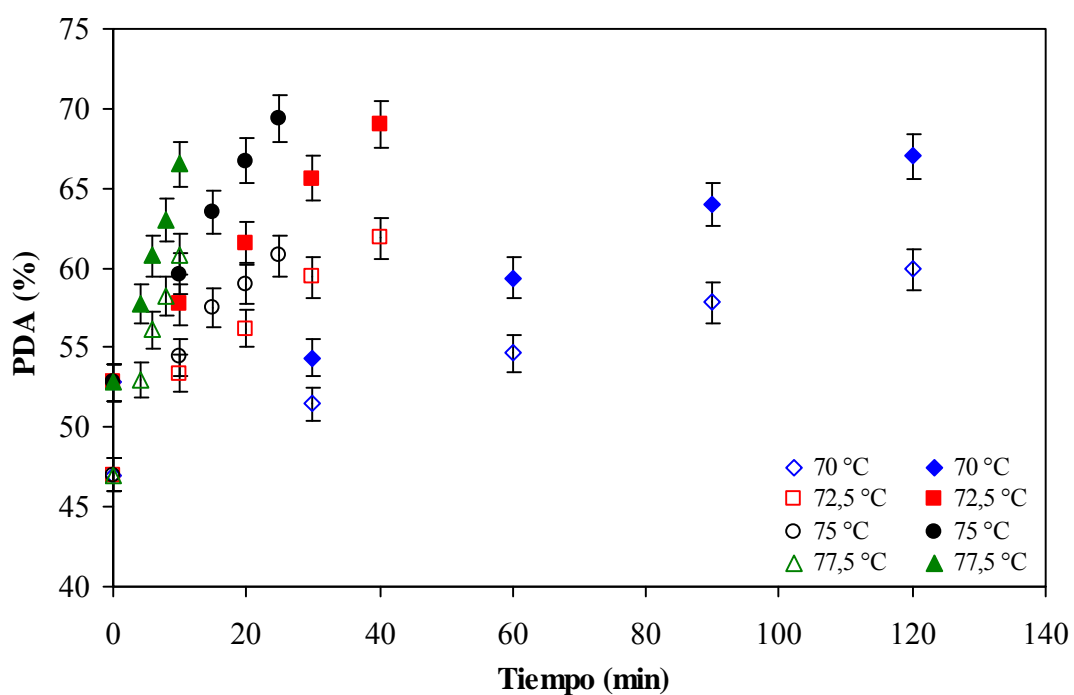


Figura 5.1. Contenido de proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados (PDA) de suspensiones de WPC tratadas térmicamente (ST). Los símbolos llenos corresponden a 5% p/v de proteína total y los símbolos vacíos a 9% p/v de proteína total. Las barras representan los intervalos para un nivel de confianza de 95%.

Analizando el efecto producido por el proceso de congelación, no se observaron diferencias significativas entre los contenidos de PDA de las suspensiones sometidas a dicho proceso en comparación con las suspensiones sin congelar, excepto cuando la temperatura de tratamiento térmico fue 72,5 °C. En este caso, el contenido de PDA fue menor para las suspensiones ST-C (Figura 5.2).

La crioconcentración pudo producir cambios en la estructura de los agregados de proteína del suero formados a 72,5 °C que provocaron variaciones en su solubilidad a pH 4,6. En bibliografía se han encontrado trabajos en donde describen las posibles causas de los cambios en la solubilidad a pH 4,6 de las proteínas del suero. [Li-Chan \(1983\)](#) estudió suspensiones de proteína del suero preparadas a partir de un WPC con 35% de PT tratadas térmicamente a 60 °C y observó que dichas suspensiones presentaron una mayor solubilidad a pH 4,6 en comparación con las suspensiones sin tratamiento térmico. Este comportamiento fue atribuido a dos posibles fenómenos. Por un lado, al desplegamiento parcial de los agregados, debido a la ruptura de algunas uniones intramoleculares no covalentes, que posibilitó que las moléculas asuman luego del enfriamiento una conformación más soluble a pH 4,6. Por otro lado, a la solubilización de los agregados proteicos presentes originalmente en el WPC debido al posible debilitamiento de las uniones intermoleculares.

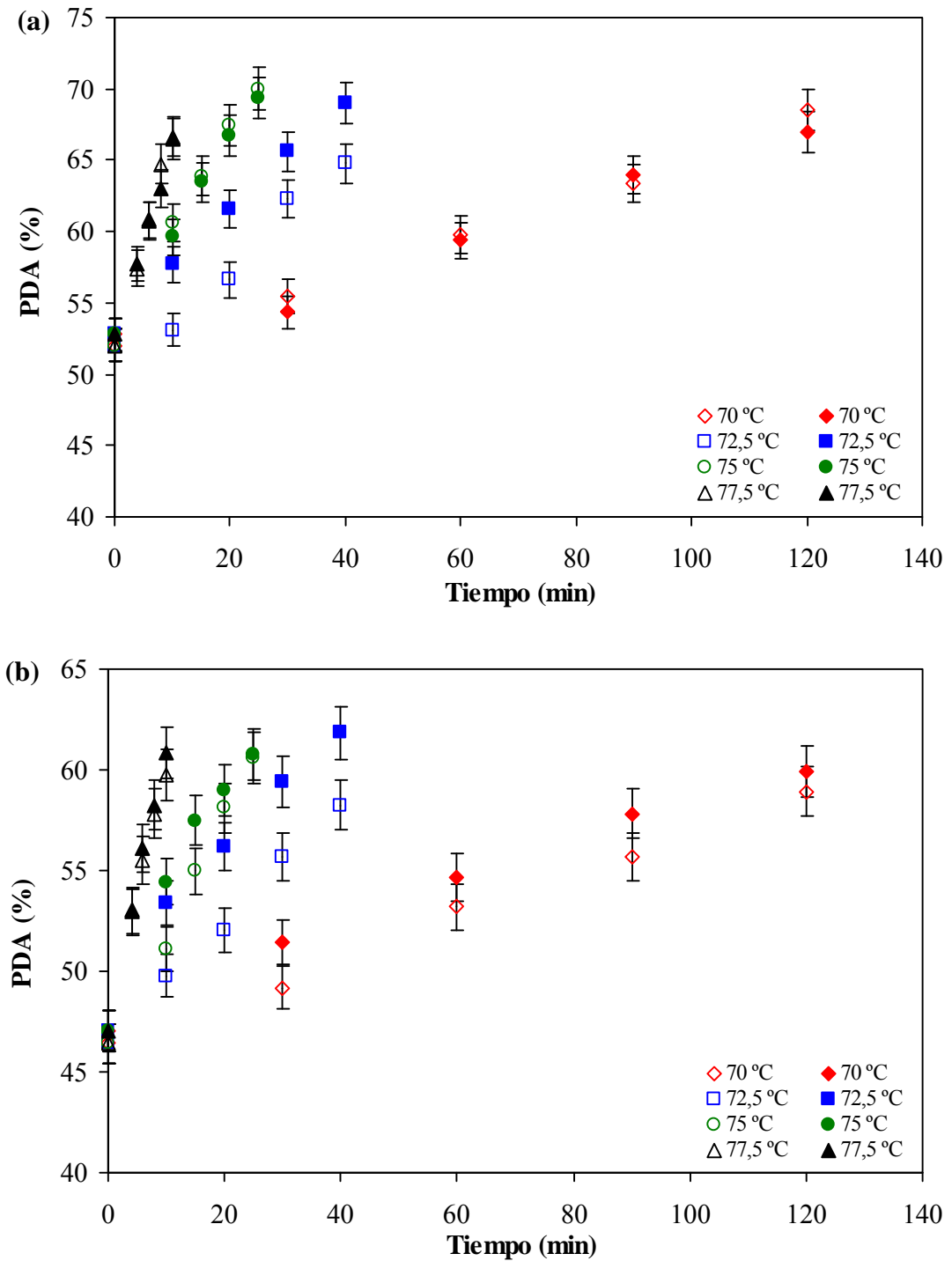


Figura 5.2. Contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados (PDA) para suspensiones de WPC. (a) 5% p/v y (b) 9% p/v de proteína total. Los símbolos llenos corresponden a suspensiones tratadas térmicamente (ST) y los símbolos vacíos corresponden a suspensiones tratadas térmicamente y congeladas (ST-C). Las barras representan los intervalos para un nivel de confianza de 95%.

5.1.1.2. Cinética global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero

5.1.1.2.1. Orden de reacción

El orden de reacción se obtuvo mediante la aplicación de las Ecuaciones 3.2 y 3.3, observándose una relación lineal entre $\ln(C/C_0)$ y el tiempo en las suspensiones ST y ST-C a todas las temperaturas de tratamiento (Figura 5.3). De esta forma, la cinética global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero pudo describirse por medio de una reacción de primer orden.

En bibliografía se han encontrado órdenes de reacción entre 1,3 y 1,5 para la cinética global de desnaturalización-agregación de la totalidad de las proteínas del suero (Patel y col., 1990). Además, otros investigadores han publicado un orden de reacción igual a 1 para la cinética de agregación de la α -lactoalbumina (van Mil y Roef, 1993; Anema y McKenna, 1996) y un orden de reacción de 1,5 para la cinética de agregación de la β -lactoglobulina (van Mil y Roef, 1993; Anema y McKenna, 1996; Verheul y col., 1998; Le Bon y col., 1999b). En el caso de la β -lactoglobulina, el orden de la reacción global de desnaturalización-agregación es un valor entre 1 y 2 (Verheul y col., 1998).

El orden de reacción puede variar dependiendo de la composición del WPC, de la temperatura y del tiempo del tratamiento térmico (de Wit, 1990). Además, Jaskulka y col. (2000) analizaron datos experimentales correspondientes a la reacción de desnaturalización de la β -lactoglobulina publicados por diversos autores y concluyeron que dichos datos pueden representarse por más de un orden de reacción.

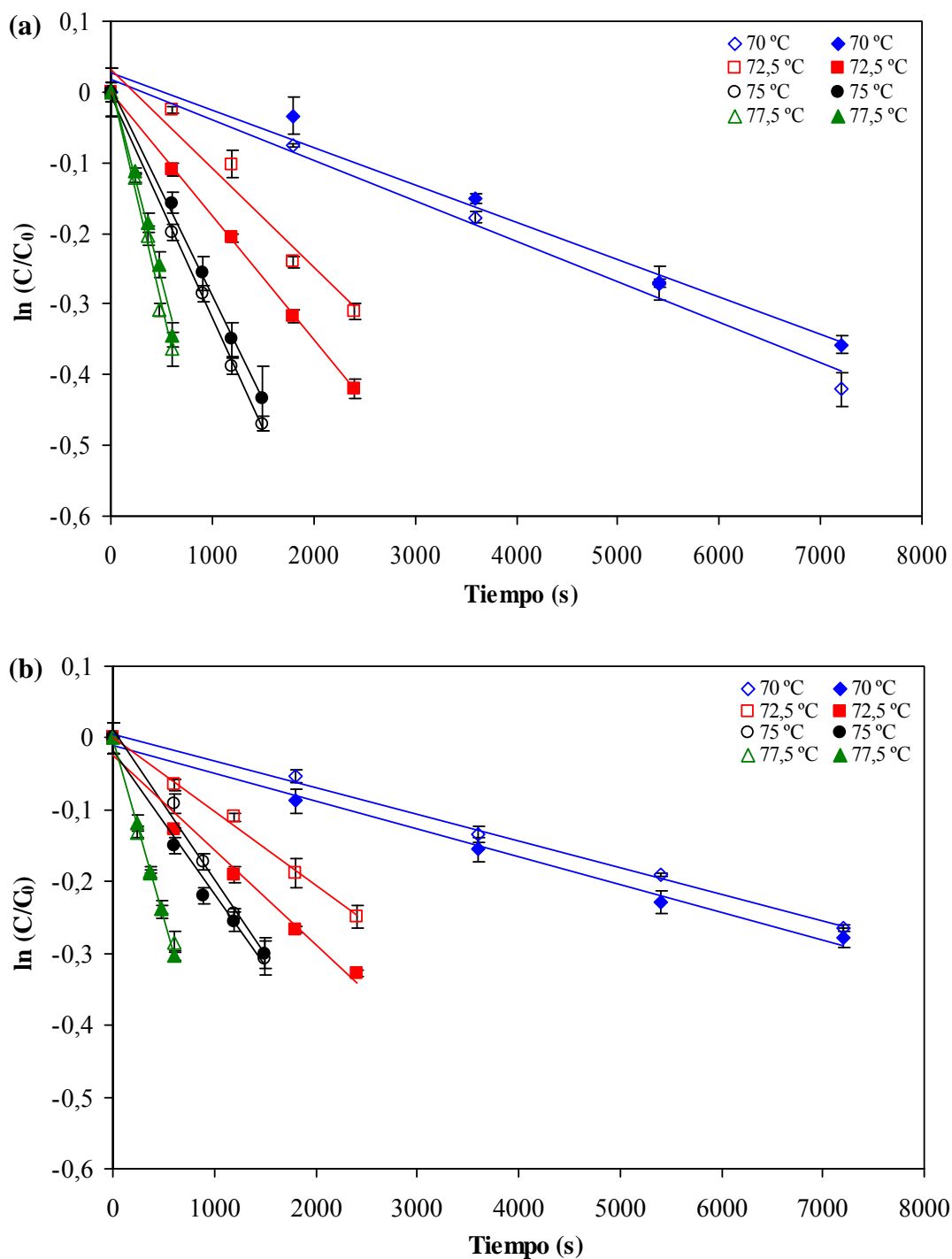


Figura 5.3. Cinética global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero. (a) 5% p/v y (b) 9% p/v de proteína total. Los símbolos llenos corresponden a las suspensiones tratadas térmicamente (ST) y los símbolos vacíos a las suspensiones tratadas térmicamente y congeladas (ST-C). Las barras de error indican los desvíos estándar y las líneas representan la regresión lineal.

5.1.1.2.2. Constantes de reacción

Los valores de las constantes de reacción global de desnaturalización-agregación de las proteínas del suero para un orden igual a 1 (k_1) se encuentran detallados en la Tabla 5.1. Los mismos fueron calculados a partir de las pendientes de las líneas de regresión de los gráficos de $\ln(C/C_0)$ versus tiempo (Figura 5.3).

De acuerdo a los resultados hallados en el presente trabajo, los valores de las constantes de reacción obtenidas fueron del mismo orden a los publicados previamente para la cinética de agregación de la β -lactoglobulina (de Wit, 1990). Considerando que la β -lactoglobulina es la proteína que se encuentra en mayor proporción en el suero, comúnmente se acepta que las características de esta proteína dominan el comportamiento de los agregados proteicos (de la Fuente y col., 200b).

Tabla 5.1. Constantes de reacción para la desnaturalización-agregación de las proteínas del suero para un orden igual a 1 (k_1).

Proteína total [% p/v]	Temperatura [°C]	Suspensiones tratadas térmicamente (ST)		Suspensiones tratadas térmicamente y congeladas (ST-C)	
		k_1 [$s^{-1} 10^5$]*	R^2	k_1 [$s^{-1} 10^5$]*	R^2
5	70,0	5,3±0,3 ^a	0,96	5,8±0,2 ^{ia}	0,98
	72,5	17,5±0,5 ^b	0,99	13,9±0,9 ^j	0,95
	75,0	29,5±1,4 ^c	0,97	31,5±0,6 ^{kc}	0,99
	77,5	56,1±2,8 ^d	0,97	62,7±2,4 ^{ld}	0,98
9	70,0	3,9±0,2 ^e	0,97	3,7±0,1 ^{me}	0,99
	72,5	13,3±0,6 ^f	0,97	10,4±0,5 ⁿ	0,98
	75,0	20,0±1,1 ^g	0,96	21,0±0,9 ^{og}	0,98
	77,5	50,3±1,5 ^{hd}	0,99	47,4±0,2 ^{ph}	0,98

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las constantes de reacción de todas las suspensiones de WPC se incrementaron significativamente al aumentar la temperatura debido a que, fundamentalmente, un aumento en la temperatura trae aparejado un aumento en la probabilidad de que ocurran colisiones entre las moléculas, favoreciendo la formación de agregados (Kazmierskim y Corredig, 2003).

Se observó que los valores de las constantes k_1 disminuyeron significativamente al aumentar el contenido de proteína total de 5 a 9% p/v cuando las temperaturas de tratamiento térmico fueron 70,0, 72,5 y 75,0 °C, no encontrándose diferencias significativas a 77,5 °C. Estas observaciones indican que el efecto de la temperatura sobre las constantes de reacción fue más significativo que el efecto del contenido de proteína total a altas temperaturas. De acuerdo a estos resultados, Iametti y col. (1995) publicaron que la formación de uniones disulfuro intermoleculares entre las moléculas de β -lactoglobulina fue menos dependiente de la concentración de proteína cuando la temperatura de tratamiento se incrementó de 70 a 85 °C.

Además, las diferencias halladas en las constantes de reacción al aumentar el contenido de proteína total de 5 a 9% p/v pueden deberse a diferencias en el contenido de sólidos totales. Se han publicado estudios que indican que un incremento en el contenido de sólidos totales produce una disminución en la susceptibilidad de las proteínas del suero frente a la desnaturalización, disminuyendo la velocidad de agregación de las mismas (Nielsen y col., 1973; Hillier y col., 1979; de Wit, 1981). McKenna y O'Sullivan (1970) hallaron que un aumento en el contenido de sólidos totales de 9 a 44% provocó una disminución en la

susceptibilidad de las proteínas del suero a la desnaturalización por calor en leche descremada y sus concentrados. Los autores indicaron que durante la desnaturalización-agregación de dichas proteínas, el efecto producido por el contenido de sólidos totales fue más importante que el producido por las variaciones en la temperatura. Además, [Anema \(2000\)](#) publicó que la velocidad de desnaturalización de la β -lactoglobulina a 75 °C en muestras de leche descremada reconstituida a varias concentraciones (9,6 a 38,4% de sólidos totales) disminuyó cuando el contenido de sólidos totales se incrementó.

Analizando el efecto producido por el proceso de congelación sobre las constantes de reacción, sólo se observaron diferencias significativas entre los valores de las constantes k_1 cuando el tratamiento térmico fue realizado a 72,5 °C. A esta temperatura, las constantes de reacción de las suspensiones ST-C fueron menores que el de las ST. Como se explicó anteriormente en la Sección 5.1.1.1, la crioconcentración pudo producir cambios en la estructura de los agregados de proteína del suero que aumentaron su solubilidad a pH 4,6, provocando una disminución en los valores de las constantes de reacción de las suspensiones ST-C tratadas a 72,5 °C.

5.1.1.2.3. Dependencia de las constantes de reacción con la temperatura

Los valores de las energías de activación (E_a) y $\ln(A)$ calculados a partir de las pendientes de las líneas de regresión de los gráficos de $\ln(k_1)$ versus $1/T$ se encuentran detallados en la Tabla 5.2. Los valores de E_a de las suspensiones de WPC

hallados se encuentran en el mismo orden que los publicados en bibliografía para diferentes proteínas del suero (de Wit, 1990; Patel y col., 1990; Anema y McKenna, 1996; Le Bon y col., 1999b; Anema, 2000).

Tabla 5.2. Energías de activación (E_a) y $\ln(A)$.

Proteína total [% p/v]	Suspensiones tratadas térmicamente (ST)			Suspensiones tratadas térmicamente y Congeladas (ST-C)		
	E_a [kJ mol ⁻¹]	$\ln(A)$	R^2	E_a [kJ mol ⁻¹]	$\ln(A)$	R^2
5	304±40	104	0,97	319±11	107	0,99
9	324±41	97	0,97	334±17	102	0,99

5.1.1.3. Estimación del contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados

Para poder realizar la estimación del contenido de PDA en las suspensiones de WPC luego de los tratamientos térmicos y del proceso de congelación, se combinaron las Ecuaciones 3.3 y 4.1 obteniéndose la siguiente expresión:

$$PDA = \left[1 - \frac{PS_0}{PT} \exp(-k_1 t) \right] 100 \quad 5.1$$

donde PS_0 es el contenido inicial de proteína soluble.

Los contenidos de PDA estimadas se encuentran graficados en la Figura 5.4. Los errores estándar de estimación para cada determinación fueron menores al 6,5% y el error estándar de estimación promedio para cada temperatura de tratamiento para las suspensiones ST y ST-C fue de 0,5 y 2,3%, respectivamente.

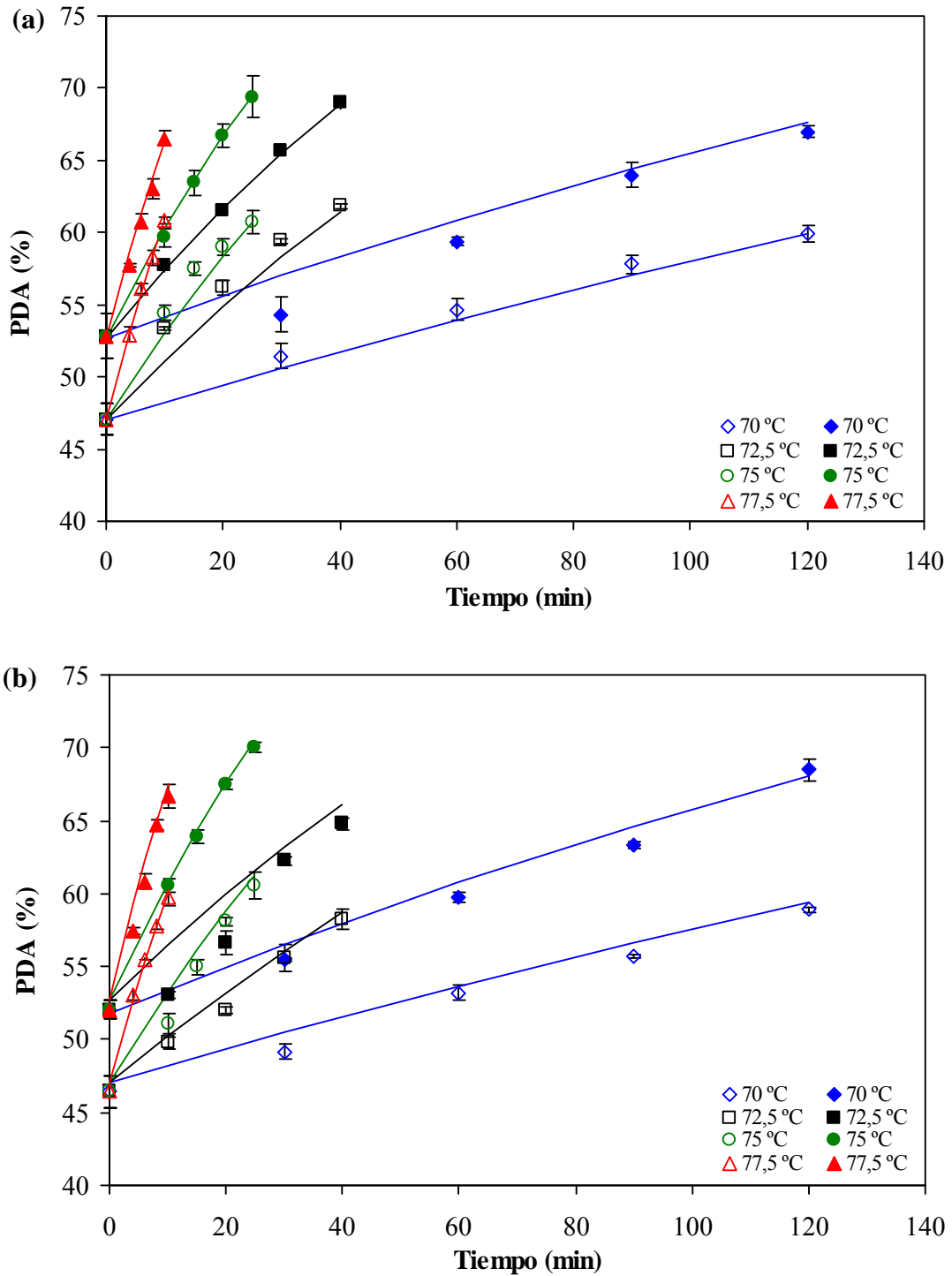


Figura 5.4. Contenidos de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados (PDA) estimados. (a) Suspensiones tratadas térmicamente (ST) y (b) suspensiones tratadas térmicamente y congeladas (ST-C). Los símbolos llenos corresponden a las suspensiones con 5% p/v de proteína total y los símbolos vacíos a las suspensiones con un 9% p/v de proteína total. Las barras de error indican los desvíos estándar y las líneas representan los PDA estimados.

5.1.2. Propiedades reológicas

5.1.2.1. Región de viscoelasticidad lineal

Los valores de módulo complejo ($|G^*|$) y la deformación (γ) de las suspensiones de WPC en función de la tensión aplicada a una frecuencia de 10 Hz se encuentran graficados en la Figura 5.5. Se observó que los valores de $|G^*|$ no fueron afectados por la magnitud de la tensión, encontrándose una relación lineal entre la tensión aplicada y la deformación medida. Estos resultados indican que las suspensiones de WPC se comportan como un material linealmente viscoelástico durante los ensayos oscilatorios realizados a valores de tensión menores a 9 Pa.

5.1.2.2. Análisis descriptivo de los espectros mecánicos

Los espectros mecánicos de las suspensiones sin tratamiento térmico se encuentran graficados en la Figura 5.6. A bajas frecuencias, se observó un comportamiento predominantemente fluido donde G'' fue mayor a G' . Al final de la primera década de frecuencias, se produjo un cruce entre G' y G'' y a frecuencias superiores a la frecuencia de corte (ω_c), se pudo visualizar un comportamiento predominantemente sólido donde G' fue mayor a G'' . De acuerdo con [Steffe \(1996\)](#), esta descripción del espectro mecánico es característica de los fluidos viscoelásticos. Similares resultados fueron observados por [Ikeda y col. \(2001\)](#) en suspensiones con un contenido entre 0,1 y 10% de WPI, en donde se produjo un cruce entre G' y G'' a frecuencias menores a 0,3 Hz.

