



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS DE LECHE  
BOVINA POR TERMOSONICACIÓN Y SU APLICACIÓN EN  
QUESO FRESCO**

**TESIS DE MAESTRÍA**

**QUE PARA OBTENER GRADO DE  
MAESTRA EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRESENTA:**

**I.A. MARÍA FERNANDA VELASCO BERMÚDEZ**

**ASESOR:**

**DR. HÉCTOR RUIZ ESPINOSA**

**COASESOR:**

**DR. GENARO GUSTAVO AMADOR ESPEJO**

**BUAP**

H. Puebla Z. Agosto, 2017



**BUAP**

Oficio: FIQ/SIEP/091/2017

**Mtro. Omar Aguirre Ibarra**  
**Director de Administración Escolar**  
**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
**PRESENTE**

Reciba un afectuoso saludo y al mismo tiempo me permito presentar a usted a los integrantes del jurado de examen que para obtener el grado de Maestra en Ingeniería Química sustentará la

**Ing. María Fernanda Velasco Bermúdez**

perteneciente a la generación 2013 con número de matrícula 213471044 y cuyo tema de tesis es: "DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS DE LECHE BOVINA POR TERMOSONICACIÓN Y SU APLICACIÓN EN QUESO FRESCO". Dicho jurado está integrado por:

**JURADO**

|             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| Presidente: | Dr. Irving Israel Ruiz López     |
| Secretario: | Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuñil  |
| Vocal:      | Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo |
| Vocal:      | Dr. Héctor Ruiz Espinosa         |

Asimismo, comunico a usted que la alumna cumple con todos los requisitos para poder llevar a cabo su examen de grado y que los integrantes de este jurado están citados con anticipación para la fecha y lugar indicados a continuación.

|                  |                                          |
|------------------|------------------------------------------|
| FECHA DE EXAMEN: | 29 de agosto de 2017                     |
| HORA:            | 18:00 horas                              |
| LUGAR:           | Facultad de Ingeniería Química, FIQ7/302 |
| DÍA:             | Martes                                   |

Sin otro particular, me es grato quedar de usted.

Atentamente  
"Pensar bien, para vivir mejor"  
H. Puebla de Z. a 25 de agosto de 2017

  
**Dr. Irving Israel Ruiz López**  
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado



**80 AÑOS**  
**DE UNIVERSIDAD**

c.c.p. Archivo  
E-mail: irving.ruiz@correo.buap.mx

Facultad  
de Ingeniería  
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San  
Manuel, Ciudad Universitaria,  
Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00  
Ext. 7250 y 7251



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA**



**ACTA DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS**

Nombre del (de la) estudiante: María Fernanda Velasco Bermúdez

Matrícula: 213471044

Nombre del director: DR. HÉCTOR RUIZ ESPINOSA

Nombre del codirector: DR. GENARO GUSTAVO AMADOR ESPEJO

**Título de la Tesis:**

**DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS DE LECHE BOVINA  
POR TERMOSONICACIÓN Y SU APLICACIÓN EN QUESO FRESCO**

**Comisión Revisora:**

Presidente: Dr. Irving Israel Ruiz López

Firma: \_\_\_\_\_

Secretario(a): Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil

Firma: \_\_\_\_\_

Vocal (1): Dr. Héctor Ruiz Espinosa

Firma: \_\_\_\_\_

Vocal (2): Dr. Genaro Gustavo Amador Espejo

Firma: \_\_\_\_\_

Los integrantes de la Comisión Revisora expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de maestría que presenta el (la) estudiante arriba indicado, por lo que **estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el (la) estudiante presente su defensa y examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación.**

Fecha de examen: 29 de agosto de 2017

Hora: 6 PM

Día de la semana: Martes

Lugar: FIQ7 Aula 302



Revisa y Autoriza: Sello de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado. - FIQ. - BUAP

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle primero a Dios por haberme iluminado y así permitirme alcanzar esta meta. Les agradezco infinitamente a mis padres por el apoyo y amor incondicional que me brindan siempre en los proyectos que me propongo y por ser mi guía en cada episodio de mi vida, sin ustedes yo no sería todo lo que soy, saben que las palabras no alcanzan para expresar mi eterno agradecimiento, son un gran ejemplo para mí, los amo. Le agradezco también infinitamente a mi hermano, quien fue parte de este proyecto ayudándome incondicionalmente en tareas realizadas en el laboratorio y por el amor que día a día me manifiesta, muchísimas gracias Jesulas. Le agradezco a Axel Ladrón de Guevara y familia por darme siempre consejos, palabras de apoyo y por el cariño brindado a lo largo de esta etapa en mi vida.

Le agradezco a CONACYT, al Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología y a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por permitirme estudiar en sus instalaciones y realizar las pruebas necesarias de este proyecto para ser una persona mejor preparada y haber realizado un trabajo de calidad. Le agradezco a mi asesor el Dr. Héctor y a mi coasesor el Dr. Genaro, por su ayuda en el desarrollo de este proyecto, sin su enseñanza, tiempo y apoyo este proyecto no habría podido ser posible. Le agradezco también al Dr. Raúl Delgado y al Dr. Irving Ruiz por sus sugerencias constructivas que ayudaron a enriquecer este proyecto, asimismo, les agradezco mucho su apoyo en cuanto a los trámites que a la titulación se refieren. También le agradezco a mis compañeros de la maestría por su ayuda y compañía en las clases y a mis chicas de servicio por su ayuda en la realización de todas las pruebas en el laboratorio así como por su bonita amistad, es algo que nunca voy a olvidar ni a dejar de valorar. Por último, agradezco a las personas que directa o indirectamente me ayudaron en la realización de este proyecto. **¡Muchas Gracias!**

**Mafer.**

# INDICE

|                                                                                |      |
|--------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                                         | iv   |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                        | vi   |
| ABREVIATURAS.....                                                              | vii  |
| RESUMEN .....                                                                  | viii |
| INTRODUCCIÓN.....                                                              | 1    |
| HIPÓTESIS.....                                                                 | 5    |
| OBJETIVOS.....                                                                 | 5    |
| I. ANTECEDENTES.....                                                           | 6    |
| 1.1 LECHE .....                                                                | 6    |
| 1.2 COMPOSICIÓN DE LA LECHE .....                                              | 6    |
| 1.2.1 LACTOSA.....                                                             | 9    |
| 1.2.2 GRASA .....                                                              | 10   |
| 1.2.3 PROTEÍNAS LÁCTEAS .....                                                  | 10   |
| 1.2.4 SALES.....                                                               | 21   |
| 1.3 QUESO .....                                                                | 23   |
| 1.3.1 DEFINICIÓN .....                                                         | 23   |
| 1.3.2 PROCESO DE ELABORACIÓN .....                                             | 23   |
| 1.3.3 CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN .....                                         | 24   |
| 1.3.4 FACTORES QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES DEL QUESO.....                      | 25   |
| 1.4 ULTRASONIDO.....                                                           | 29   |
| 1.4.1 APLICACIONES DE ULTRASONIDO DE POTENCIA EN PRODUCTOS LÁCTEOS .....       | 32   |
| II. METODOLOGÍA .....                                                          | 36   |
| 2.1 ETAPA I.....                                                               | 36   |
| 2.1.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LECHE.....                                    | 36   |
| 2.1.2 CONDICIONES DE OPERACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTOS DE TS.... | 36   |
| 2.1.3 DETERMINACIÓN DE POTENCIA ULTRASÓNICA EFECTIVA POR CALORIMETRÍA .....    | 39   |
| 2.1.4 ELABORACIÓN DE QUESO TIPO PANELA.....                                    | 40   |
| 2.1.5 ANALISIS DE PERFIL DE TEXTURA (TPA) .....                                | 41   |

|          |                                                                                                                 |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.6    | EVALUACIÓN DE COLOR EN QUESO.....                                                                               | 43 |
| 2.1.7    | ACTIVIDAD DE AGUA.....                                                                                          | 43 |
| 2.1.8    | DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....                                                                                   | 43 |
| 2.1.9    | DETERMINACIÓN DE pH.....                                                                                        | 44 |
| 2.2      | ETAPA II .....                                                                                                  | 44 |
| 2.2.1    | PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS DE LECHE.....                                                                        | 45 |
| 2.2.2    | TRATAMIENTOS DE TERMOSONICACIÓN .....                                                                           | 45 |
| 2.2.3    | DETERMINACIÓN DE PROTEINAS DEL SUERO POR HPLC.....                                                              | 47 |
| 2.2.4    | ELABORACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN .....                                                                       | 49 |
| 2.2.5    | DETERMINACIÓN DE GRADO DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEINAS POR<br>CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) ..... | 49 |
| 2.2.6    | CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA).....                                                                       | 50 |
| 2.2.7    | DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE COAGULACIÓN.....                                                                     | 51 |
| 2.2.8    | FIRMEZA DE GEL.....                                                                                             | 51 |
| 2.3      | ETAPA III .....                                                                                                 | 52 |
| 2.3.1    | PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS DE LECHE.....                                                                        | 52 |
| 2.3.2    | TRATAMIENTOS DE TS.....                                                                                         | 52 |
| 2.3.3    | ELABORACIÓN DE QUESO TIPO PANELA.....                                                                           | 53 |
| 2.3.4    | PRUEBAS EN QUESO.....                                                                                           | 53 |
| 2.3.5    | RENDIMIENTO SIMPLE .....                                                                                        | 54 |
| 2.3.6    | DETERMINACIÓN DE CLORURO DE SODIO.....                                                                          | 54 |
| 2.3.7    | DETERMINACIÓN DE PROTEINA.....                                                                                  | 54 |
| III.     | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                                                                    | 56 |
| ETAPA I  | ..... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>                                                                      |    |
| 3.1      | DETERMINACIÓN DE POTENCIA EFECTIVA Y pH .....                                                                   | 56 |
| 3.2      | HUMEDAD EN QUESOS ELABORADOS CON LECHE TRATADA POR TS .....                                                     | 59 |
| 3.3      | ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ ).....                                                                                | 60 |
| 3.4      | COLOR .....                                                                                                     | 62 |
| 3.5      | ANÁLISIS DE PERFIL DE TEXTURA .....                                                                             | 64 |
| ETAPA II | .....                                                                                                           | 67 |
| 3.6      | PRUEBAS PRELIMINARES PARA ESTANDARIZAR DETERMINACIÓN DE BLG POR HPLC...                                         | 67 |
| 3.7      | DETERMINACIÓN DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUERO POR HPLC .....                                         | 70 |

|             |                                                                                   |     |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.8         | EVALUCION DE DESNATURALIZACIÓN POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)..... | 72  |
| 3.9         | CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA .....                                              | 76  |
| 3.10        | TIEMPO DE COAGULACIÓN .....                                                       | 78  |
| 3.11        | FIRMEZA DE GEL.....                                                               | 82  |
| ETAPA III   | .....                                                                             | 86  |
| 3.12        | RENDIMIENTO .....                                                                 | 86  |
| 3.13        | EVALUACIÓN DE pH Y COMPOSICIÓN EN QUESO.....                                      | 87  |
| 3.14        | HUMEDAD .....                                                                     | 91  |
| 3.15        | COLOR .....                                                                       | 92  |
| 3.16        | ANÁLISIS DE PERFIL DE TEXTURA .....                                               | 94  |
| IV.         | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....                                               | 100 |
| V.          | REFERENCIAS.....                                                                  | 102 |
| APÉNDICE I  | .....                                                                             | 112 |
| APÉNDICE II | .....                                                                             | 113 |

# ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.1</b> Composición aproximada de leche bovina.....                                                                                          | 7  |
| <b>Tabla 1.2</b> Propiedades funcionales de las proteínas lácteas.....                                                                                | 11 |
| <b>Tabla 1.3</b> Cambios en propiedades de proteínas asociados a la desnaturalización. ....                                                           | 21 |
| <b>Tabla 1.4</b> Concentraciones de iones ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) determinadas en leche de vaca.....                                                 | 22 |
| <b>Tabla 2.1</b> Tratamientos de US aplicados .....                                                                                                   | 38 |
| <b>Tabla 2.2</b> Tratamientos preliminares de TS.....                                                                                                 | 46 |
| <b>Tabla 2.3</b> Tratamientos propuestos de TS.....                                                                                                   | 47 |
| <b>Tabla 2.4</b> Gradiente de elución binario .....                                                                                                   | 49 |
| <b>Tabla 2.5</b> Tratamientos de TS aplicados en la Etapa III .....                                                                                   | 53 |
| <b>Tabla 3.1</b> Potencia real de salida y energía entregada en tratamientos ultrasónicos selectos en leche.....                                      | 57 |
| <b>Tabla 3.2</b> pH promedio de queso panela elaborado con leche TS durante su almacenamiento refrigerado.....                                        | 59 |
| <b>Tabla 3.3</b> Contenido de humedad de queso panela elaborado con leche TS * .....                                                                  | 60 |
| <b>Tabla 3.4</b> Actividad de agua obtenida en queso panela bajo tratamientos de TS* .....                                                            | 61 |
| <b>Tabla 3.5</b> Cambios en color de queso panela elaborado con leche TS durante su almacenamiento refrigerado.....                                   | 63 |
| <b>Tabla 3.6</b> Análisis de perfil de textura de queso panela elaborado con tratamientos selectos de TS durante su almacenamiento refrigerado* ..... | 65 |
| <b>Tabla 3.7</b> Valores de concentración en ppm de las variantes de $\beta$ -LG obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos aplicados* .....   | 69 |
| <b>Tabla 3.8</b> $\beta$ -LG desnaturalizada por diferentes tratamientos de TS de leche bovina descremada.....                                        | 70 |
| <b>Tabla 3.9</b> Temperaturas de desnaturalización de proteínas séricas en leche tratada por TS de acuerdo a prueba DSC .....                         | 74 |
| <b>Tabla 3.10</b> Valores de CRA obtenidos para cada tratamiento aplicado.....                                                                        | 77 |

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 3.11</b> Tiempos de coagulación obtenidos a partir de diferentes tratamientos de TS aplicados .....                                                                                           | 79 |
| <b>Tabla 3.12</b> Firmeza de Gel de leche tratada por TS en condiciones selectas.....                                                                                                                  | 83 |
| <b>Tabla 3.13</b> Valores obtenidos de rendimiento verde y húmedo de quesos elaborados con leche sometida a tratamiento térmico y de TS .....                                                          | 87 |
| <b>Tabla 3.14</b> Valores promedio obtenidos de la evaluación de pH en quesos tipo Panela bajo tratamientos de pasteurización y TS durante su almacenamiento por 14 días .....                         | 89 |
| <b>Tabla 3.15</b> Porcentaje de proteína y cloruro de sodio en los queso Tipo Panela bajo tratamientos selectos de TS.....                                                                             | 90 |
| <b>Tabla 3.16</b> Valores promedio obtenidos de la evaluación del porcentaje de humedad en quesos tipo Panela sujetos a tratamiento de pasteurización y TS durante su almacenamiento por 14 días ..... | 92 |
| <b>Tabla 3.17</b> Color en quesos Tipo Panela bajo tratamientos selectos de TS durante su almacenamiento por 14 días .....                                                                             | 97 |
| <b>Tabla 3.18</b> Textura en queso Tipo Panela bajo tratamientos selectos de TS durante su almacenamiento en refrigeración por 14 días .....                                                           | 98 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1</b> Modificaciones en la composición de las micelas de caseína en función de diferentes condiciones fisicoquímica. .... | 14 |
| <b>Figura 1.2</b> Esquemas de $\beta$ -LG (a) Monómero (b) Unidad dimérica.....                                                       | 16 |
| <b>Figura 1.3</b> Estructura de $\alpha$ - lactalbúmina. ....                                                                         | 18 |
| <b>Figura 1.4</b> Modelo de transferencia de residuos hidrofóbicos por desnaturalización proteica.....                                | 19 |
| <b>Figura 2.1</b> Recipiente enchaquetado para sonicación de leche.....                                                               | 37 |
| <b>Figura 2.2</b> Modelo de caras centradas de los tratamientos ultrasónicos aplicados. ....                                          | 38 |
| <b>Figura 2.3</b> Diagrama de elaboración de Queso Panela .....                                                                       | 41 |
| <b>Figura 2.4</b> Texturómetro TAXT-Plus (Texture Technologies, Surrey, Reino Unido). ....                                            | 42 |
| <b>Figura 2.5</b> Diagrama Fuerza vs Tiempo del Análisis de Perfil de Textura.....                                                    | 42 |
| <b>Figura 2.6</b> Diagrama para preparación de las muestras.....                                                                      | 48 |
| <b>Figura 3.1</b> Cromatograma de leche bovina descremada mostrando variantes de $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ – LG A y B) .....  | 67 |
| <b>Figura 3.2</b> Cromatograma de los diferentes tratamientos de TS aplicados.....                                                    | 68 |
| <b>Figura 3.3</b> Termogramas de leche sometida a tratamiento térmico y diferentes tratamientos de TS.....                            | 73 |

# ABREVIATURAS

**ANOVA** Análisis de varianza

**$\alpha_w$**  Actividad de agua

**$\alpha$ -LA**  $\alpha$ -Lactalbúmina

**$\beta$ -LG**  $\beta$ -Lactoglobulina

**BSA** Albúmina bovina sérica

**CN** Caseína

**CRA** Capacidad de retención de agua

**FCM** Fosfato de calcio micelar

**FG** Firmeza de gel

**GG** Glóbulo de grasa

**HP** Alta presión

**HPLC** High Performance Liquid Chromatography

**HPP** High Pressure Processing

**HTST** (High Temperature Short Time), pasteurización a alta temperatura por tiempos cortos (72 °C, 15 s)

**Ig** Inmunoglobulinas

**LTLT** (*Low temperature, long time*), pasteurización a baja temperatura por tiempos largos (63 °C, 30 min)

**MGG** Membrana de glóbulo graso

**QP** Queso pasteurizado

**TPA** (*Texture profile analysis*), análisis de perfil de textura

**TR** Tiempo de retención

**TS** Termosonicación

**UHT** (*Ultra High Temperature*), tratamiento térmico a temperatura ultra alta, ultrapasteurización

**US** Ultrasonido

**USP** US de potencia

# RESUMEN

El tratamiento con ultrasonido de alta intensidad (US) es el proceso que transmite ondas sonoras de baja frecuencia (20-100 kHz) a través de medios sólidos o fluidos, generando cambios químicos, fisicoquímicos y/o microbiológicos en productos alimenticios diversos por efecto de cavitación y otros fenómenos relacionados. La combinación de US con tratamientos térmicos se le denomina termosonicación (TS). En leche, se ha reportado que la TS afecta macrocomponentes (reducción de tamaño de glóbulos de grasa (GG), desnaturalización parcial de proteínas) que a su vez ocasionan modificaciones en propiedades funcionales de diversos productos elaborados con ella (Feng *et al.*, 2011).

Con frecuencia, la magnitud de desnaturalización proteica que ocasionan los procesos a los que se somete la leche condiciona el uso final que se le puede dar a esta materia prima. Sin embargo, a la fecha no se ha realizado un estudio que establezca la magnitud de los cambios proteicos asociados a la aplicación de tratamientos de TS en leche ni se han comparado estos efectos sobre las capacidades tecnológicas de leche pasteurizada térmicamente. Por tanto, el objetivo de este proyecto fue determinar el grado de desnaturalización de proteínas séricas de leche bovina comparando los cambios sobre propiedades de *queso fresco* tipo panela elaborado con leche pasteurizada térmicamente con y sin asistencia de US.

Los tratamientos elaborados en el presente trabajo fueron realizados con leche cruda bovina descremada (0.5% - 0.9% grasa) sometida a un proceso ultrasónico de potencia (24 kHz, sonda de 22 mm, 3 cm de inmersión), a lo largo de diferentes etapas. La leche se sometió al proceso ultrasónico variando la amplitud de onda y el tiempo de proceso, tras lo cual, la leche fue pasteurizada por lotes y utilizada para elaborar quesos, determinando rendimiento, porcentaje de humedad, color, análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés), actividad de agua ( $a_w$ ), pH y composición (cloruros y proteína) de queso

tras 1, 7 y 14 días de almacenamiento en refrigeración. Asimismo, se realizaron pruebas para la determinación de la concentración de proteínas de la leche bovina descremada bajo diferentes tratamientos de TS por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), pruebas de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y pruebas predictivas de capacidad tecnológica de leche.

Los quesos TS mostraron por lo regular una disminución progresiva de pH, observándose también un mayor contenido de humedad al día 1 de almacenamiento y valores más altos de luminosidad en colorimetría triestímulo debido primordialmente a la homogeneización de GG por cavitación ultrasónica. No se presentaron cambios significativos ( $P < 0.05$ ) en  $a_w$  durante el tiempo de almacenamiento. Asimismo, los quesos elaborados con leche tratada por TS mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en dureza con respecto al tipo de tratamiento aplicado, obteniéndose quesos firmes con aumento progresivo de dicha característica de acuerdo al tiempo de almacenamiento. Con respecto a la determinación de proteínas desnaturalizadas por método de HPLC, se notó que se obtuvieron áreas de integración de  $\beta$ -LG bien definidas en su correspondiente tiempo de retención y se lograron observar cambios en la concentración de proteína en leche bovina descremada dependiendo del tipo de tratamiento aplicado.

Con base en los resultados obtenidos de porcentaje humedad, textura (dureza) y color, es posible proponer a la TS como una tecnología complementaria en el procesamiento de leche para elaboración de *queso fresco* tipo Panela.

# INTRODUCCIÓN

La leche es uno de los productos más apreciados y con más aplicaciones en el sector alimentario. Uno de los productos lácteos derivados más importantes desde el punto de vista económico y de consumo es el queso. En México, la producción de queso de leche bovina es la más significativa incrementándose durante los últimos años, aumentando de 133 a 140 mil toneladas del 2012 al 2013 (FAO STAT, 2016). Sin embargo, la cantidad de queso producido en el país no es suficiente para satisfacer la demanda del producto, por lo que ha sido necesaria la importación de queso proveniente de Estados Unidos, Argentina, Uruguay, Holanda, entre otros. Aunque la cantidad neta importada de queso se ha reducido en los últimos años (106 mil Ton en 2013 vs. 84,634 Ton en 2015), ésta cantidad sigue siendo considerable y existe área de oportunidad de mejora en sistemas productivos y en aspectos tecnológicos de leche que pueden conducir a la autosuficiencia.

Algunas de las innovaciones tecnológicas en el área de lácteos se han centrado en la búsqueda de alternativas de proceso que no involucren aplicación de calor como único método de conservación. Es bien sabido que el tratamiento térmico de leche ocasiona modificaciones en sus propiedades fisicoquímicas, reológicas, microbiológicas, sensoriales y microestructurales, destacando de esta última la desnaturalización de las proteínas (Morales *et al.*, 2000). Los cambios de los componentes lácteos a través de dichos tratamientos son importantes para determinar las características del producto final y se reflejan tanto en su calidad sensorial, nutrimental o en su funcionalidad, ya que altera propiedades como capacidad de absorción y retención de agua, capacidades emulgentes y espumantes, retención en materia grasa, viscosidad, gelificación y coagulación, entre otras.

