

DETERMINACIÓN ON-LINE DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN EN LECHE DE CABRA MEDIANTE DISPERSIÓN DE RADIACIÓN NIR

On-line determination of clotting time in goat's milk by backscatter of near infrared radiation

M. Castillo¹, F.A. Payne², R. González¹, M.B. López¹, J. Laencina¹

¹Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Campus Universitario de Espinardo, E-30071, Murcia, España

²Department of Biosystems and Agricultural Engineering, 128 Charles E. Barnhart Building, University of Kentucky, Lexington, KY 40546-0276, USA

* Correspondencia a:

Manuel Castillo Zambudio

E-mail: mcastillo@um.es

Tel: +34-968-364710

Fax: +34-968-364147

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia un sensor de fibra óptica que, instalado en línea, monitoriza la coagulación de la leche de cabra. El sensor determina el incremento de reflectancia difusa (880 nm) provocado por las modificaciones físico-químicas que causan la formación del gel de caseína. Los resultados obtenidos demuestran la fuerte correlación ($R^2 = 0,99$) existente entre la variable de reflectancia difusa T_{max} y el tiempo de coagulación de Berridge, parámetro de referencia para el estudio de la actividad de las enzimas coagulantes. Se observa que T_{max} constituye un 89% del tiempo de coagulación de Berridge, lo que se atribuye a una mayor sensibilidad frente a la agregación del parámetro T_{max} . Se estima que el porcentaje de hidrólisis de la k-caseína a tiempo T_{max} es del 78%. Los resultados experimentales demuestran que T_{max} no sólo responde a los cambios de concentración de enzima según la ecuación de Foltmann, sino que también refleja fielmente los efectos del resto de factores estudiados. Por su gran sensibilidad a la agregación y consistente capacidad de respuesta a los factores de la coagulación, T_{max} representa una alternativa al método de Berridge y/o es útil como parámetro de predicción del tiempo de coagulación, lo que justifica el interés del sensor de dispersión como herramienta de control de proceso.

ABSTRACT

An on-line fiber optic sensor has been used to monitor goat's milk coagulation. The sensor determined the diffuse reflectance increase (880 nm) due to the physical and chemical modifications of casein micelles, which caused the gel formation. The results obtained showed a high correlation ($R^2 = 0.99$) between the diffuse reflectance variable, T_{max} , and the Berridge clotting time, the main reference parameter in the study of enzymatic activity of coagulating enzymes. It was observed that T_{max} is an 89% of Berridge clotting time, which was related to a bigger sensitivity of T_{max} to aggregation. It was estimated that the percentage of k-casein hydrolysis at T_{max} is 78%. The results demonstrated that T_{max} not only responded to enzyme concentration changes as predicted by the Foltmann equation but also changed consistently with other coagulation factors. For this reason, and for its high sensitivity to aggregation reaction, T_{max} was proposed as an accurate alternative to Berridge method, which justify the usefulness of the backscatter sensor as a process control tool.

Palabras Clave: Tiempo de coagulación, NIR, reflectancia difusa, fibra óptica, leche de cabra.

INTRODUCCIÓN

Para establecer el punto de gelificación de la leche durante la coagulación enzimática, tradicionalmente se recurre a la determinación del tiempo de coagulación (TC). El más común de todos los métodos propuestos, a tal fin, se basa en la observación visual de los primeros flóculos de caseína adheridos a la pared de vidrio de una botella (Sommer y Matsen, 1935) o de un tubo de ensayo (Berridge, 1952). Por su sencillez y exactitud, el tiempo de coagulación propuesto por Berridge (TCB) se ha venido utilizando habitualmente como método de referencia para la medida de la actividad de las enzimas coagulantes (norma FIL/IDF 110A: 1987; apéndice A). Posteriormente esta norma ha servido de base para elaborar otras más específicas y complejas, pero que siguen empleando TCB para estimar el punto de gelificación (estándar FIL/IDF 176: 1996; estándar FIL/IDF 157A: 1997).

Merin et al. (1989) consideran que TCB es el tiempo de latencia que separa la adición de la enzima y la formación de flóculos aparentes de caseína. Según McMahon et al. (1984a), se corresponde con la suma del tiempo mínimo empleado por la enzima para hidrolizar el porcentaje de caseína, capaz de desencadenar la reacción de agregación, y del tiempo necesario para que dicha reacción avance hasta ser captada por el ojo humano. En definitiva, TCB no es sino

una estimación del tiempo transcurrido hasta el "punto de gelificación teórico" (PGT) definido por McMahon et al. (1984a, b) como el preciso momento en el que la leche deja de comportarse como un líquido y por Ross-Murphy (1995) como la transición desde el estado sol, donde el peso molecular medio de la molécula gelificante (M_w) es finito, hasta el estado gel que supone un valor infinito de M_w .

Pero podemos utilizar parámetros no visuales, y más objetivos que TCB, para estimar PGT, basados en diferentes propiedades físicas tales como dispersión de luz, ultrasonidos, opacidad, viscosidad y conductividad eléctrica, entre otras. Los equipos más frecuentemente empleados son el formógrafo y el reómetro. Sin embargo, los TC obtenidos con diversos instrumentos representan pesos moleculares y/o grados de coagulación específicos (McMahon y Brown, 1984), por lo que la exactitud de estimación de PGT dependerá de los parámetros físicos elegidos y de la resolución del equipo.