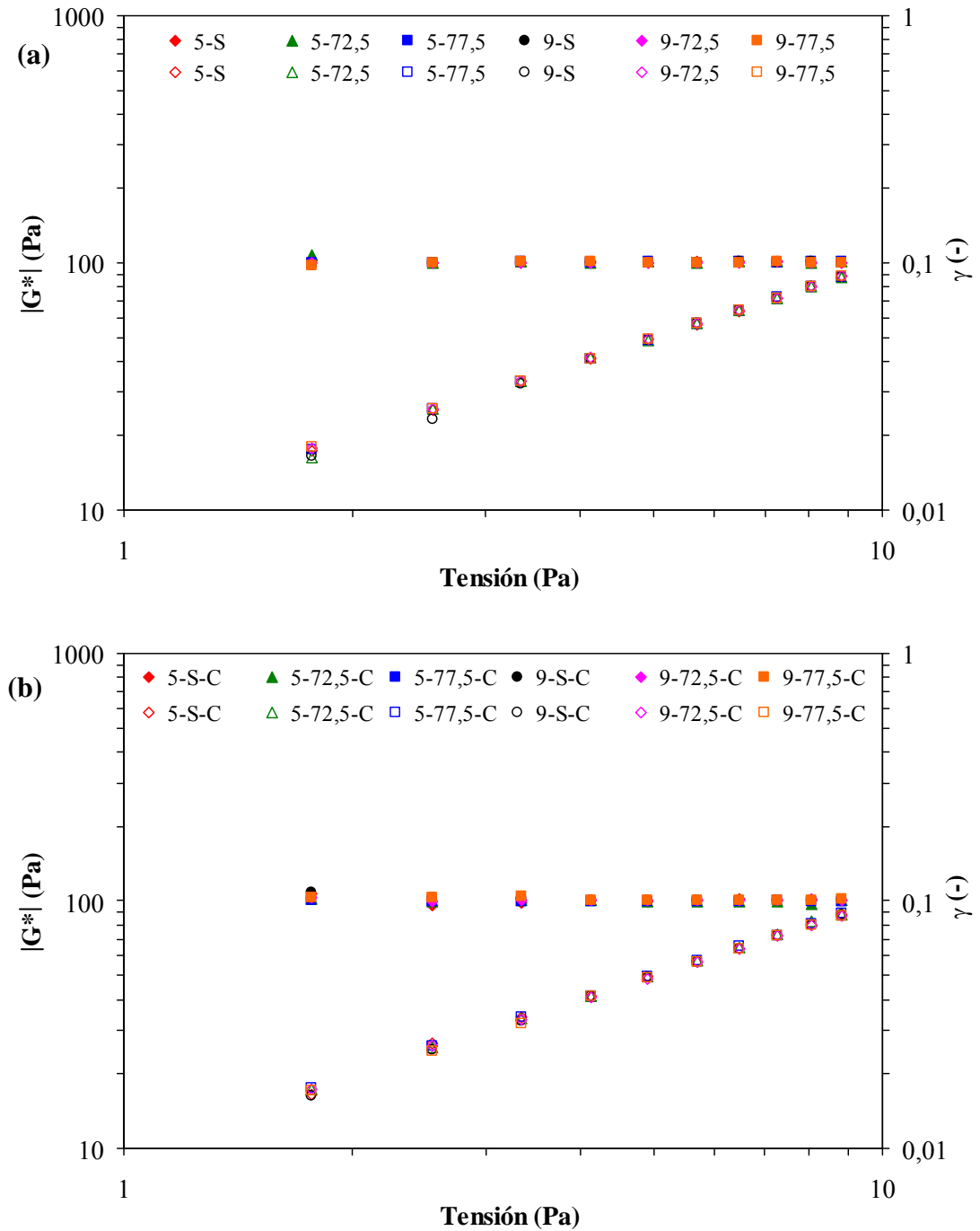


Figura 5.5. Valores de módulo complejo ($|G^*|$) y deformación (γ) en función de la tensión aplicada de suspensiones de WPC: (a) Suspensiones sin tratamiento térmico (S) y tratadas térmicamente (ST) y (b) Suspensiones sin tratamiento térmico y congeladas (S-C) y tratadas térmicamente y congeladas (ST-C). Los símbolos llenos representan a $|G^*|$ y los símbolos vacíos representan a γ . Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

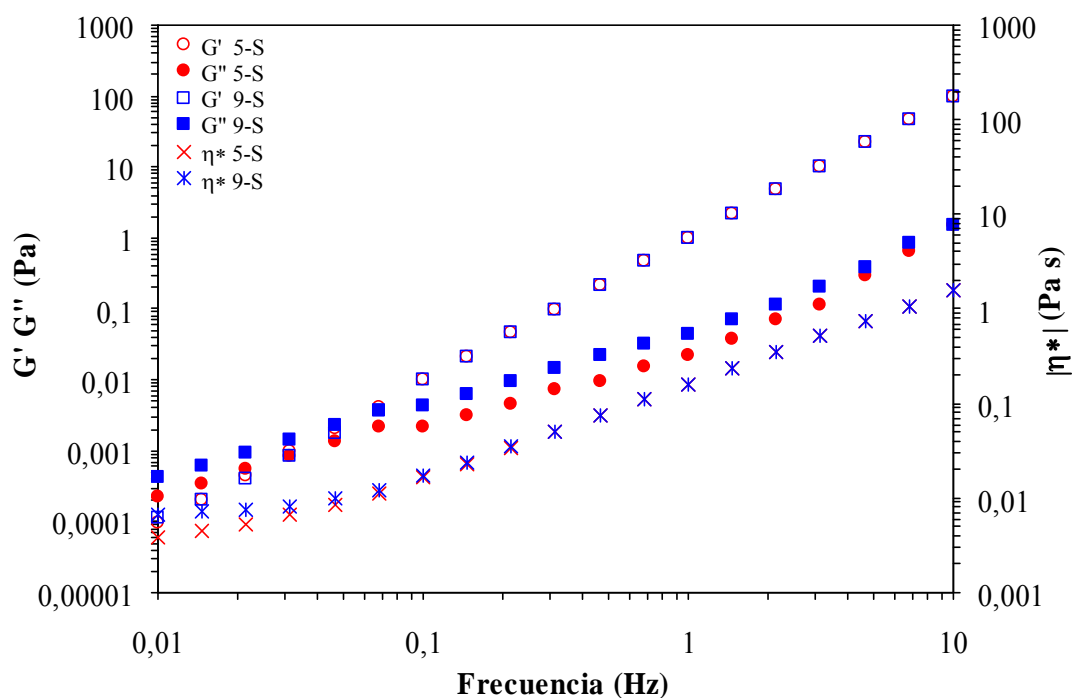


Figura 5.6. Espectro mecánico de suspensiones de WPC sin tratamiento térmico (S) con 5 y 9% p/v de proteína total. Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

En el presente estudio, se observó una independencia de G' y una escasa dependencia de G'' con el contenido de proteína total en las suspensiones sin tratamiento térmico (Figura 5.6). Del mismo modo, Ikeda y col. (2001) publicaron que los valores de G' y G'' de suspensiones de β -lactoglobulina presentaron poca dependencia con la concentración en un rango de 0,01 a 7%. Además, los autores observaron el mismo comportamiento en suspensiones de WPI en un rango de concentración de 0,1 a 10%. La escasa dependencia de los módulos con la concentración ha sido observada en algunas dispersiones coloidales de proteínas globulares en estado nativo y fue interpretada en términos de la formación de coloides cristalinos (Ikeda y Nishinari, 2001a y b; Ikeda y col., 2001).

En las suspensiones de WPC sin tratamiento térmico, se observó un

comportamiento dilatante donde $|\eta^*|$ se incrementó con la frecuencia (Figura 5.6). Varios autores han observado un comportamiento similar en suspensiones de proteínas del suero. [Mleko y Foegeding \(1999\)](#) publicaron que algunas suspensiones de proteína del suero que contenían PDA obtenidas a partir de suspensiones de WPI tratadas térmicamente presentaron un comportamiento dilatante. [Mleko \(2004\)](#) observó que suspensiones de proteína del suero presentaron un comportamiento tanto dilatante como pseudoplástico en un amplio rango de contenido de proteína total, dependiendo de la muestra analizada (suero en polvo, suero en polvo desmineralizado, WPC y WPI).

Se ha publicado que el comportamiento dilatante puede provenir de un grado de estructuración de los agregados de WPC durante los ensayos oscilatorios ([Walkenström, y col., 1999](#)). Dicho comportamiento puede ser provocado por la fuerza aplicada, debido a que el material adopta una estructura mas ordenada, o por la presencia de grandes interacciones entre las partículas ([Mleko y Foegeding, 1999](#)). Además, se ha publicado que los ensayos oscilatorios pueden inducir un orden cristalino en suspensiones de esferas rígidas con interacciones de corto alcance ([Ackerson y Pusey, 1988; Vermant y Solomon, 2005](#)).

Los espectros mecánicos de las suspensiones tratadas térmicamente para un mismo contenido de proteína total (Figura 5.7) y los correspondientes a las muestras sometidas al proceso de congelación (Figuras 5.8 y 5.9), presentaron una descripción similar a los de las suspensiones sin tratamiento térmico. No obstante, se pudo observar una dependencia de G'' y de ω_c con los tratamientos realizados.

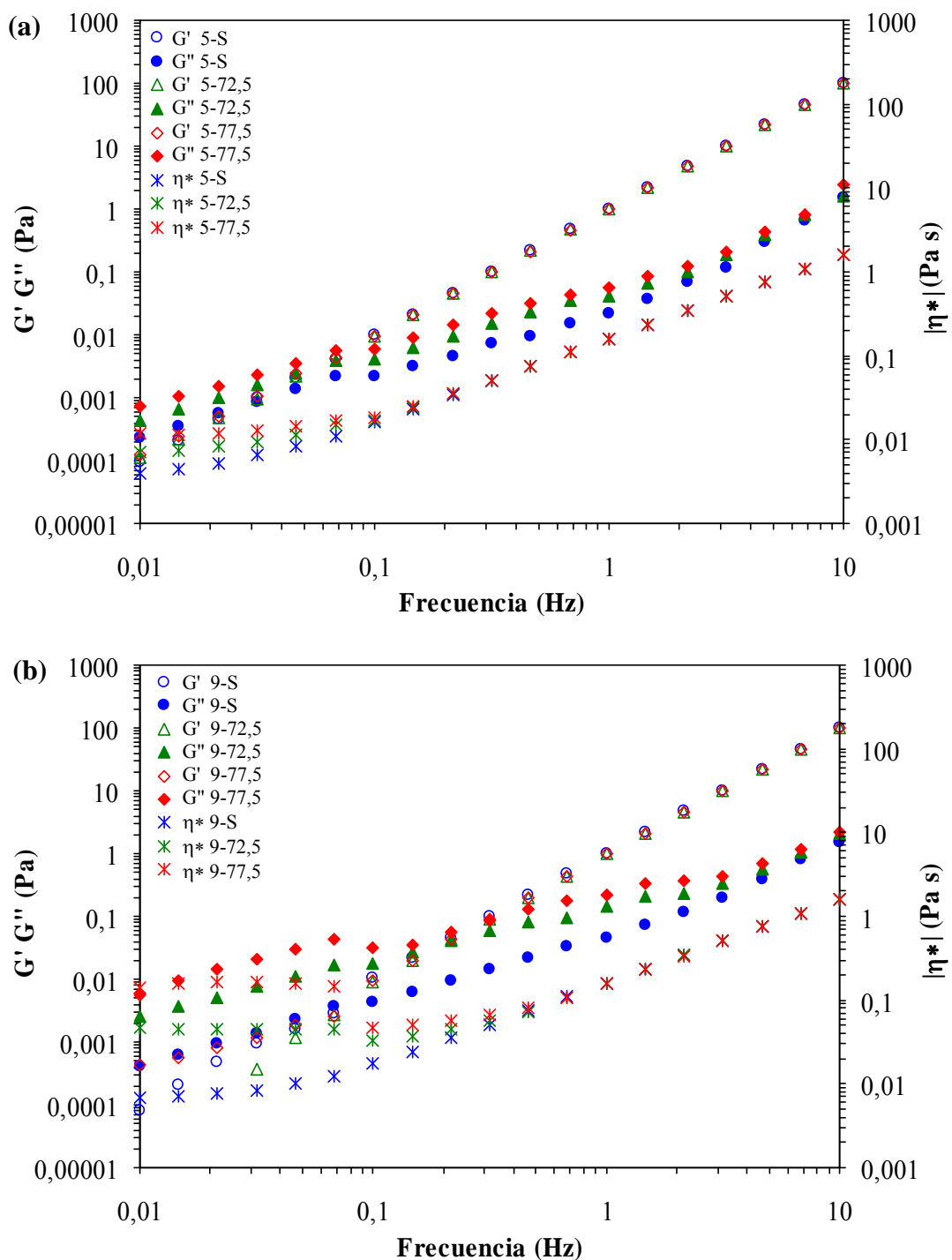


Figura 5.7. Espectro mecánico de suspensiones de WPC tratadas térmicamente (ST): (a) 5% p/v y (b) 9% p/v de proteína total. Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

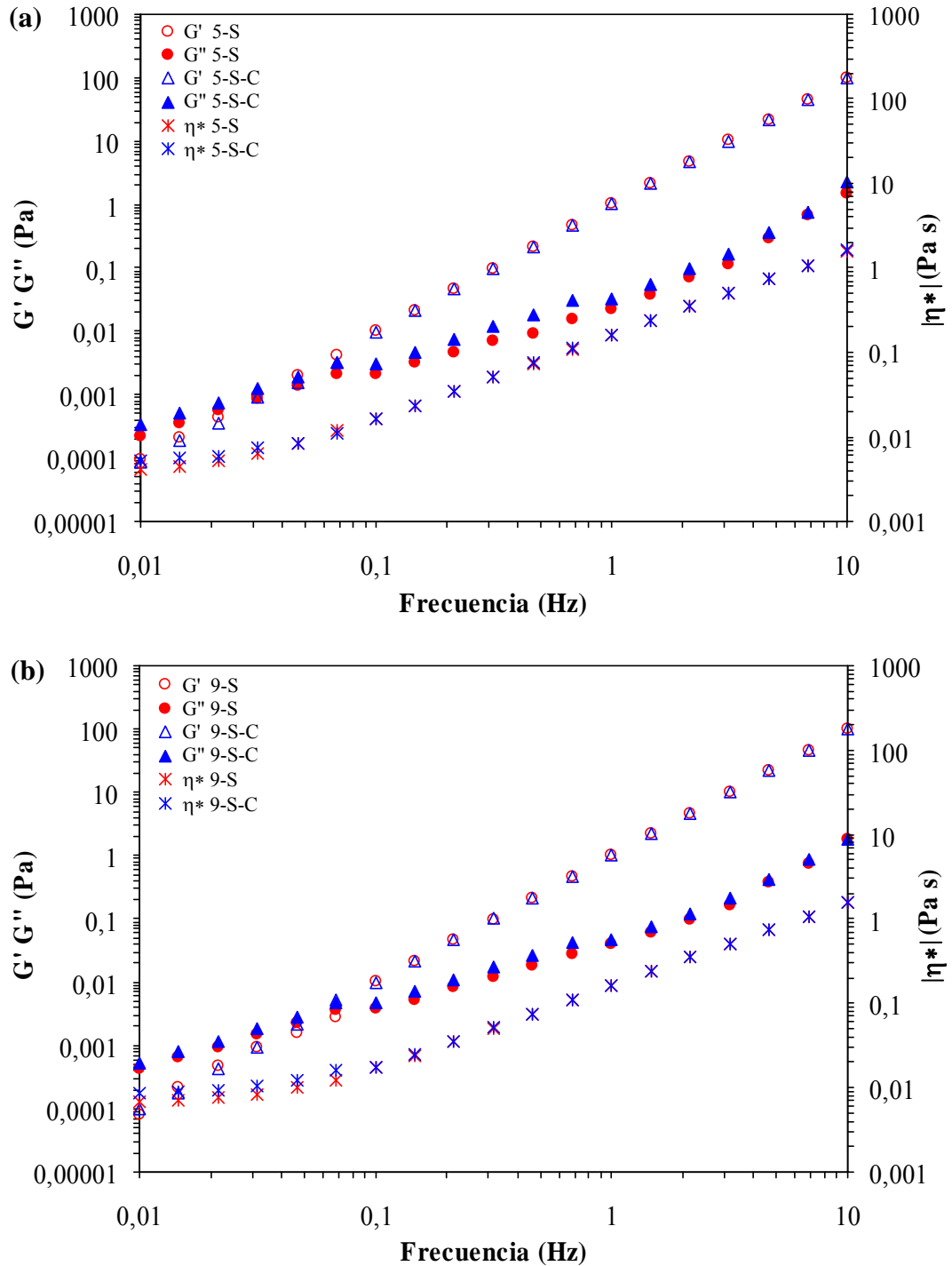


Figura 5.8. Espectros mecánicos de suspensiones de WPC sin tratamiento térmico y congeladas (S-C): (a) 5% p/v y (b) 9% p/v de proteína total. Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

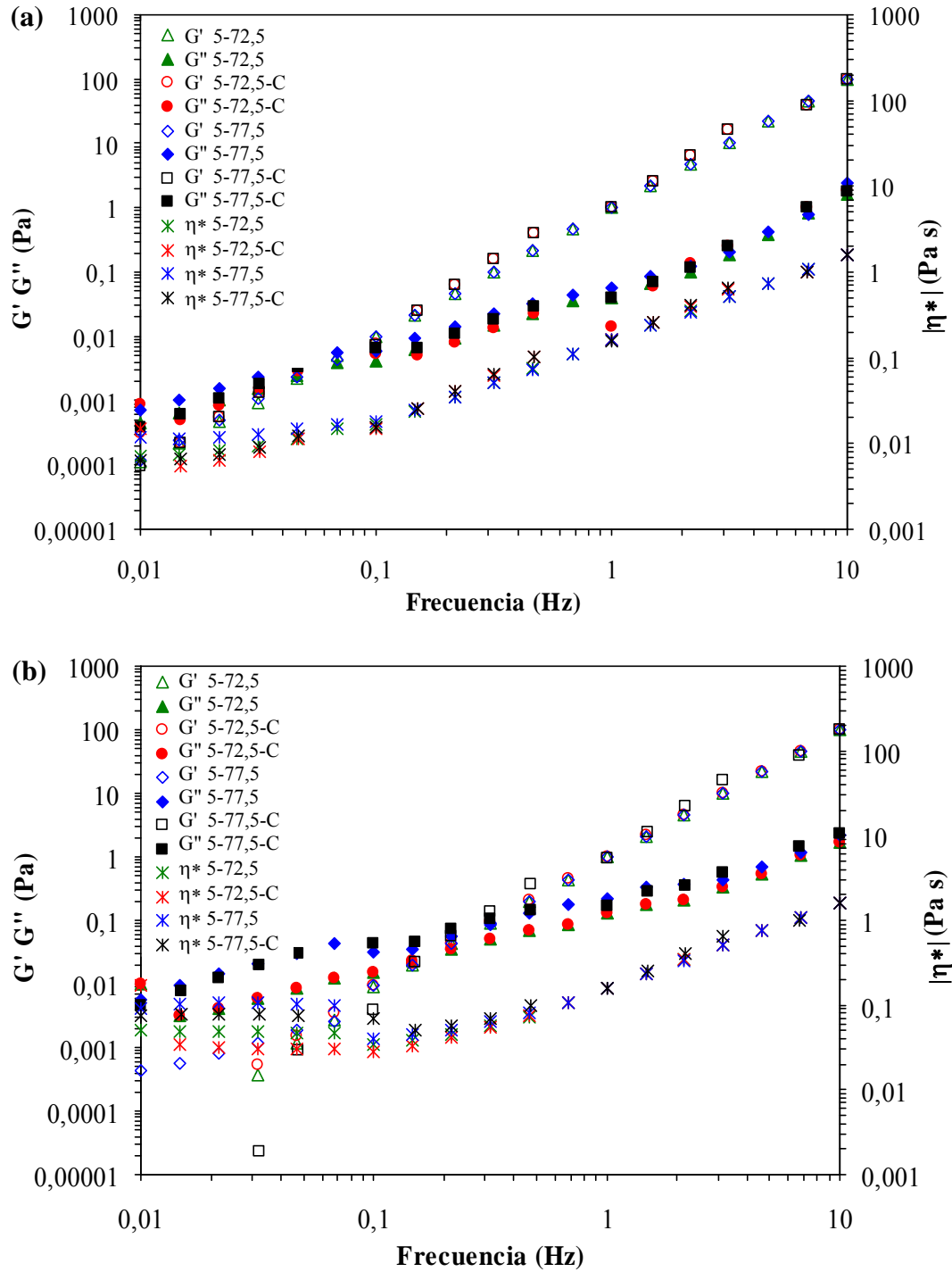


Figura 5.9. Espectros mecánicos de suspensiones de WPC tratadas térmicamente y congeladas (ST-C): (a) 5% p/v y (b) 9% p/v de proteína total. Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

Las variaciones de los valores de δ con la frecuencia de las suspensiones de WPC se encuentran graficadas en la Figura 5.10. En todas las muestras estudiadas, se observó que a bajas frecuencias los valores de δ fueron relativamente altos indicando que la componente viscosa dominó el comportamiento viscoelástico de las suspensiones. A medida que la frecuencia se incrementó, se observó una disminución en los valores de δ y a altas frecuencias dichos valores fueron muy bajos, indicando un dominio de la componente elástica.

Se observó que las suspensiones tratadas térmicamente presentaron valores de δ mayores a los de las suspensiones sin tratamiento térmico (Figura 5.10), indicando que los tratamientos térmicos produjeron un aumento en el comportamiento viscoso de las suspensiones de WPC. Además, en las suspensiones tratadas térmicamente con 9% p/v de PT, pudo visualizarse un comportamiento puramente viscoso donde los valores de δ fueron iguales o cercanos a 90° (Figura 5.10b).

En las muestras sometidas al proceso de congelación con el mismo contenido de proteína total y condiciones de tratamiento térmico, las variaciones más notorias en los valores de δ fueron observadas en las suspensiones con un 5% p/v de PT (Figura 5.10a). Las suspensiones sin tratamiento térmico y congeladas presentaron valores de δ mayores que el de las suspensiones sin tratamiento térmico. Por el contrario, los valores de δ fueron menores para las suspensiones tratadas térmicamente y congeladas en comparación a las suspensiones tratadas térmicamente.

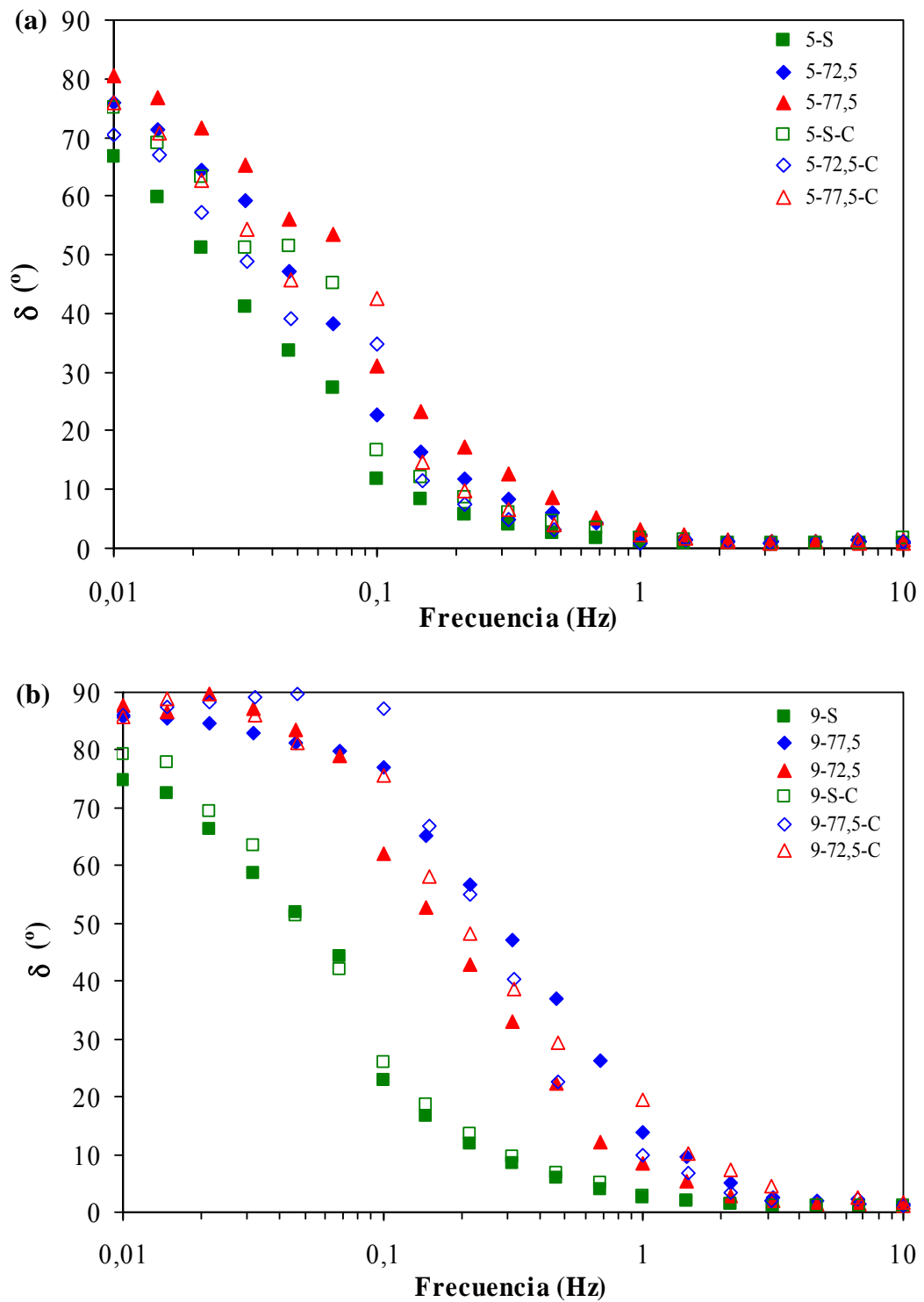


Figura 5.10. Dependencia del ángulo de fase (δ) con la frecuencia (ω) en suspensiones de WPC. (a) 5% p/v y (b) 9% p/v de proteína total. Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

5.1.2.3. Parámetros reológicos

Los valores de los parámetros reológicos derivados del modelo de Ley de Potencia para G' y G'' (Ecuación 3.25 y 3.26) se encuentran detallados en la Tabla 5.3. En todas las suspensiones de WPC analizadas, se observó que el exponente x fue significativamente mayor que y , indicando que G' se incrementa más rápidamente que G'' al aumentar la frecuencia. Es interesante destacar además que la magnitud de x es aproximadamente igual a 2 (Tabla 5.3), revelando un gran incremento de G' con la frecuencia.

Tabla 5.3. Parámetros reológicos obtenidos a partir del modelo de Ley de Potencia para los módulos elástico ($G'=a\omega^x$) y viscoso ($G''=b\omega^y$) de suspensiones de WPC.

Muestras	Módulo elástico (G')			Módulo viscoso (G'')		
	a [Pa s]*	x [-]*	R^2	b [Pa s]*	y [-]*	R^2
5-S	0,025±0,000 ^a	2,011±0,007 ^a	0,99	0,005±0,000 ^a	1,177±0,016 ^{ab}	0,98
9-S	0,024±0,000 ^a	2,019±0,007 ^a	0,99	0,008±0,000 ^a	1,119±0,008 ^c	0,99
5-72,5	0,025±0,001 ^a	2,005±0,009 ^a	0,99	0,008±0,002 ^a	1,106±0,007 ^c	0,99
9-72,5	0,019±0,000 ^a	2,114±0,008 ^a	0,99	0,033±0,002 ^b	0,872±0,021 ^e	0,99
5-77,5	0,026±0,000 ^a	1,987±0,003 ^a	0,99	0,011±0,000 ^a	1,054±0,006 ^d	0,99
9-77,5	0,041±0,009 ^b	1,786±0,093 ^b	0,99	0,066±0,009 ^c	0,728±0,039 ^f	0,96
5-S-C	0,024±0,000 ^a	2,041±0,007 ^{ac}	0,99	0,006±0,000 ^a	1,031±0,005 ^{dg}	0,99
9-S-C	0,025±0,000 ^a	2,014±0,005 ^a	0,99	0,009±0,001 ^a	1,000±0,007 ^g	0,99
5-72,5-C	0,023±0,000 ^a	2,033±0,003 ^{ac}	0,99	0,006±0,000 ^a	1,193±0,008 ^a	0,97
9-72,5-C	0,021±0,000 ^a	2,066±0,021 ^{ac}	0,99	0,026±0,001 ^b	0,924±0,003 ^h	0,99
5-77,5-C	0,023±0,000 ^a	2,028±0,001 ^a	0,99	0,008±0,000 ^a	1,140±0,009 ^{bc}	0,98
9-77,5-C	0,022±0,001 ^a	2,045±0,004 ^{ac}	0,99	0,054±0,002 ^d	0,803±0,011 ⁱ	0,98

* Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Debido a que $|\eta^*|=|G^*|/\omega$ y además $|G^*|=[(G'')^2+(G')^2]^{1/2}$, es posible que el comportamiento dilatante observado en la $|\eta^*|$ en todas las suspensiones de WPC discutido en la Sección 5.1.2.2 sea el resultado del gran incremento de G' con la frecuencia (Rao y Tattiyakul, 1999). Este comportamiento puede ser atribuido a la estructuración de los agregados solubles de proteína del suero durante los ensayos realizados en el reómetro bajo flujo de corte oscilatorio (Walkenström, y col., 1999).

En las suspensiones sin tratamiento térmico se analizó el efecto del contenido de proteína total sobre los valores de los parámetros reológicos hallados. Sólo se observaron diferencias significativas en los valores del exponente y del módulo G'' , resultando menores para las suspensiones con un 9% p/v de PT. Estos resultados son consistentes con los obtenidos durante el análisis cualitativo de los espectros mecánicos discutidos en la Sección 5.1.2.2, en donde se observó una escasa dependencia de G'' con el contenido de proteína total.

Analizando el efecto producido por los tratamientos térmicos en las suspensiones con un mismo contenido de proteína total, se observaron diferencias significativas en los valores de los parámetros a y x del módulo G' solamente en las suspensiones 9-77,5, en donde a fue mayor y x fue menor que los valores correspondientes a las suspensiones sin tratamiento térmico y a las 9-72,5. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en los valores del parámetro b del módulo G'' solamente en las suspensiones con 9% p/v de PT, en donde b se incrementó al aumentar la intensidad del tratamiento térmico. Por último, se observaron diferencias significativas en los valores de los exponentes y del módulo G'' en todas las suspensiones de WPC, en donde y disminuyó al aumentar la

intensidad del tratamiento térmico. Estos resultados demuestran que los tratamientos térmicos provocaron una disminución en los valores de los exponentes x e y , indicando una menor velocidad de variación tanto de G' como de G'' con la frecuencia. Dicho comportamiento puede deberse a un mayor grado de estructuración de las suspensiones tratadas térmicamente debido a la formación de agregados.

Analizando el efecto producido por el proceso de congelación para un mismo contenido de proteína total y similares condiciones de tratamiento térmico, se encontraron diferencias significativas en los valores de los parámetros a , x y b solamente en las suspensiones con un 9% p/v de PT tratadas en condiciones de intensidad de tratamiento térmico alta. En este caso, a fue menor, x fue mayor y b fue menor en las suspensiones 9-77,5-C en comparación con las suspensiones 9-77,5.

Además, las mayores diferencias encontradas fueron en los valores de los exponentes y . Por un lado, dicho exponente fue menor para las suspensiones sin tratamiento térmico y congeladas en comparación con las suspensiones sin tratamiento térmico. Este fenómeno puede deberse a la presencia de un mayor grado de estructuración en las suspensiones sin tratamiento térmico y congeladas. Durante el proceso de congelación, la crioconcentración de los solutos puede impactar significativamente en la estabilidad de las proteínas (Franks y Hatley, 1991). Además, el aumento en la concentración de las proteínas durante la congelación puede provocar la agregación de las mismas (Tolstoguzov y Braudo, 1983, Franks y Hatley, 1991).