Debido a la evaluación exhaustiva realizada a los tratamientos térmicos desde hace décadas actualmente se cuenta con información abundante sobre sus efectos en la composición, estructura y funcionalidad proteica de leche. Sin embargo, se han

desarrollado tecnologías denominadas *emergentes* o *no térmicas*, que pretenden disminuir los efectos potencialmente negativos de los tratamientos térmicos. Entre estas tecnologías se incluyen ultrasonido de potencia, campos eléctricos pulsados (CEP), irradiación, alta presión estática y dinámica, ozonificación, luz ultravioleta, por citar algunas (Ruiz Espinosa, 2017). Uno de los tratamientos emergentes que está cobrando auge es el ultrasonido, el cual cuenta ya con aplicaciones importantes en la industria alimentaria y su utilización está creando un panorama novedoso para la creación de nuevas técnicas de procesamiento, las cuales pueden complementar o sustituir a las técnicas convencionales (Dolatowski *et al.*, 2007). Una de las principales ventajas del US para la industria alimentaria es su percepción por el público en general como una técnica segura, no tóxica y amigable con el medio ambiente (Kentish y Ashokkumar, 2011). El término US se refiere a la aplicación de ondas sonoras que están en una frecuencia por encima de 20 kHz, las cuales, dependiendo de su frecuencia y efectos, puede dividirse en dos grupos: *de potencia* (que se refiere a la gama de frecuencias que van de 20 kHz a 100 KHz) y *de diagnóstico*, el cual generalmente tiene una frecuencia superior a 1 MHz y se utiliza principalmente con fines médicos y en el ámbito industrial como proceso de limpieza. En este estudio dado que se trabajará específicamente con US de potencia (USP), a partir de este punto la abreviatura USP se refiere a este tipo de proceso en particular.

Dependiendo del proceso que asista y del producto fabricado, se ha demostrado que el empleo del USP puede ayudar a optimizar los tiempos de procesamiento de diversos productos alimenticios además de mejorar características sensoriales y funcionales del mismo, incluyendo consistencia y textura. Esto puede resultar favorable al reducirse costos de operación, reduciendo la manipulación requerida y los gastos energéticos asociados en comparación a los procesos convencionales. Así, por citar algunos ejemplos, existen estudios que demuestran que mediante el monitoreo de la atenuación de pulsos ultrasónicos se demostró que es posible determinar el grado de homogeneización de grasa en leche y a través del registro de la velocidad del ultrasonido junto con el grado de ultrasonido aplicado se puede aproximar un grado de emulsificación en sustancias

similares observándose emulsiones más estables que las convencionalmente producidas (Chemat *et al.*, 2011). Por otro lado, hay reportes de estudios sobre el uso de US como alternativa para modificar la textura y propiedades reológicas de queso crema donde se observó un incremento del contenido de grasa y del rendimiento de los quesos, además de lograr mejorar propiedades reológicas y de textura y su termoestabilidad significativamente (Almanza - Rubio *et al.*, 2016).

Cuando una tecnología emergente como el US se combina con un tratamiento térmico se establece un proceso mixto; aunque de primera instancia esto podría parecer contradictorio, el componente térmico garantiza la inocuidad del proceso, dado que normalmente para este factor de conservación se tienen bien identificadas las variables apropiadas para garantizar la seguridad y la vida de anaquel deseada del producto, incluyendo el patógeno más termorresistente, las condiciones adecuadas para reducir las cuentas de microorganismos deteriorativos en magnitudes esperadas y al menos un indicador térmico de proceso. Por su parte, el componente no térmico se aplica con la finalidad de propiciar el desarrollo de funcionalidades únicas en el producto (p.e., capacidad de retención de agua, capacidad emulgente, etc.). A la tecnología mixta que combina un tratamiento térmico con US se le denomina TS (TS). Recientemente, la TS se ha propuesto como una alternativa de procesamiento de leche y otros productos lácteos, donde se han observado variaciones en la desnaturalización de las proteínas de suero, acompañado de mejoras en otras características como color, apariencia y homogeneización de la grasa láctea (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2008). Dentro de las alteraciones alcanzadas en leche por el efecto de TS se han reportado la modificación en la composición de la MGG y la disminución de su tamaño de partícula por efecto de la cavitación (produciendo glóbulos con tamaños menores a 1  $\mu\text{m}$ ). En cuanto al color, la leche US muestra un aumento en los valores luminosidad ( $L^*$ ), obteniéndose leche más blanca a aquella tratada por procesos de homogeneización. Asimismo, microbiológicamente se ha reportado que la TS no genera una extensión adicional en la vida de anaquel de leche, comparada con tratamientos térmicos convencionales, a pesar

de propiciar una reducción en cuentas microbianas; también han sido reportadas modificaciones sensoriales relacionadas con el olor y sabor de leche bovina (Chouliara *et al*, 2010; Bermúdez-Aguirre *et al*, 2008).

A pesar de los diversos estudios realizados sobre el efecto de TS en leche, no existe información publicada sobre su influencia en el grado de desnaturalización de proteínas séricas o sus efectos sobre factores de calidad en productos alimenticios derivados. Por tanto, existe el interés por determinar el efecto del tratamiento de TS sobre la desnaturalización de proteínas séricas de leche bovina descremada y su aplicación en un producto lácteo específico (queso *Panela*).

# HIPÓTESIS

La TS de leche bovina descremada permitirá modificar la estructura de proteínas de suero (principalmente beta lactoglobulina) generando cambios en sus propiedades funcionales que mejoren características tecnológicas de subproductos selectos, como el queso tipo *Panela*.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del tratamiento de TS de leche bovina descremada sobre la desnaturalización de proteínas séricas, analizando cambios resultantes en sus propiedades funcionales y evaluando la viabilidad de su aplicación como pretratamiento para elaborar un producto específico (queso tipo *Panela*).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el grado de desnaturalización de proteínas de suero en leche bovina descremada sometida a condiciones selectas de TS mediante una técnica cromatográfica.
2. Determinar el efecto de tratamientos selectos de TS de leche bovina descremada sobre propiedades funcionales relacionadas con proteínas y su grado de desnaturalización.
3. Evaluar cambios durante la manufactura y el almacenamiento refrigerado de queso tipo *Panela* elaborado con leche descremada sometida a tratamientos de TS previamente seleccionados.

# I. ANTECEDENTES

## 1.1 LECHE

La leche es el producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de mamíferos, excluyendo al calostro. La leche de diversos animales, tales como vaca, búfala, cabra y oveja, es utilizada para consumo humano, ya sea como tal o en la forma de una gama de productos lácteos (Walstra *et al.*, 2006), siendo mayor objeto de estudio la leche bovina, por su alta tasa de consumo (88% del total mundial). La leche debe someterse a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen su inocuidad. Además, otras operaciones como clarificación, descremado, estandarización y homogeneización se aplican al fluido siempre y cuando no recontaminen al producto y cumplan con las especificaciones de su denominación. Tal es la definición adoptada por la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, la cual establece las denominaciones comerciales de los diferentes tipos de leche que se comercializan dentro de nuestro territorio. Asimismo, la leche también es considerada como el producto íntegro del ordeño completo e ininterrumpido de una hembra lechera sana, bien alimentada y no fatigada y cuya función natural principal es la nutrición de la cría (Walstra *et al.*, 2006; Veisseyre, 1988).

## 1.2 COMPOSICIÓN DE LA LECHE

Las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas de los alimentos están determinadas por las propiedades de sus constituyentes principales; al observar su composición promedio se evidencia la gran complejidad de la leche, la cual contiene todos los macro y micronutrientes esenciales (ver Tabla 1.1). El azúcar principal es un disacárido conocido como lactosa, constituido por glucosa y galactosa. Además, se sabe que la grasa de leche bovina contiene hasta 400 ácidos grasos (AG's), más que cualquier otra grasa, resultando en varios miles de triglicéridos (TG), la principal estructura lipídica en leche. Asimismo,

ésta contiene todas las vitaminas conocidas, algunas en concentraciones muy altas, lo cual se supone es para satisfacer necesidades de cada especie en particular (Fox, 2011).

**Tabla 1.1** Composición aproximada de leche bovina (Walstra *et al.*, 2006).

| Componente            | Contenido promedio en leche (% p / p ) | Rango (% p / p) | Contenido promedio en materia seca (% p / p) |
|-----------------------|----------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|
| Agua                  | 87.1                                   | 85.3 – 88.7     | –                                            |
| Sólidos no grasos     | 8.9                                    | 7.9 – 10.0      | –                                            |
| Grasa en materia seca | 31                                     | 22 – 38         | –                                            |
| Lactosa               | 4.6                                    | 3.8 – 5.3       | 36                                           |
| Grasa                 | 4.0                                    | 2.5 – 5.5       | 31                                           |
| Proteína <sup>a</sup> | 3.3                                    | 2.3 – 4.4       | 25                                           |
| Caseína               | 2.6                                    | 1.7 – 3.5       | 20                                           |
| Minerales             | 0.7                                    | 0.57 – 0.83     | 5.4                                          |
| Ácidos orgánicos      | 0.17                                   | 0.12 – 0.21     | 1.3                                          |
| Misceláneos           | 0.15                                   | –               | 1.2                                          |

<sup>a</sup> Compuestos de nitrógeno no proteico no incluidos.

La composición proteica de la leche bovina es especialmente compleja. Las proteínas de leche se dividen en dos grandes grupos: caseínas y proteínas de suero. Las caseínas son propias de la leche y tienen algunas propiedades específicas: son en cierta medida fosforiladas, poseen una estructura secundaria limitada y se encuentran organizadas en un coloide de asociación denominado micela. Cerca del 80% del total de proteínas se compone de caseínas, en realidad una mezcla de cuatro proteínas mayoritarias:  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ -, y  $\kappa$ -caseína. El resto consiste, en gran parte, de proteínas de lactosuero, siendo  $\beta$ -LG la más importante, aunque también otras como  $\alpha$ -LA, albúmina bovina sérica e inmunoglobulina G se encuentran presentes en cantidades significativas. Finalmente, hay al menos 80 proteínas minoritarias, incluyendo aproximadamente sesenta enzimas distintas (Fox, 2011; Damodaran *et al.*, 2008). La composición mineral de la leche es variada desde los puntos de vista químico (una gran diversidad de sales diferentes, con contenidos considerables de calcio, fósforo, magnesio, sodio, cloruro, etc.) y fisicoquímico

(con estados dispersos solubles e insolubles); una descripción más detallada de los principales componentes de leche se presenta en secciones subsecuentes.

Muchos factores afectan la composición de leche. Dentro de los más importantes se incluyen a la raza, la alimentación, la temporada, la región y la salud de la vaca (Hui, 1993). Estudios sobre las variaciones anuales, estacionales y mensuales en la composición de la leche muestran una asociación significativa con las condiciones climáticas. Los valores altos en cantidad de células somáticas (relacionadas con incidencia de mastitis), número de bacterias totales (BMA's) y los valores más bajos de grasa y proteínas se registran durante los meses de verano, en correspondencia con el aumento en el índice de temperatura-humedad (Bertocchi *et al.*, 2014). Parte de la variabilidad en la composición y los constituyentes en la leche puede ajustarse o contrarrestarse mediante el uso de tecnologías en el procesamiento de alimentos, aunque algunas diferencias pueden persistir (Fox y McSweeney, 1998).

La leche puede ser considerada como un sistema dinámico debido a la inestabilidad de diversas estructuras que contiene; los cambios en estado de dispersión de sus componentes por temperatura y pH son relevantes, teniendo mayor impacto en sales inorgánicas y proteínas. Asimismo, la presencia de enzimas que pueden modificar a los constituyentes de la leche por medio de lipólisis, proteólisis o por reacciones de reducción u oxidación. Finalmente, el crecimiento de microorganismos es un problema relevante en leche, el cual puede causar grandes cambios directamente proporcionales a dicho crecimiento como lo son en el pH o en el potencial redox, así como por enzimas propias de los mismos y el intercambio de gases con la atmósfera como lo es el dióxido de carbono (Fox y McSweeney, 1998).

### 1.2.1 LACTOSA

La lactosa es el hidrato de carbono principal (0-10%) en la leche de la mayoría de especies y es el carbohidrato característico de la leche. Es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa, actuando como azúcar reductor. La concentración de lactosa en la leche es inversamente proporcional a la concentración de lípidos y a la concentración de caseína. La lactosa tiene dos funciones importantes en la leche: es una fuente de energía para el recién nacido y es responsable de aproximadamente el 50% de la presión osmótica de la leche, que es isotónica con la sangre y por lo tanto es esencialmente constante. Para la leche con un nivel bajo de lactosa, la concentración de sales inorgánicas es alta para mantener la presión osmótica en el nivel deseado (Fox, 2011).