Los recientes avances en el campo de las fibras ópticas han permitido adaptar, a la línea de producción, determinados métodos espectrofotométricos de uso generalmente laboratorial. La gran flexibilidad y el pequeño tamaño de las fibras ópticas y los potentes sistemas actuales de análisis de datos han abierto nuevas posibilidades para la monitorización de la coagulación en la cuba de cuajado, mediante dispersión de

radiación de infrarrojo próximo. El Área de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Murcia, en estrecha colaboración con el Departamento de Biosistemas e Ingeniería Agrícola de la Universidad de Kentucky, viene desarrollando experiencias sobre la aplicación de sensores de fibra óptica en el estudio y monitorización de la coagulación de leche de cabra (Castillo et al., 2000; Castillo 2001; Castillo et al., 2002; Castillo et al., 2003a, b).

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Cada experiencia consistió en un diseño factorial con tres réplicas ($n = 3$), con dos o tres factores y con a niveles en el factor A , b niveles en el factor B , y así sucesivamente. Se consideró que cada combinación de niveles de factores es un tratamiento, por lo que contando con n observaciones por tratamiento, el total de observaciones del experimento, para el caso de tres factores, se correspondió con $nabc$. El orden de realización de cada uno de los ensayos simples que constituyó el experimento se asignó aleatoriamente.

Análisis fisicoquímico de la leche de cabra

El análisis de los componentes mayoritarios de la leche de cabra empleada se realizó mediante espectrometría de infrarrojo (MilkoScan FT 120 o MilkoScan 133-B; Foss Electric A/S, Hilleroed, Denmark). Los equipos se calibraron previamente con muestras testadas de leche de cabra. El pH se determinó con un electrodo combinado de vidrio (modelo 81-04, Orion Research Inc., Boston, MA, EEUU) conectado a un analizador de iones (modelo EA 940, Orion Research Inc.).

Preparación de muestras de leche

El procedimiento seguido en las experiencias se presenta de forma esquemática en el diagrama de bloques de la Figura 1.

Determinación del tiempo de coagulación de Berridge

Antes de realizar el ensayo, la muestra de leche se calentó a la temperatura de coagulación y se dividió en dos porciones. Una parte (2kg) se introdujo en una cuba de 2 L para monitorizar la coagulación mediante el sensor óptico y la parte restante se utilizó en alícuotas de 10 mL para la determinación (por quintuplicado) de TCB mediante la norma FIL 110A (1987). En cada caso, la leche para la determinación de TCB se coaguló a la temperatura del ensayo, en vez de a 30°C como especifica la norma. A fin de comparar los parámetros de reflectancia difusa y TCB, en cada tubo de ensayo en vez de 1 mL de la disolución de enzima, como requiere el estándar, se añadieron 50 μ L para asegurar el mismo efecto de dilución tanto en los tubos de coagulación como en la cuba de cuajado. La temperatura de coagulación se controló mediante un baño termostático (Lauda RM 20, Brinkman Instrument Inc., Westbury, NY, EEUU) y el equilibrio térmico de la muestra se verificó mediante un termómetro digital (modelo 5831 A, Omega Engineering Inc., Stamford, CT, EEUU).

Enzima

La dilución de la leche causa un incremento de TC, siendo además los parámetros de reflectancia difusa muy sensibles a la dilución (Castillo, 2001). Para poder comparar TCB con los parámetros de reflectancia, a diferentes concentraciones de enzima, se requiere que la variación proporcional del volumen de la muestra de leche bebida a la adición de la enzima sea constante tanto en la cuba como en el tubo de ensayo, y para las diferentes concentraciones de enzima utilizadas. Se ensayaron concentraciones de enzima de 0,020, 0,035 y 0,050 mL kg^{-1} de leche. Previamente a la realización de cada réplica, se prepararon disoluciones en tampón acetato (pH 5,5) de quimosina B recombinante