Por otro lado, el exponente y fue mayor para las suspensiones tratadas térmicamente y congeladas en comparación con las suspensiones tratadas

térmicamente. Este fenómeno puede deberse a la presencia de un menor grado de estructuración de las suspensiones tratadas térmicamente y congeladas, posiblemente debido a que la formación de cristales de hielo pudo provocar la modificación o ruptura de la estructura de los agregados proteicos solubles.

5.1.2.4. Tiempos característicos de relajación

Los valores de los tiempos característicos de relajación (τ_c) de las suspensiones de WPC se encuentran detallados en la Tabla 5.4. En las suspensiones sin tratamiento térmico, analizando el efecto del contenido de proteína total, se observó que el valor de τ_c de las suspensiones con un 5% p/v de PT fue significativamente mayor que el de las suspensiones con un 9% p/v de PT. Este fenómeno indica que las muestras con menor contenido de proteína total poseen un menor rango de comportamiento viscoso en el espectro mecánico.

Las partículas coloidales cargadas en medio acuoso pueden organizarse formando un arreglo cristalino (Lindsay y Chaikin, 1982). Este sistema coloidal, denominado coloide cristalino, responde mecánicamente a pequeñas deformaciones oscilatorias como si fuese un sólido. El comportamiento reológico de las dispersiones de proteínas globulares es similar al comportamiento de los coloides cristalinos. Este fenómeno puede deberse a la existencia de fuerzas repulsivas de hidratación, donde las interacciones polares orientan a las moléculas de agua sobre la superficie de las proteínas generando repulsión entre las mismas. Estas fuerzas polares pueden ser

mayores a las fuerzas atractivas de van der Waals o las fuerzas repulsivas electrostáticas (Ikeda & Nishinari, 2001b).

Tabla 5.4. Tiempos característicos de relajación (τ_c) de suspensiones de WPC.

Muestras	τ_c [s]*
5-S	7,25±0,73 ^a
9-S	3,51±0,02 ^{bc}
5-72,5	3,68±0,29 ^b
9-72,5	0,64±0,04 ^d
5-77,5	2,43±0,08 ^e
9-77,5	0,63±0,05 ^d
5-S-C	3,94±0,02 ^b
9-S-C	2,83±0,04 ^{ce}
5-72,5-C	5,00±0,44 ^f
9-72,5-C	0,85±0,05 ^d
5-77,5-C	3,38±0,04 ^{bc}
9-77,5-C	0,48±0,02 ^d

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$).

Se ha observado que los coloides cristalinos no fluyen fácilmente a bajas concentraciones (Inoue y Matsumoto, 1996). En este estudio, los altos contenidos de PDA encontrados en las suspensiones sin tratamiento térmico (mayores a 40%) pueden estar relacionados con las elevadas temperaturas utilizadas en algunas etapas del proceso de elaboración del WPC (Puyol y col., 1999; de la Fuente y col., 2002a; de la Fuente y col., 2002b; Roufik y col., 2005). No obstante, es posible que las proteínas del suero nativas que pudieron quedar remanentes le hayan otorgado a las suspensiones de WPC algunas propiedades mecánicas características de los coloides cristalinos, como la dificultad para fluir a bajas concentraciones de proteína, que

estaría relacionada con los altos valores en los τ_c de las suspensiones con un 5% p/v de PT.

Analizando el efecto producido por los tratamientos térmicos en las suspensiones con un mismo contenido de proteína total, se observó que los valores de τ_c de las suspensiones tratadas térmicamente fueron significativamente menores a los τ_c de las suspensiones sin tratamiento térmico. Ikeda y Nishinari (2000) publicaron que la desnaturalización puede provocar la pérdida de las fuerzas repulsivas superficiales presentes en las dispersiones de proteínas globulares, como las fuerzas de hidratación, debido a la exposición de los sitios activos hidrofóbicos.

Además, se observó que sólo en las suspensiones tratadas térmicamente con un 5% p/v de PT los valores de τ_c disminuyeron significativamente cuando la intensidad del tratamiento térmico se incrementó. El comportamiento reológico está relacionado con el tamaño, la naturaleza y la cantidad de agregados proteicos presentes en el medio. Además, los agregados con mayor tamaño pueden incrementar la componente viscosa de las suspensiones. Kazmierski y Corredig (2003) publicaron que el tamaño de los agregados de proteínas del suero es más dependiente de la temperatura que del tiempo de tratamiento térmico y que los agregados que fueron formados a altas temperaturas poseen un mayor tamaño.

Analizando el efecto producido por el proceso de congelación para un mismo contenido de proteína total y similares condiciones de tratamiento térmico, se observaron diferencias significativas solamente en las suspensiones con un 5% p/v de PT. Por un lado, los valores de τ_c fueron significativamente menores en las suspensiones 5-S-C en comparación con las suspensiones 5-S. Por otro lado, los

valores de τ_c fueron significativamente mayores para las suspensiones 5-72,5-C y 5-77,5-C en comparación con las suspensiones 5-72,5 y 5-77,5. Estos resultados concuerdan con los discutidos en la Sección 5.1.2.3, donde se explicó que la crioconcentración pudo provocar la agregación de las proteínas o la modificación y ruptura de la estructura de los agregados solubles presentes en las suspensiones aumentando o disminuyendo las repulsiones entre los mismos.

Además, cabe destacar que únicamente se han observado variaciones en los valores de τ_c de las suspensiones con un 5% p/v de PT. Las proteínas del suero tienen la capacidad de ligar moléculas de agua por medio de puentes hidrógeno. Cuando se incrementa la concentración de proteína en la solución, el agua intersticial se encuentra menos disponible para la congelación. La estabilidad de los sistemas acuosos alimentarios congelados, como por ejemplo el suero, depende del estado físico de sus componentes y de la proporción de cada uno de ellos en la solución inicial ([Aider y col., 2007](#)). A su vez, el estado físico de los componentes depende de la composición relativa de cada uno de ellos, de la temperatura y del contenido de agua. Se ha observado que la estabilidad de las proteínas en medio acuoso se incrementa con el incremento en la concentración debido al efecto de auto-estabilización. Dicho fenómeno se ha observado en dispersiones de varias enzimas y de β -lactoglobulina ([Pikal-Cleland y col., 2000](#); [Xiaolin y Pikal, 2005](#)).

5.2. Efecto del proceso de congelación sobre las propiedades fisicoquímicas y reológicas de queso blando magro elaborado con proteínas del suero

5.2.1. Propiedades fisicoquímicas

5.2.1.1. Contenido de humedad

Los contenidos de humedad durante la maduración de los quesos refrigerados (QR) y congelados (QC) se encuentran graficados en la Figura 5.11. El contenido de humedad inicial de los quesos QR y QC fue de $52,80 \pm 0,46$ y $53,49 \pm 2,06\%$, respectivamente. Otros autores también obtuvieron valores de contenidos de humedad elevados cercanos al 50% en varios tipos de quesos magros elaborados con imitadores de grasa a base de proteínas del suero (McMahon y col., 1996; Romeih y col., 2002; Koca y Metin, 2004; Sahan y col., 2008).

Los imitadores de grasa se caracterizan por su alta capacidad de retención de agua, condición que puede explicar el alto contenido de humedad hallado en los quesos que contienen dichos ingredientes (Romeih y col., 2002). Además, un alto contenido de humedad es indicativo de un retardo en la sinéresis de la cuajada durante el proceso de elaboración de quesos. McMahon y col. (1996) han sugerido que los aditivos imitadores de grasa interfieren en la retracción de la red de caseína, disminuyendo la fuerza impulsora que permite liberar el agua de las partículas de la cuajada y retardando de esta forma la sinéresis.

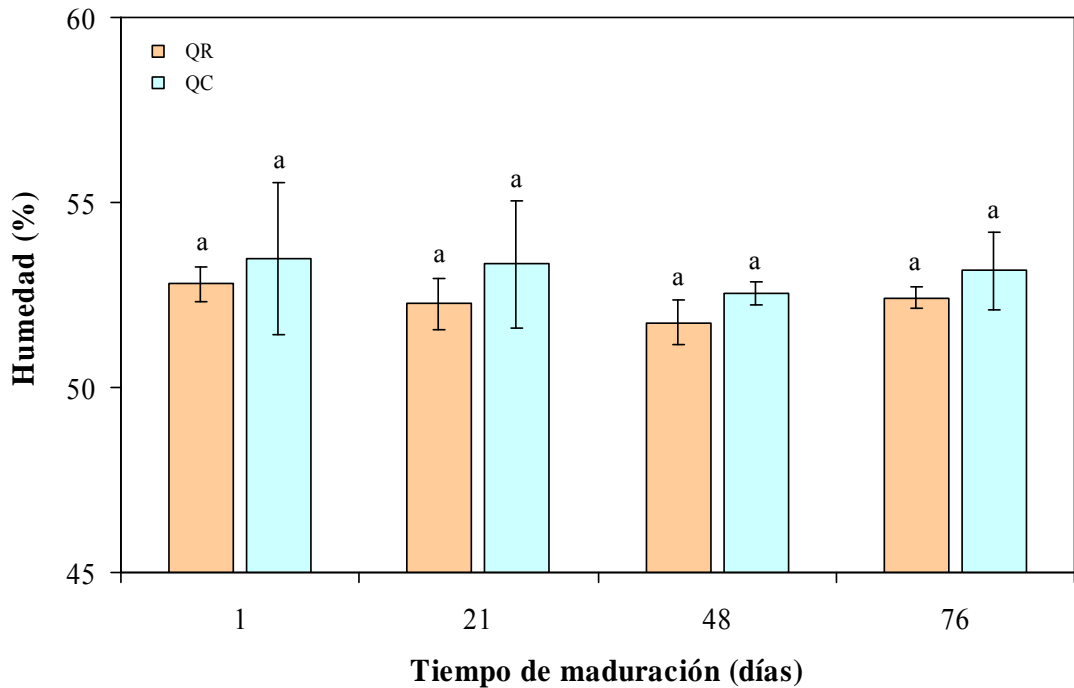


Figura 5.11. Variación del contenido de humedad durante la maduración de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero. Las barras de error representan los desvíos estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Durante el período de maduración estudiado, no se observaron diferencias significativas en el contenido de humedad de los quesos QR y QC. Durante el salado de los quesos por inmersión, se genera un gradiente de humedad y de sal desde la superficie hasta el centro del queso (Luna y Chavez, 1992). Luego, durante la maduración se produce una pérdida de humedad debido a la deshidratación del queso y una redistribución de sal hasta llegar a una concentración uniforme de sal en todo el producto (Zorrilla y Rubiolo, 1998). No obstante, los resultados hallados en el presente trabajo podrían deberse a que los quesos fueron envasados al vacío en bolsas plásticas. Similares resultados fueron encontrados por Bertola y col. (1999), quienes publicaron que el contenido de humedad de quesos Port Salut, Tybo y Mozzarella envasados en bolsas plásticas no varió durante la maduración. Además,

Verdini y Rubiolo (2002) hallaron que el contenido de humedad de las zonas interna y central de quesos Port Salut Argentino envasados en bolsas plásticas no sufrió cambios durante el período de maduración estudiado.

Analizando el efecto del proceso de congelación, no se observaron diferencias significativas entre los valores de contenido de humedad de los quesos QR y QC durante todo el período de maduración estudiado.

5.2.1.2. Valores de pH

Los valores de pH durante la maduración de los quesos QR y QC se encuentran graficados en la Figura 5.12. El pH inicial de los quesos QR y QC fue de $5,27 \pm 0,03$ y $5,28 \pm 0,02$, respectivamente.

Durante el período de maduración estudiado de los quesos QR, se observó una disminución significativa del valor de pH entre los días 1 y 48. Por un lado, las bacterias lácticas fermentan la lactosa residual formando ácidos orgánicos de cadena corta solubles en agua que, por disociación, liberan H^+ y aniones al medio causando una disminución en el pH. Por otro lado, la producción de ácidos permite la inmediata solubilización del calcio y del fosfato que se encuentran atrapados en la red de para-caseína. De esta forma, estos compuestos solubilizados pueden actuar como buffer impidiendo la disminución del pH durante el resto del período de maduración estudiado (Upreti y Metzger, 2007).

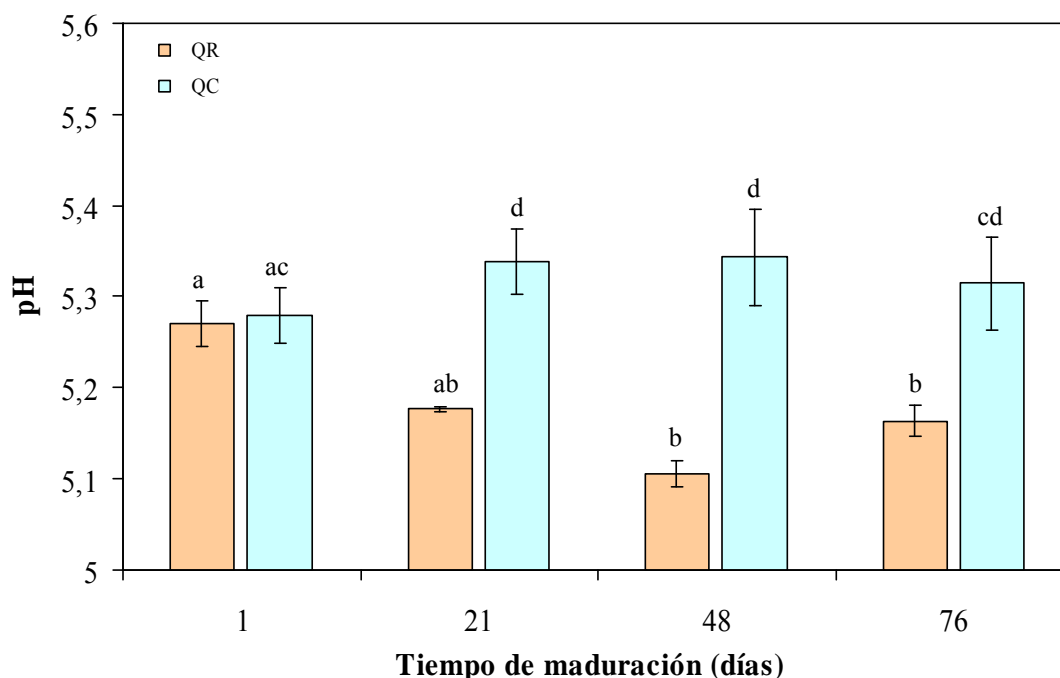


Figura 5.12. Variación del pH durante la maduración de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero. Las barras de error representan los desvíos estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Durante el período de maduración estudiado de los quesos QC, se observó un aumento significativo del valor de pH entre los días 1 y 21. El incremento del pH del queso durante la maduración puede estar asociado a un incremento gradual en la hidratación de la para-caseína y a un aumento en la disponibilidad de varios residuos de proteína (grupos ϵ y α -carboxilos de los ácidos aspártico y glutámico) que, al combinarse con los H^+ presentes en el medio, pueden reducir la actividad del ión hidrógeno en la fase acuosa del queso durante el almacenamiento (Guinee y col., 2002). El incremento en la hidratación de la para-caseína puede estar asociado a cambios en el equilibrio entre las concentraciones de fosfato cálcico soluble y coloidal (Guo y col., 1997) y a la migración de sal desde la fase acuosa hacia la fase proteica del queso (Cervantes y col., 1983; Guinee, 2004). Por un lado, durante el

proceso de congelación se produce el fenómeno de crioconcentración en donde los solutos de la fase acuosa (sales, azúcares, ácidos, etc.) son desplazados del frente de hielo móvil, formando regiones de mayor concentración de solutos localizadas frente a la interfase móvil y entre los cristales de hielo. Este proceso pudo producir la migración de sal desde la fase acuosa no congelada hacia la fase proteica. Por otro lado, el proceso de congelación pudo haber generado daño celular en las bacterias lácticas, disminuyendo la producción de ácidos orgánicos que impidió el descenso del pH durante la maduración de los quesos QC.

Analizando el efecto del proceso de congelación sobre los valores de pH, se observaron diferencias significativas entre los días 21 y 76 de maduración. En este caso, los quesos QC presentaron valores significativamente mayores de pH en comparación a los quesos QR.

5.2.1.3. Concentración de sal

Las concentraciones de sal de los quesos QR y QC durante la maduración se encuentran graficados en la Figura 5.13. La concentración de sal inicial para los quesos QR y QC fue de $0,41 \pm 0,00$ y $0,44 \pm 0,01\%$, respectivamente.

Durante el período de maduración estudiado de los quesos QR y QC, se observó un aumento significativo en la concentración de sal entre los días 1 y 21. Este fenómeno indica que se logró la redistribución de sal, llegando a una concentración uniforme en todo el queso de aproximadamente 0,72%.

Además, analizando el efecto del proceso de congelación sobre la concentración de sal, no se observaron diferencias significativas entre los quesos QR y QC durante todo el período de maduración estudiado.

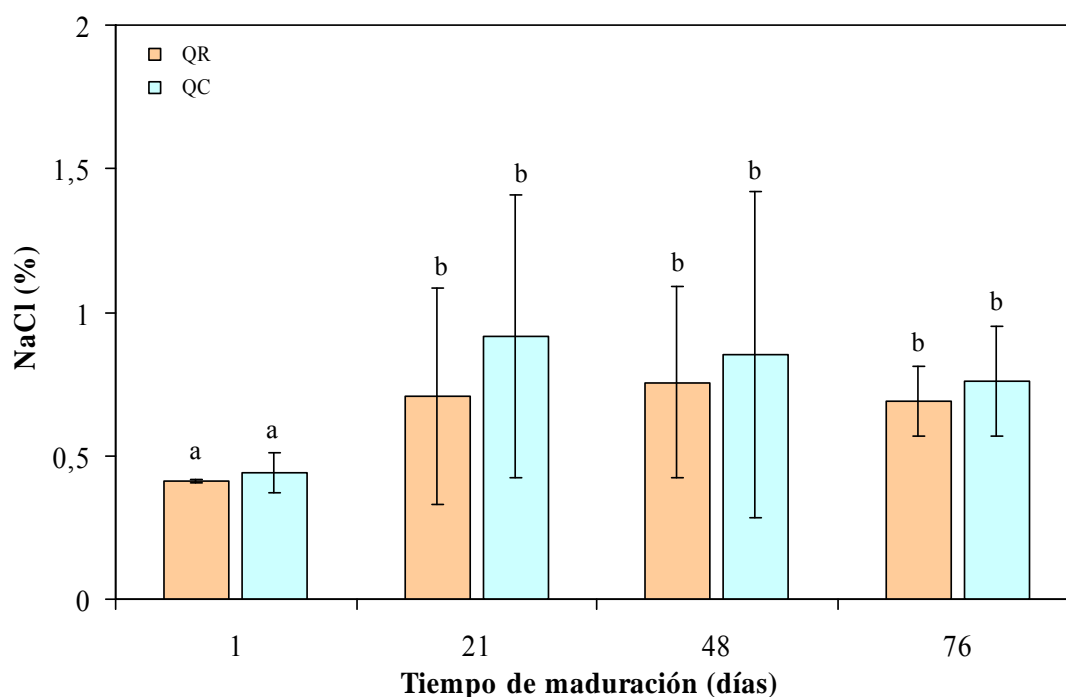


Figura 5.13. Variación de la concentración de sal (NaCl) durante la maduración de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero. Las barras de error representan los desvíos estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.2.1.4. Proteína total

Los contenidos de proteína total durante la maduración de los quesos QR y QC se encuentran graficados en la Figura 5.14. El contenido de proteína total inicial para los quesos QR y QC fue de $33,58 \pm 0,01$ y $32,87 \pm 0,70\%$, respectivamente. Otros autores han publicado también altos valores de contenido de proteína total en varios

tipos de quesos magros elaborados con imitadores de grasa a base de proteínas del suero (Koca y Metin, 2004; Haque y col., 2007; Sahan y col., 2008).

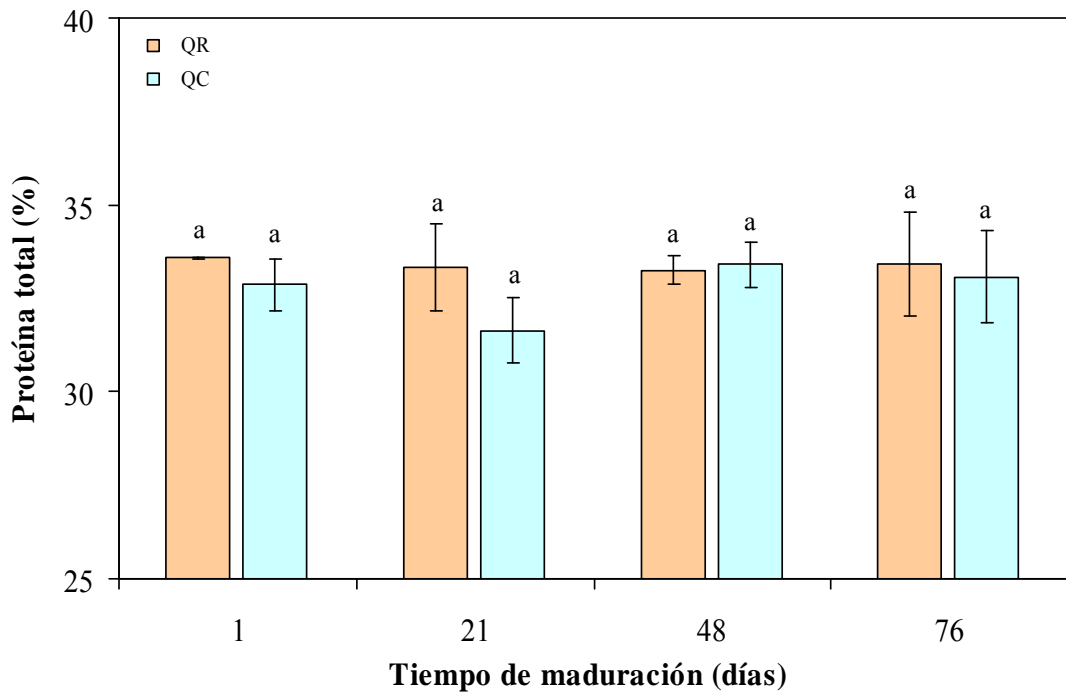


Figura 5.14. Variación del contenido de proteína total durante la maduración de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero. Las barras de error representan los desvíos estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Durante el período de maduración estudiado, no se observaron diferencias significativas en el contenido de proteína total de los quesos QR y QC.

Además, analizando el efecto del proceso de congelación sobre el contenido de proteína total, no se observaron diferencias significativas entre los quesos QR y QC durante todo el período de maduración estudiado.

5.2.1.5. Índice de maduración

Los valores de índice de maduración (IM) durante la maduración de los quesos QR y QC se encuentran graficados en la Figura 5.15. El IM inicial para los quesos QR y QC fue de $3,60 \pm 0,67$ y $4,09 \pm 0,66\%$, respectivamente.

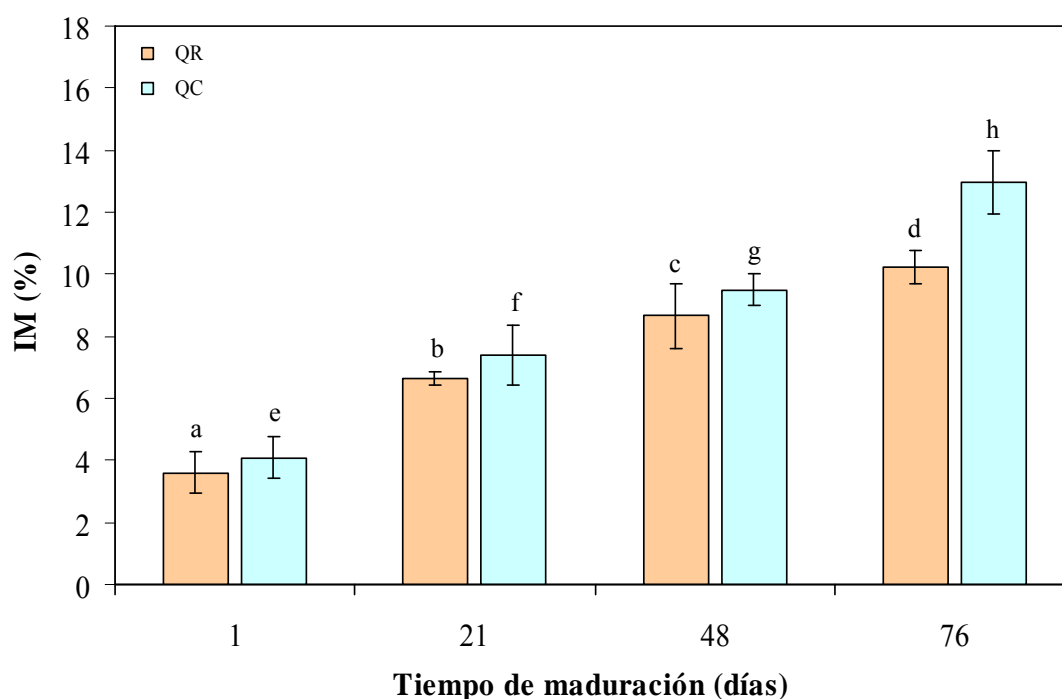


Figura 5.15. Variación del índice de maduración (IM) durante la maduración de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero. Las barras de error representan los desvíos estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Durante el período de maduración estudiado de los quesos QR y QC, se observó un aumento significativo en los valores de IM entre los días 1 y 76. El IM es utilizado como un índice de la proteólisis primaria en los quesos, durante la cual se lleva a cabo la hidrólisis de las caseínas por parte de la quimosina residual,

resultando en la formación de péptidos de tamaños intermedios y grandes (Fox y McSweeney, 1996).

Analizando el efecto del proceso de congelación sobre los valores de IM, se observaron diferencias significativas entre los quesos QR y QC durante todo el período de maduración estudiado. En este caso, los quesos QC presentaron valores significativamente mayores de IM en comparación a los quesos QR. Durante el proceso de congelación, la deshidratación de las proteínas puede causar la ruptura de la estructura proteica y la formación de hielo puede causar el daño celular de las bacterias, generando la liberación de enzimas proteolíticas al medio (Verdini y Rubiolo 2002, Gravier y col., 2004). Además, la matriz del queso que fue dañada por la congelación puede ser más susceptible a la proteólisis (Bertola y col., 1996).

Los valores de IM obtenidos durante el período de maduración estudiado para un queso blando magro elaborado con proteínas del suero fueron relativamente bajos. Se ha observado una disminución en la velocidad de hidrólisis de las caseínas en quesos elaborados con proteínas del suero (Lelièvre, 1995; Benfeldt y col., 1998). Sahan y col. (2008) encontraron valores de IM menores para quesos Kashar bajos en grasa elaborados con Simplese[®] en comparación con quesos Kashar tradicionales. Este fenómeno podría deberse a la presencia de inhibidores de proteasas en los quesos. Los mismos normalmente residen en el suero, pero pueden ser incorporados a la cuajada por medio de la adición de proteínas del suero desnaturalizadas a la leche que se utilizará en la elaboración del queso (Lelièvre, 1995; Benfeldt y col., 1998).

Además, durante la producción de quesos magros, en la etapa de desuerado se obtienen valores de pH del suero elevados y se utilizan bajas temperaturas de cocción. Estas condiciones favorecen la reducción en la retención de quimosina en el queso y producen una disminución en la actividad de la plasmina. Estos fenómenos explicarían el menor grado de proteólisis observado durante la maduración de quesos bajos en grasa (Mistry, 2001). Fenelon y Guinee (2000), quienes estudiaron la proteólisis primaria durante la maduración de quesos Cheddar elaborados con diferentes contenidos de grasa, observaron una menor velocidad de degradación de la α_{S1} -caseína al disminuir el contenido de grasa en los quesos. Estos resultados se correlacionaron con una disminución en la actividad de la quimosina residual.

5.2.2. Propiedades reológicas

5.2.2.1. Región de viscoelasticidad lineal

Los valores de módulo complejo ($|G^*|$) y la deformación (γ) de los quesos QR y QC en función de la tensión aplicada a una frecuencia de 10 Hz se encuentran graficados en la Figura 5.16. Se observó que los valores de $|G^*|$ a cualquier día de maduración no fueron afectados por la magnitud de la tensión, encontrándose una relación lineal entre la tensión aplicada y la deformación medida. Estos resultados indican que tanto los quesos QR como los quesos QC se comportan como un material linealmente viscoelástico durante los ensayos oscilatorios realizados a valores de tensión menores a 630 Pa.