Mientras que las propiedades de la lactosa son generalmente similares a las de otros azúcares, se diferencia en algunos aspectos tecnológicamente importantes. Algunas características relevantes de la lactosa incluyen a las siguientes:

- Es un azúcar reductor, es decir, que tiene un grupo carbonilo (un grupo aldehído en el caso de la lactosa) libre, o potencialmente libre.
- Puede participar en la reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático), lo que resulta en la producción de componentes de sabor potencialmente deseables o indeseables dependiendo del producto y polímeros marrones.
- Presenta baja solubilidad, especialmente el isómero  $\alpha$ , en agua, pero cuando está en solución es difícil de cristalizar, lo que puede causar problemas en los productos lácteos ricos en lactosa a menos que se tomen precauciones para inducir y controlar la cristalización.
- Tiene un bajo nivel de dulzura, sólo un 16% más dulce que la sacarosa. Sin embargo, es un agente de aumento muy útil cuando el dulzor excesivo es indeseable.
- Es importante en la fabricación de productos lácteos fermentados, donde sirve como una fuente de carbono para las bacterias ácido lácticas (Fox, 2011).

### **1.2.2 GRASA**

La grasa láctea se compone principalmente de triglicéridos (aproximadamente el 98% de la grasa total), con contribuciones minoritarias de fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres, y mono- y diacilgliceroles. Los ácidos grasos que la componen varían ampliamente a lo largo de la cadena (2 a 20 átomos de carbono) y en cuanto a su saturación (0 a 4 dobles enlaces). Una de las principales propiedades de la grasa es su fusión/cristalización. La grasa láctea se funde en un amplio intervalo de temperaturas, de -35 a 38 °C, con una proporción considerable de la fundición de la grasa entre los 10 y 20 °C. Esta propiedad de fundibilidad, debida a la compleja mezcla de triglicéridos de la grasa de la leche, puede afectar notablemente a las propiedades funcionales de los productos lácteos. El sabor deseable de la grasa de la leche es uno de sus principales atributos. El perfil de sabor es complejo, debido al gran número de compuestos volátiles que contribuyen al aroma y sabor general. Dos reacciones de deterioro, la oxidación y la lipólisis, pueden presentarse en grasa de la leche, desencadenando la producción de sabores desagradables que puede destruir su delicado sabor característico (Taylor y MacGibbon, 2011).

### **1.2.3 PROTEÍNAS LÁCTEAS**

La leche contiene más de 100 proteínas diferentes, las cuales son polímeros muy complejos compuestos por 21 aminoácidos y que generalmente están clasificadas en tres fracciones nitrogenadas: caseínas ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -CN), las cuales se encuentran en mayor proporción (78%); proteínas séricas o proteínas del lactosuero (20%), en las cuales encontramos  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA, e Ig y proteínas de MGG (~1%). Además, la leche contiene una fracción de nitrógeno no proteico (NPN por sus siglas en inglés) (~1%). Las proteínas de la leche también incluyen a una amplia variedad de enzimas (considerándose cerca de 60) y hormonas. Las caseínas y las proteínas del suero están presentes por lo menos como 28 variantes genéticas identificadas. Las caseínas también poseen diferentes grados de glicosilación ( $\kappa$ -Caseína) y fosforilación. También están en una parte hidrolizadas con la

formación de productos de degradación, como la  $\gamma$ -caseína (Dupont *et al.*, 2011). Las proteínas pueden ser clasificadas de acuerdo a la organización de su estructura nativa. Así, las proteínas globulares son aquellas que existen en forma esférica o elipsoidal, resultantes del plegado de las cadenas polipeptídicas en sí mismas (Fennema, 2008). Estas proteínas son de forma globular y son regularmente solubles en soluciones acuosas; constan de un núcleo con empaque de tipo sólido y de una superficie con características líquidas (Savadkoohi, 2013). En su estado nativo, estas proteínas son termodinámicamente estables en rangos específicos de temperatura, pH, fuerza iónica y presión. Sin embargo, se desnaturalizan cuando son expuestas a cambios en las condiciones de su medio ambiente. La mayoría de las enzimas son proteínas globulares.

**Tabla 1.2** Propiedades funcionales de las proteínas lácteas (Taylor, 2007).

| <b>Funcionalidad</b>   | <b>Atributos</b>                                                                                                                                                               |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ligado de agua         | Habilidad para unir moléculas de agua e hinchamiento.<br>Esta característica depende de las interacciones proteína-agua por medio de enlaces peptídico o de cadenas laterales. |
| Solubilidad            | Habilidad para disolver.<br>Prerrequisito para la mayoría de otras propiedades deseables.<br>Depende de variaciones de pH y punto isoeléctrico.                                |
| Estabilidad de calor   | Habilidad para resistir el calor sin espesamiento.<br>Es un atributo esencial para muchas aplicaciones en productos alimenticios.                                              |
| Gelado y viscosidad    | Habilidad para espesar y formar geles.<br>Relacionado con las propiedades de hidratación y la habilidad para formar redes.                                                     |
| Aireado y emulsificado | Habilidad para estabilizar interfaces<br><br>Dependiente de las propiedades anfífilas de las proteínas y su habilidad para desdoblarse en una interface.                       |

Las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos están relacionadas a sus características estructurales y fisicoquímicas. Algunos de los roles funcionales de las proteínas están listados en la Tabla 1.3. Es esencial una comprensión fundamental de las propiedades físicas, químicas, nutricionales y funcionales de las proteínas y los cambios que estas propiedades conllevan durante el procesamiento si se desea mejorar el rendimiento de las proteínas en los alimentos (Fennema, 2008). El uso efectivo de las proteínas en los sistemas alimenticios es dependiente de la modificación de las características funcionales de las proteínas para satisfacer las necesidades complejas de los productos alimenticios manufacturados. Muchas proteínas alimenticias necesitan modificaciones para mejorar sus propiedades funcionales (solubilidad, efecto espumante, emulsificante, etc.) (Chobert, 2012).

#### **1.2.3.1 ESTRUCTURA PROTEICA**

La conformación asumida por las proteínas nativas comprende diferentes tipos dentro de su molécula, que definen sus propiedades inmunológicas, enzimáticas u hormonales (Badui, 2006).

#### **Caseínas**

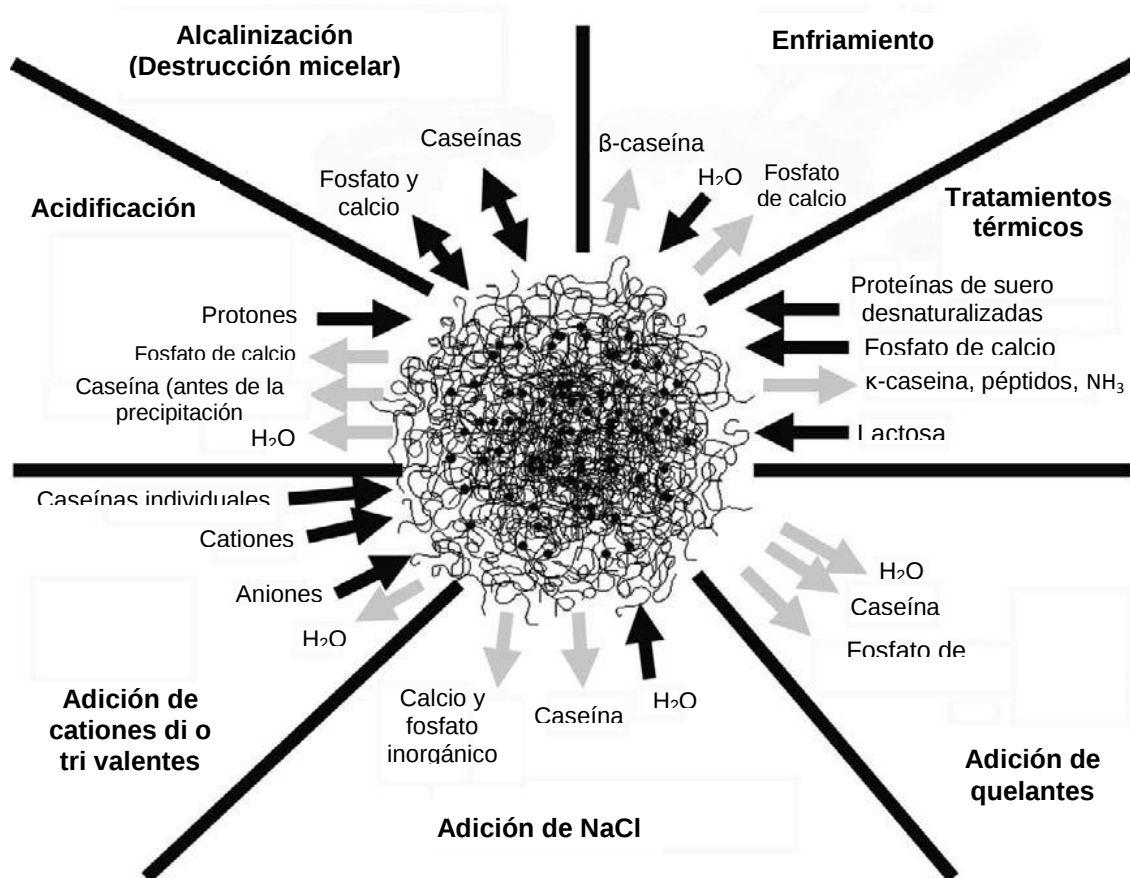
Las caseínas son grupos de fosfoproteínas encontradas en las leches de todos los mamíferos. Estas existen generalmente como agregados complejos o micelas de las proteínas y fosfato de calcio mineral. Debido a que las caseínas utilizan el mismo mecanismo secuestrante de calcio para regular las concentraciones de fosfato de calcio del ambiente, estas han sido identificadas recientemente como miembros de una amplia familia de fosfoproteínas secretoras de unión de calcio provenientes de un gen similar (Horne, 2009).

Las propiedades de las caseínas difieren de las demás proteínas lácteas; son hidrofóbicas, poseen una gran carga, tienen prolinas y pocos residuos de cisteína, forman únicamente cadenas cortas de  $\alpha$ -hélices y tienen poca estructura secundaria y terciaria mínima. Esto no implica que las moléculas de caseína estén enroscadas al azar, aunque en dispersión acuosa, las cadenas se encuentran parcialmente desdobladas. A razón de su estructura micelar y su gran capacidad para la hidrólisis por proteasas nativas (D – plasmina / catepsina), una medición exacta de caseínas en la leche es difícil de lograr (Dupont *et al.*, 2011; Walstra *et al.*, 2006).

Muchos grupos hidrófobos están expuestos, de modo que las moléculas forman fácilmente enlaces hidrofóbicos. Así, las caseínas muestran de este modo una amplia capacidad para asociarse, tanto la asociación existente en sí mismas como una asociación entre micelas de caseína. Se necesita una carga relativamente alta para mantener a la caseína en solución. Las moléculas de caseína no pueden o son difícilmente desnaturalizadas debido a que tienen poca estructura secundaria y terciaria. Debido a esto, las caseínas no se convierten en insolubles mediante calentamiento a temperaturas que estén por debajo de los 100 °C.

La carga alta que poseen las caseínas se debe en parte a sus grupos fosfato, estos son en mayor parte esterificados a residuos de serina; cercanos al pH de la leche se ionizan en gran medida. Los grupos fosfato unen fuertemente iones divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ , especialmente a pH elevados (Walstra *et al.*, 2006). Actualmente, la estructura primaria completa es bien conocida y se ha revelado que existen cuatro diferentes cadenas peptídicas, siendo estas:  $\alpha$ -s1,  $\alpha$ -s2,  $\beta$  y  $\kappa$ , de las cuales su rango molar es 11:3:10:4. Diferencias en fosforilación y glicosilación, así como una proteólisis causan heterogeneidad adicional.