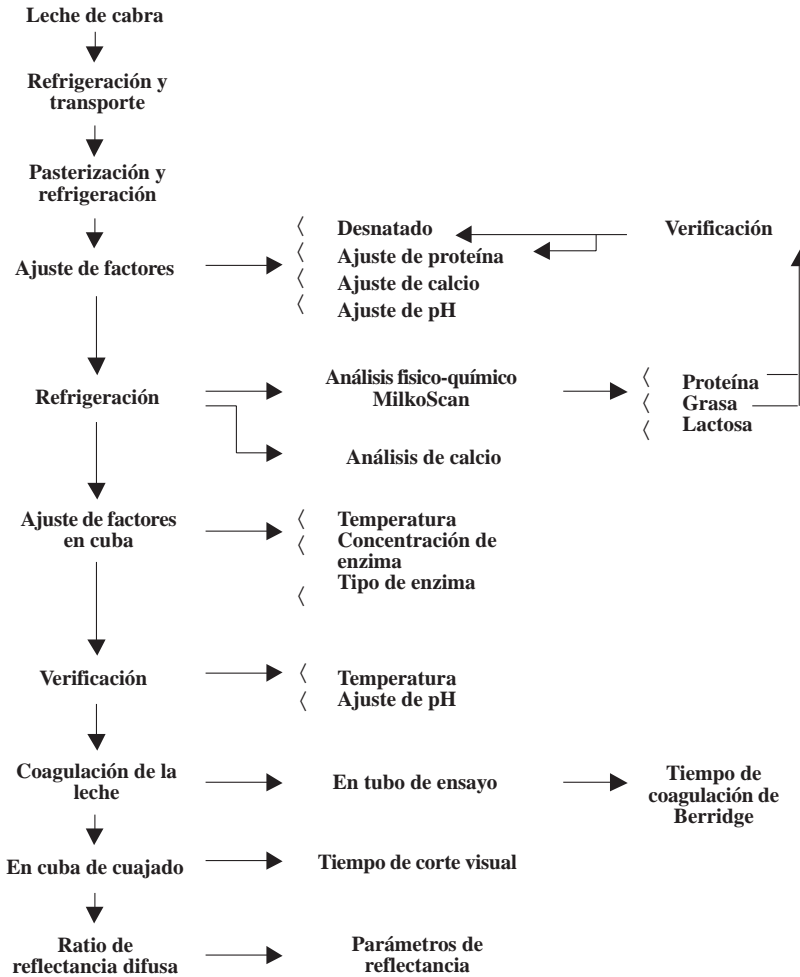


Figura 1. Diagrama de flujo de los ensayos realizados

(Chr. Hansen Inc., Milwaukee, WI, EEUU), que se mantuvieron a 2°C hasta su uso. Las diluciones de enzima se estandarizaron de forma que 10 mL suministraron respectivamente 0,04, 0,07 y 0,10 mL de quimosina recombinante a la muestra de 2 kg de leche utilizada para monitorizar la reflectancia en la cuba de cuajado y a la vez 50 µL proporcionaron respectivamente $2,0 \times 10^{-4}$, $3,5 \times 10^{-4}$ y $5,0 \times 10^{-4}$ de quimosina a los 10 mL de leche empleada para determinar TCB en los tubos de ensayo. De esta forma el efecto de dilución, medido como fracción de volumen

entre la disolución que contiene la enzima y la muestra de leche, fue de 5×10^{-3} , en ambos casos.

Obtención del perfil de reflectancia

La monitorización de la coagulación se realizó mediante un sensor de fibra óptica (modelos 3 y 4A, CoAguLite, Reflectronics, Inc., Lexington, KY, EEUU) instalado en la pared de una cuba de cuajado de acero inoxidable (15 cm x 13.3 cm x 15 cm) como se observa en la

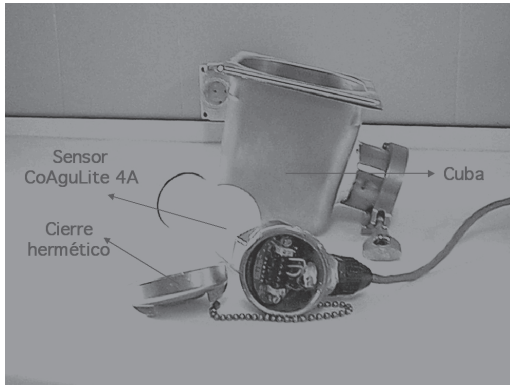


Figura 2. Sensor de reflectancia difusa

Figura 2. El voltaje se midió cada 2 s, almacenándose la media de tres medidas cada 6 s. Los primeros 10 registros de voltaje, corregidos con respecto al valor cero de reflectancia (1 V) y promediados, constituyeron el voltaje inicial (V_0). El sistema calculó, a tiempo real, la ratio de reflectancia (R), que aumentó con el tiempo constituyendo el perfil de reflectancia. R se calculó mediante división del voltaje a tiempo t (menos 1 V correspondiente al cero de reflectancia) por V_0 . También se calculó a tiempo real la primera derivada de R con respecto al tiempo

(R'), empleando lotes de 4 minutos de las medidas más recientes (41 puntos). La pendiente de cada lote de datos se calculó mediante regresión lineal cada 6 s y se asignó al punto medio de cada lote de datos. De forma similar también se calculó la segunda derivada (R''). Los parámetros obtenidos a partir del perfil de reflectancia son: T_{max} , tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la primera derivada (min); D_{max} , máximo valor de la primera derivada (min^{-1}); R_{max} , ratio de reflectancia a tiempo T_{max} (adimensional); T_{2max} , tiempo desde la adición de enzima hasta el máximo de la segunda derivada (min) y T_{2min} , tiempo desde la adición de enzima hasta el mínimo de la segunda derivada (min). El perfil de reflectancia y los principales parámetros derivados se representan en la Figura 3.

Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el Modelo Lineal General (GLM) del paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS). En el modelo estadístico se consideraron, como efectos principales, los factores del diseño experimental, incluyéndose también en el análisis

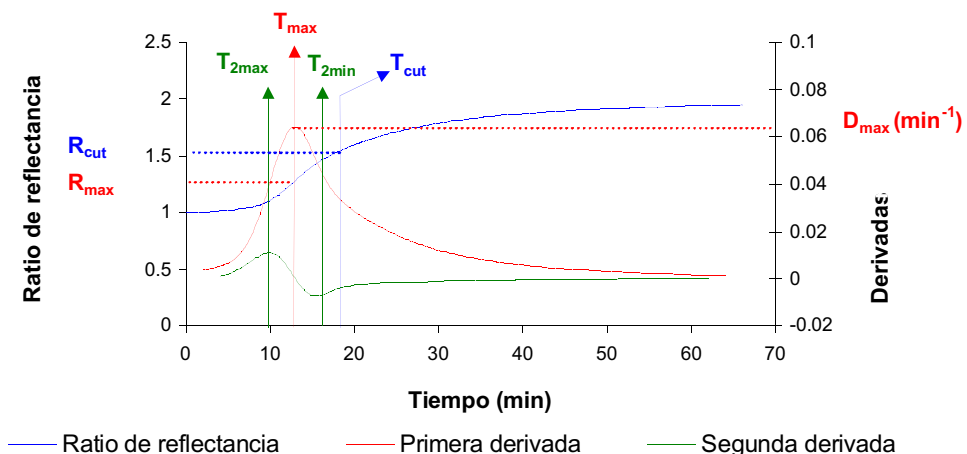


Figura 3. Típico perfil de reflectancia y parámetros derivados

sus interacciones. El efecto aleatorio ejercido sobre los parámetros estudiados por variables no fijas se consideró mediante inclusión de co-variables en el modelo. Tras un análisis preliminar de los datos, se eliminaron todas aquellas interacciones y co-variables que no contribuyeron significativamente a la variabilidad de los datos. Para el análisis de la varianza (ANOVA), las medias de mínimos cuadrados (LSM) y la significación de cada tratamiento se obtuvieron mediante suma de cuadrados tipo IV. Las diferencias entre las medias de los tratamientos estudiados se consideraron significativas cuando $P < 0,05$. Para la selección de un modelo matemático de predicción de TCB se consideraron en el análisis de regresión lineal todos los factores experimentales y las variables de reflectancia difusa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Predicción del tiempo de coagulación de Berridge