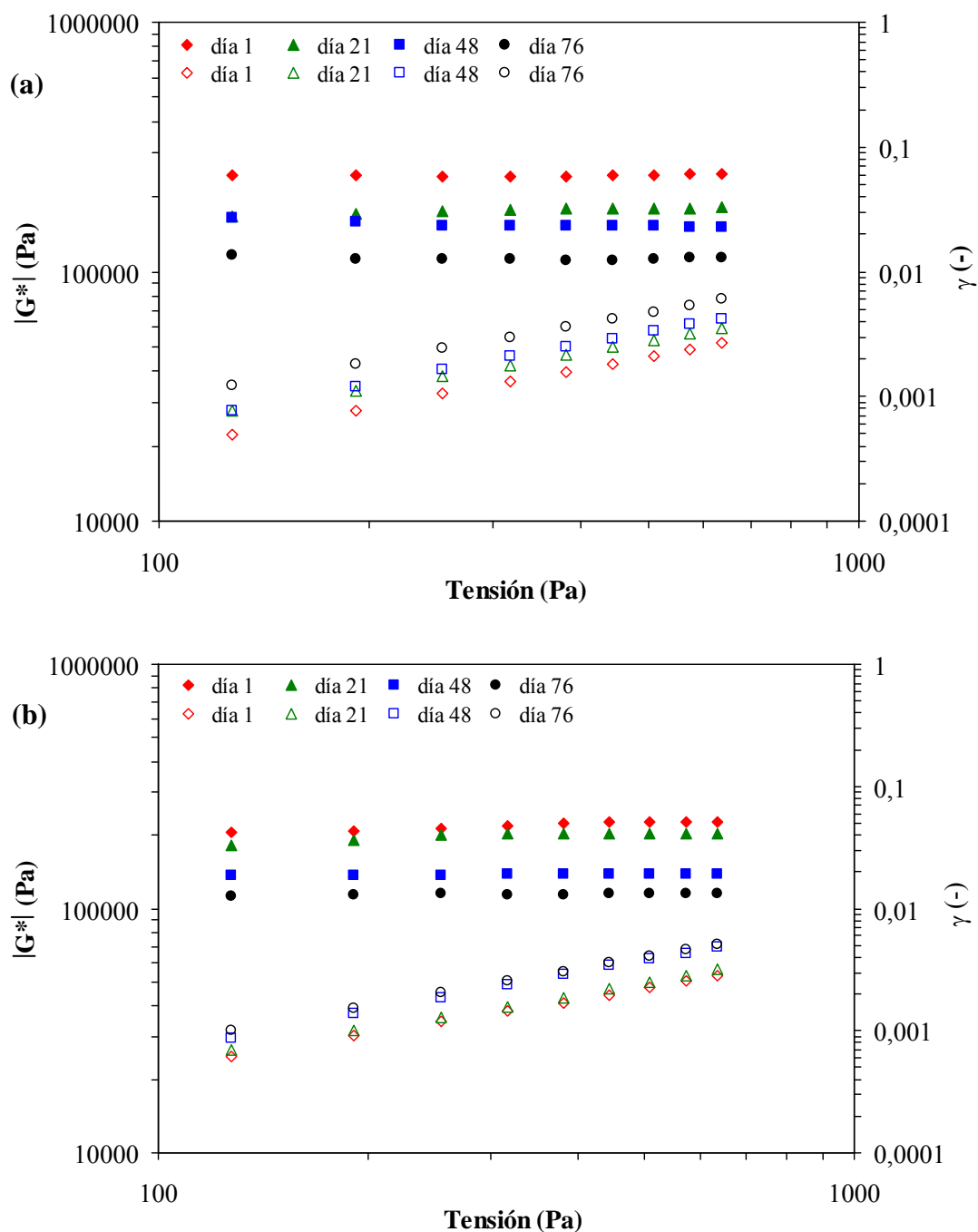


Figura 5.16. Valores de módulo complejo ($|G^*|$) y deformación (γ) en función de la tensión aplicada de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero: (a) Quesos refrigerados (QR) y (b) quesos congelados (QC). Los símbolos llenos representan a $|G^*|$ y los símbolos vacíos representan a γ . Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

5.2.2.2. Análisis descriptivo de los espectros mecánicos

Los espectros mecánicos de los quesos QR se encuentran graficados en la Figura 5.17a. En todo el rango de frecuencias estudiado, se observó que G' fue mayor a G'' evidenciando un comportamiento predominantemente sólido a cualquier día de maduración. De acuerdo con [Steffe \(1996\)](#), esta descripción del espectro mecánico es característica de los sólidos viscoelásticos. Similares resultados fueron observados por [Ma y col. \(1997\)](#) en un queso Cheddar magro elaborado con Dairy-LoTM y por otros autores en varios tipos de quesos bajos en grasa ([Subramanian y Gunasekaran, 1997b](#)). Además, se observó que ambos módulos disminuyen al aumentar el tiempo de maduración (Figura 5.17a).

Los espectros mecánicos de los quesos QC (Figura 5.17b) presentaron una descripción similar al de los quesos QR.

Los valores de $\tan(\delta)$ en función de la frecuencia para los quesos QR y QC se encuentran graficados en la Figura 5.18. Si bien la $\tan(\delta)$ es un valor adimensional que compara la cantidad de energía perdida por ciclo de deformación durante un ensayo oscilatorio ([Ferry, 1970](#)), dicho parámetro fue utilizado para indicar la relación entre el comportamiento viscoso y el grado de proteólisis ([Gravier y col., 2004](#)). Valores de $\tan(\delta)$ menores a 1 evidencian un comportamiento predominantemente sólido y valores mayores a 1 indican un comportamiento predominantemente viscoso.

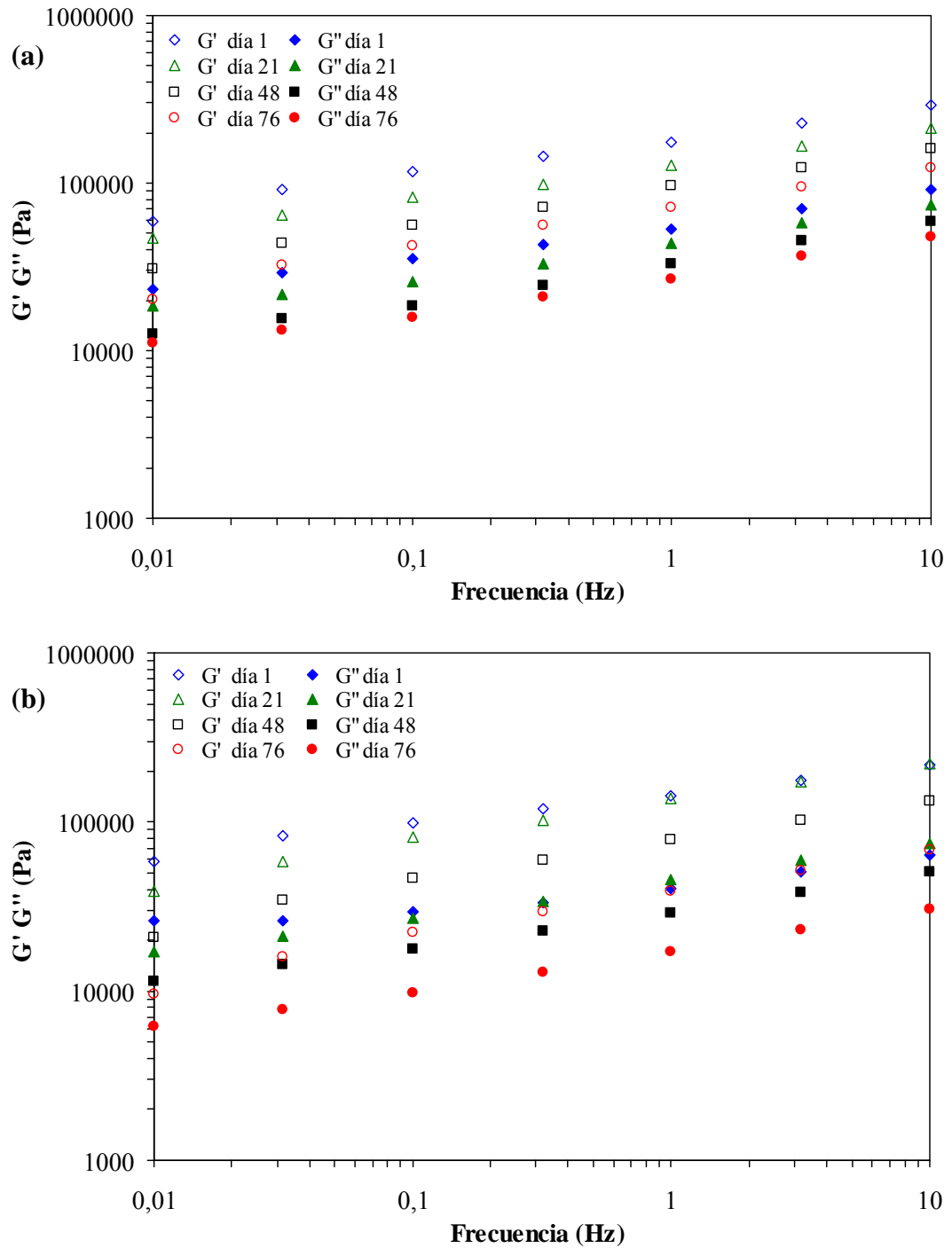


Figura 5.17. Espectros mecánicos de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero: (a) quesos refrigerados (QR) y (b) quesos congelados (QC). Los símbolos llenos representan a G' y los símbolos vacíos representan a G'' . Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

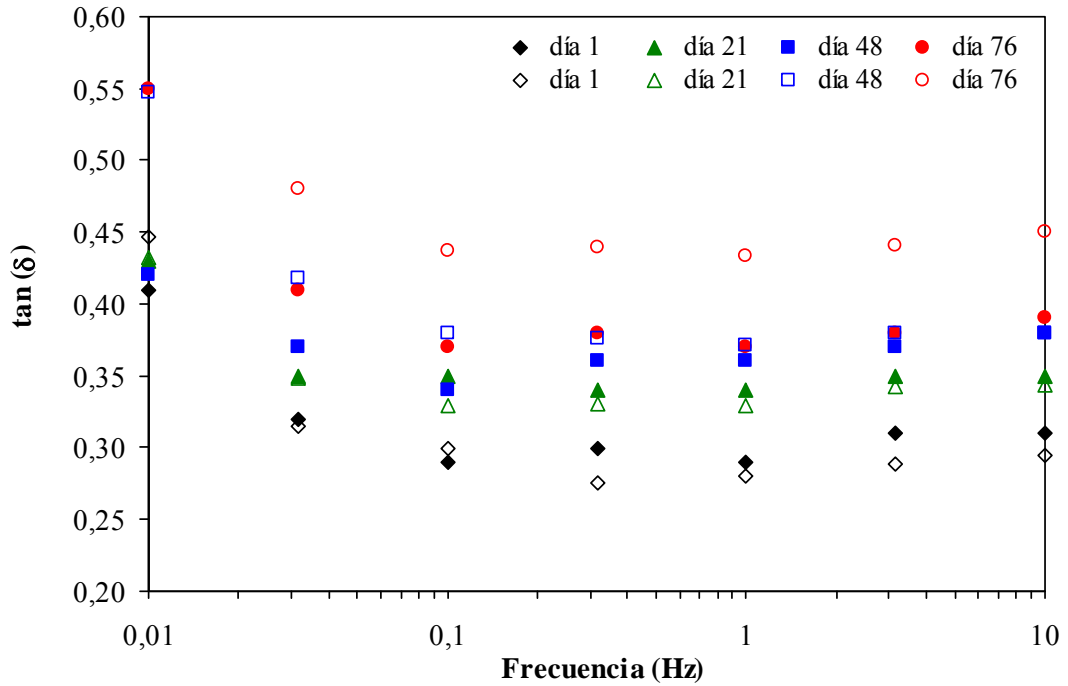


Figura 5.18. Dependencia de la $\tan(\delta)$ con la frecuencia en un queso blando magro elaborado con proteínas del suero. Los símbolos llenos representan a los quesos refrigerados (QR) y los símbolos vacíos representan a los quesos congelados (QC). Cada curva corresponde a una de tres mediciones.

Los cambios observados en los valores de la $\tan(\delta)$ fueron similares tanto para los quesos QR como para los quesos QC. A todas las frecuencias, los valores de $\tan(\delta)$ estuvieron entre 0,28 y 0,65, indicando que las propiedades elásticas predominan a cualquier día de maduración.

Además, durante el período de maduración estudiado se observó que los valores de $\tan(\delta)$ de los quesos QR y QC se incrementaron. Este comportamiento indica un incremento en las propiedades viscosas de los quesos. Por otro lado, en los días 48 y 76 de maduración, los quesos QC presentaron valores de $\tan(\delta)$ mayores a los de los quesos QR indicando que el proceso de congelación produjo un aumento en el comportamiento viscoso de los quesos.

5.2.2.3. Parámetros reológicos

Los valores de los parámetros reológicos derivados del modelo de Ley de Potencia para G' y G'' (Ecuaciones 3.25 y 3.26) correspondientes a los quesos QR y QC se encuentran expresados en las Tabla 5.5 y 5.6.

Durante el período de maduración estudiado de los quesos QR y QC, se observó una tendencia decreciente en los parámetros a del módulo G' y b del módulo G'' , encontrándose diferencias significativas entre los valores de a de los días 1 y 48 de maduración y entre los valores de b de los días 21 y 76.

Como se explicó en la Sección 3.3 del Capítulo 3, los parámetros a y b representan las magnitudes de G' y G'' respectivamente a una dada frecuencia (1 rad/s). La disminución en los valores de a observados durante el período de maduración estudiado podría deberse a la pérdida de estructura de las proteínas, ya que los productos provenientes de la proteólisis son solubles en agua y no contribuyen a la formación de la red de caseína (Ustunol y col., 1995). Además, la disminución observada en los valores de b puede ser atribuida a la producción de grupos iónicos que poseen la capacidad de ligar agua, reduciendo la disipación viscosa durante la maduración (Creamer y Olson, 1982; Ak y Gunasekaran, 1996, Dave y col., 2003).

Por otro lado, se observó un incremento significativo en los valores de los exponentes x e y entre los días 1 y 21 de maduración. Estas observaciones demuestran que tanto G' como G'' presentaron una mayor velocidad de variación con

la frecuencia durante la maduración, indicando que disminuyó el grado de estructuración de la red de caseína (Gravier y col., 2004).

Tabla 5.5. Parámetros reológicos obtenidos a partir del modelo de Ley de Potencia para el módulo elástico ($G' = a\omega^x$) de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero.

Quesos	Tiempo de maduración [días]	a [Pa s]*	x [-]*	R^2
QR	1	121,1±5,2 ^a	0,217±0,001 ^a	0,99
	21	79,2±16,1 ^b	0,231±0,011 ^b	0,99
	48	72,1±10,6 ^{bc}	0,236±0,008 ^b	0,99
	76	43,9±4,5 ^c	0,248±0,017 ^b	0,99
QC	1	85,5±21,7 ^d	0,196±0,019 ^a	0,99
	21	77,1±21,2 ^e	0,245±0,015 ^b	0,99
	48	53,8±11,9 ^{ef}	0,252±0,020 ^b	0,99
	76	38,4±13,5 ^g	0,275±0,013 ^b	0,99

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 5.6. Parámetros reológicos obtenidos a partir del modelo de Ley de Potencia para el módulo viscoso ($G'' = b\omega^y$) de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero.

Quesos	Tiempo de maduración [días]	b [Pa s]*	y [-]*	R^2
QR	1	39,5±1,5 ^a	0,185±0,002 ^a	0,99
	21	28,8±5,5 ^a	0,210±0,011 ^b	0,99
	48	25,6±3,5 ^{ab}	0,233±0,008 ^b	0,99
	76	17,7±1,5 ^b	0,215±0,011 ^b	0,99
QC	1	29,5±4,7 ^a	0,161±0,019 ^a	0,98
	21	29,5±10,4 ^a	0,221±0,015 ^b	0,98
	48	26,5±7,5 ^{ab}	0,223±0,009 ^b	0,99
	76	18,3±5,9 ^b	0,243±0,005 ^b	0,99

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Analizando el efecto del proceso de congelación sobre los parámetros reológicos, solamente se observaron diferencias significativas en los valores del parámetro a . En este caso, los quesos QC presentaron valores de a significativamente menores en comparación a los de los quesos QR durante todo el período de maduración estudiado. Estos resultados indican que únicamente G' fue afectado por el proceso de congelación, posiblemente debido a la deshidratación local de las proteínas que provoca la ruptura de la estructura del queso luego de la descongelación (Diefes y col., 1993).

Debido a que el proceso de congelación afectó significativamente solo al parámetro a , se eligió estudiar el decaimiento del mismo durante la maduración.

5.2.2.4. Cinética de decaimiento del parámetro reológico a

La cinética de decaimiento del parámetro reológico a , modelada asumiendo una cinética de primer orden (Ecuación 4.3), se encuentra graficada en la Figura 5.19.

Los valores de las constantes cinéticas de decaimiento para los quesos QR y QC fueron $0,012 \pm 0,001$ y $0,011 \pm 0,009 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, no observándose diferencias significativas entre ambos valores. De acuerdo a lo discutido en la Sección 5.2.2.3, los valores del parámetro reológico a de los quesos QC fueron significativamente menores que los de los quesos QR. No obstante, los resultados obtenidos evidencian que los mismos disminuyen con la misma velocidad durante el período de maduración estudiado.

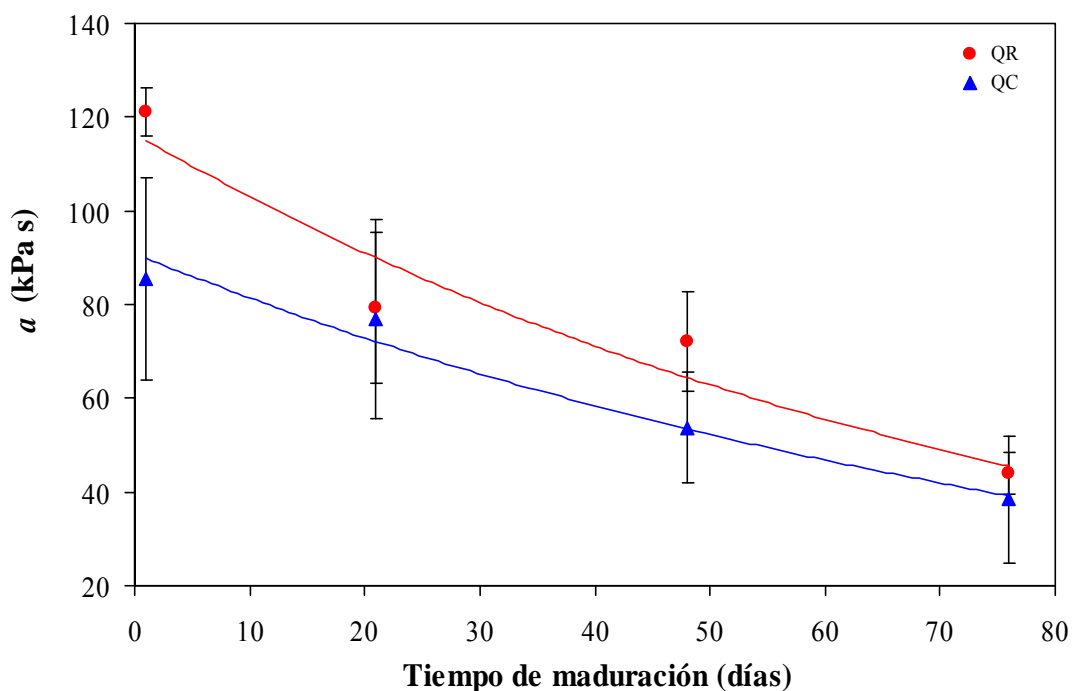


Figura 5.19. Decaimiento del parámetro reológico a obtenido a partir del modelo de Ley de Potencia en función del tiempo de maduración de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero. Los símbolos representan a los valores experimentales, las barras de error indican los desvíos estándar y las líneas representan el modelo ajustado.

5.2.3. Correlaciones entre propiedades fisicoquímicas y el parámetro reológico a

Las ecuaciones que correlacionan las propiedades fisicoquímicas con el parámetro reológico a se encuentran detalladas en la Tabla 5.7. Para la realización de las correlaciones, se eligieron los parámetros fisicoquímicos que presentaron diferencias significativas durante la maduración y por efecto del proceso de congelación.

Tabla 5.7. Correlaciones entre propiedades fisicoquímicas y el parámetro reológico a de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero.

Quesos	Ecuación de regresión	R ²
QR	$a = -1471,85 + 299,31 \cdot \text{pH}$	0,50
	$a = 154,58 - 117,818 \cdot \text{NaCl}$	0,42
	$a = 153,48 - 10,22 \cdot \text{IM}$	0,81
	$a = -1005,74 + 215,36 \cdot \text{pH} - 48,5 \cdot \text{NaCl}$	0,53
	$a = -156,66 + 58,30 \cdot \text{pH} - 9,11 \cdot \text{IM}$	0,82
	$a = -311,24 + 26,62 \cdot \text{NaCl} + 85,82 \cdot \text{pH} - 9,81 \cdot \text{IM}$	0,83
QC	$a = 1179,92 + 209,72 \cdot \text{pH}$	0,06
	$a = 81,76 - 24,44 \cdot \text{NaCl}$	0,05
	$a = 113,41 - 5,86 \cdot \text{IM}$	0,67
	$a = 778,17 - 132,27 \cdot \text{pH} - 14,18 \cdot \text{NaCl}$	0,07
	$a = -486,44 + 113,37 \cdot \text{pH} - 6,28 \cdot \text{IM}$	0,69
	$a = -379,74 + 4,18 \cdot \text{NaCl} + 92,81 \cdot \text{pH} - 6,32 \cdot \text{IM}$	0,69

La mejor correlación simple para los quesos QR y QC fue obtenida entre los IM y el parámetro a ($R^2=0,81$ para los QR y $R^2=0,67$ para los QC). No se obtuvieron mejores correlaciones utilizando combinaciones de otros factores, como la concentración de sal y el pH, con el IM.

La correlación negativa que existe entre el IM y el parámetro a indica que cuando el IM se incrementa, el parámetro reológico decrece. Esta relación observada entre los parámetros reológicos y la proteólisis reafirma la importancia que posee la red proteica en la textura del queso (Bertola y col., 1992; Verdini y Rubiolo, 2002; Gravier y col., 2004). Durante la proteólisis, se produce un incremento en el contenido de compuestos en la fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 que en su mayor parte no pueden contribuir en la formación de la estructura del queso. Este comportamiento está relacionado con una disminución en la rigidez de la red proteica que produce un ablandamiento del queso durante la maduración.

Además, se observó una baja correlación entre la concentración de sal, el pH y el parámetro a (R^2 entre 0,05 y 0,53) tanto en las regresiones simples como en las múltiples cuando el IM fue excluido. Verdini y Rubiolo (2002) observaron, en quesos Port Salut, que la mejor correlación para el módulo elástico fue obtenida por medio de una función lineal del contenido de humedad, la concentración de sal y el IM. Los valores del módulo elástico decrecieron cuando los contenidos de humedad, la concentración de sal y el IM se incrementaron, sugiriendo que la contribución de cada parámetro fue significativa. No obstante, los autores estudiaron la maduración del queso utilizando dos zonas de muestreo y observaron que la concentración de sal y el contenido de humedad se encontraban muy relacionados con dichas zonas.

En todas las correlaciones realizadas, los mejores ajustes obtenidos con los datos correspondientes a los QR pueden ser atribuidos a la presencia de otros factores que contribuyen al comportamiento reológico en los quesos QC. Como se discutió en la Sección 5.2.2.3, el proceso de congelación produjo efectos significativos en los valores del parámetro reológico a , indicando que es un factor que contribuye, junto con los parámetros fisicoquímicos, al comportamiento reológico de los quesos QC.

5.3. Caracterización del comportamiento reológico de los sistemas alimentarios en estudio

5.3.1. Principio de Superposición Tiempo -Temperatura

5.3.1.1. Suspensiones de WPC

Los valores de los factores de ajuste (a_T) obtenidos a partir de la Ecuación 4.4 que fueron empleados para superponer los valores de G'' de las suspensiones de WPC se encuentran detallados en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8. Valores de los factores de ajuste (a_T) para el módulo viscoso (G'') de suspensiones de WPC utilizando como temperatura de referencia 40 °C

Muestra	Factor a_T				
	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
5-S	3,35	1,51	1,08	1,00	0,97
9-S	2,47	1,41	1,02	1,00	0,87
5-72,5	4,10	1,95	1,10	1,00	0,97
9-72,5	3,71	2,72	1,10	1,00	0,98
5-77,5	3,48	1,95	1,39	1,00	0,98
9-77,5	4,45	3,15	1,20	1,00	0,98
5-S-C	4,95	2,45	1,25	1,00	0,98
9-S-C	4,50	2,11	1,37	1,00	0,85
5-72,5-C	3,91	1,35	1,29	1,00	0,85
5-77,5-C	2,25	1,49	1,10	1,00	0,81
9-72,5-C	4,50	2,36	1,32	1,00	0,91
9-77,5-C	3,30	2,52	2,10	1,00	0,98

En las suspensiones de WPC sin tratamiento térmico, el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura pudo aplicarse únicamente en las zonas correspondientes a las temperaturas comprendidas entre 30 y 50 °C para las suspensiones con un 5% p/v de PT y entre 30 y 40 °C para las suspensiones con un 9% p/v de PT (Figura 5.20). En este caso, los valores experimentales de G' y G'' se superpusieron satisfactoriamente utilizando el mismo factor de ajuste a_T , indicando que en estas regiones las suspensiones de WPC sin tratamiento térmico se comportan como un material termorreologicamente simple (Ferry, 1970).

En el caso de las suspensiones de WPC tratadas térmicamente, el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura pudo aplicarse únicamente en las zonas correspondientes a las temperaturas comprendidas entre 30 y 50 °C para las suspensiones con 5 y 9% p/v de PT tratadas en condiciones de intensidad de tratamiento térmico baja (Figura 5.21) y entre 40 y 50 °C para las suspensiones con 5% p/v de PT tratadas en condiciones de intensidad de tratamiento térmico alta (Figura 5.22a). En el caso de las suspensiones 9-77,5, dicho principio no pudo aplicarse a ninguna temperatura debido a que los datos experimentales de G' y G'' no pudieron superponerse de manera satisfactoria utilizando el mismo factor a_T (Figura 5.22b).

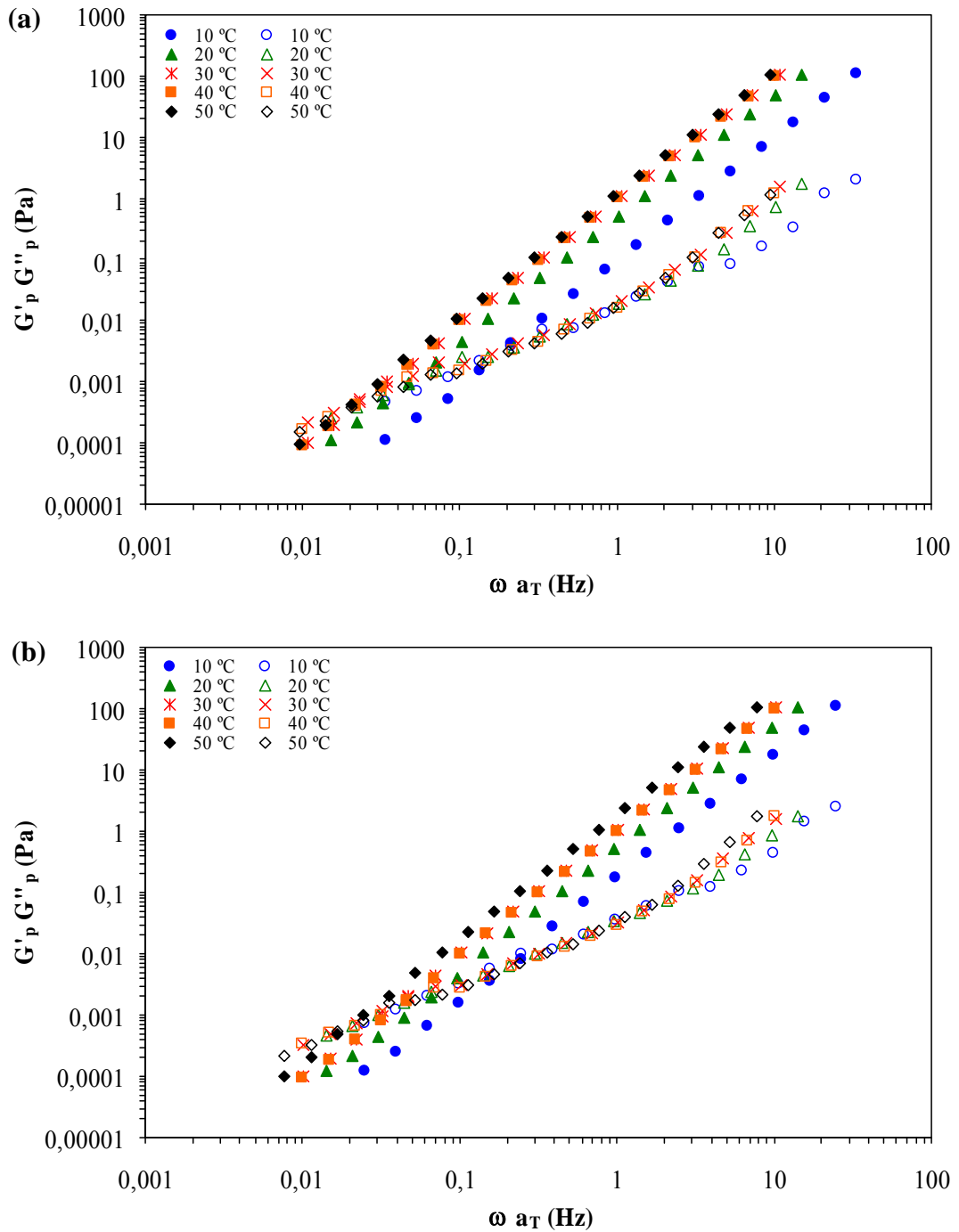


Figura 5.20. Curvas maestras obtenidas aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a la temperatura de referencia de 40 °C para suspensiones de WPC sin tratamiento térmico: (a) suspensiones 5-S y (b) suspensiones 9-S. Los símbolos llenos corresponden a G'_p y los símbolos vacíos corresponden a G''_p .