La estructura y estabilidad de las caseínas se pueden ver afectadas por tratamientos diversos. En la Figura 1.1 se presentan algunas de las principales modificaciones de estas proteínas ante algunas de las operaciones típicas de conservación de leche.



**Figura 1.1** Modificaciones en la composición de las micelas de caseína en función de diferentes condiciones fisicoquímica (Adaptado de Gaucheron, 2011).

### Proteínas de suero

La información conseguida sobre la estructura de la proteína del suero y su estabilidad tiene un gran potencial para facilitar el diseño de productos. Estudios recientes demuestran la importancia de conocer dicha estructura y estabilidad, incluyendo los efectos de la presión, temperatura y desnaturalizantes químicos (Edwards *et al.*, 2009). La mayoría de las proteínas del suero usualmente son globulares, teniendo una gran

actividad hidrofóbica y cadenas compactas de péptidos doblados. En su mayoría contienen una proporción notable de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -laminas, en las cuales la distribución de las cargas es homogénea. Se hacen insolubles a valores de pH menores a 6.5 si la leche es calentada, situación contraria a las caseínas debido a que están muy hidratadas, sin contar con tanta carga eléctrica externa. Dichas cargas se relacionan a la desnaturalización de las proteínas involucradas (Walstra *et al.*, 2006).

A diferencia de las caseínas, las proteínas del suero son compactas y globulares con un peso molecular que puede variar entre 14-1000 KDa. En estado nativo, no se asocian con las caseínas, pero en leches tratadas térmicamente y homogeneizadas hay una fracción que si lo hace. Entre las características más importantes de estas proteínas se encuentran que son las primeras en desnaturalizarse dentro del sistema lácteo, liberando grupos sulfhidrilo al incrementar la temperatura. Esto reduce el potencial de óxido/reducción, lo que inhibe de manera parcial dichos procesos. De igual manera, contienen una mayor cantidad de tipos de aminoácidos y presentan un mejor balance de los mismos a diferencia de las caseínas, por lo que su valor nutritivo es superior (Badui, 2006).

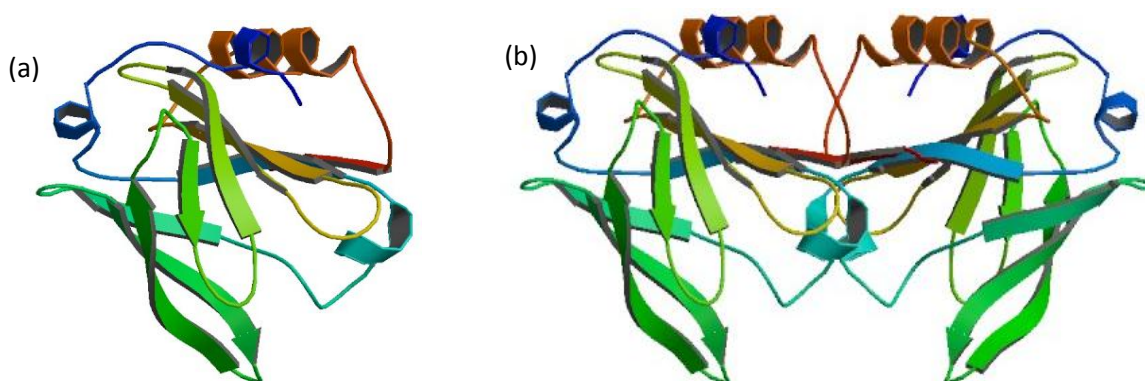
De igual manera, se trata del grupo más heterogéneo de componentes en comparación a las caseínas, compartiendo unas cuantas características, además de ser solubles bajo condiciones en las que las caseínas son insolubles. A diferencia de las caseínas, las cuales carecen de estructura secundaria, las proteínas del suero tienen estructuras secundarias y terciarias altamente organizadas. Tanto la  $\beta$ -LG como la  $\alpha$ -LA son sintetizadas en la glándula mamaria, mientras que la albúmina sérica es transportada en la glándula mamaria por la vía sanguínea. Las características más notables de las principales proteínas séricas se describen a continuación.

### **$\beta$ -Lactoglobulina**

La  $\beta$ -LG representa aproximadamente el 50 % de las proteínas del suero, y aproximadamente el 12 % del total de proteínas, en la leche bovina (Ng-Kwai-Hang, 2011).

Su estructura primaria consiste de una secuencia de 162 aminoácidos por monómero y con un peso molecular de aproximadamente 18 kDa, teniendo 5 residuos de cisteínas capaces de formar uniones disulfuro entre los residuos 66 y 160, 119 y 121 o 106 y 119. La cisteína es especialmente importante porque reacciona, después de la desnaturalización térmica, con el disulfuro intermolecular de  $\kappa$ -caseína y afecta significativamente a la coagulación del cuajo y la estabilidad térmica de la leche, siendo también responsable del sabor a cocido de la leche tratada térmicamente. Se trata de una proteína globular con una estructura terciaria tridimensional bien definida. Tiene una  $\alpha$ -hélice a lo largo del  $\beta$ -barril. Además de estar compuesta de pequeñas moléculas anfifílicas e hidrofóbicas. Las estructuras secundaria y terciaria de las interacciones de la  $\beta$ -LG tienen dos cadenas -S-S- y un grupo sulfhidrilo libre. Este grupo no está expuesto en el estado nativo de la proteína. La  $\beta$ -LG está presente en tres variantes genéticas principales (A, B, C), estando asociadas entre ellas en diferentes valores:  $A > B > C$  (Creamer *et al.*, 2011).

Las interacciones de  $\beta$ -LG dependen directamente del pH, por ejemplo, al ser mayor a 3.5 el dímero se disocia a un monómero ligeramente expandido. A pH 3 a 7 se asocia él mismo para formar dímeros con una geometría parecida a dos esferas que inciden. Entre pH de 3.5 a 5.2 el dímero tetrameriza para dar un octámero. Con pH por encima de 7.5 el dímero se disocia con un cambio conformacional vinculado a dar un monómero expandido (Ng-Kwai-Hang, 2011; Fox, 2009; Fennema, 2008).



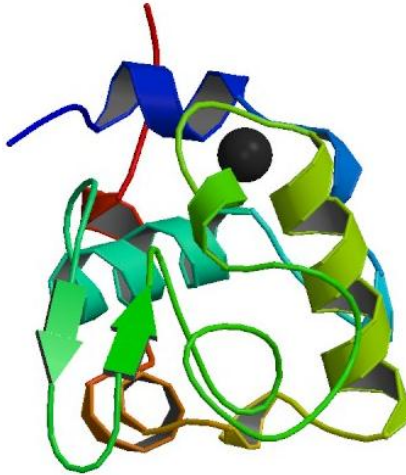
**Figura 1.2** Esquemas de  $\beta$ -LG (a) Monómero (b) Unidad dimérica (Creamer *et al.*, 2011).

$\beta$ -LG es muy resistente a la proteólisis en su estado nativo, lo cual sugiere que su función principal no es con enfoque nutricional, sino que podría tener una o ambas de las siguientes funciones biológicas: a) ligar retinol (vitamina A) en un contenedor hidrofóbico, protegiéndolo de la oxidación y transportándolo a través del sistema digestivo y b) estimular la actividad de las lipasas, a través de su capacidad para unirse a ácidos grasos (Fox, 2009).

### **$\alpha$ -Lactoalbúmina**

Es la más pequeña de todas las proteínas séricas, con una masa molecular de 14.17 KDa (Figura 1.3). Juega un papel muy importante en la biosíntesis de la lactosa, participando como el modificador del complejo lacto-sintetasa. Tiene una secuencia de 123 aminoácidos. Sus 8 residuos de cisteína están conectados por puentes disulfuro entre las posiciones 6 y 120, 28 y 111, 61 y 77 y por último 73 y 91. Diversos estudios revelan que la  $\alpha$ -LA une calcio, fosfolípidos y componentes de membranas (Ng-Kwai-Hang, 2011; Brew, 2011).

Debido a su abundancia y fácil purificación, esta proteína sirve como modelo para el pronto desarrollo de modelos de investigación de las propiedades químicas y biofísicas de las proteínas. Una unión estrecha de  $\text{Ca}^{2+}$  está presente en toda las lactoalbúminas. Este ión no es requerido en la biosíntesis de la lactosa, pero juega un papel importante en cuanto a estructura y estabilidad de la proteína. El calcio puede removerse a pH bajo usando agentes quelantes para producir apoproteínas. La unión de ese ion a una apo-  $\alpha$ -lactoalbúmina resulta muy fuerte (Brew, 2011). A bajas fuerzas iónicas, temperaturas fisiológicas y pH la apo- $\alpha$ -lactoalbúmina tiene una estructura líquida globular, un estado caracterizado por una larga proporción de estructura secundaria, mas no arreglada para una estructura terciaria (Brew, 2011).



**Figura 1.3 Estructura de  $\alpha$ -lactalbúmina (Brew, 2011).**

### **Albúmina Bovina Sérica**

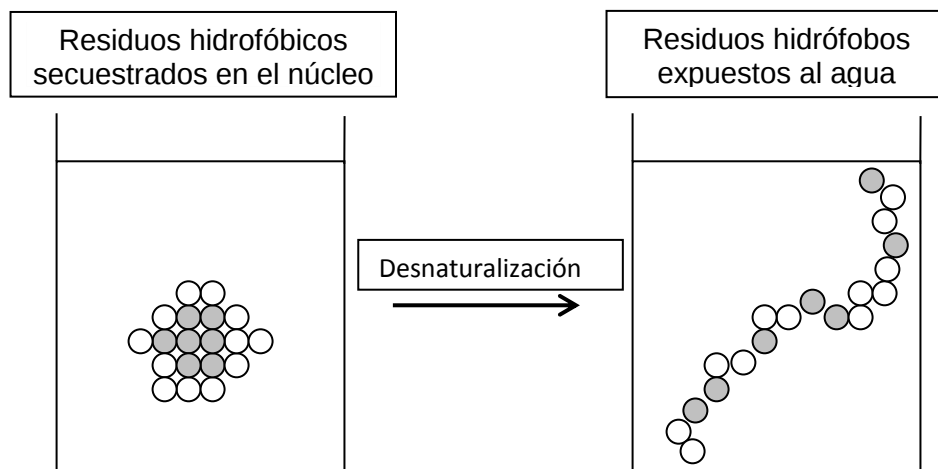
La leche bovina contiene 0.1 – 0.4 g/L de BSA, la cual es una proteína de menor importancia que, probablemente, se encuentra en leche proveniente del suero sanguíneo y no cuenta con una función biológica conocida en la leche. Es una molécula grande que tiene tres dominios globulares, lo que resulta en una forma alargada de 3 x 12 nm de tamaño. Cuenta con 17 enlaces disulfuro y un grupo –SH. Debido a su baja concentración en la leche, la BSA tiene poco efecto en las propiedades fisicoquímicas de proteínas de suero (Fox, 2009; Walstra *et al.*, 2006).

### **Inmunoglobulinas**

La leche bovina contiene 0.6 – 1 g de Ig y son anticuerpos sintetizados en respuesta a la estimulación por antígenos específicos. Se producen específicamente en la sangre. Las inmunoglobulinas (Ig por sus siglas en inglés) son moléculas grandes de glicoproteína de composición heterogénea, incluso dentro de una subclase. IgG1 es la principal Ig en leche bovina, caprina u ovina, con menores cantidades de IgG2, IgA e IgM. Su principal función natural es inmunizar a la cría (Fox, 2009; Walstra *et al.*, 2006).