Tras el análisis de los diferentes modelos de regresión propuestos, sólo T_{\max} fué eficaz para la predicción de TCB. El modelo de regresión

de TCB frente a T_{\max} (Cuadro 1) demuestra la existencia de una fuerte relación lineal. La regresión explica el 99,13% del total de la variación observada en TCB ($P < 0,0001$) permitiendo predecir dicha variable a partir de T_{\max} , con un error estándar (SEP) de 53,70 s (Castillo et al., 2000).

Remeuf et al. (1993) estudiaron la coagulación mediante un sensor de transmisión NIR y un formógrafo y obtuvieron una buena correlación entre los TC obtenidos mediante ambos métodos. Recientemente, O'Callaghan et al. (1999a) realizaron una experiencia en la que seis técnicas de monitorización de la coagulación (sensor "CoAguLite" de reflectancia difusa de NIR, sensores "Gelograph" y "TxPro" de transmisión de NIR, sensor térmico "hot-wire" y sensores vibracionales "Viscolite" y "Sofraser") se comparan entre sí y con los parámetros reológicos G' y G'' . Dichos autores afirman que usando cualquiera de los sensores ensayados es posible predecir el valor de TC determinado con el reómetro (TCR) con un SEP comprendido entre 45 y 70 s, según el sensor considerado. De los seis sensores estudiados, sólo el sensor CoAguLite es común a nuestros estudios. Mediante el empleo de las correspon-

Cuadro 1. Modelo de regresión lineal para la predicción de TCB ^{1, II}

<i>ANOVA de regresión lineal</i>						
Fuente	GL	SC	Estadístico F	Significación		
Modelo	1	7206'250	9003'035	0'0001		
Residual	79	63'234				
Total	80	7269'484				
<i>Regresión lineal</i>						
Parámetros del modelo	Coefficiente	SEE	Significación	CV (%)	SEP (min)	R ²
Ordenada en el origen	$\beta_0 = -0'628$	0'207	0'0032	5'40	0'895	0'991
T_{\max}	$\beta_1 = 1'17$	0'0124	0'0001			

¹ TCB, tiempo de coagulación de Berridge; T_{\max} , tiempo desde la adición de enzima hasta el punto de inflexión de la curva de reflectancia; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados; SEE, error estándar de estimación del parámetro; R², coeficiente de determinación; CV, coeficiente de variación; SEP, error estándar de predicción. N = 81. ^{II} Según Castillo (2001).

dientes ecuaciones de regresión (O'Callaghan et al., 1999a y modelo del Cuadro 1), podemos asignar valores arbitrarios de T_{max} (8-12 min) para comparar la predicción respectiva de los valores de TCR y TCB. De esta forma, se observa que las predicciones obtenidas para TCB son, por término medio, 3,81 min menores que las predicciones de los valores de TCR. Según Famelart et al. (1999), no existen diferencias entre los TC obtenidos mediante formógrafo y reómetro. Considerando esta afirmación, nuestros resultados confirman los de Giangiaco et al. (1998) que comprueban que TCB es 3-4 min menor que el TC determinado con el formógrafo.

Relación entre T_{max} y el tiempo de coagulación de Berridge

Según Castillo (2001) los valores experimentales de T_{max} siempre son algo menores que los de TCB y el valor de la diferencia $TCB - T_{max}$, en el 90% de las observaciones, es menor de 3,20 min. A partir de las medias de ambos parámetros, se estima que T_{max} representa un 89% de TCB (Castillo et al., 2003b). Ya que el lapso de tiempo entre dichas variables es pequeño, se comparan las medias mediante un test "t de Student" para muestras apareadas. La hipótesis nula es que la media de las diferencias entre cada dos parejas de datos es cero ($H_0 : \mu_1 = \mu_2$). El pequeño valor de P obtenido ($P < 0,0001$) sugiere que T_{max} y TCB son variables diferentes (Castillo et al., 2000). Coincidiendo con nuestros resultados, numerosos autores refieren la existencia de diferencias entre los métodos de determinación de TC (McMahon y Brown, 1982) que deben corresponderse con distintos grados de hidrólisis de la k-caseína y de agregación de las micelas. Como T_{max} es aproximadamente un 89% de TCB, la primera variable detectaría un grado de agregación menor que TCB, por lo que el método óptico exhibiría una mayor sensibilidad. En esta dirección apuntan McMahon et al. (1984b) al afirmar que los métodos basados en la determinación de

turbidez detectan antes la coagulación que los visuales. Giangiaco et al. (1998) determinan TCB y la variación de luminosidad (DL) con respecto al tiempo y siempre observan en primer lugar el punto de inflexión de la curva luminosidad/tiempo. Según O'Callaghan et al. (1999a) el punto de gelificación se detecta antes con sensores ópticos que empleando los sensores hot-wire y vibracionales.