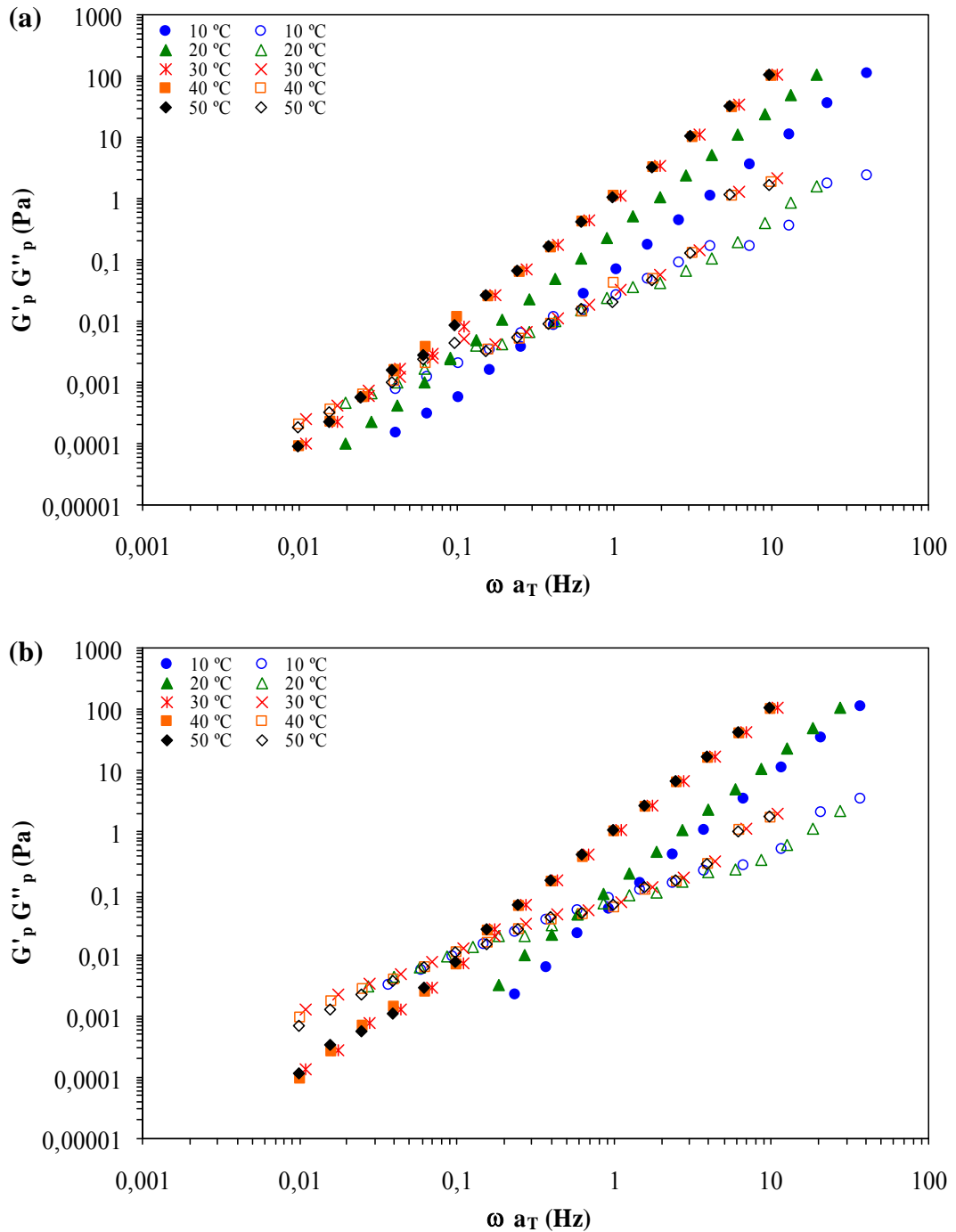


Figura 5.21. Curvas maestras obtenidas aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a la temperatura de referencia de 40 °C para suspensiones de WPC tratadas en condiciones de intensidad de tratamiento térmico baja: (a) suspensiones 5-72,5 y (b) suspensiones 9-72,5. Los símbolos llenos corresponden a G'_p y los símbolos vacíos corresponden a G''_p .

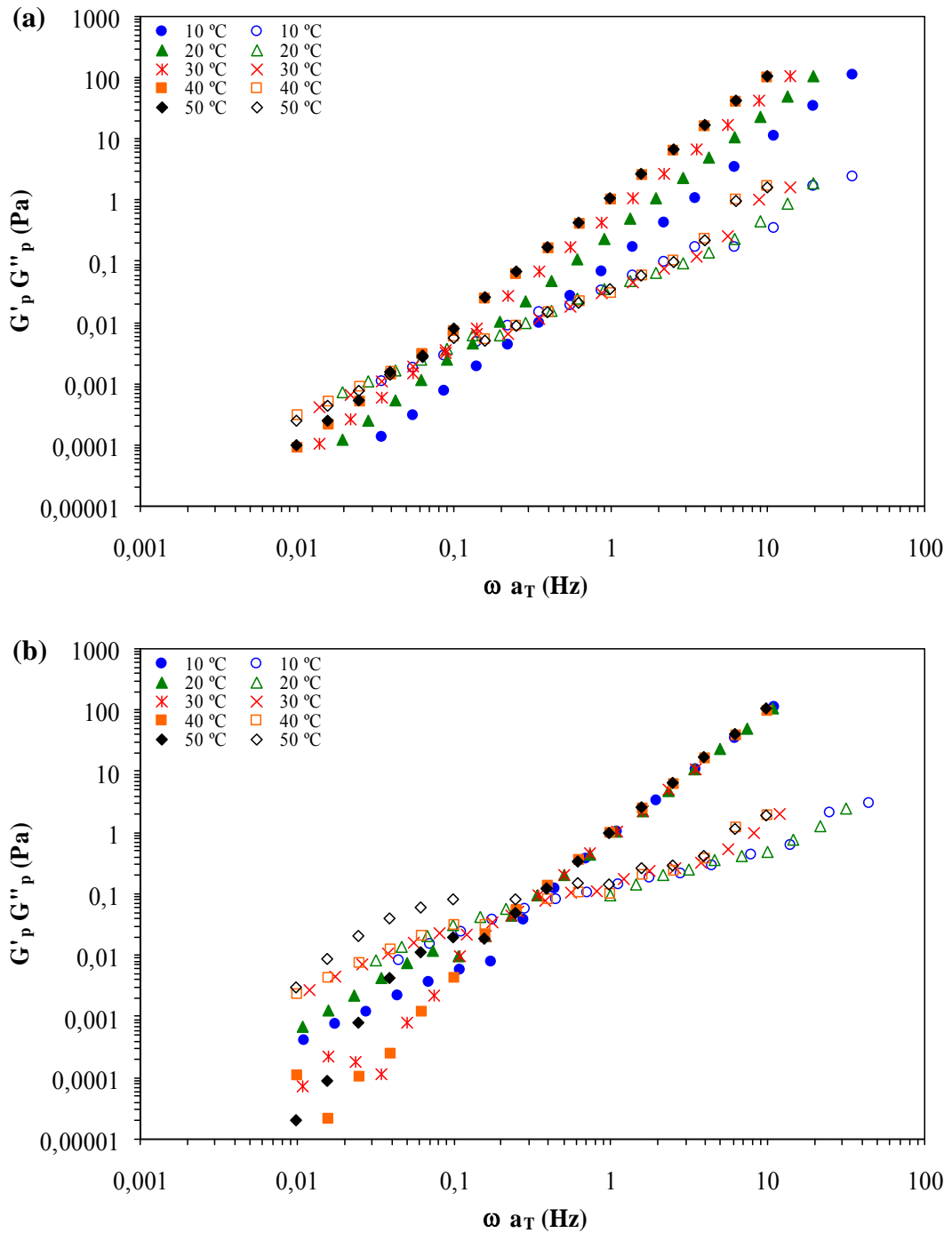


Figura 5.22. Curvas maestras obtenidas aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a la temperatura de referencia de 40 °C para suspensiones de WPC tratadas en condiciones de intensidad de tratamiento térmico alta: (a) suspensiones 5-77,5 y (b) suspensiones 9-77,5. Los símbolos llenos corresponden a G'_p y los símbolos vacíos corresponden a G''_p .

Analizando a las suspensiones de WPC sin tratamiento térmico y congeladas, el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura pudo aplicarse únicamente en las suspensiones con 5% p/v de PT en la zona correspondiente a las temperaturas comprendidas entre 40 y 50 °C (Figura 5.23a). En cambio, en las suspensiones de WPC tratadas térmicamente y congeladas, dicho principio no pudo aplicarse ninguna condición de intensidad de tratamiento térmico (Figura 5.24 y 5.25).

Como se explicó en la Sección 5.1.2.4, el comportamiento reológico de las suspensiones de proteínas globulares es similar al comportamiento de los coloides cristalinos, debido principalmente a la presencia de fuerzas repulsivas de hidratación. Las interacciones polares orientan a las moléculas de agua sobre la superficie de las proteínas. De esta forma, se generan sucesivas capas de hidratación unidas principalmente por puentes hidrógeno, generando una fuerza repulsiva que puede ser considerada mucho más grande que las fuerzas atractivas de van der Waals o las fuerzas repulsivas electrostáticas (Ikeda y Nishinari, 2000). Cuando la temperatura de las suspensiones se incrementa, las uniones puente hidrógeno pueden debilitarse y las interacciones hidrofóbicas pueden verse favorecidas. Todos estos factores pueden contribuir a la complejidad termorreológica de las suspensiones de WPC observadas en diferentes rangos de temperaturas.

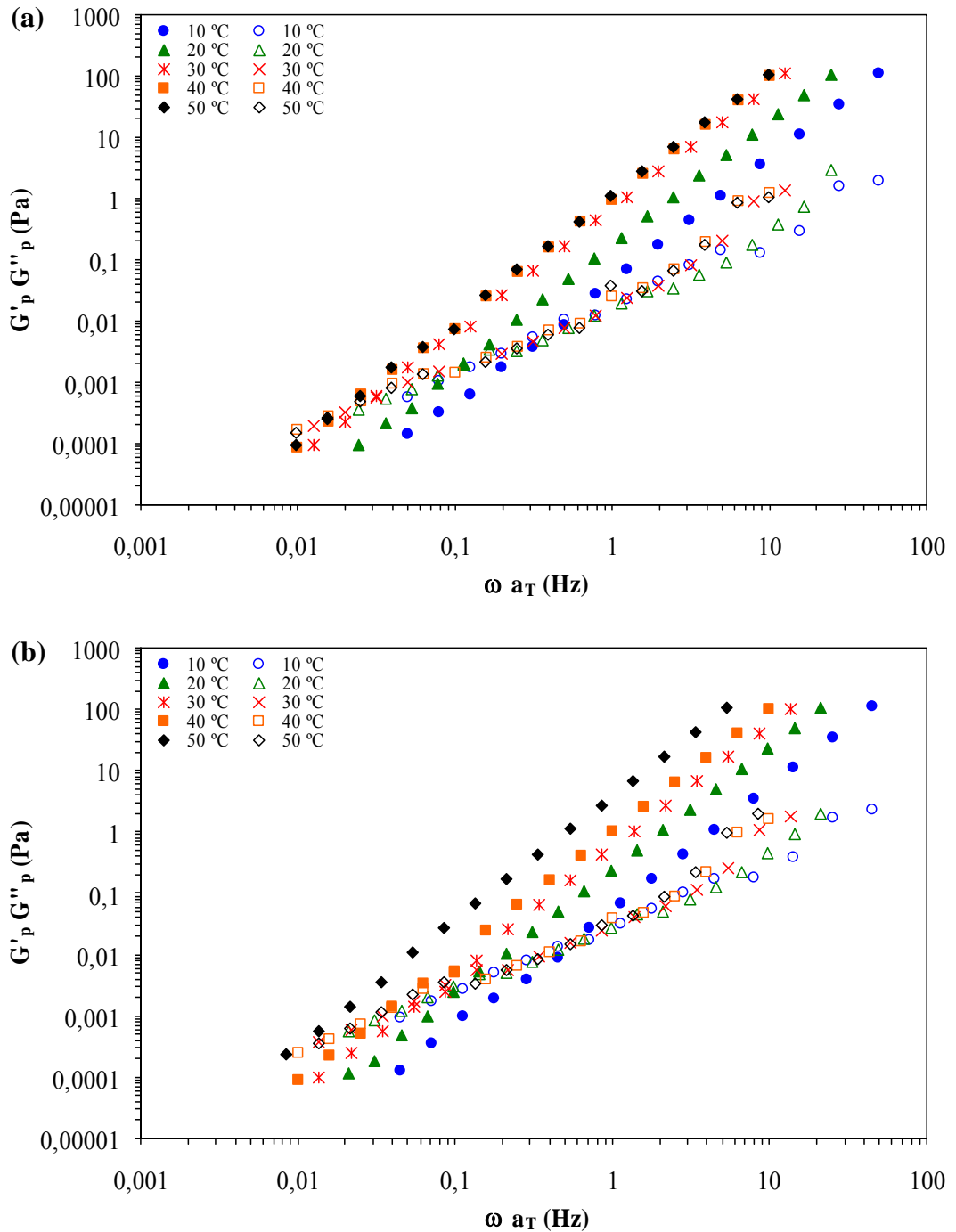


Figura 5.23. Curvas maestras obtenidas aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a la temperatura de referencia de 40 °C para suspensiones de WPC sin tratamiento térmico y congeladas: (a) suspensiones 5-S-C y (b) suspensiones 9-S-C. Los símbolos llenos corresponden a G'_p y los símbolos vacíos corresponden a G''_p .

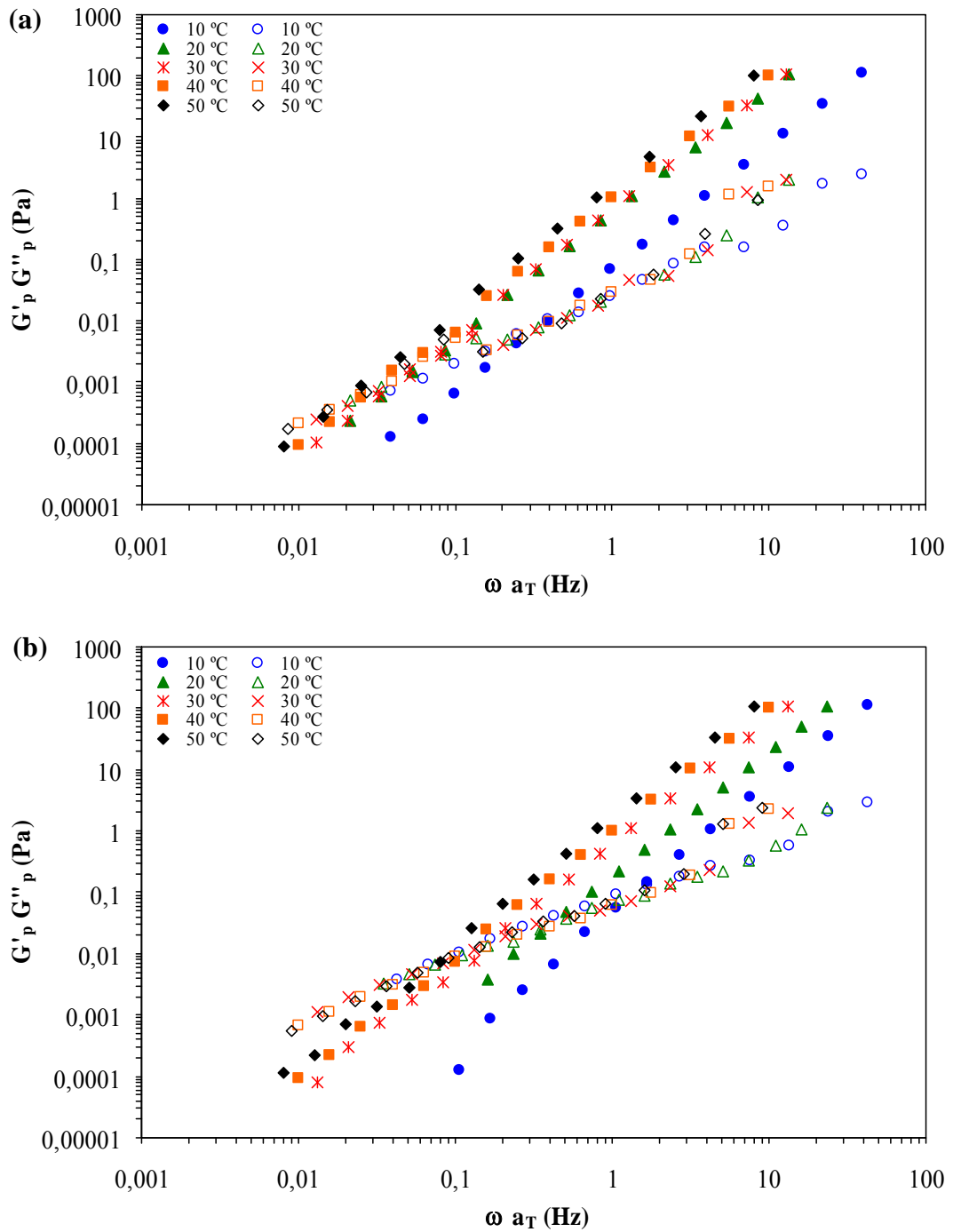


Figura 5.24. Curvas maestras obtenidas aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a la temperatura de referencia de 40 °C para suspensiones de WPC tratadas en condiciones de intensidad de tratamiento térmico baja y congeladas: (a) suspensiones 5-72,5-C y (b) suspensiones 9-72,5-C. Los símbolos llenos corresponden a G'_p y los símbolos vacíos corresponden a G''_p .

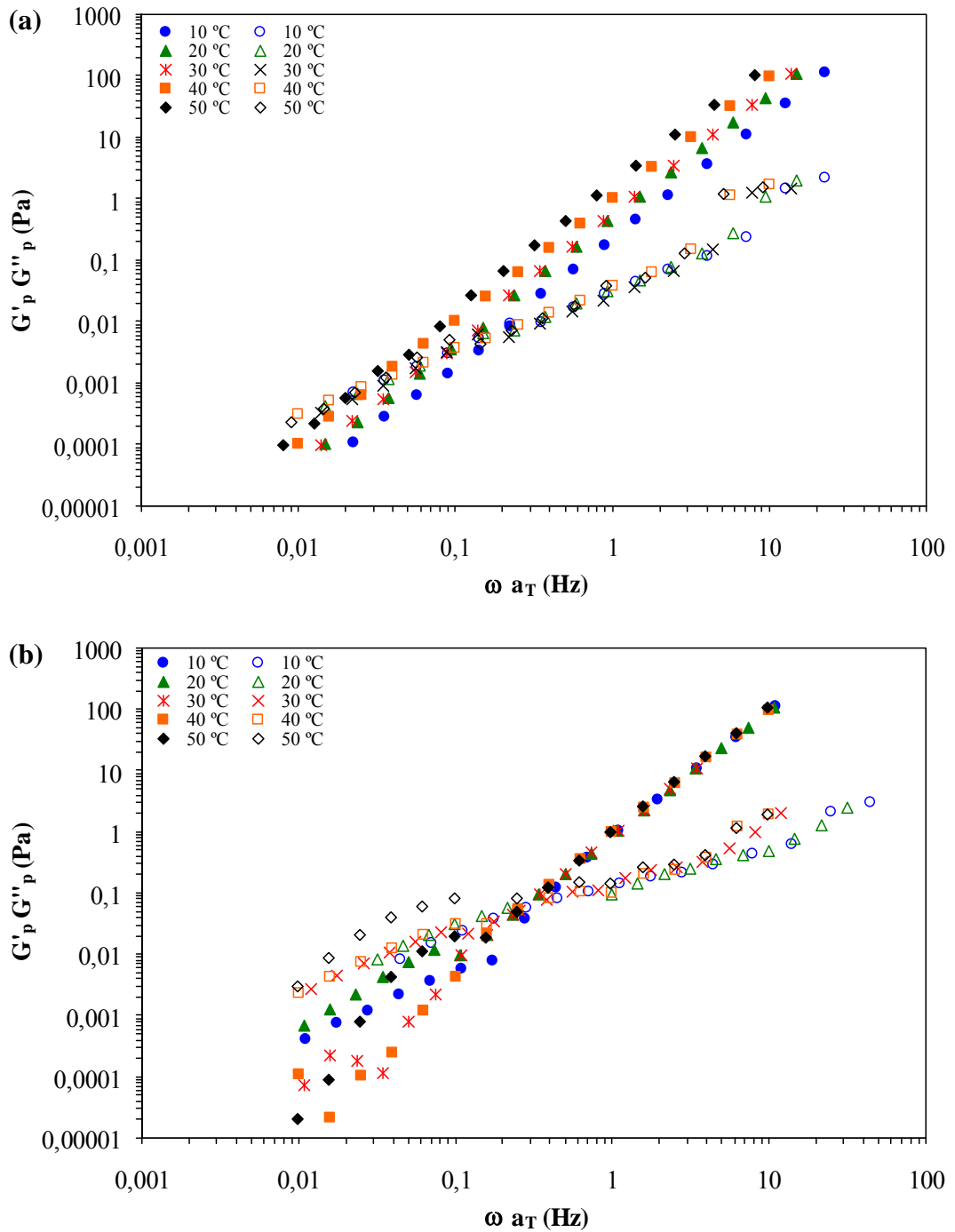


Figura 5.25. Curvas maestras obtenidas aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a la temperatura de referencia de 40 °C para suspensiones de WPC tratadas en condiciones de intensidad de tratamiento térmico alta y congeladas: (a) suspensiones 5-77,5-C y (b) suspensiones 9-77,5-C. Los símbolos llenos corresponden a G'_p y los símbolos vacíos corresponden a G''_p .

5.3.1.2. Queso blando magro elaborado con proteínas del suero

Los valores de a_T obtenidos a partir de la Ecuación 4.4 que fueron empleados para superponer los valores de G'' de los quesos QR y QC se encuentran detallados en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9. Valores de los factores de ajuste (a_T) para el módulo viscoso (G'') de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero utilizando como temperatura de referencia 30 °C.

Muestra	Factor a_T				
	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
QR-48	290,10	27,90	1,00	0,056	0,005
QR-76	235,10	4,21	1,00	0,050	0,005
QC-48	92,75	9,10	1,00	0,220	0,035
QC-76	22,15	5,15	1,00	0,035	0,004

En todos los casos se pudo obtener una buena superposición de los datos experimentales (Figura 5.26 y 5.27). Luego, estos valores de a_T fueron utilizados para superponer las curvas correspondientes a G' . En este caso, los resultados obtenidos indican que a bajas temperaturas (10 a 30 °C) se obtuvo una buena superposición, mientras que a altas temperaturas (40 a 50 °C) las curvas de G' no se superpusieron correctamente (Figura 5.26 y 5.27).

De acuerdo a lo expresado anteriormente, en los quesos QR y QC se observó que en la región de altas frecuencias (correspondiente a las temperaturas más bajas) los datos experimentales de G' y G'' se superpusieron de manera satisfactoria utilizando el mismo factor a_T . Estos resultados indican que en esta región, los quesos se comportan como un material termorreológicamente simple.

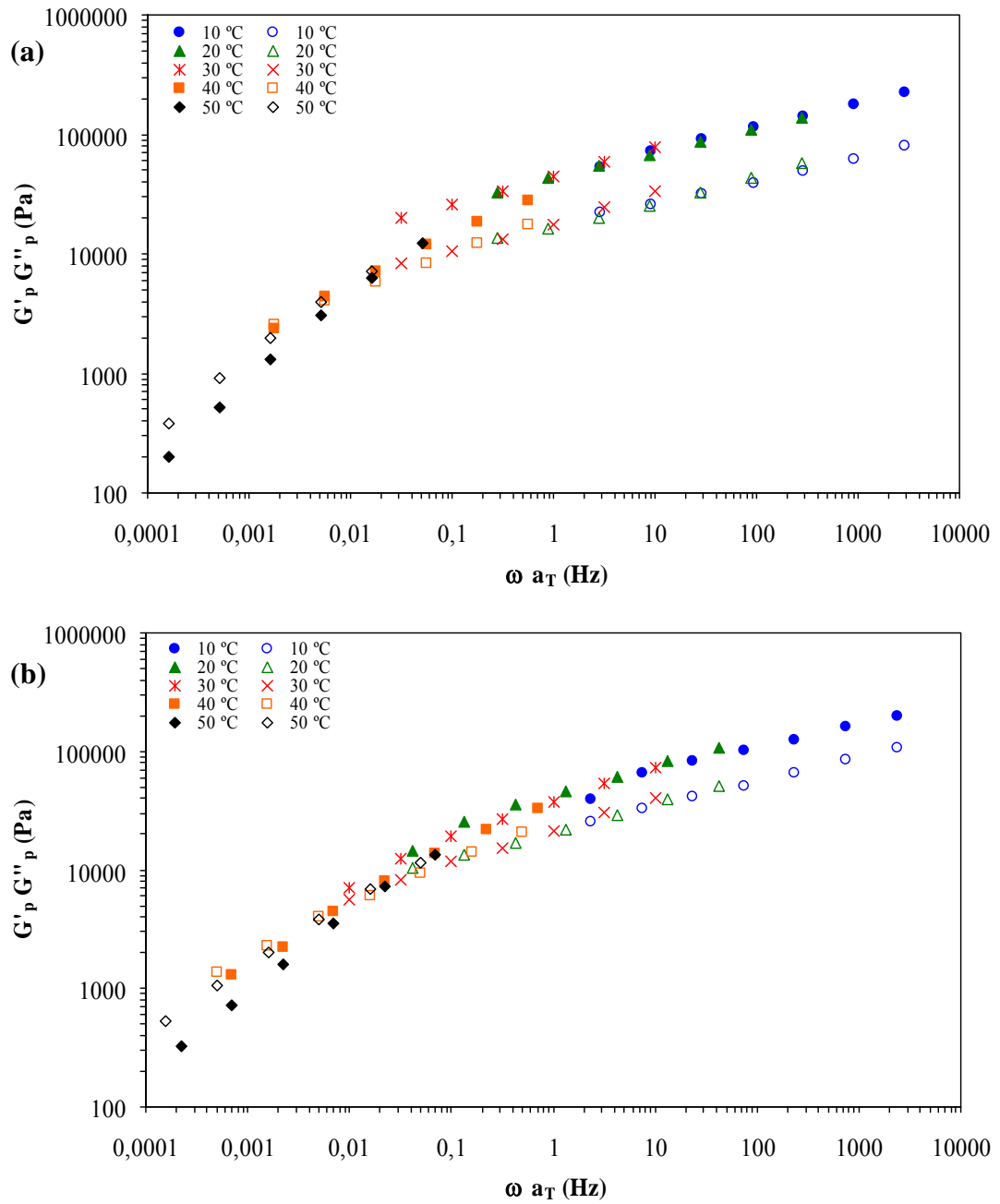


Figura 5.26. Curvas maestras obtenidas aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a la temperatura de referencia de 30 °C para un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR): (a) 48 días de maduración y (b) 76 días de maduración. Los símbolos llenos corresponden a G'_p y los símbolos vacíos corresponden a G''_p .