### 1.2.3.2 DESNATURALIZACIÓN PROTEICA

El término de desnaturalización es usado pobremente para nombrar el cambio de las proteínas de una forma soluble a una forma insoluble. De acuerdo a Neurath *et al.* (1944) la desnaturalización es cualquier modificación no hidrolítica (sin afectar enlaces peptídicos) de la estructura de una proteína nativa, lo cual afecta sus propiedades químicas físicas y biológicas. Cambios adecuados en el ambiente de la proteína nativa como pH, calentamiento, enfriamiento, presurización y agentes pueden conducir a su desnaturalización. Las moléculas desnaturalizadas de las proteínas se someten a un proceso para formar redes de polímeros. En este caso la energía libre del sistema incrementa dentro de la molécula proteica provocando el desdoblamiento de la estructura, resultando así la exposición de los grupos hidrofóbicos. Para que el sistema alcance estabilidad termodinámica, las moléculas forman una red para ocultar las regiones hidrofóbicas. Así, la desnaturalización proteica también puede definirse como la transferencia de residuos hidrofóbicos desde el núcleo hidrofóbico al agua (Figura 1.4). El mecanismo exacto para desnaturalizar depende del tipo de proceso que afecta a la proteína. Eventualmente, la reacción expondrá los residuos hidrofóbicos originando el desdoblamiento y la desnaturalización proteica (Savadkoohi, 2013).



**Figura 1.4 Modelo de transferencia de residuos hidrofóbicos por desnaturalización proteica (Savadkoohi, 2013).**

En leche, las proteínas séricas, debido a su complejidad estructural, son más susceptibles a desnaturalizarse que las caseínas. Varios agentes pueden causar desnaturalización de las proteínas globulares, los cuales se describen brevemente a continuación (Walstra *et al.*, 2006):

- *Temperaturas elevadas* siempre conducen a la desnaturalización (aumento en el efecto del cambio de la entropía conformacional), aunque la temperatura necesaria varía; un valor común de desnaturalización de proteínas séricas es 70 °C.
- *Bajas temperaturas* pueden causar la desnaturalización en algunas proteínas globulares (enlaces hidrófobos llegan a ser un poco débiles o incluso repulsivos); el enfriamiento necesario es casi siempre al menos de -20 °C. En algún lugar entre las temperaturas máxima y mínima de desnaturalización, las proteínas están en su máxima estabilidad conformacional.
- *Alta presión*, es decir, una presión hidrostática o dinámica por encima de los 200 MPa puede también causar la desnaturalización de proteínas séricas, rompiendo enlaces de hidrógeno.
- *pH altos*, por encima de 8 o 9, puede provocar la desnaturalización debido a la repulsión mutua entre los grupos cargados negativamente. Estos valores en el pH rara vez se aplican en la práctica aunque la desnaturalización también puede ocurrir a pH bajos.
- Varios *reactivos* añadidos a una solución de proteína en altas concentraciones causan la desnaturalización, a menudo rompiendo enlaces de hidrógeno, pero estos reactivos no se aplican en la fabricación de productos lácteos. En el laboratorio, se utiliza a menudo urea.
- A menudo, una combinación de dos agentes puede causar la desnaturalización, por ejemplo, un aumento de temperatura moderada y un aumento del pH moderado.

Es común relacionar la desnaturalización con daños a la proteína, ya que pueden perderse funciones fisiológicas, actividad enzimática o bien, modificarse sus propiedades funcionales al ocurrir agregación o insolubilización. La desnaturalización puede ser

deseable cuando se habla de elevar la digestibilidad de las proteínas por cocción o por la desnaturalización de inhibidores de tripsina presentes en las leguminosas. También sirve para mejorar funcionalidad, como cuando se aumentan sus propiedades de espumado y emulsificación por el desdoblamiento de las moléculas que favorece la estabilización en interfaces al lograr la exposición de sitios hidrofóbicos que interaccionan con la fase orgánica o hidrofóbica de una emulsión.

**Tabla 1.3** Cambios en propiedades de proteínas asociados a la desnaturalización.

| <b>Tipo</b>                                  | <b>Efectos en proteínas</b>                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Desnaturalización térmica                    | Fuertemente influida por el contenido de humedad. Facilita digestión proteica. Afecta estabilidad de las interacciones no-covalentes de la estructura tridimensional. |
| Cambios de pH                                | Cambios en la ionización de cadenas laterales cargadas que afecta el número de los puentes salinos que estabilizan la estructura nativa.                              |
| Desnaturalización por urea                   | Afecta interacciones de los puentes de hidrógeno, y por ende las interacciones hidrofóbicas; asimismo, afecta puentes disulfuro.                                      |
| Desnaturalización con detergentes            | Si sobrepasa la concentración micelar crítica del sistema, las micelas inducen el desplegamiento de la molécula.                                                      |
| Desnaturalización con disolventes orgánicos. | Cambios en estructura tridimensional. Cambios hacia una mayor o una menor solubilización dependiendo del tipo de solvente.                                            |

#### 1.2.4 SALES

La fracción de sales de la leche consiste en aproximadamente 8 – 9 g/L de leche. La leche tiene por lo menos treinta elementos inorgánicos, los cuales son importantes bajo el punto de vista tecnológico, nutrimental y de estabilidad fisicoquímica. De estos, 22 minerales son considerados esenciales para la nutrición de los seres humanos, todos ellos (principalmente K, Na, Ca, Mg, Cl y fosfato) presentes en la leche, confirmando su excelencia nutrimental. Se pueden considerar tres familias de componentes de sal en la leche, el primero incluye sodio, potasio y cloruro, que existen casi en su totalidad como iones libres en la leche y son de fácil difusión. Las concentraciones de esta familia están negativamente correlacionadas con la lactosa como requerimiento para mantener el equilibrio osmótico de la leche en la sangre. La segunda familia incluye calcio coloidal, magnesio, fósforo inorgánico y citrato; en base molar, alrededor de dos tercios del calcio,

un tercio del magnesio, la mitad de fósforo inorgánico y menos de una décima parte de citrato en la leche son coloidales y en su mayoría están presentes en las micelas de caseína y es por eso que las concentraciones de Ca coloidal, Mg, fósforo inorgánico y citrato se encuentran fuertemente relacionados con el contenido de caseína en leche. La tercera familia incluye a las sales, cuyas concentraciones se ven afectadas por el pH natural de la leche, estas son el calcio difusible, magnesio difusible, citrato difusible,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Alrededor del 20 a 30 % del Ca y Mg difusibles están presentes como iones libres, el resto existe como sales de citrato y fosfato. Las concentraciones de Ca, Mg y citrato están positivamente relacionadas porque el Ca y Mg forman complejos fuertes con el citrato al pH de la leche. Una relación negativa entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y pH y una relación positiva entre  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  se relacionan con el producto de solubilidad del fosfato de calcio micelar (Goff y Hill, 1993; Walstra *et al.*, 2006). La leche contiene varios elementos en cantidades traza. Los ácidos orgánicos se producen en gran medida como iones o como sales, siendo el citrato el más importante. Además, en la leche también se encuentran componentes misceláneos en cantidades traza (Walstra *et al.*, 2006). Un resumen de la compleja composición mineral de leche se presenta en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.4** Concentraciones de iones ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) determinadas en leche de vaca (Gaucheron, 2011).

| Iones   | Concentración Total | Concentración Micelar |
|---------|---------------------|-----------------------|
| Ca      | 30.0                | 21.0                  |
| Mg      | 5.0                 | 1.5                   |
| Na      | 22.0                | 0.5                   |
| K       | 35.0                | 0.7                   |
| Pi      | 21.0                | 10.0                  |
| Citrato | 9.0                 | 0.9                   |
| Cl      | 30.0                | 0.0                   |

Probablemente, la estructura mineral más importante de leche es el fosfato de calcio micelar (FCM) también conocido como fosfato de calcio coloidal. Éste puede describirse como una mezcla de caseinato de calcio (que contiene fosfato orgánico presente en residuos de fosfoseril de las caseínas) y complejo de fosfato de calcio inorgánico

organizados en estructuras denominadas nanoaglomerados, de vital importancia para la conformación de micelas de caseína, como se explicará en la siguiente sección (Gaucheron, 2011).

### **1.3 QUESO**

#### **1.3.1 DEFINICIÓN**

El queso es el producto obtenido por coagulación de la leche cruda o pasteurizada (entera, semidescremada y descremada), constituido esencialmente por caseína de la leche en forma de gel con mayor o menor grado de hidratación (Eck, 2000). De acuerdo al Codex Alimentarius (FAO/OMS, 2008), el queso es el producto sólido o semisólido, madurado o fresco, en el que el valor de la relación suero proteínas/caseína no supera al de la leche, y que es obtenido por coagulación (total o parcial) de la leche por medio de la acción del cuajo o de otros agentes coagulantes adecuados, con una pérdida parcial de lactosuero (Scott *et al.*, 1998). Desde un punto de vista fisicoquímico, el queso se puede definir como un sistema tridimensional tipo gel, formado básicamente por la caseína integrada en un complejo caseinato fosfato cálcico, el cual por coagulación engloba GG, agua, lactosa, minerales, vitaminas y otras sustancias menores de la leche, las cuales permanecen adsorbidas en el sistema o se mantienen en la fase acuosa retenida (Walstra *et al.*, 2006).

#### **1.3.2 PROCESO DE ELABORACIÓN**

En esencia, el proceso de elaboración de queso es bastante simple; no obstante, involucra fenómenos físicos y químicos muy complejos. Se trata esencialmente de un proceso de concentración, a partir de la coagulación de la proteína mayoritaria de la leche (caseína) por la acción enzimática (cuajo) u otro coagulante de tipo ácido orgánico (comúnmente ácido láctico) (Johnson y Law, 2011). El paso indispensable en la elaboración de los quesos, es la coagulación de la caseína, provocada mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas (cuajos de distintos tipos) y calcio. El proceso de formación del coagulo

incluye dos etapas. En la primera, se desarrolla un proceso enzimático modulado por la quimosina, la cual rompe los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina presentes en la  $\kappa$ -caseína, liberándose el glicomacropéptido en la solución. En la segunda etapa, los agregados del para- $\kappa$ -caseína producen el coágulo en presencia de calcio en solución (Udayarajan, 2007). Hasta la etapa de coagulación, los procedimientos básicos en la elaboración de los diferentes tipos de quesos son muy similares; sin embargo, las etapas siguientes varían de acuerdo con el tipo de queso a producir. Una vez que la leche se ha coagulado, se debe proceder al cortado del coágulo (cortes verticales y horizontales) en pequeños cubos, para favorecer la eliminación del suero (desuerado). Posteriormente se procede a su moldeado, el cual tiene como finalidad dar forma al queso y ayudar a que los gránulos de la cuajada se aglomeren. Generalmente, el moldeado y el prensado se realizan utilizando el mismo equipo, pues los moldes tienen dispositivos que ejercen presión sobre el queso. Comúnmente en el caso de quesos suaves como del tipo *fresco*, no es necesario aplicar presión, pues es suficiente con la que provoca el propio peso del queso (autoprensado). Posteriormente, el queso se sala; el salado, además de proporcionar sabor al producto, evita la proliferación de microorganismos y contribuye a la formación de la corteza del queso. En el proceso, se utiliza sal cristalizada o salmueras de diferentes concentraciones, de acuerdo con el tipo de queso (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012).

### **1.3.3 CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN**

Existen diversos criterios de clasificación con base en las condiciones de proceso o las características fisicoquímicas del tipo de queso:

- a) Por contenido de humedad, se clasifican en quesos duros (20 – 42%), semiduros (44 – 55%) y blandos o suaves (aprox. 55%) (Scott *et al.*, 1998)
- b) De acuerdo al tipo de coagulación de la caseína, se clasifican en quesos de coagulación enzimática, quesos de coagulación ácida y quesos de coagulación ácida/térmica (Gunasekaran y AK, 2003; Fox *et al.*, 2000; Dalglish, 1999).

- c) De acuerdo a su estado de maduración: frescos (6 días), semi-maduros (40 días) y maduros (>70 días) (McSweeney, 2004).