Grado de hidrólisis a tiempo T_{max}

Según Castillo et al. (2003b), el porcentaje de hidrólisis a tiempo T_{max} es 78%, mientras que a tiempo t_{IP} es 61% (t_{IP} = período de inducción, definido por Saputra en 1992). Según Carlson et al. (1987), la agregación no se inicia de forma apreciable hasta que se ha hidrolizado al menos un 60-80% de la k-caseína. De acuerdo con dichos autores, y considerando los porcentajes de hidrólisis estimados respectivamente a los tiempos t_{IP} y T_{max} , se podría localizar el inicio de la agregación entre t_{IP} y T_{max} .

Ya que T_{max} se corresponde con un 89% de TCB y teniendo en cuenta que, Green et al. (1978) aseguran que la agregación se observa a un tiempo comprendido entre un 70 y un 90% de TCB, se podría considerar T_{max} como el momento en el que se produce el "inicio significativo" de los procesos de agregación y gelificación. T_{max} representaría un grado incipiente de agregación, suficientemente significativo como para que el sensor de NIR sea capaz de detectarlo, como un punto de inflexión en la curva de reflectancia difusa. Existe mucha similitud entre nuestra hipótesis y los trabajos de Carlson et al. (1987) que muestran que una hidrólisis del 60% corresponde a un incremento de turbidez incipiente y que una hidrólisis del 80% coincide con el punto de inflexión de la curva de turbidez. Dichos autores interpretan que el nivel de hidrólisis requerido para el "inicio sustancial de la floculación" coincide con el dramático aumento de turbidez observado en el punto de inflexión.

En resumen, T_{\max} es significativamente diferente de TCB y constituye un 89% de éste, demostrando una mayor sensibilidad a la agregación. Existe una correlación lineal significativa entre ambas variables, que permite predecir TCB a partir de T_{\max} (SEP = 53,70 s). En T_{\max} , el 80% de la hidrólisis ha finalizado, iniciándose, en ese momento o instantes antes, la agregación de las micelas de caseína que determina la aparición del punto de inflexión en la curva de reflectancia. Por tanto, podríamos considerar a T_{\max} como el punto de inicio significativo de los procesos de agregación y endurecimiento.

Efecto de los factores de la coagulación sobre T_{\max} y TCB

Tipo de enzima

Los trabajos realizados por Castillo et al., (2002) demuestran que la influencia del tipo de enzima sobre T_{\max} , a igual TCB, es altamente significativa ($P < 0,003$). El valor de T_{\max} en leche coagulada con cuajo de cabrito es un 89%

del tiempo obtenido con *M. miehei*. Estos resultados son consistentes con los de Ustunol et al. (1991) y López (1993) y sugieren una mayor sensibilidad de T_{\max} a los procesos de agregación, en comparación con TCB. Diversos autores han constatado el efecto del tipo de enzima sobre la velocidad de agregación (Lawrence y Creamer, 1969) y de endurecimiento (Fox, 1988). Los resultados obtenidos indican que la reflectancia difusa puede ser muy útil para comparar preparados enzimáticos comerciales tanto en el laboratorio como en la industria.

Concentración de enzima

Según (Castillo et al., 2000), el efecto de la concentración de enzima sobre T_{\max} y TCB es muy significativo ($P < 0,0001$). En ambas variables se aprecia una disminución al aumentar la concentración de enzima (Figura 4) que refleja un aumento de las velocidades de hidrólisis y agregación. Estos resultados coinciden con los publicados en leche de vaca por Ustunol et al. (1993) que observan una relación inversa entre la concentración de enzima y los parámetros