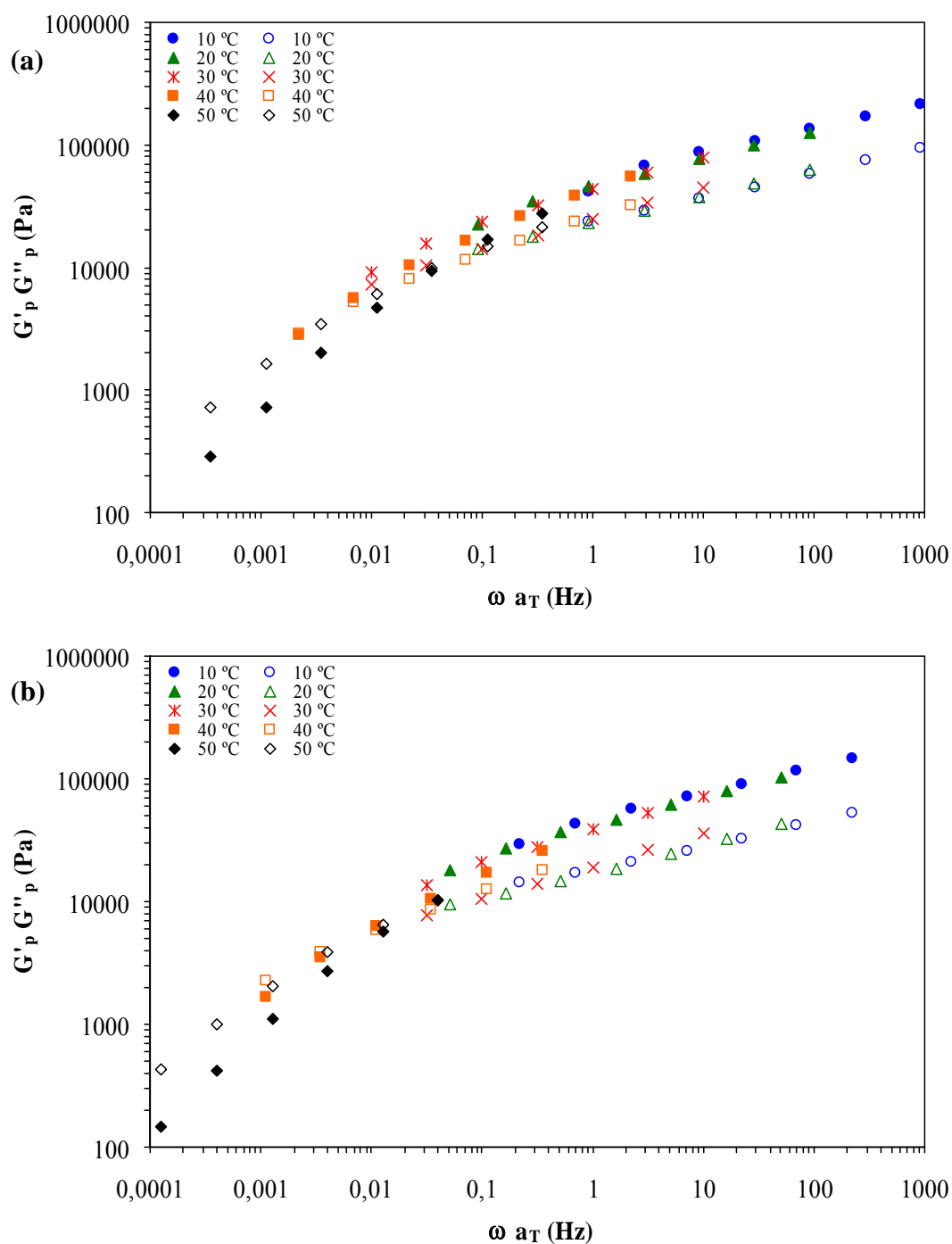


Figura 5.27. Curvas maestras obtenidas aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura a la temperatura de referencia de 30 °C para un queso blando magro elaborado con proteínas del suero congelado (QC): (a) 48 días de maduración y (b) 76 días de maduración. Los símbolos llenos corresponden a G'_p y los símbolos vacíos corresponden a G''_p .

Por el contrario, en la región de bajas frecuencias (correspondiente a las temperaturas más altas) los valores de G' experimentaron una desviación, indicando que no pueden superponerse de manera satisfactoria utilizando el mismo factor a_T que superpone a los valores de G'' . En concordancia con estos resultados, se han encontrado trabajos en donde el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura no pudo aplicarse a temperaturas superiores a los 40 °C en quesos Mozzarella descremados (Udyarajan y col., 2007) y bajos en humedad (Singh y col. 2006).

El queso es un material complejo compuesto principalmente por proteínas, agua, grasa y minerales. A temperaturas superiores a los 40 °C, el queso experimenta una serie de cambios que incluyen la fusión de la grasa y perturbaciones en las interacciones proteicas que dan lugar a la fusión del queso. No obstante, se ha publicado que en quesos con ausencia de grasa la matriz casearia experimenta un cambio desde comportamiento predominantemente sólido a bajas temperaturas a un comportamiento predominantemente fluido a temperaturas superiores a los 40 °C, debido principalmente a la relajación de las uniones proteicas (Lucey col., 2003).

En el queso existen una gran cantidad de mecanismos de unión entre las moléculas que lo componen que incluyen puentes hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas entre grupos de fosfato cálcico y caseínas. Cuando la temperatura del queso se incrementa, las uniones puentes hidrógeno pueden debilitarse y las interacciones hidrofóbicas pueden verse favorecidas. Udyarajan y col. (2007) publicaron que durante el calentamiento, el calcio y el fosfato presentes en la fase acuosa del queso puede generar la formación de nuevo fosfato cálcico insoluble capaz de interactuar con las

caseínas. Todos estos factores pueden contribuir a la complejidad termorreológica del queso observada a altas temperaturas.

5.3.2. Modelo de Maxwell

Las curvas maestras de los quesos QR y QC, obtenidas por medio de la superposición de los datos experimentales de los módulos G' y G'' a las temperaturas en donde se cumplió con el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura (10 a 30 °C), pudieron modelarse utilizando los parámetros del modelo de Maxwell detallados en la Tabla 5.10 (Figura 5.28 y 5.29).

En todos los casos se obtuvo un buen ajuste ($R^2=0,99$) utilizando 5 y 6 elementos, indicando que el comportamiento viscoelástico de dichos quesos puede representarse satisfactoriamente por medio del modelo de Maxwell, pudiéndose utilizar además para predecir funciones viscoelásticas lineales. Similares resultados fueron publicados por diversos autores que ajustaron este modelo a las curvas maestras obtenidas para varios tipos de quesos. [Muliawan y Hatzkiriakos \(2007\)](#) utilizaron 6 elementos para un queso Mozzarella, [Subramanian y Guasekaran \(1997b\)](#) utilizaron 8 elementos para un queso Mozzarella bajo en grasa y humedad y [Subramanian y col. \(2006\)](#) emplearon 11 elementos para un queso procesado bajo en grasa.

Tabla 5.10. Parámetros del modelo de Maxwell (λ_i y G_i para $i=1,\dots,5$) de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero.

Muestras	Elemento de Maxwell N°	Tiempo de relajación (λ_i) [s]	Módulo de relajación (G_i) [kPa]*	R ²
QR-46	1	0,0001	113,75	0,99
	2	0,001	67,11	
	3	0,01	40,45	
	4	0,1	26,92	
	5	1	12,99	
	6	10	21,42	
QR-78	1	0,0001	160,26	0,99
	2	0,001	55,83	
	3	0,01	50,59	
	4	0,1	35,91	
	5	1	14,15	
	6	10	20,00	
QC-46	1	0,0001	173,87	0,99
	2	0,001	80,06	
	3	0,01	53,76	
	4	0,1	35,84	
	5	1	16,17	
	6	10	17,93	
QC-78	1	0,0001	-	0,99
	2	0,001	91,55	
	3	0,01	42,42	
	4	0,1	25,65	
	5	1	18,07	
	6	10	14,75	

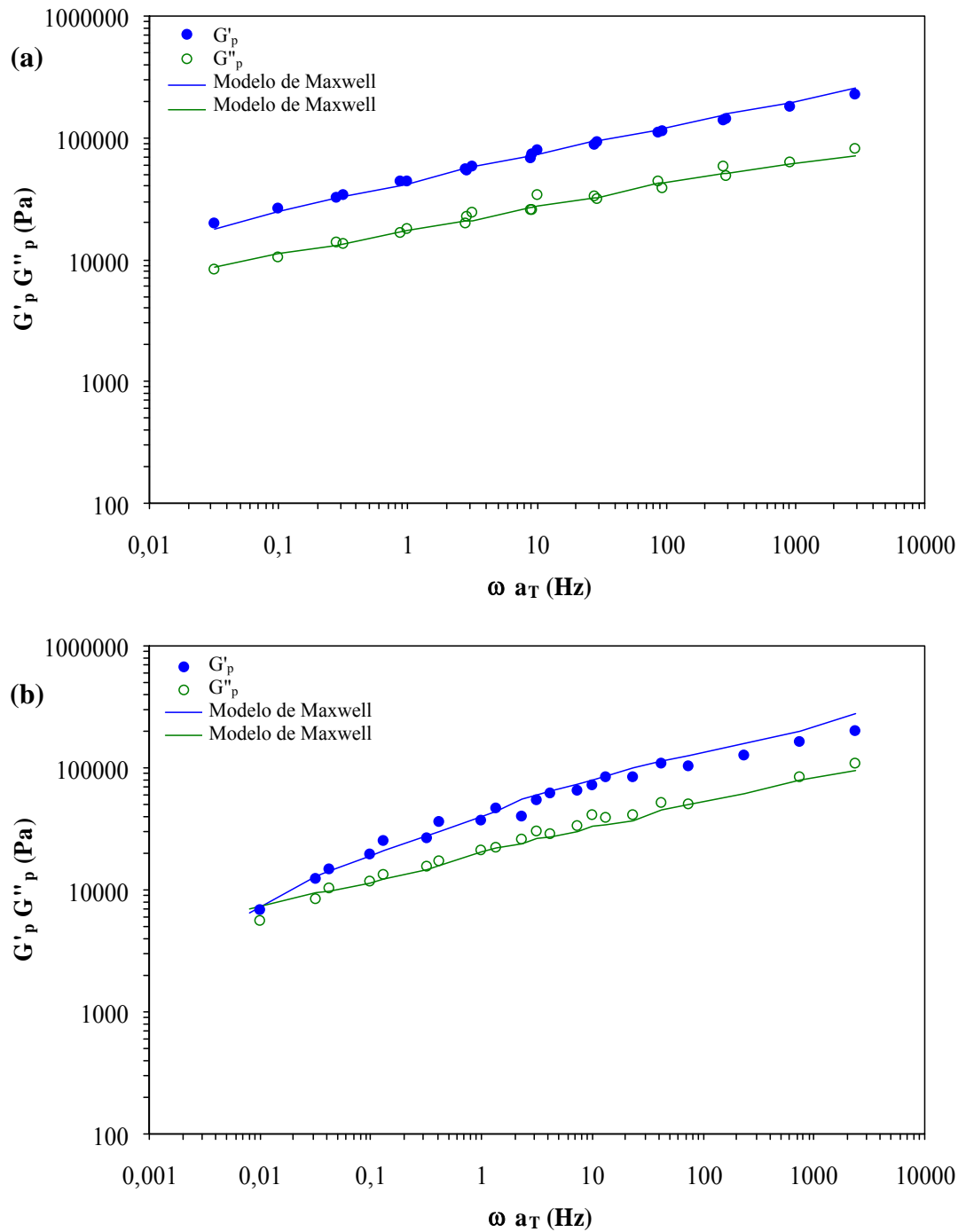


Figura 5.28. Ajuste del modelo de Maxwell a las curvas maestras de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR): (a) 48 días de maduración y (b) 76 días de maduración.

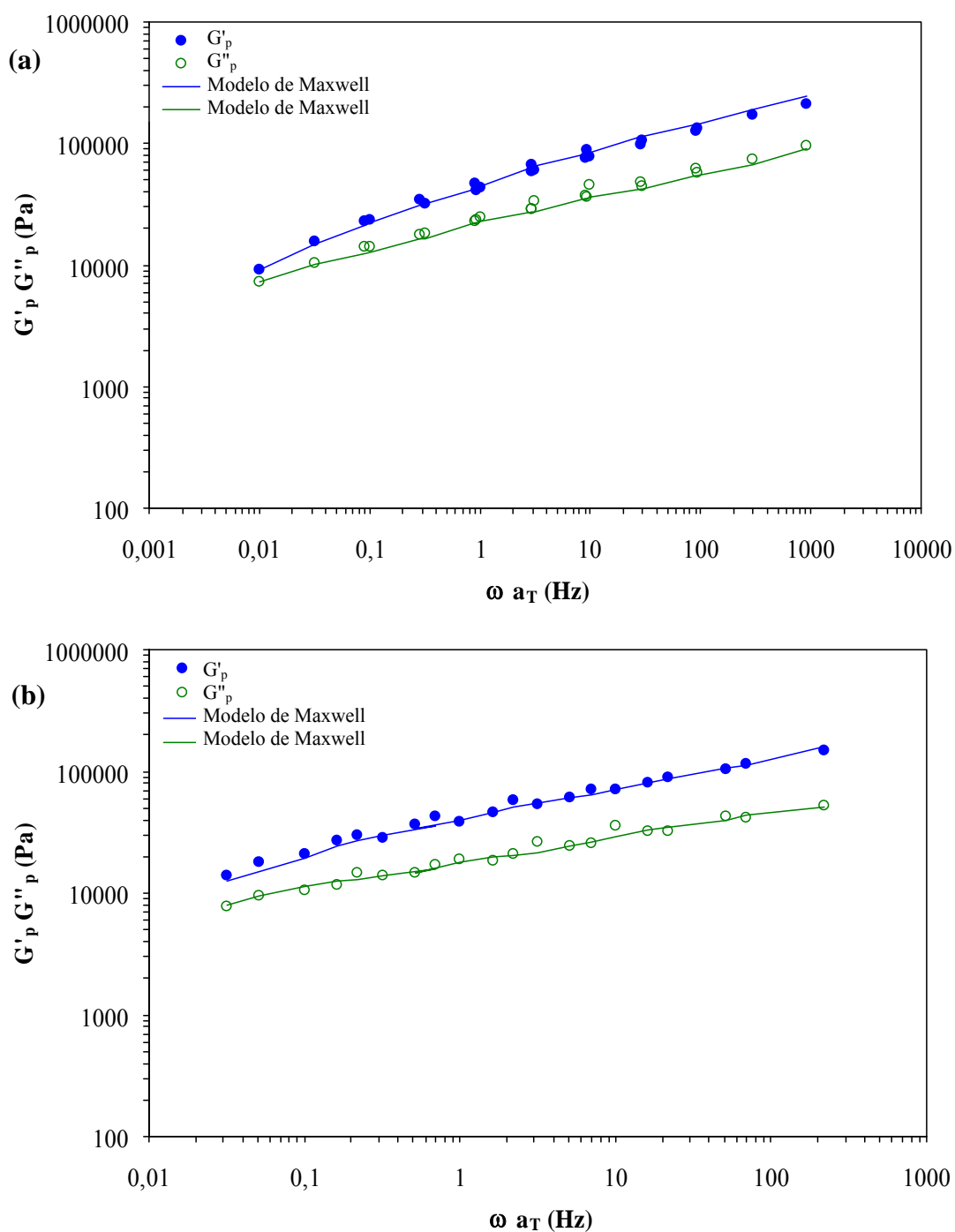


Figura 5.29. Ajuste del modelo de Maxwell a las curvas maestras de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero congelado (QC): (a) 48 días de maduración y (b) 76 días de maduración.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

El estudio del efecto del proceso de congelación sobre el contenido de proteína que se desnaturizó y/o que formó agregados (PDA) y sobre las propiedades reológicas de suspensiones de proteínas del suero permitió caracterizar el comportamiento de este sistema alimentario.

El proceso de congelación produjo cambios en el contenido de PDA en las suspensiones de proteína del suero tratadas térmicamente sólo cuando la temperatura de tratamiento fue de 72,5 °C. En este caso, el contenido de PDA fue menor en las suspensiones tratadas térmicamente y congeladas. Este fenómeno se debió posiblemente al efecto de la crioconcentración que pudo ocasionar cambios en la estructura de los agregados proteicos, aumentando su solubilidad a pH 4,6. La cinética global de desnaturización-agregación pudo describirse por medio de una reacción de primer orden y, a partir del análisis de dicha cinética, se obtuvo una ecuación que puede ser utilizada para estimar el contenido de PDA luego de los tratamientos térmicos y del proceso de congelación.

Los espectros mecánicos de las suspensiones de WPC presentaron un comportamiento similar al de los coloides cristalinos, que se evidenció a partir del análisis cualitativo de los mismos y a través del análisis estadístico de los valores de los tiempos característicos de relajación calculados. El análisis de los parámetros del modelo de Ley de Potencia demostró que las suspensiones con un mayor contenido de proteína total presentaron una mayor dependencia de los módulos elástico y viscoso con la frecuencia. Además, se observó que el módulo viscoso fue más influenciado por las condiciones experimentales estudiadas (contenido de proteína

total, tratamientos térmicos y proceso de congelación) que el módulo elástico, debido principalmente a los cambios observados en el parámetro γ .

La caracterización del comportamiento reológico de las suspensiones de proteínas del suero aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura permitió obtener curvas maestras solamente en algunas condiciones experimentales y en un rango acotado de temperaturas (30 a 50 °C). Este resultado indica que las mismas se comportan como materiales termorreológicamente simples en esta zona del espectro mecánico.

El estudio del efecto del proceso de congelación sobre las propiedades fisicoquímicas y reológicas de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero permitió caracterizar el comportamiento de este sistema alimentario.

El proceso de congelación produjo cambios solamente en los valores de pH y de índice de maduración, siendo los valores correspondientes a los quesos congelados mayores que los de los quesos refrigerados. De este modo, el aumento en el índice de maduración indica que el proceso de congelación produjo un aumento en el grado de proteólisis de los quesos.

Los espectros mecánicos de los quesos presentaron un comportamiento similar al de sólidos viscoelásticos. Los resultados provenientes del análisis de los parámetros del modelo de Ley de Potencia demostraron que los quesos blandos magros elaborados con proteínas del suero presentaron una dependencia de los módulos elástico y viscoso con el tiempo de maduración. En este caso, los valores de

los parámetros a y b disminuyeron mientras que los valores de los exponentes x e y aumentaron con el tiempo. Estos resultados se relacionaron con la disminución del grado de estructuración de la red de caseína de los quesos durante la maduración. El proceso de congelación afectó únicamente a los valores del parámetro a correspondiente al módulo elástico, en donde los quesos congelados presentaron menores valores en comparación a los quesos refrigerados. Este fenómeno fue atribuido a la posible deshidratación local de las proteínas que provoca la ruptura de la estructura del queso luego de la descongelación.

La mejor correlación obtenida fue entre los valores de índice de maduración y el parámetro reológico a , reafirmando la importancia que posee la red proteica en la textura del queso.

La caracterización del comportamiento reológico de los quesos elaborados con proteínas del suero aplicando el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura permitió obtener curvas maestras solamente en el rango de bajas temperaturas (10 a 30 °C), indicando que los quesos se comportan como materiales termorreologicamente simples en esta zona del espectro mecánico. Además, se pudo aplicar satisfactoriamente el modelo Maxwell con 5 y 6 elementos a las curvas maestras obtenidas, indicando que el comportamiento viscoelástico de los quesos analizados puede representarse por medio de este modelo, pudiéndose utilizar además para predecir funciones viscoelásticas lineales.

NOMENCLATURA

a	Magnitud de G' a una frecuencia (1 rad/s)
A	Factor de frecuencia
a_T	Factor de ajuste utilizado en el Principio de Superposición Tiempo-Temperatura
b	Magnitud de G'' a una frecuencia (1 rad/s)
c	Concentración
C	Contenido de proteína
C_0	Contenido inicial de proteína
E_a	Energía de activación
G	Módulo de Hooke
G'	Módulo elástico
G'_p	Módulo elástico corregido
G''	Módulo viscoso
G''_0	Módulo viscoso medido a la temperatura T_0
G''_p	Módulo viscoso corregido
$ G^* $	Módulo complejo
IM	Índice de maduración
k	Constante aparente de reacción
K	Constante de Boltzmann
k_0	Constante cinética de decaimiento del parámetro reológico
k_n	Constante de reacción
k_1	Constante de reacción para un orden igual a 1
n	Orden de reacción

n	Número de moléculas de polímero por cm^3
N	Número de submoléculas en una molécula de polímero
NT	Nitrógeno total
NS	Nitrógeno soluble a pH 4,6
p	p -ésima contribución al tiempo de relajación
P_0	Valor inicial del parámetro reológico
$P(\theta)$	Parámetro reológico
PDA	Proteína que se desnaturalizó y/o que formó agregados
PS	Proteína soluble
PS_0	Proteína soluble inicial
PT	Proteína total
QC	Quesos congelados
QC-1	Quesos congelados correspondientes al día 1 de maduración
QC-21	Quesos congelados correspondientes al día 21 de maduración
QC-48	Quesos congelados correspondientes al día 48 de maduración
QC-76	Quesos congelados correspondientes al día 76 de maduración
QR	Quesos refrigerados
QR-1	Quesos refrigerados correspondientes al día 1 de maduración
QR-21	Quesos refrigerados correspondientes al día 21 de maduración
QR-48	Quesos refrigerados correspondientes al día 48 de maduración
QR-76	Quesos refrigerados correspondientes al día 76 de maduración
R	Constante universal de los gases
S	Suspensiones sin tratamiento térmico

S-C	Suspensiones sin tratamiento térmico y congeladas
ST	Suspensiones tratadas térmicamente
ST-C	Suspensiones tratadas térmicamente y congeladas
T	Temperatura absoluta
t	Tiempo
T ₀	Temperatura absoluta de referencia
WPC	Concentrado de proteína de suero
x	Velocidad de variación de G' con la frecuencia
y	Velocidad de variación de G'' con la frecuencia
γ	Deformación
γ_0	Amplitud de deformación
$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación
δ	Ángulo de fase
η	Viscosidad
η_s	Viscosidad del solvente
η'	Viscosidad dinámica
$ \eta^* $	Viscosidad compleja
θ	Tiempo de maduración
λ	Tiempo de relajación para el modelo de Maxwell
λ_p	Tiempo de relajación genérico
λ_{p0}	Tiempo de relajación genérico a la temperatura de referencia T ₀
$\lambda_{p(R)}$	Tiempo de relajación para la teoría de Rouse
$\lambda_{p(Z)}$	Tiempo de relajación para la teoría de Zimm

ρ	Densidad
ρ_0	Densidad medida a una temperatura T_0
τ	Tensión de corte
τ_c	Tiempo característico de relajación
τ'_k	Coefficiente numérico para el tiempo de relajación (teoría de Zimm)
τ_0	Amplitud de la tensión de corte
ω	Frecuencia de oscilación
ω_c	Frecuencia de corte entre G' y G''
5-S	Suspensiones con 5% p/v de proteína total sin tratamiento térmico
5-S-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total sin tratamiento térmico y congeladas
9-S	Suspensiones con 9% p/v de proteína total sin tratamiento térmico
9-S-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total sin tratamiento térmico y congeladas
5-70-30	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 30 min
5-70-30-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 30 min y congeladas
5-70-60	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 60 min
5-70-60-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 60 min y congeladas

5-70-90	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 90 min
5-70-90-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 90 min y congeladas
5-70-120	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 120 min
5-70-120-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 120 min y congeladas
9-70-30	Suspensiones con 9% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 30 min
9-70-30-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 30 min y congeladas
9-70-60	Suspensiones con 9% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 60 min
9-70-60-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 60 min y congeladas
9-70-90	Suspensiones con 9% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 90 min
9-70-90-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 90 min y congeladas
9-70-120	Suspensiones con 9% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 120 min

9-70-120-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total térmicamente a 70 °C durante 120 min y congeladas
5-72,5	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 15 min
5-72,5-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 15 min y congeladas
5-72,5-10	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 10 min
5-72,5-10-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 10 min y congeladas
5-72,5-20	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 20 min
5-72,5-20-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 20 min y congeladas
5-72,5-30	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 30 min
5-72,5-30-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 30 min y congeladas
5-72,5-40	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 40 min
5-72,5-40-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 40 min y congeladas

9-72,5	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 40 min
9-72,5-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 40 min y congeladas
9-72,5-10	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 10 min
9-72,5-10-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 10 min y congeladas
9-72,5-20	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 20 min
9-72,5-20-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 20 min y congeladas
9-72,5-30	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 30 min
9-72,5-30-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 72,5 °C durante 30 min y congeladas
5-75-10	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 10 min
5-75-10-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 10 min y congeladas
5-75-15	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 15 min

5-75-15-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 15 min y congeladas
5-75-20	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 20 min
5-75-20-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 20 min y congeladas
5-75-25	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 25 min
5-75-25-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 25 min y congeladas
9-75-10	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 10 min
9-75-10-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 10 min y congeladas
9-75-15	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 15 min
9-75-15-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 15 min y congeladas
9-75-20	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 20 min
9-75-20-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 20 min y congeladas

9-75-25	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 25 min
9-75-25-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 75 °C durante 25 min y congeladas
5-77,5	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 77,5 °C durante 6 min
5-77,5-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total térmicamente a 77,5 °C durante 6 min y congeladas
5-77,5-4	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 4 min
5-77,5-4-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 4 min y congeladas
5-77,5-8	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 8 min
5-77,5-8-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 8 min y congeladas
5-77,5-10	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 10 min
5-77,5-10-C	Suspensiones con 5% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 10 min y congeladas
9-77,5	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 12 min

9-77,5-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 12 min y congeladas
9-77,5-4	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 4 min
9-77,5-4-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 4 min y congeladas
9-77,5-6	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 6 min
9-77,5-6-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 6 min y congeladas
9-77,5-8	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 8 min
9-77,5-8-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 8 min y congeladas
9-77,5-10	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 10 min
9-77,5-10-C	Suspensiones con 9% p/v de proteína total tratadas térmicamente a 77,5 °C durante 10 min y congeladas

APÉNDICES

APÉNDICE I

Análisis estadístico

Tabla AI.1. Comparación de los valores de contenido de PDA entre suspensiones con 5 y 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 70 °C.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	52.98	XXXX
9-S	3	51.4767	XX
5-70-30	3	54.4067	XXX
9-70-30	3	55.5233	XXXX
5-70-60	3	59.4967	XXXXX
9-70-60	3	58.4767	XXXXXX
5-70-90	3	64.1067	XXXX
9-70-90	3	61.38	XXXXXXX
5-70-120	3	67.1333	XXXX
9-70-120	3	63.32	XXXXX

Tabla AI.2. Comparación de los valores de contenido de PDA entre suspensiones con 5 y 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 72,5 °C.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	52.98	XXXX
9-S	3	51.4767	XX
5-72,5-10	3	57.7767	XXXXXX
9-72,5-10	3	57.3033	XXXXXX
5-72,5-20	3	61.6967	XXXXXX
9-72,5-20	3	59.9067	XXXXXX
5-72,5-30	3	65.7567	XXXX
9-72,5-30	3	62.86	XXXXX
5-72,5-40	3	69.13	XX
9-72,5	3	65.1067	XXXX

Tabla AI.3. Comparación de los valores de contenido de PDA entre suspensiones con 5 y 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 75 °C.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
9-S	3	51.4767	XX
5-S	3	52.98	XXXX
5-75-10	3	59.7567	XXXXXX
9-75-10	3	58.2733	XXXXXX
5-75-15	3	63.61	XXXX
9-75-15	3	61.0767	XXXXXX
5-75-20	3	66.91	XXX
9-75-20	3	62.4533	XXXXX
5-75-25	3	69.57	X
9-75-25	3	64.0833	XXXX

Tabla AI.4. Comparación de los valores de contenido de PDA entre suspensiones con 5 y 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 77,5 °C.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
9-S	3	51.4767	XX
5-S	3	52.98	XXXX
5-77,5-4	3	57.8467	XXXXXX
9-77,5-4	3	56.9	XXXXXX
5-77,5	3	60.87	XXXXXXXX
9-77,5-6	3	59.8033	XXXXXXXX
5-77,5-8	3	63.1467	XXXXXX
9-77,5-8	3	61.79	XXXXXX
5-77,5-10	3	66.65	XXXX
9-77,5-10	3	64.1867	XXXX

Tabla AI.5. Comparación entre los valores de contenido de PDA de suspensiones con 5% p/v de PT tratadas térmicamente a 70 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	52.98	XXXX
5-S-C	3	52.02	XXX
5-70-30	3	54.4067	XXX
5-70-30-C	3	55.4333	XXXX
5-70-60	3	59.4967	XXXXX
5-70-60-C	3	59.7733	XXXXXX
5-70-90	3	64.1067	XXXX
5-70-90-C	3	63.35	XXXXXX
5-70-120	3	67.1333	XXXX
5-70-120-C	3	68.5067	XXX

Tabla AI.6. Comparación entre los valores de contenido de PDA de suspensiones con 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 70 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
9-0	3	51.4767	XX
9-0-C	3	51.02	X
9-70-30	3	55.5233	XXXX
9-70-30-C	3	53.5333	XXX
9-70-60	3	58.4767	XXXXXX
9-70-60-C	3	57.2033	XXXXX
9-70-90	3	61.38	XXXXXXXX
9-70-90-C	3	59.5	XXXXX
9-70-120	3	63.32	XXXXXX
9-70-120-C	3	62.4533	XXXXX

Tabla AI.7. Comparación entre los valores de contenido de PDA de suspensiones con 5% p/v de PT tratadas térmicamente a 72,5 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	52.98	XXXX
5-S-C	3	52.02	XXX
5-72,5-10	3	57.7767	XXXXXX
5-72,5-10-C	3	53.0933	XXX
5-72,5-20	3	61.6967	XXXXXX
5-72,5-20-C	3	56.6033	XXXX
5-72,5-30	3	65.7567	XXXX
5-72,5-30-C	3	62.2467	XXXXX
5-72,5-40	3	69.13	XXXX
5-72,5-40-C	3	64.7933	XXXX

Tabla AI.8. Comparación entre los valores de contenido de PDA entre suspensiones con 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 72,5 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
9-S	3	51.4767	XX
9-S-C	3	51.02	X
9-72,5-10	3	57.3033	XXXXXX
9-72,5-10-C	3	54.0933	XXX
9-72,5-20	3	59.9067	XXXXXX
9-72,5-20-C	3	56.1333	XXXX
9-72,5-30	3	62.86	XXXXX
9-72,5-30-C	3	59.4467	XXXXXX
9-72,5	3	65.1067	XXXX
9-72,5-C	3	61.84	XXXXX