El *queso fresco* presenta distintos nombres según la región de producción y numerosas variantes en cuanto a las técnicas de elaboración. De acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994 el *queso fresco* se caracteriza por un contenido de humedad elevado, un sabor suave y un periodo de vida de anaquel corto, por lo que debe ser refrigerado. De los quesos típicos de México, se consideran como frescos los siguientes: panela, fresco, ranchero, blanco, Oaxaca, requesón, queso crema, algunas variedades de adobera, entre otros.

#### **1.3.4 FACTORES QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES DEL QUESO**

Independientemente del origen de la leche, las propiedades físicas del queso se rigen por la interacción entre las moléculas de caseína. Algunos de los factores que influyen en estas interacciones varían en función del tipo de queso, el grado de maduración, su composición química (en particular, el contenido de caseína y la distribución de la humedad y la grasa), el contenido de la sal, pH y acidez, así como determinadas condiciones medioambientales como la temperatura (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012).

##### **1.3.4.1 CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS**

En general, se puede decir que existen dos fenómenos opuestos que controlan la firmeza del queso. El primero consiste en la acción de las diferentes enzimas proteolíticas sobre la matriz proteica, principalmente sobre la  $\alpha_{s1}$ -CN, que da como resultado una disminución de la firmeza y, en consecuencia, modificaciones en algunas propiedades como el color, la elasticidad y textura del queso. El segundo es el efecto de pérdida de humedad, que al provocar una disminución de la hidratación de las proteínas conduce a una mayor interacción de las mismas provocando el aumento de la firmeza de la matriz proteica (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012). En los quesos frescos, la elevada humedad y el bajo pH, son condiciones que afectan notoriamente la textura y sabor durante la conservación,

de forma que una excesiva proteólisis podría ocasionar defectos como una textura excesivamente blanda y un sabor amargo (Fox y McSweeney, 1996). La sal además de tener un papel en el sabor y conservación del queso, en altas concentraciones disminuye la actividad enzimática proteolítica, aumentando la salida de agua presente en la red proteica de la cuajada (sinéresis) ocasionando con ello, menor humedad y por lo tanto mayor dureza en el queso. La acidez en el queso, es otro factor que no sólo tiene incidencia sobre el sabor, sino también directamente en los cambios que experimenta la red proteica (cuajada) del queso, teniendo ésta una correlación directa en los fenómenos de sinéresis (es decir; a mayor acidez, mayor sinéresis) y textura final.

Otro cambio bioquímico en queso es la lipólisis, en la cual, en la estructura del queso, la grasa se encuentra distribuida como material de relleno en la matriz proteica. Por lo tanto, si se incrementa su contenido en la formulación el queso presentará menor firmeza y mayor elasticidad mientras que cuando su contenido reduzca (ya sea por acción lipolítica o intencional para fines de obtener un producto con bajo contenido de grasa) se obtendrán quesos más duros y rígidos. Se reconoce también que el pH es uno de los parámetros que afecta sobre todo las propiedades texturales del queso, debido a su efecto sobre la red de proteínas. Un pH cercano al punto isoeléctrico provoca fuertes fuerzas iónicas e hidrófobas, que resultan en una red de caseína compacta típica de los quesos duros, mientras que el caso de un pH más alto, las caseínas presentan una carga negativa, lo que genera repulsión entre los agregados proteicos, generándose un queso con mayor humedad, más elástico y menos compacto (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012). La proteólisis es otro cambio bioquímico donde se degradan las proteínas en compuestos de menor peso molecular, péptidos y aminoácidos, mediante enzimas específicas (proteasas) provenientes del coagulante utilizado, algunas endógenas de leche o del cultivo iniciador. Este proceso es el principal responsable de los cambios en la textura del queso, como son: dureza, elasticidad, cohesión, fracturabilidad, capacidad de estiramiento, entre otros. También contribuye con el desarrollo de diferentes sabores a través de la liberación de los aminoácidos y su catabolismo (Gallegos Pineda, 2015).

### 1.3.4.2 CAMBIOS ASOCIADOS A PRETRATAMIENTOS DE LECHE

#### Tratamientos térmicos

El tratamiento térmico es usado invariablemente a fin de preservar la leche mediante la eliminación de organismos patógenos o deteriorativos, la inactivación de enzimas o por la alteración del estado fisicoquímico (Oldfield, 1996). Los efectos del tratamiento térmico sobre los componentes de la leche (proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales) son muy importantes para el carácter del producto final ya que se someten a modificaciones que afectan a la calidad sensorial y nutricional de la leche. Se describen dos grupos de reacciones que se pueden usar para evaluar los tratamientos térmicos. El Tipo I incluye la desnaturalización, la degradación y la inactivación de componentes termolábiles, tratándose principalmente de proteínas de suero, enzimas y vitaminas. Las reacciones de Tipo II incluyen la formación de sustancias que no están presentes, o solamente existen a nivel traza, en la leche no procesada (lactulosa, hidroximetilfurfural, furosina, etc.) (Morales *et al.*, 2000).

En general, los tratamientos térmicos más intensos (p.e enlatado, UHT) permiten prolongar la vida de anaquel de alimentos selectos en mayor medida que los tratamientos moderados (como pasteurización), aunque esto conlleve mayores modificaciones en la calidad sensorial, funcional y nutrimental de los productos. La pasteurización es conocida como el método de conservación estándar de leche; que consiste en el calentamiento uniforme de cada partícula del producto y buscando la destrucción de todos los microorganismos patógenos, coliformes y la mayoría de los psicrótrofos, sólo sobreviviendo los mesófilos termorresistentes. El tratamiento se lleva a cabo de acuerdo a condiciones predeterminadas de proceso (LTLT; HTST; HHST, high heat, shorter time, p.e 94 °C, 0.1 s). No obstante, se han reportado cambios biológicos, químicos y fisicoquímicos en leche durante el procesamiento térmico y su posterior almacenamiento refrigerado; estos impactan negativamente sus propiedades nutrimentales, sensoriales y/o

tecnológicas por lo que se ha propuesto emplear tecnologías no térmicas como una alternativa de conservación de leche, ya sea como un método único, o acoplado con tratamientos térmicos (Ruiz Espinosa, 2017).

Además de los métodos tradicionales de conservación como la pasteurización, ultrapasteurización, secado y congelado, una variedad de nuevas tecnologías está ahora disponibles para mejorar la inocuidad y eficiencia del procesamiento de leche, su vida de anaquel, y propiedades funcionales, para elaborar diversos productos e ingredientes (Ashokkumar *et al*, 2010). En años recientes, se ha investigado sobre nuevas tecnologías que favorezcan la innovación de productos alimenticios, proponiendo mejoras sobre estos mismos, apartadas de los procesos térmicos convencionales utilizados para su conservación y de sus cambios indeseables, principalmente sensoriales y funcionales. Dentro de estas tecnologías, denominadas *emergentes* o *no térmicas*, podemos mencionar a alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsados, homogeneización a alta presión, microfluidización, pulsos de luz visible, luz ultravioleta y ultrasonido US (Mason *et al.*, 2011; Ashokkumar *et al*, 2010).

### **Procesamiento a Alta Presión**

En la actualidad, una de las tecnologías no térmicas más aplicada en el tratamiento de alimentos es el procesamiento a alta presión o HPP (por sus siglas en inglés). El HPP ha sido capaz de escalar de nivel laboratorio a planta piloto y operación industrial en los últimos 20 años. HPP es la tecnología emergente con más productos a la venta en el mercado, tales como jugos de frutas, jamón York, frutas y verduras, salsas, postres, productos lácteos, pescados y mariscos, huevos y guacamole, con alta aceptación por los consumidores (Bermúdez-Aguirre y Barbosa Cánovas, 2011).

Esta tecnología se basa en dos principios fundamentales, el principio de Pascal, el cual especifica que la presión en cualquier punto de un fluido es la misma en todas las

direcciones, ejerciendo la misma fuerza sobre superficies iguales; y el principio de Le Chatelier que define que, si un sistema en equilibrio es perturbado, éste se desplaza para contrarrestar el cambio hasta alcanzar una nueva posición de equilibrio. Durante el tratamiento a HPP, cualquier reacción relacionada con una reducción en el volumen (como el cambio en la configuración molecular, fase de transición o reacciones químicas) se verá mejorada y viceversa. Muchos cambios tienen lugar como resultado de un cambio de volumen causada por la presión, dichos cambios son dependientes de varios parámetros tales como la intensidad del tratamiento, la temperatura, la longitud de proceso y la acumulación de presión y el sistema de descompresión, entre otros (Evert, 2013).

También, el HPP tiene algunos efectos sobre el material presurizado, actuando sobre las fuerzas interactivas no covalentes que estabilizan la estructura de biopolímeros, tales proteínas y polisacáridos y, como consecuencia, el proceso puede inducir la desnaturalización, agregación y formación de gel de los componentes principales de los alimentos. En la tecnología de quesos, la mayoría de los estudios se han centrado en la aplicación de HPP en la inactivación de los microorganismos, así como en las modificaciones de la maduración del queso (deceleración o aceleración). Otras aplicaciones de la HPP en el queso incluyen la aceleración de absorción de la salmuera, incremento de rendimiento en queso y mejoramiento de textura de quesos bajos en grasa, entre otras (Evert, 2013).

#### **1.4 ULTRASONIDO**

El US se refiere a las ondas sonoras por encima de la frecuencia del oído humano ( $\sim > 18$  kHz). Hay un amplio margen para nuevas investigaciones sobre el uso del US en el procesamiento de alimentos, tanto desde un punto de vista industrial como de investigación. Las aplicaciones en la industria de alimentos de esta tecnología emergente pueden dividirse en dos categorías; US de baja potencia (energías bajas y altas

frecuencias) en el rango de los MHz para pruebas no destructivas y el US de alta potencia (alta intensidad y baja frecuencia) en el rango de los kHz utilizados en procesamiento. La primera categoría implica el uso de frecuencias superiores a 100 kHz con intensidades por debajo de  $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^2$ . El US de baja intensidad utiliza un nivel de potencia tan pequeño que las ondas ultrasónicas no causan alteraciones físicas o químicas en las propiedades del material a través del cual pasa la onda, generalmente considerándose no destructiva (Mason *et al.*, 2011; Ashokkumar *et al.*, 2010). El uso más frecuente que se le da a este tipo de US en la industria alimentaria es como técnica analítica para proporcionar información sobre características fisicoquímicas en los alimentos, como la composición, la estructura y su estado físico (Dolatowski *et al.*, 2007; Fellows, 2000).

Por su parte, el USP utiliza intensidades mayores a  $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^2$  (generalmente en el rango de  $10 - 1000 \text{ W}\cdot\text{cm}^2$ ) y con frecuencias entre los 18 y 100 kHz (Dolatowski *et al.*, 2007; McClements, 1995). Los efectos químicos, mecánicos o físicos de las ondas de US en ese rango pueden alterar propiedades del material en el cual se emplee. El USP ha sido utilizado por varios años para generar emulsiones, destruir las células y dispersar agregados materiales. Recientemente, han sido identificadas diversas áreas con un mejor potencial para el desarrollo del futuro, por ejemplo, control y modificación de procesos de cristalización, de gasificación, de alimentos líquidos, inactivación enzimática, mejora de secado, filtración y la inducción de reacciones de oxidación.