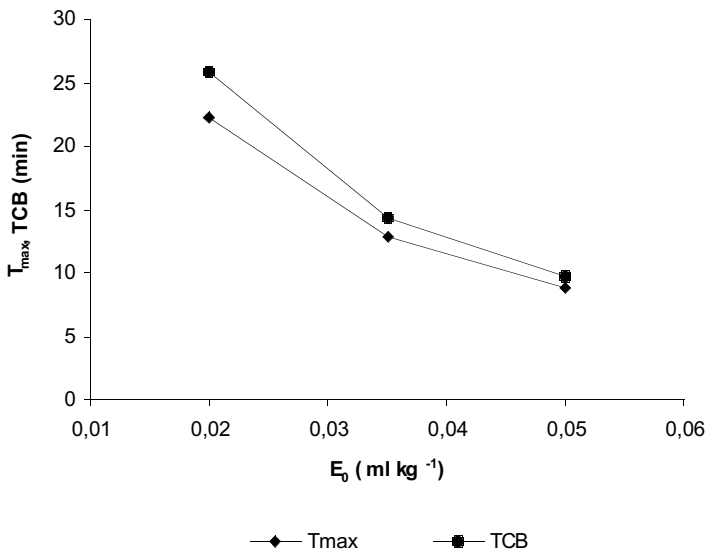


Figura 4. Efecto de la concentración de enzima sobre T_{\max} y TCB

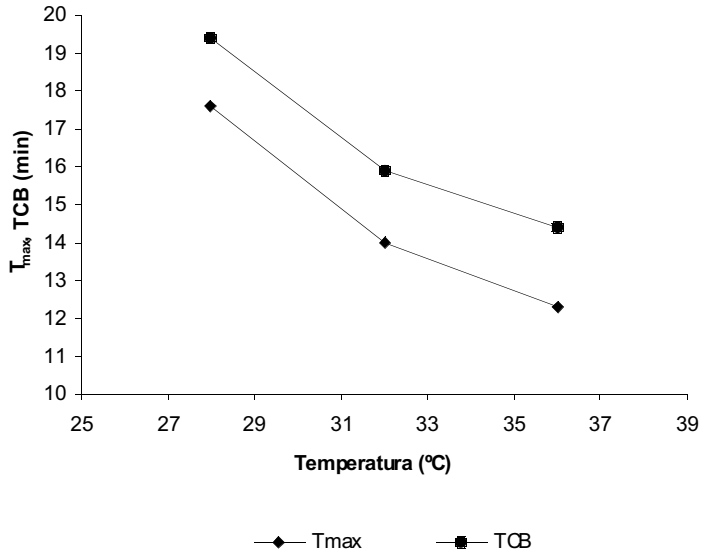


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre T_{max} y TCB

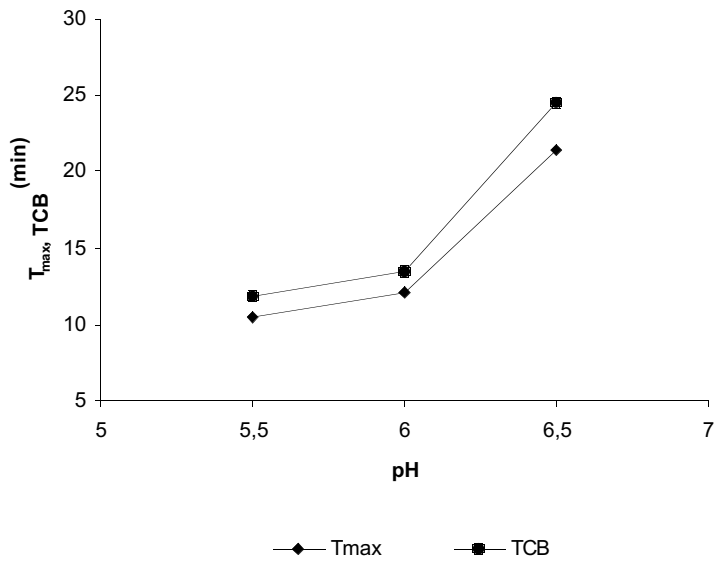


Figura 6. Efecto del pH sobre T_{max} y TCB

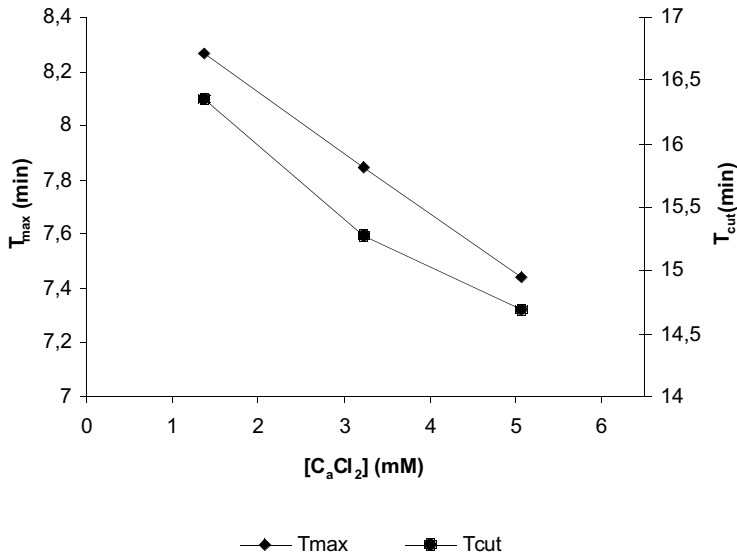


Figura 7. Efecto del cloruro cálcico sobre T_{\max} y T_{cut}

T_{\max} y TCB. También en leche de vaca, Payne et al. (1993) confirman el ascenso de T_{\max} al disminuir la concentración de enzima.

Storch y Segelcke (1874) observaron que TC es inversamente proporcional a la concentración de enzima ($T_c E = K$; T_c , tiempo de coagulación; E, actividad enzimática; K, constante). Como esta relación sólo resulta válida dentro de estrechos márgenes de pH, temperatura y concentración de enzima, Holter (1932) propone una expresión que es posteriormente modificada por Foltmann (1959) ($T_c = (a / [E]) + b$; T_c , tiempo de coagulación; [E], concentración de enzima; a y b, constantes). Posteriormente la "ley de Foltmann" ha sido reconfirmada en numerosas ocasiones (McMahon y Brown, 1982).

Si se analiza mediante dicha ecuación la tendencia de T_{\max} en función de la concentración de enzima (Castillo et al., 2000), se obtiene como se esperaba, una relación lineal ($R^2 = 0,9998$) entre dicha variable y la inversa de la concentración de enzima ($T_{\max} = (0,444 / [E]) + 0,0659$). McMahon y Brown (1983) obtienen con un formógrafo una pendiente de 0,0754, mientras que López (1993) encuentra valores de 0,222

(TCB) y 0,173 (viscosimetría). Lamentablemente, la comparación de las pendientes, requiere que TC sea obtenido con el mismo método, en idénticas condiciones y expresando la concentración de enzima en las mismas unidades, motivo por el que en el presente estudio, no se establece dicha comparación. En definitiva, podemos afirmar que el comportamiento de T_{\max} frente a la concentración de enzima, es equivalente al observado para TCB, que actualmente sigue siendo el parámetro de referencia en el cálculo de la actividad enzimática de los coagulantes comerciales.

Temperatura y pH

Según Castillo et al. (2000), las LSM de T_{\max} y TCB disminuyen significativa y paralelamente cuando aumenta la temperatura ($P < 0,0001$) o desciende el pH ($P < 0,0012$), como se aprecia en las Figuras 5 y 6. Nuestros resultados coinciden con las referencias obtenidas mediante reflectancia difusa en leche de vaca por Ustunol et al. (1993) y por Payne et al. (1993). Este efecto se atribuye a la modificación de la

cinética de las reacciones de hidrólisis enzimática y agregación micelar, si bien, en ambos casos, la influencia sobre la reacción de agregación es predominante (Castillo, 2001).