Tabla AI.9. Comparación entre los valores de contenido de PDA de suspensiones con 5% p/v de PT tratadas térmicamente a 75 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-0	3	52.98	XXXX
5-0-C	3	52.02	XXX
5-75-10	3	59.7567	XXXXXX
5-75-10-C	3	60.5967	XXXXXX
5-75-15	3	63.61	XXXX
5-75-15-C	3	63.9	XXXX
5-75-20	3	66.91	XXX
5-75-20-C	3	67.4733	XXX
5-75-25	3	69.57	X
5-75-25-C	3	70.0233	X

Tabla AI.10. Comparación entre los valores de contenido de PDA de suspensiones con 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 75 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
9-S	3	51.4767	XX
9-S-C	3	51.02	X
9-75-10	3	58.2733	XXXXXX
9-75-10-C	3	55.3167	XXX
9-75-15	3	61.0767	XXXXXX
9-75-15-C	3	58.8333	XXXXXX
9-75-20	3	62.4533	XXXXX
9-75-20-C	3	61.69	XXXXXX
9-75-25	3	64.0833	XXXX
9-75-25-C	3	63.9833	XXXX

Tabla AI.11. Comparación entre los valores de contenido de PDA de suspensiones con 5% p/v de PT tratadas térmicamente a 77,5 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	52.98	XXXX
5-S-C	3	52.02	XXX
5-77,5-4	3	57.8467	XXXXXX
5-77,5-4-C	3	57.4333	XXXXXX
5-77,5	3	60.87	XXXXXXXX
5-77,5-C	3	60.8	XXXXXX
5-77,5-8	3	63.1467	XXXXX
5-77,5-8-C	3	64.7233	XXXX
5-77,5-10	3	66.65	XXXX
5-77,5-10-C	3	66.6533	XXXX

Tabla AI.12. Comparación entre los valores de contenido de PDA entre suspensiones con 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 77,5 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
9-S	3	51.4767	XX
9-S-C	3	51.02	X
9-77,5-4	3	56.9	XXXXX
9-77,5-4-C	3	57.0533	XXXXX
9-77,5-6	3	59.8033	XXXXXXXX
9-77,5-6-C	3	59.3467	XXXXXX
9-77,5-8	3	61.79	XXXXXX
9-77,5-8-C	3	61.4333	XXXXXX
9-77,5-10	3	64.1867	XXXX
9-77,5-10-C	3	63.17	XXXXX

Tabla AI.13. Comparación de las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación entre suspensiones con 5 y 9% de PT tratadas a 70 °C.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.411682	1	0.411682	693.40	0.0000
Interceptos	0.0136533	1	0.0136533	23.00	0.0001
Pendientes	0.009375	1	0.009375	15.79	0.0005
Modelo	0.43471	3			

Tabla AI.14. Comparación de las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación entre suspensiones con 5 y 9% de PT tratadas a 72,5 °C.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.582596	1	0.582596	1702.61	0.0000
Interceptos	0.0362468	1	0.0362468	105.93	0.0000
Pendientes	0.00252771	1	0.00252771	7.39	0.0115
Modelo	0.62137	3			

Tabla AI.15. Comparación de las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación entre suspensiones con 5 y 9% de PT tratadas a 75 °C.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.49501	1	0.49501	725.34	0.0000
Interceptos	0.05547	1	0.05547	81.28	0.0000
Pendientes	0.0183928	1	0.0183928	26.95	0.0000
Modelo	0.568873	3			

Tabla AI.16. Comparación de las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación entre suspensiones con 5 y 9% de PT tratadas a 77,5 °C.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.36358	1	0.36358	1109.58	0.0000
Interceptos	0.0106408	1	0.0106408	32.47	0.0000
Pendientes	0.000998288	1	0.000998288	3.05	0.0927
Modelo	0.375219	3			

Tabla AI.17. Comparación entre las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación de las suspensiones con 5% p/v de PT tratadas térmicamente a 70 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.595623	1	0.595623	786.85	0.0000
Interceptos	0.000283736	1	0.000283736	0.37	0.5457
Pendientes	0.00104069	1	0.00104069	1.37	0.2516
Modelo	0.596947	3			

Tabla AI.18. Comparación entre las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación de las suspensiones con 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 70 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.281296	1	0.281296	1272.95	0.0000
Interceptos	0.00717333	1	0.00717333	32.46	0.0000
Pendientes	0.00015316	1	0.00015316	0.69	0.4127
Modelo	0.288622	3			

Tabla AI.19. Comparación entre las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación de las suspensiones con 5% p/v de PT tratadas térmicamente a 72,5 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.533842	1	0.533842	905.35	0.0000
Interceptos	0.0689411	1	0.0689411	116.92	0.0000
Pendientes	0.00687424	1	0.00687424	11.66	0.0021
Modelo	0.609657	3			

Tabla AI.20. Comparación entre las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación de las suspensiones con 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 72,5 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.302433	1	0.302433	959.57	0.0000
Interceptos	0.0365313	1	0.0365313	115.91	0.0000
Pendientes	0.00561908	1	0.00561908	17.83	0.0003
Modelo	0.344583	3			

Tabla AI.21. Comparación entre las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación de las suspensiones con 5% p/v de PT tratadas térmicamente a 75 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.742902	1	0.742902	1568.01	0.0000
Interceptos	0.00047145	1	0.00047145	1.00	0.3277
Pendientes	0.000898283	1	0.000898283	1.90	0.1803
Modelo	0.744272	3			

Tabla AI.22. Comparación entre las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación de las suspensiones con 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 75 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.337684	1	0.337684	782.62	0.0000
Interceptos	0.00738084	1	0.00738084	17.11	0.0003
Pendientes	0.000158106	1	0.000158106	0.37	0.5502
Modelo	0.345223	3			

Tabla AI.23. Comparación entre las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación de las suspensiones con 5% p/v de PT tratadas térmicamente a 77,5 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.451728	1	0.451728	996.62	0.0000
Interceptos	0.0000418134	1	0.00004181	0.09	0.7638
Pendientes	0.00140892	1	0.00140892	3.11	0.0896
Modelo	0.453179	3			

Tabla AI.24. Comparación entre las constantes cinéticas de desnaturalización-agregación de las suspensiones con 9% p/v de PT tratadas térmicamente a 77,5 °C sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Tiempo	0.307983	1	0.307983	1956.61	0.0000
Interceptos	0.000894063	1	0.00089406	5.68	0.0248
Pendientes	0.000269537	1	0.00026953	1.71	0.2021
Modelo	0.309147	3			

Tabla AI.25. Análisis estadístico para comparación entre los parámetros reológicos α de suspensiones de WPC tratadas térmicamente sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	0,000113778	1	0,000113778	15,34	0,0007
B:muestra	0,000400222	5	0,0000800444	10,79	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,000444222	5	0,0000888444	11,98	0,0000
RESIDUOS	0,000178	24	0,00000741667		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00113622	35			

* Códigos:

Tratamiento: tratamiento térmico, tratamiento térmico y congelación.

Muestra: suspensiones sin tratamiento térmico, suspensiones tratadas térmicamente.

Como se observó interacción, se realizó el análisis con los datos por separado usando ANOVA de un solo factor (Glantz y Slinker, 1990).

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	0,0246667	X
5-72,5	3	0,0253333	X
5-77,5	3	0,026	X
9-S	3	0,024	X
9-72,5	3	0,0186667	X
9-77,5	3	0,0406667	X

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	0,0246667	X
5-S-C	3	0,0236667	X
9-S	3	0,024	X
9-S-C	3	0,025	X
5-72,5	3	0,0253333	X
5-72,5	3	0,023	X
5-77,5	3	0,026	X
5-77,5-C	3	0,023	X
9-72,5	3	0,0186667	X
9-72,5-C	3	0,0213333	X
9-77,5	3	0,0406667	X
9-77,5-C	3	0,022	X

Tabla AI.26. Análisis estadístico para comparación entre los parámetros reológicos x de suspensiones de WPC tratadas térmicamente sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	0,0230534	1	0,0230534	29,11	0,0000
B:muestra	0,0940986	5	0,0188197	23,77	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0858628	5	0,0171726	21,69	0,0000
RESIDUOS	0,019004	24	0,000791833		
TOTAL (CORREGIDO)	0,222019	35			

* Códigos:

Tratamiento: tratamiento térmico, tratamiento térmico y congelación.

Muestra: suspensiones sin tratamiento térmico, suspensiones tratadas térmicamente.

Como se observó interacción, se realizó el análisis con los datos por separado usando ANOVA de un solo factor (Glantz y Slinker, 1990).

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	2,01133	X
9-S	3	2,01933	X
5-72,5	3	2,005	X
5-77,5	3	1,98733	X
9-72,5	3	2,11433	X
9-77,5	3	1,78633	X

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	2,01133	X
5-S-C	3	2,04133	XX
9-S	3	2,01933	X
9-C	3	2,014	X
5-72,5	3	2,005	X
5-72,5-C	3	2,033	XX
5-77,5	3	1,98733	X
5-77,5-C	3	2,028	X
9-72,5	3	2,11433	X
9-72,5-C	3	2,066	XX
9-77,5	3	1,78633	X
9-77,5-C	3	2,045	XX

Tabla AI.27. Análisis estadístico para comparación entre los parámetros reológicos *b* de suspensiones de WPC tratadas térmicamente sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	0,000113778	1	0,000113778	16,86	0,0004
B:muestra	0,0138476	5	0,00276951	410,30	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,000218222	5	0,0000436444	6,47	0,0006
RESIDUOS	0,000162	24	0,00000675		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0143416	35			

* Códigos:

Tratamiento: tratamiento térmico, tratamiento térmico y congelación.

Muestra: suspensiones sin tratamiento térmico, suspensiones tratadas térmicamente.

Como se observó interacción, se realizó el análisis con los datos por separado usando ANOVA de un solo factor (Glantz y Slinker, 1990).

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	0,00466667	X
5-72,5	3	0,00766667	X
5-77,5	3	0,01133333	X
9-S	3	0,00766667	X
9-72,5	3	0,03233333	X
9-77,5	3	0,06633333	X

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	0,00466667	X
5-S-C	3	0,006	X
9-S	3	0,00766667	X
9-S-C	3	0,009	X
5-72,5	3	0,00766667	X
5-72,5-C	3	0,00633333	X
5-77,5	3	0,01133333	X
5-77,5-C	3	0,008	X
9-72,5	3	0,03233333	X
9-72,5-C	3	0,02566667	X
9-77,5	3	0,06633333	X
9-77,5-C	3	0,05366667	X

Tabla AI.27. Análisis estadístico para comparación entre los parámetros reológicos y de suspensiones de WPC tratadas térmicamente sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	0,000300444	1	0,000300444	1,35	0,2571
B:muestra	0,665039	5	0,133008	596,67	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0877356	5	0,0175471	78,72	0,0000
RESIDUOS	0,00535	24	0,000222917		
TOTAL (CORREGIDO)	0,758425	35			

* Códigos:

Tratamiento: tratamiento térmico, tratamiento térmico y congelación.

Muestra: suspensiones sin tratamiento térmico, suspensiones tratadas térmicamente.

Como se observó interacción, se realizó el análisis con los datos por separado usando ANOVA de un solo factor.

Contraste Múltiple de Rango para y según muestra

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	1,17733	XX
5-72,5	3	1,10633	X
5-77,5	3	1,05433	X
9-S	3	1,11867	X
9-72,5	3	0,872	X
9-77,5	3	0,727667	X

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	1,17733	XX
5-S-C	3	1,03133	XX
9-S	3	1,11867	X
9-S-C	3	0,999667	X
5-72,5	3	1,10633	X
5-72,5-C	3	1,193	X
5-77,5	3	1,05433	X
5-77,5-C	3	1,14	XX
9-72,5	3	0,872	X
9-72,5-C	3	0,924333	X
9-77,5	3	0,727667	X
9-77,5-C	3	0,802667	X

Tabla AI.28. Análisis estadístico para comparación entre los tiempos característicos (τ_c) de suspensiones de WPC tratadas térmicamente sin congelar y sometidas al proceso de congelación.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	0,681175	1	0,681175	9,87	0,0044
B:muestra	117,207	5	23,4415	339,72	0,0000
INTERACCIONES					
AB	20,5049	5	4,10097	59,43	0,0000
RESIDUOS	1,65604	24	0,0690016		
TOTAL (CORREGIDO)	140,05	35			

* Códigos:

Tratamiento: tratamiento térmico, tratamiento térmico y congelación.

Muestra: suspensiones sin tratamiento térmico, suspensiones tratadas térmicamente.

Como se observó interacción, se realizó el análisis con los datos por separado usando ANOVA de un solo factor (Glantz y Slinker, 1990).

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	7,247	X
5-72,5	3	3,67833	X
5-77,5	3	2,42533	X
9-S	3	3,512	X
9-72,5	3	0,642667	X
9-77,5	3	0,626667	X

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
5-S	3	7,247	X
5-S-C	3	3,93867	X
9-S	3	3,512	XX
9-S-C	3	2,83233	XX
5-72,5	3	3,67833	X
5-72,5-C	3	5,001	X
5-77,5	3	2,42533	X
5-77,5-C	3	3,37633	XX
9-72,5	3	0,642667	X
9-72,5-C	3	0,849333	X
9-77,5	3	0,626667	X
9-77,5-C	3	0,483667	X

Tabla AI.29. Análisis estadístico entre los valores de contenido de humedad de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	4,092	1	4,092	3,46	0,0812
B:días	2,99041	3	0,996804	0,84	0,4898
INTERACCIONES					
AB	0,133912	3	0,0446375	0,04	0,9898
RESIDUOS	18,9029	16	1,18143		
TOTAL (CORREGIDO)	26,1192	23			

* Códigos:

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Días: días de maduración.

Tabla AI.30. Análisis estadístico entre los valores de pH de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	0,119004	1	0,119004	125,82	0,0000
B:días	0,00884583	3	0,00294861	3,12	0,0555
INTERACCIONES					
AB	0,0412125	3	0,0137375	14,52	0,0001
RESIDUOS	0,0151333	16	0,000945833		
TOTAL (CORREGIDO)	0,184196	23			

* Códigos:

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Días: días de maduración.

Como se observó interacción, se realizó el análisis con los datos por separado usando ANOVA de un solo factor ([Glantz y Slinker, 1990](#)).

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
QR-1	3	5,27333	X
QR-21	3	5,18	XX
QR-48	3	5,10667	X
QR-76	3	5,16667	X

Muestra	Frec.	Media	Grupos homogéneos
QC-1	3	5,28333	X
QC-21	3	5,34	X
QC-48	3	5,34667	X
QC-76	3	5,32	XX

Muestra	Frec.	Media	Grupos homogéneos
QR-1	3	5,28333	X
QC-1	3	5,27333	X
QR-21	3	5,34	X
QC-21	3	5,18	X
QR-48	3	5,34667	X
QC-48	3	5,10667	X
QR-76	3	5,32	X
QC-76	3	5,16667	X

Tabla AI.31. Análisis estadístico entre los valores de concentración de sal de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	0,06	1	0,06	2,78	0,1151
B:días	0,59215	3	0,197383	9,13	0,0009
INTERACCIONES					
AB	0,0258333	3	0,00861111	0,40	0,7560
RESIDUOS	0,3458	16	0,0216125		
TOTAL (CORREGIDO)	1,02378	23			

* Códigos:

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Días: días de maduración.

Días	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Día 1	6	0,425	0,0600174	X
Día 21	6	0,81	0,0600174	X
Día 48	6	0,803333	0,0600174	X
Día 76	6	0,725	0,0600174	X

Tabla AI.32. Análisis estadístico entre los valores de contenido de proteína total de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	2,49615	1	2,49615	3,04	0,1005
B:días	2,82823	3	0,942744	1,15	0,3602
INTERACCIONES					
AB	2,65228	3	0,884094	1,08	0,3872
RESIDUOS	13,1463	16	0,821642		
TOTAL (CORREGIDO)	21,1229	23			

* Códigos:

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Días: días de maduración.

Tabla AI.33. Análisis estadístico entre los valores de índice de maduración (IM) de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:tratamiento	8,76525	1	8,76525	15,56	0,0012
B:días	194,238	3	64,7461	114,94	0,0000
INTERACCIONES					
AB	4,75338	3	1,58446	2,81	0,0727
RESIDUOS	9,01305	16	0,563315		
TOTAL (CORREGIDO)	216,77	23			

* Códigos:

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Días: días de maduración.

Días	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Día 1	6	3,84633	0,306408	X
Día 21	6	7,009	0,306408	X
Día 48	6	9,08567	0,306408	X
Día 76	6	11,607	0,306408	X

Tratamiento	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
QR	12	7,28267	0,216663	X
QC	12	8,49133	0,216663	X

Tabla AI.34. Análisis estadístico para comparación entre los parámetros reológicos α de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:días	1,22958E10	3	4,09859E9	19,68	0,0000
B:tratamiento	1,42652E9	1	1,42652E9	6,85	0,0187
INTERACCIONES					
AB	1,03975E9	3	3,46583E8	1,66	0,2146
RESIDUOS					
	3,33233E9	16	2,08271E8		
TOTAL (CORREGIDO)					
	1,80944E10	23			

* Códigos:

Días: días de maduración.

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Días	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Día 1	6	103308,0	5891,67	X
Día 21	6	78119,0	5891,67	X
Día 48	6	62863,8	5891,67	XX
Día 76	6	41181,5	5891,67	X

Tratamiento	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
QC	12	63658,5	4166,04	X
QR	12	79077,8	4166,04	X

Tabla AI.35. Análisis estadístico para comparación entre los parámetros reológicos x de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES*					
A:días	0,00935567	3	0,00311856	15,03	0,0001
B:tratamiento	0,000486	1	0,000486	2,34	0,1454
INTERACCIONES					
AB	0,00187433	3	0,000624778	3,01	0,0609
RESIDUOS					
	0,00331933	16	0,000207458		
TOTAL (CORREGIDO)					
	0,0150353	23			

* Códigos:

Días: días de maduración.

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Días	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Día 1	6	0,2065	0,00588017	X
Día 21	6	0,238	0,00588017	X
Día 48	6	0,243667	0,00588017	X
Día 76	6	0,261167	0,00588017	X

Tabla AI.36. Análisis estadístico para comparación entre los parámetros reológicos *b* de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES*					
A:días	8,60175E8	3	2,86725E8	8,55	0,0013
B:tratamiento	2,23185E7	1	2,23185E7	0,67	0,4266
INTERACCIONES					
AB	1,29214E8	3	4,30713E7	1,28	0,3137
RESIDUOS	5,36674E8	16	3,35421E7		
TOTAL (CORREGIDO)	1,54838E9	23			

* Códigos:

Días: días de maduración.

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Días	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Día 1	6	34499,0	2364,39	X
Día 21	6	29183,8	2364,39	X
Día 48	6	26040,0	2364,39	XX
Día 76	6	17974,5	2364,39	X

Tabla AI.36. Análisis estadístico para comparación entre los parámetros reológicos y de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC) durante el período de maduración estudiado.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES*					
A:días	0,012433	3	0,00414433	33,02	0,0000
B:tratamiento	0,000006	1	0,000006	0,05	0,8297
INTERACCIONES					
AB	0,002351	3	0,000783667	6,24	0,0052
RESIDUOS	0,002008	16	0,0001255		
TOTAL (CORREGIDO)	0,016798	23			

Códigos:

Días: días de maduración.

Tratamiento: refrigeración (QR) y proceso de congelación (QC).

Como se observó interacción, se realizó el análisis con los datos por separado usando ANOVA de un solo factor (Glantz y Slinker, 1990).

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
QR-1	3	0,185333	X
QR-21	3	0,210333	X
QR-48	3	0,232667	X
QR-76	3	0,215667	X

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
QC-1	3	0,161	X
QC-21	3	0,221	X
QC-48	3	0,222667	X
QC-76	3	0,243333	X

Muestra	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
QR-1	3	0,185333	XX
QC-1	3	0,161	X
QR-21	3	0,210333	XX
QC-21	3	0,221	XX
QR-48	3	0,232667	XX
QC-48	3	0,222667	XX
QR-76	3	0,215667	XXX
QC-76	3	0,243333	X

Tabla AI.37. Comparación entre las constantes cinéticas de decaimiento del parámetro reológico a de un queso blando magro elaborado con proteínas del suero refrigerado (QR) y congelado (QC).

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Días	2,68118	1	2,68118	54,18	0,0000
Interceptos	0,298991	1	0,298991	6,04	0,0232
Pendientes	0,00526534	1	0,00526534	0,11	0,7477
Modelo	0.43471	3			

APÉNDICE II

Cálculo de los factores a_T

El procedimiento llevado a cabo para la selección del valor a_T que superpuso satisfactoriamente los puntos experimentales de G'' consistió en los siguientes pasos:

- 1) A una determinada temperatura T y, utilizando la Ecuación 4.4., se calcularon los valores de a_T para cada frecuencia, tomando como temperatura de referencia T_0 :

Frecuencia [Hz]	a_T
ω_1	$a_{T\ 1}$
ω_2	$a_{T\ 2}$
ω_3	$a_{T\ 3}$
.....
ω_n	$a_{T\ n}$

- 2) Se graficaron los módulos corregidos G''_p (Ecuación 3.40) en función de ωa_T para definir el rango de frecuencia dónde se observó superposición de los datos experimentales (Figura AII.1).
- 3) Se calcularon las distancias entre los puntos correspondientes a la temperatura de referencia T_0 y los puntos correspondientes a la temperatura T para cada valor de a_T de acuerdo al procedimiento planteado por [Rosati y col. \(2000\)](#) (Figura AII.2.).

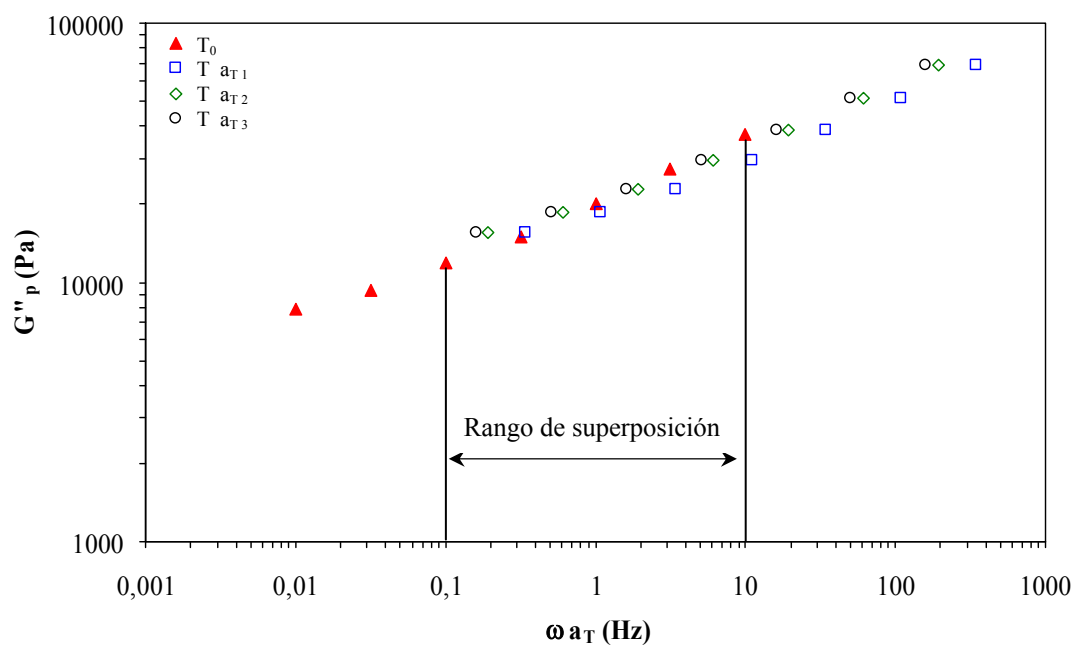


Figura AII.1. Módulos corregidos (G''_p) en función de ωa_T para diferentes factores de ajuste a_T .

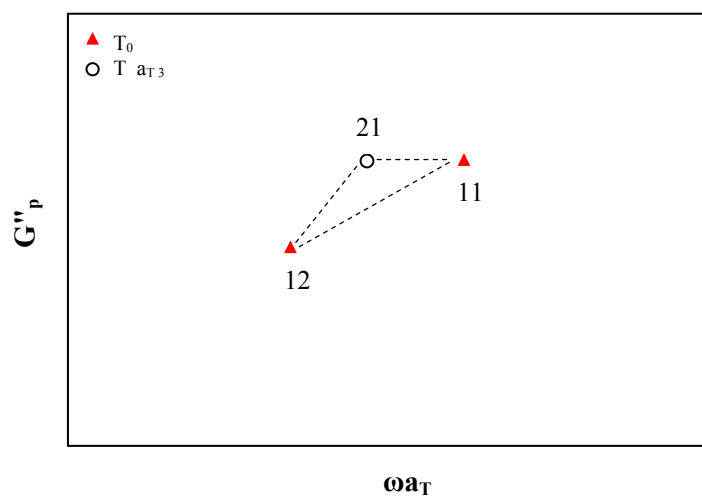


Figura AII.2. Esquema del procedimiento numérico utilizado para seleccionar el factor de ajuste a_T .

En este caso, la distancia entre 21 y 11 estará dada por:

$$d_{21}^1 = \sqrt{(\omega_{21}a_T - \omega_{11})^2 + (G''_{p21} - G''_{p11})^2}$$

y la distancia entre 21 y 12 es:

$$d_{21}^2 = \sqrt{(\omega_{21}a_T - \omega_{12})^2 + (G''_{p21} - G''_{p12})^2}$$

La sumatoria de las distancias d_{21}^1 y d_{21}^2 es un mínimo si el punto 21 cae en el segmento definido entre los puntos 11 y 12.

- 4) Se seleccionó el factor a_T que permitió obtener el menor valor de la sumatoria de las distancias para cada grupo de datos analizados.

APÉNDICE III

Determinación de los parámetros del modelo de Maxwell

El procedimiento llevado a cabo para obtención de los parámetros del modelo de Maxwell fue el propuesto por [Subramanian y col. \(2006\)](#):

- 1) Se comenzó seleccionando convenientemente los tiempos de relajación (λ_i) para reducir el número de cálculos y asegurar un mejor ajuste. Para ello se impusieron las siguientes limitaciones:

$$\lambda_{\max} \omega_{\min} > 1$$

$$\lambda_{\min} \omega_{\max} < 1$$

donde λ_{\max} es el tiempo de relajación máximo, λ_{\min} es el tiempo de relajación mínimo, ω_{\max} es la máxima frecuencia para la cual existen datos experimentales y ω_{\min} es la mínima frecuencia para la cual existen datos experimentales.

- 2) Se obtuvo el mejor valor del módulo de de relajación (G_i) para cada λ_i realizando regresiones no lineales utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows 3.0. El procedimiento se llevó a cabo por medio de la minimización de las diferencias entre los valores experimentales de los módulos y los valores predichos para cada frecuencia ω_j (Ecuaciones 3.52 y 3.53). El ajuste por medio de regresión no lineal se realizó utilizando el método Gauss-Newton.
- 3) Se debió tener en cuenta que los valores de los G_i calculados debían ser siempre positivos para que los mismos tengan un sentido físico.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Salam, M. H.; El-Etriby, H. M. (1996). Acid induced gelation of heated whey protein concentrates. *Milchwissenschaft*, 51, 327–330.
- Abrahamsen R. K. (1979). Cheesemaking from milk fortified with ultrafiltrated whey protein concentrate. *Milchwissenschaft*, 34(2), 65–68.
- Ackerson, B. J.; Pusey, P. N. (1988). Shear-induced order in suspensions of hard spheres. *Physical Reviews Letter*, 61, 1033–1036.
- Aguilera, J. M. (1995). Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 49, 83–89.
- Aider, M.; de Halleux, D.; Akbache, A. (2007). Whey cryoconcentration and impact on its composition. *Journal of Food Engineering*, 82, 92–102.
- Ak, M. M.; Gunasekaran, S. (1996). Dynamic rheological properties of Mozzarella cheese during refrigerated storage. *Journal of Food Science*, 61(3), 566–576.
- Anandharamakrishnan, C.; Rielly, C. D.; Stapley, A. G. F. (2008). Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 41, 270–277.
- Anema, S. G. (2000). Effect of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4168–4175.
- Anema, S. G.; McKenna, A. B. (1996). Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 422–428.

- AOAC. (1990). Association of Official Analytical Chemists Official methods of análisis. Volumen II: Food Composition, additives, natural contaminants. Editado por Kenneth Helrich. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, Estados Unidos.
- Ashokan, B. K.; Kokini, J. L. (2005). Determination of the WLF constants of cooked soy flour and their dependence on the extent of cooking. *Rheologica Acta*, 45(2), 192–201.
- Baldwin, K. A.; Baer, R. J.; Parsons, J. G.; Seas, S. W.; Spurgeon, K. R.; Torrey, G. S. (1986). Evaluation of yield and quality of cheddar cheese manufactured from milk with added whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 69, 2543–2550.
- Banks, J. M. (2004). The technology of low-fat cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 199–207.
- Banks, J. M.; Stewart, G.; Muir, D. D.; West, I. G. (1987). Increasing the yield of cheddar cheese by the acidification of milk containing heat-denatured whey protein. *Milchwissenschaft*, 42(4), 212–215.
- Benfeldt, C.; Sørensen, J.; Petersen, T. E. (1998). Inhibitory activity against plasmin, trypsin, and elastase in rennet whey and in cheese fortified with whey protein. *Journal of Dairy Science*, 81, 615–620.
- Bernal, V.; Jelen, P. (1985). Thermal stability of whey proteins. A calorimetric study. *Journal of Dairy Science*, 68, 2847–2852.

- Bertola N. C.; Califano A. N.; Bevilacqua A. E.; Zaritzky N. E. (1996). Textural changes and proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese frozen under various conditions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie*, 29, 470–474.
- Bertola, N. C.; Bevilacqua, A. E.; Zaritzky, N. E. (1992). Proteolytic and rheological evaluation of maturation of Tybo Argentino Cheese. *Journal of Dairy Science*, 75, 3273–3281.
- Bertola, N.; Bevilacqua, A.; Califano, A.; Zaritzky, N. (1999). Vinculación entre el comportamiento reológico y los cambios microestructurales en quesos madurados en películas plásticas. En VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Rafaela, Santa Fe, Argentina.
- Bevilacqua, A. E. (1997). Propiedades físico-químicas y comportamiento reológico en la maduración de quesos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Bhargava, A.; Jelen, P. (1995). Freezing of whey protein concentrate solutions and its effect on protein functionality indicators. *International Dairy Journal*, 5, 533–54.
- Bird, R. B.; Armstrong, R.; Hassager, O. (1977). Dynamics of polymeric liquids. Vol. I, John Wiley & Sons, New York, Estados Unidos.
- Blond, G.; Le Meste, M. (2004). Principles of frozen storage. En *Handbook of Frozen Foods*. Editado por Y. H. Hui, I. Guerrero Legaretta, P. Cornillon, M. H. Lim, K. D. Murrell, W. Nip. CRC Press, Cambridge, Inglaterra.

- Brown, J. A.; Foegeding, E. A.; Daubert, C. R.; Drake, M. A.; Gumpertz, M. (2003). Relationships among rheological and sensorial properties of young cheeses. *Journal of Dairy Science*, 86, 3054–3067.
- Brown, R. J.; Ernstrom A. (1982). Incorporation of ultrafiltration concentrated whey solids into cheddar cheese for increased yield. *Journal of Dairy Science*, 65, 2391–2395.
- Bryant, C. M.; McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 143–151.
- Bryant, C. M.; McClements, D. J. (2000a). Influence of NaCl and CaCl₂ on cold-set gelation of heat-denatured whey protein. *Journal of Food Science*, 65(2), 259–263.
- Bryant, C. M.; McClements, D. J. (2000b). Optimizing preparation conditions for heat-denatured whey protein solutions to be used as cold-gelling ingredients. *Journal of Food Science*, 65(2), 259–263.
- Bylund, G. (1995). Whey processing. En *Dairy Processing Handbook*. Editado por Tetra Pak Processing Systems AB, Suecia.
- CAA. (2006). Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII: Alimentos Lácteos. En: <http://www.anmat.gov.ar/CODIGOA/CAA1.HTM>.
- Califano A. N.; Bevilacqua A. E. (1999). Freezing low moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. *Food Chemistry*, 64, 193–198.

- Cervantes, M. A.; Lund, D. B.; Olson, N. F. (1983). Effects of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese texture. *Journal of Dairy Science*, 66, 204–2133.
- Chaves, A. C. S. D.; Viotto, W. H; Grosso, C. R. F. (1999). Proteolysis and functional properties of Mozzarella cheese as affected by refrigerated storage. *Journal of Food Science*, 64(2), 202–205.
- Chen, X. D.; Chen, Z. D.; Nguang, S. K.; Anema, S. (1998). Exploring the reaction kinetics of whey protein denaturation/aggregation by assuming the denaturation step reversible. *Biochemical Engineering Journal*, 2, 63–69.
- Chevalier, F.; Chobert, J.; Popineau, Y.; Nicolasa, M. G.; Haertlé, T. (2001). Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, 11, 145–152.
- Creamer, L. K.; Olson, N. F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631–636, 646.
- Dalgleish, D. G.; Senaratne, V.; Francois, S. (1997). Interactions between α -lactalbumin and β -lactoglobulin in the early stages of heat denaturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4806–4813.
- Dave, R. I.; Sharma, P.; Muthukumarappan, K. (2003). Effects of starter culture and coagulating enzymes on viscoelastic behavior and melt of mozzarella Cheese. *Journal of Food Science*, 68(4), 1404–1410.

- de la Fuente, M. A.; Hemar, Y.; Tamehana, M.; Munro, P. A.; Singh, H. (2002a). Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 12, 361–369.
- de la Fuente, M. A.; Singh H.; Hemar, Y. (2002b). Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 262–274.
- de Wit, J. N. (1981). Structure and functional behaviour of whey proteins. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35, 47–64.
- de Wit, J. N. (1990). Thermal stability and functionality of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 73, 3602–3612.
- de Wit, J. N.; Hontelez-Backx, E.; Adamse, M. (1988). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 3. Functional properties in aqueous solution. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42, 155–172.
- de Wit, J. N.; Klarenbeek, G.; Adamse, M. (1986). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and composition. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 41–56.
- de Wit, J. N.; Klarenbeek, G.; Hontelez-Backx, E. (1983). Evaluation and functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 1. Isolation and characterization. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 37, 37–49.

- Diefes, H. A.; Rizvi, S. H.; Bartsch, J. A. (1993). Rheological behavior of frozen and thawed low-moisture part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 58(4), 764–769.
- Ennis, M. P.; Mulvihill, D. M. (2000). Milk Proteins. En *Handbook of hidrocolloids*. Editado por G. O. Phillips y P.A. Williams. Woodhead Publshing Editors. CRC Press. Cambridge. Inglaterra.
- Fenelon, M. A.; Guinee, T. P. (1997). The compositional, textural and maturation characteristics of reduced-fat Cheddar made from milk containing added Dairy-LoTM. *Milchwissenschaft*, 52, 385–389.
- Fenelon, M. A.; Guinee, T. P. (2000). Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal*, 10, 151–158.
- Fenema O.; Powrie W.;Narth E. (1973). *Low temperature preservation of food and living matter*. Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.
- Ferry, J. D. (1970). *Viscoelastic Properties of Polymers*. John Willey & Sons, New York, Estados Unidos.
- Fox, P. F. (1963). Potentiometric determination of salt in cheese. *Journal of Dairy Science*, 46, 744–745.
- Fox, P. F. (1987). Cheese: an overview. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Volumen I. Editado por P. F. Fox. Elsevier Applied Science, Londres, Inglaterra.

- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379–1400.
- Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12, 457–509.
- Franco, J. M.; Borjano, M.; Gallegos, C. (1997). Linear viscoelasticity of salad dressing emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 713–719.
- Franks, F.; Hatley, R. H. M. (1991). Stability of proteins at subzero temperatures: thermodynamics and some ecological consequences. *Pure and Applied Chemistry*, 63(10), 1367–1380.
- Fu, J.; Mulvaney, S. J.; Cohen, C. (1997). Effect of added fat on the rheological properties of wheat flour doughs. *Cereal Chemistry*, 74(3), 304–311.
- Garret, J. M.; Stairs, R. A.; Annet, R. G. (1988). Thermal denaturation and coagulation of whey proteins: effect of sugars. *Journal of Dairy Science*, 71, 10–16.
- Geurts, T. J.; Walstra, P.; Muller, H. (1974). Transport of salt and water during salting of cheese. I. Analysis of the process involves. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 28, 102–129.
- Giroux, H. J.; Britten, M. (2004). Heat-treatment of whey proteins in the presence of anionic surfactants. *Food Hydrocolloids*, 18, 685–692.
- Glantz, S. A.; Slinker, B. K. (1990). *Primer of applied regression and analysis of variance*. McGraw-Hill Inc, New York, Estados Unidos.

- Gravier, N. G.; Zaritzky, N. E.; Califano, A. N. (2004). Viscoelastic behavior of refrigerated and frozen low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 9, 123–128.
- Guinee, T. P. (2004) Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 99–109.
- Guinee, T. P.; Feeney, E. P.; Auty, M. A. E.; Fox, P. F. (2002). Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 1655–1669.
- Guo, M. R.; Gilmore, J. A.; Kindstedt, P. S. (1997). Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 80, 3092–3098.
- Haque, Z. U.; Küçükönen, E.; Aryana, K. J. (2007). Influence of fat-replacing ingredients on process and age induced soluble nitrogen content and ultrastructure of lowfat Cheddar cheese. *Food Science and Technology Research*, 13, 338–344.
- Hillier, R. M.; Lyster, R. L. J.; Cheeseman, G. C. (1979). Thermal denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cheese whey: Effect of total solids concentration and pH. *Journal of Dairy Research*, 46, 103–111.
- Hines, M. E.; Foegeding, E. A. (1993). Interactions of α -lactalbumin and bovine serum albumin with β -lactoglobulin in thermally induced gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3), 341–346.
- Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11, 495–503.

- Hoffman, M. A. M.; van Mil, P. J. J. M. (1997). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin: role of the thiol group and disulfide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2942–2948.
- Hongsprabhas, P.; Barbut, S. (1996). Ca^{2+} -induced gelation of whey protein isolate: effects of pre-heating. *Food Research International*, 29, 135–139.
- Hudson, H. M.; Daubert, C. R.; Foegeding, E. A. (2000). Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3112–3119.
- Huffman, L. M. (1996). Processing whey protein for use as a food ingredient. *Food Technology*, 50, 49–52.
- Iametti, S.; Cairoli, S.; De Gregori, B.; Bonomi, F. (1995). Modifications of high-order structures upon heating of β -lactoglobulin: dependence on the protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 53–58.
- IDF. (1969). International Dairy Federation. Determination of the Fat Content of Cheese and of Processed Cheese Products. IDF Standard 5A, Bruselas, Bélgica.
- Ikeda, S.; Nishinari, K. (2000). Intermolecular forces in bovine serum albumin solutions exhibiting solidlike mechanical behaviors. *Biomacromolecules*, 1, 757–763.
- Ikeda, S.; Nishinari, K. (2001a). On solid-like rheological behaviors of globular protein solutions. *Food Hydrocolloids*, 15, 401–406.

- Ikeda, S.; Nishinari, K. (2001b). Solid-like mechanical behaviors of ovalbumin aqueous solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 315–320.
- Ikeda, S.; Nishinari, K.; Foegeding, E. A. (2001). Mechanical characterization of network formation during heat-induced gelation of whey protein dispersions. *Biopolymers*, 56, 109–119.
- Inoue, H.; Matsumoto, T. (1996). Viscoelastic characterization of solid-like structure in aqueous colloids of globular proteins. *Colloids Surfaces A*, 109, 89–96.
- Jaskulka, F. J.; Smith, D. E.; Larntz, K. (2000). Determining the kinetic reaction rate order for the thermal denaturation of β -lactoglobulin using two statistical approaches. *International Dairy Journal*, 10, 589–595.
- Kapoor, R.; Metzger, L. E. (2004). Evaluation of Salt Whey as an Ingredient in Processed Cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 1143–1150.
- Kasapis, S. (2001). The use of Arrhenius and WLF kinetics to rationalise the rubber-to-glass transition in high sugar-kappa-carrageenan systems. *Food Hydrocolloids*, 15, 239–245.
- Kavas, G.; Oysun, G.; Kinik, O.; Uysal, H. (2004). Effect of some fat replacers on chemical, physical and sensory attributes of low-fat white pickled cheese. *Food Chemistry*, 88, 381–388.
- Kazmierskim, M.; Corredig, M. (2003). Characterization of soluble aggregates from whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 17, 685–692.

- Kilara, A. (2004). Whey Proteins. En *Proteins in Food Processing*. Editado por R. Y Yada. Woodhead Publishing CRC, Cambridge, Inglaterra.
- Koca, N.; Metin, M. (2004). Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh Kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 365–373.
- Kuchroo, C. N.; Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, 331–335.
- Kulmyrzaev, A.; Cancelliere, C.; McClements, D. J. (2000). Influence of sucrose on cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1314–1318.
- Kulmyrzaev, A.; McClements, D. J. (2000). High frequency dynamic shear rheology of honey. *Journal of Food Engineering*, 45, 219–224.
- Kuo, M. I.; Gunasekaran S. (2003). Effect of frozen storage on physical properties of pasta filata and nonpasta filata Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 1108–1117.
- Law, A. J. R.; Banks, J. M.; Horne, D. S.; Leaver, J.; West, I. G. (1994). Denaturation of the whey proteins in heated milk and their incorporation into cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, 49(2), 63–67.
- Law, A. J. R.; Leaver, J. (1997). Effect of protein concentration on rates of thermal denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4255–4261.

- Law, A. J. R.; Leaver, J. (2000). Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3), 672–679.
- Law, B. A. (1987). Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Volumen 1. Editado por P. F. Fox. Elsevier Applied Science, Londres, Inglaterra.
- Lawrence, R. C.; Creamer, L. K.; Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70, 1748–1760.
- Lawrence, R.; Consolacion, F.; Jelen, P. (1986). Formation of structured protein foods by freeze texturization. *Food Technology*, 40, 77–90.
- Le Bon, C.; Nicolai, T.; Durand, D. (1999a). Growth and structure of aggregates of heat-denatured β -lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 451–465.
- Le Bon, C.; Nicolai, T.; Durand, D. (1999b). Kinetics of aggregation and gelation of globular proteins after heat-induced denaturation. *Macromolecules*, 32, 6120–6127.
- Lelièvre, J. (1995). Whey proteins in cheese-an overview. En *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*. Editado por E. L. Malin y M. H. Tunick. Plenum Press, New York, Estados Unidos.
- Li-Chan, E. (1983). Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 48, 47–56.
- Lindsay, H. M.; Chaikin, P. M. (1982). Elastic properties of colloidal crystals and glasses. *Journal of Chemical Physics*, 36, 3774–3781.

- Lizarraga, M. S.; De Piante Vicin, D.; Gonzalez, R.; Rubiolo, A.; Santiago, L. G. (2006). Rheological behaviour of whey protein concentrate and λ -carrageenan aqueous mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20, 740–748.
- Lucey, J. A.; Fox, P. F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1714–1724.
- Lucey, J. A.; Johnson, M. E.; Horne, D. S. (2003). Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86 (9), 2725–2743.
- Lück, H. (1977). Preservation of cheese and perishable products by freezing. *South Africa Journal of Dairy Technology*, 9(4), 127–112.
- Luna, J. A.; Chavez, M. S. (1992). Mathematical model for water diffusion during brining of hard and semi-hard cheese. *Journal of Food Science*, 57, 55–58.
- Ma, L.; Drake, M. A.; Barbosa-Canovas, G. V.; Swanson, B. G. (1997). Rheology of full-fat and low-fat Cheddar cheeses as related to type of fat mimetic. *Journal of Food Science*, 62, 748–752.
- McKenna, B. M.; O'Sullivan, A. C. (1970). Whey protein denaturation in concentrated skim milks. *Journal of Dairy Science*, 54, 1075–1077.
- McMahon, D. J.; Alleyne, M. C.; Fife, R. L.; Oberg, C. J. (1996). Use of fat replacers in low fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 79, 1911–1921.
- Mead, D.; Roupas, P. (2001). Effect of incorporation of denatured whey proteins on chemical composition and functionality of pizza cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 56(4), 19–23.

- Mendieta-Taboada, O.; Sobral, P. J. A.; Carvalho, R. A.; Habitante, A. M. B. Q. (2008). Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 22, 1485–1492.
- Meza, B. E.; Verdini, R. A.; Rubiolo A. C. (2009). Viscoelastic behaviour of heat-treated whey protein concentrate suspensions. *Food Hydrocolloids*, 23, 661–666.
- Mistry, V. V. (2001). Low fat cheese technology. *International Dairy Journal*, 11, 413–422.
- Mleko, S. (2004). Rheological properties of whey products dispersions. *Milchwissenschaft*, 59, 287–290.
- Mleko, S.; Foegeding, E. A. (1999). Formation of whey protein polymers: effects of a two-step heating process on rheological properties. *Journal of Texture Studies*, 30, 137–149.
- Mleko, S.; Foegeding, E. A. (1999). Formation of whey protein polymers: effects of a two-step heating process on rheological properties. *Journal of Texture Studies*, 30, 137–149.
- Morr, C. V. (1990). Effect of heating and elevated temperature storage on cheese whey. *Journal of Food Science*, 55, 1177–1179.
- Morr, C. V.; Foegeding, E. A. (1990). Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, 44, 100–112.

- Muliawan, E. B.; Hatzikiriakos, S. G. (2007). Rheology of mozzarella cheese
International Dairy Journal, 17, 1063–1072.
- Mulvihill, D. M.; Kinsella, J. E. (1987). Gelation characteristics of whey proteins and
 β -lactoglobulin. Food Technology, 41, 102–111.
- Nickerson, M. T.; Paulson, A. T.; Spears, R. A. (2004). Time-temperature studies of
gellan polysaccharide gelation in the presence of low, intermediate and high
level of co-solutes. Food Hydrocolloids, 18, 783–794.
- Nickerson, M. T.; Paulson, A. T.; Speers, R. A. (2004a) Time-temperature studies of
gellan polysaccharide gelation in the presence of low, intermediate and high
level of co-solutes. Food Hydrocolloids, 18, 783–794.
- Nickerson, M. T.; Paulson, A. T.; Speers, R. A. (2004b). A time-temperature
rheological approach for examining food polymer gelation. Trends in Food
Science and Technology, 15, 569–574.
- Nielsen, M. A.; Coulter, S. T.; Morr, C. V.; Rosenau, J. R. (1973). Four factor
response surface experimental design for evaluating the role of processing
variable upon protein denaturation in heated whey systems. Journal of Dairy
Science, 56, 76–83.
- Patel, M. T.; Kilara, A.; Huffman, L. M.; Hewitt, S. A.; Houlihan, A. V. (1990).
Studies on whey protein concentrates. 1. Compositional and thermal properties.
Journal of Dairy Science, 73, 1439–1449.

- Pereyra Gonzáles, A. S.; Naranjo, G. B.; Malec, L. S.; Vigo, M. S. (2003). Available lysine, protein digestibility and lactulose in comercial infant formulas. *International Dairy Journal*, 13, 95–99.
- Pikal-Cleland, K. A.; Rodríguez-Hornedo, N.; Amidon, G. L.; Carpenter, J. F. (2000). Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric β -galactosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(2), 398–406.
- Ptaszek, P.; Grzesik, M. (2007). Viscoelastic properties of maize starch and guar gum gels. *Journal of Food Engineering*, 82, 227–237.
- Punidades, P.; Feirtag, J.; Tung, M. A. (1999). Yield testing. (improving cheese yield through incorporation of whey proteins). *Dairy Industries International*, 64(9), 25, 27–28, 30.
- Puyol, P.; Cotter, P. F.; Mulvihill, D. M. (1999). Thermal gelation of commercial whey protein concentrate: influence of pH 4.6 insoluble protein on thermal gelation. *International Journal of Dairy Technology*, 52, 81–91.
- Rank, T. C.; Grappin, R.; Olson, N. F. (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review. *Journal of Dairy Science*, 68(3), 801–805.
- Rao, D. V.; Renner, E. (1988). Studies on the application of ultrafiltration for the manufacture of cheddar cheese. 1. Determination of the optimun temperature for heat denaturation of whey proteins in the ultrafiltration concentrate. *Milchwissenschaft*, 43(4), 216–218.

- Rao, M. A.; Tattiyakul, J. (1999). Granule size and rheological behavior of heated tapioca starch dispersions. *Carbohydrate Polymers*, 38, 123–132.
- Reid, D. S.; Yan, H. (2004). Rheological, melting and microstructural properties of cheddar and mozzarella cheeses affected by different freezing methods. *Journal of Food Quality*, 27, 436–458.
- Resch J. J.; Daubert, C. R. (2002). Rheological and physicochemical properties of derivatized whey protein concentrate powders. *International Journal of food Properties*, 5, 419–434.
- Rodríguez, J. (1998). Recent advances in the development of low-fat cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 249–254.
- Romeih, E. A.; Michaelidou, A.; Biliaderis, C. G.; Zerfiridis, G. K. (2002). Low-fat White-Brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. *International Dairy Journal*, 12, 525–540.
- Rosati, D.; Van Loon, B.; Navard, P. (2000). Rheology of strongly segregated poly(styrene–dimethylsiloxane) block copolymers. *Polymer*, 41, 367–375.
- Rosenberg, M.; Wang, Z; Chuang, S. L.; Shoemaker, C. F. (1995). Viscoelastic properties changes in cheddar cheese during ripening. *Journal food science*, 60(3), 640–644.
- Roufik, S.; Paquin, P.; Britten, M. (2005) Use of high-performance size exclusion chromatography to characterize protein aggregation in commercial whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 15, 231–241.

- Roupas, P.; Mead D. (2001). Whey proteins and pizza cheese. *Dairy industries international*, 66(99), 16–18.
- SAGPyA (2005). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la República Argentina. En: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>.
- Sahan, N.; Yasar, K.; Hayaloglu, A. A.; Karaca, O. B.; Kaya, A. (2008). Influence of fat replacers on chemical composition, proteolysis, texture profiles, meltability and sensory properties of low-fat Kashar cheese. *Journal of Dairy Research*, 75, 1–7.
- Sanchez, C.; Beauregard, J. L; Bimbenet, J. J; Hardy, J. (1996). Flow properties, firmness and stability of double cream cheese containing whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 61(4), 843–846.
- Santoro, M.; Faccia, M. (1996). Degradation of the protein fraction in a cheese fortified with whey proteins. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 50, 61–68.
- Sato, K.; Nakamura, M.; Nishiya, T.; Kawanari, M.; Nakajima, I. (1995). Preparation of a gel of partially heat-denatured whey protein by proteolytic digestion. *Milchwissenschaft*, 50, 389–392.
- Schramm, G. (2000). *A practical approach to rheology and rheometry*. Gebrueder HAAKE GmgH, Karlsruhe, Alemania.
- Singer, N. S. (1996). Microparticulated proteins as fat mimetics. En *Handbook of Fat Replacers*. Editado por S. Roller y S. A. Jones. CRC Press, Nuw York, Estados Unidos.

- Singer, N. S.; Yamamoto, S.; Latella, J. (1988). Protein product base. European Patent Applied N° 0.250.623.
- Singh, A. P.; Lakes, R. S. Gunasekaran, S. (2006) .Viscoelastic characterization of selected foods over an extended frequency range. *Rheologica Acta*, 46, 131–142.
- Smithers, G. W.; Copeland A. D. (1997). International whey conference. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 119–123.
- Sodini, I.; Mattas, J.; Tong, P. S. (2006). Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. *International Dairy Journal*, 16, 1464–1469.
- Sopade, P. A.; Halley, P. J.; D'arcy, B. R.; Bhandari, B.; Caffin, N. (2004). Dynamic and steady-state rheology of australian honeys at subzero temperatures. *Journal of Food Process Engineering*, 27, 284–309.
- Sousa, M. J. ; Ardö, Y.; McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis duringcheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327–345.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. Freeman Press., Miami, Estados Unidos.
- Subramanian, R.; Gunasekaran, S. (1997a). Small amplitude oscillatory shear studies on mozzarella cheese. Part I. Region of linear viscoelasticity. *Journal of Texture Studies*, 28, 633–642.

- Subramanian, R.; Gunasekaran, S. (1997b). Small amplitude oscillatory shear studies on mozzarella cheese. Part II: Relaxation spectrum. *Journal of Texture Studies*, 28, 643–656.
- Subramanian, R.; Muthukumarappan, K.; Gunasekaran, S. (2006). Linear viscoelastic properties of regular- and reduced-fat pasteurized process cheese during heating and cooling. *International Journal of Food Properties*, 9, 377–393.
- Subramanian, R.; Muthukumarappan, K.; Gunasekaran, S. (2003). Effect of methocel as a water binder on the linear viscoelastic properties of mozzarella cheese during early stages of maturation. *Journal of Texture Studies*, 34, 361–380.
- Sworn, G.; Kasapis, S. (1998). The use of Arrhenius and WLF kinetics to rationalise the mechanical spectrum in high sugar gellan systems. *Carbohydrate Research*, 309, 353–361.
- Tamaki, K.; Tsuguaki, N.; Kiyoshi, T. (1991). Process for producing textured protein food materials. United States Patent N° 5.011.702.
- Tolkach, A.; Steinle, S.; Kulozik, U. (2005). Optimization of thermal pretreatment conditions for the separation of native α -lactalbumin from whey protein concentrates by means of selective denaturation of β -lactoglobulin. *Journal of Food Science*, 70(9), E557-E566.
- Tolstoguzov, V. B; Braudo, E. E. (1983). Fabricated foodstuffs as multicomponent gels. *Journal of Texture Studies*, 14, 183–212.

- Udyarajan, C. T.; Horne, D. S.; Lucey, J. A. (2007). Use of time–temperature superposition to study the rheological properties of cheese during heating and cooling. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 686–698.
- Upreti, P.; Metzger, L. E. (2007). Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: pH changes during ripening. *Journal of Dairy Science*, 90, 1–12.
- Ustunol, Z.; Kawachi, K.; Steffe, J. (1995). Rheological properties of Cheddar cheese as influenced by fat reduction and ripening time. *Journal of Food Science*, 60, 1208–1210.
- Van Hekken, D. L.; Tunick, M. H.; Park, Y. W. (2005). Effect of frozen storage on the proteolytic and rheological properties of Soft caprine milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 88, 1966–1972.
- van Mil, P. J. M.; Roef, S. P. F. M. (1993). Denaturation of whey proteins studied by thermal analysis and chromatography. En *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*. Editado por E. Dickinson y P. Walstra. The Royal Society of Chemistry, Estados Unidos.
- Vardhanabhuti, B.; Foegeding, E. A. (1999). Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3649–3655.
- Verdini, R. A. (2000). Estudio de la variación de los parámetros químicos y físicos durante la maduración de quesos blandos conservados por congelación. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

- Verdini, R. A.; Rubiolo, A. C. (2002). Texture changes during the ripening of Port Salut Argentino cheese in 2 sampling zones. *Journal of Food Science*, 67, 1808–1813.
- Verdini, R. A.; Zorrilla, S. E.; Rubiolo, A. C. (2002). Free amino acid profiles during the ripening of Port Salut Argentino cheese after frozen storage. *Journal of Food Science*, 67(9), 3264–3270.
- Verheul, M.; Roef, S. P. F. M.; de Kruif, K. G. (1998). Kinetics of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 896–903.
- Vermant, J.; Solomon, M. J. (2005). Flow-induced structure in colloidal suspensions. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17, R187–R216.
- Walkenström, P.; Nielsen, M.; Windhab, E.; Hermansson, A. -M. (1999). Effects of flow behaviour on the aggregation of whey protein suspensions, pure or mixed with xanthan. *Journal of Food Engineering*, 42, 15–26.
- Walters, K. (1975). *Rheometry*. John Wiley & Sons, New York, Estados Unidos.
- Wang, Q.; Cui, S. W. (2005). Understanding the physical properties of food polysaccharides. En *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. Editado por S. W. Cui. CRC Press. Florida, Estados Unidos.
- Welty, W. M.; Marshall, R. T.; Grün, I. U.; Eilersieck, M. R. (2001). Effects of milk fat, cocoa butter, or selected fat replacers on flavor volatiles of chocolate ice cream. *Journal of Dairy Science*, 84, 21–30.

- Wientjes, R. H. W.; Duits, M. H. G.; Jongschaap, R. J. J.; Mellema, J. (2000). Linear rheology of guar gum solutions. *Macromolecules*, 33, 9594–9605.
- Winter, H. H.; Chambón, F. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a cross-linking polymer at the gel point. *Journal Rheology*, 30, 367-382.
- Xiaolin, T.; Pikal, M. J. (2005). The effect of stabilizers and denaturants on the cold denaturation temperatures of proteins and implications for freeze-drying. *Pharmaceutical Research*, 22(7), 1167–1175.
- Xiong, Y. L.; Dawson, K. A.; Wan, L. (1993). Thermal aggregation of β -lactoglobulin: effect of pH, ionic environment, and thiol reagent. *Journal of Dairy Science*, 76, 70–77.
- Yildiz, M. E.; Kokini, J. L. (2001). Determination of Williams-Landel-Ferry constants for a food polymer system. Effect of water activity and moisture content. *Journal of Rheology*, 45(4), 903–912.
- Zalazar, C. A.; Zalazar, C. S.; Bernal, S.; Bertola, N.; Bevilacqua, A.; Zaritzky, N. (2002). Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical, rheological and sensory properties of low fat soft cheeses. *International Dairy Journal*, 12, 45–50.
- Zorrilla, S. E.; Rubiolo, A. C. (1998). Modelling average concentrations of salt and salt substitute in partial or total volumes of semihard cylindrical cheeses. *International Journal of Food Science and Technology*, 33, 501–508.