Concentración de CaCl₂

El tratamiento térmico de la leche por encima de 65-70°C provoca la precipitación parcial del fosfato cálcico por lo que, antes de la coagulación generalmente se añade CaCl₂ para contrarrestar dicho efecto. Castillo et al. (2002) demuestran que la influencia de la adición de CaCl₂ sobre T_{\max} y el tiempo de corte es muy significativo ($P < 0,007$). Las LSM de T_{\max} y del tiempo de corte decrecen significativamente con la adición de CaCl₂ (Figura 7), confirmando lo observado previamente por Payne et al. (1993). Según Bringe y Kinsella (1986), la velocidad de hidrólisis aumenta con la adición de CaCl₂, mientras que contrariamente, Famelart et al. (1999) observan un descenso lineal de la constante de hidrólisis al añadir CaCl₂. No obstante, mayoritariamente se cree que la adición de CaCl₂ no afecta directamente a la fase enzimática de la coagulación (Van Hooydonk y Van Den Berg, 1988) sino que afecta indirectamente, descendiendo el pH de la leche. El calcio ejerce su principal efecto en la fase de agregación, especialmente si se mantiene constante el pH (Van Hooydonk y Van Den Berg, 1988). Por eso, en este estudio se ajusta el pH a 6,5 tras la adición de los diferentes niveles de CaCl₂ seleccionados, por lo que las variaciones de T_{\max} sólo reflejan su efecto sobre la fase de agregación.

Concentración de sustrato

Castillo et al. (2003a) afirman que la variabilidad de T_{\max} en función de la concentración de sustrato es muy significativa ($P < 0,0001$). T_{\max} aumenta con la concentración proteica ($P < 0,0001$). La interpretación no resulta sencilla si consideramos las profundas contradicciones encontradas en la literatura en relación con el efecto

de la concentración de sustrato sobre TC y la constante de hidrólisis. Algunos autores aseguran que, concentrando la proteína por ultrafiltración, desciende TC (O'Callaghan *et al.*, 1999b). Sin embargo, nuestros resultados coinciden con Dagleish (1980) que afirma que, mediante ultrafiltración de la leche, TC no varía o sufre un ligero aumento. Por su parte, otros autores como Garnot *et al.* (1982) y Clark y Sherbon (2000) afirman que TC aumenta al elevar la concentración proteica.

Saputra (1992) y Lomholt (1996), entre otros, observan que la constante de velocidad de hidrólisis disminuye con la concentración de proteína, lo que se atribuye a la disminución de la velocidad efectiva de difusión de la enzima por aumento de la concentración proteica, y podría explicar porqué T_{\max} aumenta significativamente con la proteína. Saputra (1992) monitoriza el proceso de hidrólisis empleando reflectancia difusa y describe dicha reacción mediante un modelo de difusión basado en una cinética de primer orden. Este autor observa valores ascendentes de T_{\max} al aumentar la proteína a todas las longitudes de onda, temperaturas y concentraciones de enzima estudiadas. No obstante, en nuestras condiciones experimentales (Castillo et al., 2003a), la enzima podría estar saturada con el sustrato, por lo que un incremento en la concentración de caseína, a concentración constante de enzima, podría traducirse en un aumento de la duración del período de latencia necesario para el inicio de la fase de agregación. En dichas condiciones, la misma cantidad de enzima tendría que hidrolizar a velocidad constante más sustrato, provocando un retraso de T_{\max} .

Resumiendo, y en general, se observan comportamientos paralelos de TCB y T_{\max} frente a los diferentes factores de la coagulación. Estos resultados nos permiten proponer a T_{\max} como alternativa frente al tradicional TCB, no sólo para la determinación de la actividad enzimática de cuajos y enzimas coagulantes, tanto en laboratorio como en línea, sino también para la caracterización de cultivos bacterianos, el ensayo

de aditivos y la selección de las condiciones de elaboración.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio no hubiera sido posible sin la intensa colaboración entre el Departamento de Biosistemas e Ingeniería Agrícola de la Universidad de Kentucky y el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia. También estamos muy agradecidos a la Fundación Séneca (Proyecto Séneca: PB/19/FS/99) y a la Universidad de Murcia (beca predoctoral de Castillo, M.).

BIBLIOGRAFÍA

- Berridge, N. J. 1952. Some observations on the determination of the activity of rennet. *Analyst* 77: 57-62.
- Bringe, N. A. y Kinsella, J. E. 1986. Influence of calcium chloride on the chymosin-initiated coagulation of casein micelles. *J. Dairy Res.* 53: 371-379.
- Carlson, A., Hill, C. G. y Olson, N. F. 1987. Kinetics of milk coagulation: II. Kinetics of the secondary phase: Micelle flocculation. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 590-600.
- Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., López, M. B. 2000. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *Int. Dairy J.* 10: 551-562.
- Castillo, M. 2001. Predicción del tiempo de corte en la elaboración de queso mediante dispersión de radiación de infrarrojo próximo. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., Laencina, J., López, M. B. 2002. Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goat's milk using a light scattering sensor. *Int. Dairy J.* 12: 1019-1023.
- Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., Laencina, J., López, M. B. 2003a. Effect of protein and temperature on cutting time prediction in goats' milk using an optical reflectance sensor. *J. Dairy Res.* 70: 205-215.
- Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., Laencina, J., López, M. B. 2003b. Modelling casein aggregation and curd firming in goats' milk from backscatter of infrared light. *J. Dairy Res.* 70: 335-348.
- Clark, S. y Sherbom, J. W. 2000. Alpha_{s1}-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Res.* 38: 123-134.
- Dalgleish, D. G. 1980. Effect of milk concentration on the rennet coagulation time. *J. Dairy Res.* 47: 231-235.
- Famelart, M. H., Le Graet, Y. y Raulot, K. 1999. Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl₂: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation. *Int. Dairy J.* 9: 293-297.
- Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF). 1987. Determination of the clotting time of milk to which a milk-clotting enzyme solution has been added. International IDF Standard 110A: Appendix A. Brussels.
- Federación Internacional de lechería (FIL-IDF). 1996. Microbial coagulants: determination of total milk-clotting activity. International IDF Standard 176. Brussels.
- Federación Internacional de lechería (FIL-IDF). 1997. Bovine rennets: determination of total milk-clotting activity. International IDF Standard 157A. Brussels.
- Foltmann, B. 1959. On the enzymatic and the coagulation stages of the renneting process. 15th International Dairy Congress, London. 2: 655-661.
- Fox, P. F. 1988. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10: 522-535.
- Garnot, P., Rank, T. C. y Olson, N. F. 1982. Influence of protein and fat contents of ultrafiltered milk on rheological properties

- of gels formed by chymosin. *J. Dairy Sci.* 65 (12): 2267-2273.
- Giangiaco, R., Lizzano, R., Barzaghi, S., Cattaneo, T. M. P. y Barros, A.S. 1998. NIR and other luminometric methods to monitor the primary clotting phase of milk. *J. Near Infrared Spectrosc.* 6: 205-211.
- Green, M. L., Hobbs, D. G., Morant, S. V. y Hill, V.A. 1978. Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk II. Process of gel assembly. *J. Dairy Res.* 45: 413-422.
- Holter, H. 1932. Über die Labwirkung. *Biochem. Z.* 255: 160-188.
- Lawrence, R. C. y Creamer, L. K. 1969. The action of calf rennet and other proteolytic enzymes on k-casein. *J. Dairy Res.* 36: 11-20.
- Lomholt, S. B. 1996. The kinetics of the aggregation of casein micelles by rennet. Ph.D. Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University.
- López, M. B. 1993. Cuajos y enzimas coagulantes en la elaboración de queso de cabra en la región de Murcia. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- McMahon, D. J. y Brown, R. J. 1982. Evaluation of Formograph for comparing rennet solutions. *J. Dairy Sci.* 65 (8): 1639-1642.
- McMahon, D. J. y Brown, R. J. 1983. Milk coagulation time: linear relationship with inverse of rennet activity. *J. Dairy Sci.* 66 (2): 341-344.
- McMahon, D. J. y Brown, R. J. 1984. Enzymic coagulation of casein micelles: a review. *J. Dairy Sci.* 67: 499-512.
- McMahon, D. J., Brown, R. J. y Ernstrom, C. A. 1984 a. Enzymic coagulation of milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 67 (4): 745-748.
- McMahon, D. J., Brown, R. J., Richardson, G. H. y Ernstrom, C. A. 1984 b. Effects of calcium, phosphate, and bulk culture media on milk coagulation properties. *J. Dairy Sci.* 67 (5): 930-938.
- Merin, U., Talpaz, H. y Fishman, S. 1989. A mathematical model for the description of chymosin action on casein micelles. *J. Dairy Res.* 56: 79-86.
- O'Callaghan, D. J., O'Donnell, C. P. y Payne, F. A. 1999 a. A comparison of on-line techniques for determination of curd setting time using cheesemilks under different rates of coagulation. *J. Food Eng.* 41: 43-54.
- O'Callaghan, D. J., O'Donnell, C. P. y Payne, F. A. 1999 b. Effect of protein content of milk on the storage and loss moduli in renneting milk gels. *J. Food Process Eng.* 22: 249-261.
- Payne, F. A., Hicks, C. L. y Shen, P. S. 1993. Predicting optimal cutting time of coagulating milk using diffuse reflectance. *J. Dairy Sci.* 76 (1): 48-61.
- Ross-Murphy, S. B. 1995. Rheological characterisation of gels. *J. Texture Stud.* 26: 391-400.
- Remeuf, F., Picque, D. y Corrieu, G. 1993. The MEX-3 suspended solids meter with RD-20/10 sensor in milk coagulation. BTG Application Bulletin AP1050.01e, Zellweger, Nunn Brook Rd, The County Estate, Sutton-in-Ashfield, NG17 2HU, England.
- Saputra, D. 1992. Analysis of enzymatic hydrolysis of milk using diffuse reflectance of near infrared radiation. Ph.D. Thesis, University of Kentucky.
- Sommer, H. H. y Matsen, H. 1935. The relation of mastitis to rennet coagulability and curd strength of milk. *J. Dairy Sci.* 18: 741-749.
- Storch, V. y Segelcke, T. 1874. *Milchforsch, Milchprax.* 3: 997. Citado por McMahon y Brown 1983.
- Ustunol, Z., Hicks, C. L. y Payne, F. A. 1991. Diffuse reflectance profiles of eight milk-clotting enzyme preparations. *J. Food Sci.* 56 (2): 411-415.
- Ustunol, Z., Hicks, C. L., Payne, F. A. y Milton, K. 1993. Effect of pH, temperature and enzyme concentration on diffuse reflectance profiles of coagulating milk. *Ital. J. Food Sci.* 2: 107-114.

Van Hooydonk, A. C. M. y Van Den Berg, G.
1988 Control and determination of the curd-
setting during cheesemaking. Brussels:
International Dairy Federation. (IDF B-DOC
225).