Durante el proceso de sonicación, ondas longitudinales son creadas cuando una onda sónica se transmite en un medio líquido. De este modo, se crean regiones de compresión y expansión alterada. Estas regiones de cambios de presión causan formación de burbujas de gas en el medio. Dichas burbujas tienen un área superficial larga durante su ciclo de expansión el cual incrementa la difusión del gas, causando que la burbuja se expanda. Entonces, es alcanzado un punto donde la energía ultrasónica proporcionada no es suficiente para retener la fase vapor de las burbujas y al mismo tiempo ocurre una condensación rápida. Las moléculas condensadas colisionan violentamente creando ondas

de expansión. Estas ondas crean regiones de muy alta temperatura y presión, alcanzando hasta 5500 °C y 50 MPa. Esto es debido al hecho de que el colapso se produce en un tiempo muy corto (<1 microsegundo) que conduce a un calentamiento casi adiabático del interior de la burbuja. Al fenómeno de formación y colapso violento de burbujas se le denomina cavitación, que genera micro corrientes que son capaces de mejorar la transferencia de calor. Los efectos combinados de vibración mecánica, corrientes acústicas y cavitación pueden mejorar la transferencia de masa, la velocidad de reacción y la eficiencia de extracción. Los efectos físicos no cavitacionales (vibraciones mecánicas y de transmisión acústica) y los efectos físicos por cavitación (fuerzas de cizallamiento, ondas de choque, microjets, etc.) del US se han utilizado para asistir una serie de aplicaciones que incluyen emulsificación, extracción, limpieza, homogeneización, entre otras (Ashokkumar *et al.*, 2010; Dolatowski, 2007).

La ultrasonificación ha sido identificada como una tecnología particularmente prometedora para procesar materias alimenticias específicas incluidas aquellas de naturaleza láctea. La elección de la frecuencia para aplicaciones específicas se basa en los requisitos de efectos físicos, químicos o una combinación de ambos. En las aplicaciones de elaboración de alimentos y productos lácteos, se prefiere US de baja frecuencia ya que los efectos físicos son más fuertes y la producción/reacción de radicales no es significativa. Del mismo modo, suelen preferirse tiempos cortos de exposición. Aparte de la eficiencia energética de una corta exposición, estudios han demostrado que la sonicación prolongada de leche podría generar una serie de compuestos orgánicos volátiles que pueden ser responsables de un aroma indeseable (denominado plástico). Estos compuestos se relacionan con reacciones de pirólisis dentro de las burbujas de cavitación y con la oxidación de los lípidos inducida por radicales libres, resultantes de la descomposición de hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados. Por otra parte, la formación de espuma de soluciones lácteas durante su procesamiento puede reducir el rendimiento del producto final y puede acelerar la degradación oxidativa. Estudios reportan la utilización de US pulsado a 20 kHz para desgasificar leche descremada reconstituida; mientras que las burbujas de gas fueron

fácilmente removidas en menos de 5 min de sonicación, el contenido de oxígeno disuelto no se podía reducir de manera significativa, incluso después de 20 min. Estudios recientes han demostrado que el US puede ser un método eficaz para la reducción al mínimo de espuma (Ashokkumar *et al.*, 2010).

#### **1.4.1 APLICACIONES DE ULTRASONIDO DE POTENCIA EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

Ertugay *et al.* (2004) estudiaron el efecto del tratamiento del US en la homogeneización de la leche a 20 kHz y compararon los resultados con los obtenidos de un homogeneizador convencional. El tamaño de distribución de los GG después de la homogeneización convencional (200 bar y 55 °C) fue de aproximadamente 2 – 5 µm. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 1.5, el intervalo de tamaño de los GG en las muestras de leche homogeneizadas por US era mucho más pequeño. El tamaño promedio y la distribución del tamaño de los GG dependían de la energía ultrasónica y la duración de la sonicación, se encontró que el tratamiento con US de alta amplitud tuvo un efecto importante en la homogeneización de la leche en comparación con homogeneización convencional. A medida que los tiempos de exposición y niveles de potencia se incrementaron, la eficiencia de homogeneización también se incrementó. Atribuyeron el tamaño más pequeño observado de los GG a los efectos físicos generados durante la cavitación acústica.

Cuando una tecnología emergente se combina con un tratamiento térmico se busca establecer un proceso mixto que garantiza la inocuidad mediante su componente térmico mientras que genera funcionalidades únicas con el no térmico. A la tecnología mixta que combina un tratamiento térmico con US se le denomina TS.

Como efecto de su aplicación, se han observado variaciones en la desnaturalización de las proteínas de lactosuero, acompañado de mejoras en otras características como color, apariencia y homogeneización. Bermúdez–Aguirre *et al.* (2008) estudiaron los cambios de

la microestructura de los GG en leche entera después de ser sometida a tratamientos de TS. La sonicación (24 kHz, 400 W teóricos, 30 min) de leche entera con un tratamiento térmico (63 °C, 30 min), dio como resultado glóbulos de < 1 µm con más sitios de unión en la MGG favoreciendo la fusión de caseínas y proteínas del suero y por lo tanto la producción de un ingrediente ideal para la elaboración de queso. Los autores sugirieron que los cambios observados se debieron a la cavitación ya que el tratamiento de calor por sí solo no mostró cambios similares a los GG. En otra investigación se estudiaron las propiedades reológicas del yogurt elaborado con leche sometida a TS. La textura y firmeza del yogurt se vieron mejoradas significativamente por el procedimiento de TS (Ashokkumar *et al.*, 2010). Asimismo, Riener *et al.* (2009) estudiaron el efecto de TS de leche sobre propiedades fisicoquímicas y microestructurales selectas de geles de yogurt durante su fermentación, donde prepararon cultivos de yogurt (0.1, 1.5 y 3.5 % de grasa) a partir de leche precalentada a 45 °C y sometida a TS durante 10 min a 24 kHz. Los resultados fueron comparados con la preparación convencional de yogurt con leche precalentada (90 °C, 10 min). Los cultivos elaborados con leche termosonicada tuvieron valores de pH, firmeza de gel y viscosidad más altos y mayor capacidad de retención de agua (CRA) que los elaborados con procedimiento convencional. Asimismo, la microestructura de las leches termosonicadas mostró que éstas tienen una red que presenta una naturaleza más porosa y un tamaño de partícula promedio más pequeño (< 1 µm) en comparación a los yogures convencionales. Los resultados se atribuyeron a cambios en las interacciones proteína–proteína y proteína–lípidos que impulsaron la mejora de la firmeza sobre los yogures convencionales, también a que se pudo promover una unión mejorada de agua dentro de la red tridimensional con efectos benéficos sobre la CRA.

En cuanto a la exploración de los efectos que pretratamientos de TS puede causar en queso, Bermúdez – Aguirre *et al.* (2010) procesaron *queso fresco* con leche TS. Diversos parámetros fisicoquímicos fueron evaluados, así como la calidad microbiana durante el almacenamiento (4 °C). La leche fue sonicada (400 W, 24 kHz, 120 µm) para

posteriormente ver su interacción en siete sistemas diferentes (uno sin tratar; 63 °C/30 min; 63 °C/10 min + sonicación; 63 °C/30 min + sonicación; 72 °C/15 s; 72 °C/15 s + sonicación y 72 °C/1 min + sonicación). Los resultados mostraron que se redujeron los tiempos de coagulación considerablemente, el rendimiento del queso y la luminosidad ( $L^*$ ) de queso incrementaron; propiedades de textura e imágenes de microestructura arrojaron resultados satisfactorios. La vida útil se prolongó hasta más de 23 días y el producto se consideró de una mayor calidad global. Los cambios observados se atribuyeron a un reordenamiento microestructural de componentes selectos de leche, como GG y micelas de caseína.

Almanza–Rubio *et al.* (2016) realizaron un estudio sobre la modificación de propiedades texturales y reológicas de queso crema a partir de leche termosonicada, elaborando queso crema con leche sometida a US (20 kHz) con combinaciones variadas de potencia (0 – 100 W), temperatura (4 – 63 °C) y tiempo (0 – 30 min). Los resultados principales mostraron que la TS de la leche redujo el tamaño de los glóbulos de materia grasa aumentando el contenido de grasa y el rendimiento del queso crema. Además, la TS de leche mejoró significativamente la termoestabilidad del queso crema. Los autores determinaron que los resultados obtenidos se deben a la cavitación acústica que conlleva a la producción de fuerzas físicas fuertes como cavitación, cizalladura, turbulencia y generación de calor. Así, estas fuerzas reducen el tamaño de los GG y también pueden alterar la MGG modificando la habilidad de estos para interactuar entre ellos y con caseínas.

Por otro lado, dentro del Cuerpo Académico Consolidado *Innovación en Tecnología para el Desarrollo de Productos Alimenticios* de la BUAP, se han llevado a cabo estudios sobre la aplicación de la TS en leche y diversos productos lácteos derivados. En este sentido, Pérez Mata (2014) y Gallegos Pineda (2015) estudiaron la influencia de tratamientos de TS en leche de quesería empleada para la elaboración de queso Mozzarella y queso Chihuahua (respectivamente). Dentro de los principales cambios observados en los quesos tipo Mozzarella, Pérez Mata (2014) menciona que se observó un rendimiento mayor para los

productos elaborados con leche TS, principalmente a 720 s y 100 % amplitud. Asimismo, los quesos TS fueron más blancos (mayor luminosidad) durante todo el periodo de muestreo, atribuible a la homogeneización de GG inducida por el US. Además, exhibieron una menor firmeza a todos los tiempos de muestreo y, tanto la capacidad de fundido como la liberación de aceite disminuyeron significativamente producto de la TS. Mientras tanto, Gallegos Pineda (2015) observó que los quesos Chihuahua TS elaborados (50% amplitud, 6 min y 100 % de amplitud, 4 min) presentaron incrementos sustanciales en los tiempos de cocimiento y cheddarización requeridos en comparación con un queso LTLT, además presentaron un mayor rendimiento (mayor a 0.96 %), humedad (por encima del 3.96 %) y luminosidad y menor firmeza y pH que los quesos LTLT.

## **II. METODOLOGÍA**

La metodología del presente trabajo fue dividida en tres etapas.

### **2.1 ETAPA I**

El objetivo de esta etapa fue probar condiciones preliminares (amplitud y tiempo de sonicación) de procesos USP en leche bovina descremada mediante un modelo de caras centradas que permitieran estudiar su capacidad tecnológica para elaborar quesos tipo Panela, analizando la presencia de posibles cambios en propiedades funcionales relacionadas con proteínas sobre los quesos elaborados.

#### **2.1.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LECHE**

Se adquirió leche cruda de un proveedor local en la ciudad de Puebla, México y posteriormente se descremó (0.05 % – 0.09 % grasa) utilizando una descremadora centrífuga eléctrica SCM, (LKL, Nova Zagoria, Bulgaria) con capacidad de 120 L/h. Se determinó su composición inicial (grasa, proteína, sólidos no grasos), de acuerdo al valor promedio de 15 determinaciones realizadas con un analizador rápido ultrasónico Lactoscan LA (Nova Zagoria, Bulgaria). Los valores promedios obtenidos fueron considerados para el resto de las pruebas de esta etapa.

#### **2.1.2 CONDICIONES DE OPERACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTOS DE TS**

El proceso de US se aplicó utilizando un procesador ultrasónico Hielscher UP400S (Teltow, Alemania) con una potencia eléctrica máxima de salida de 400 W, una frecuencia fija de 24 kHz, un sonotrodo de 22 mm de diámetro (H22L2D, amplitud máx. 100  $\mu\text{m}$ ) con una densidad de potencia acústica de 85 W/cm<sup>2</sup>.

El procesador cuenta con un control externo que permite variar la potencia de salida por medio del porcentaje de amplitud de onda aplicada que va de 20 al 100 %. Debido a las características de diseño del equipo la sonda queda ajustada y fija en un recipiente de vidrio enchaquetado o *reactor* (SEV, Puebla, México) (Figura 2.1) por lo que en esta prueba el sonotrodo quedó inmerso a una profundidad de 9.5 cm en la leche ya que, para cada tratamiento de TS, se colocaron 2 L de leche en el reactor correspondiente a su capacidad neta. Al reactor se le colocó un adaptador en la entrada para ajustar correctamente el sonotrodo.

Durante el proceso de TS, la temperatura fue registrada a todo momento, aunque para esta etapa en particular no fue controlada con la finalidad de determinar la potencia efectiva ultrasónica de salida para cada tratamiento, como se explica en la siguiente sección.



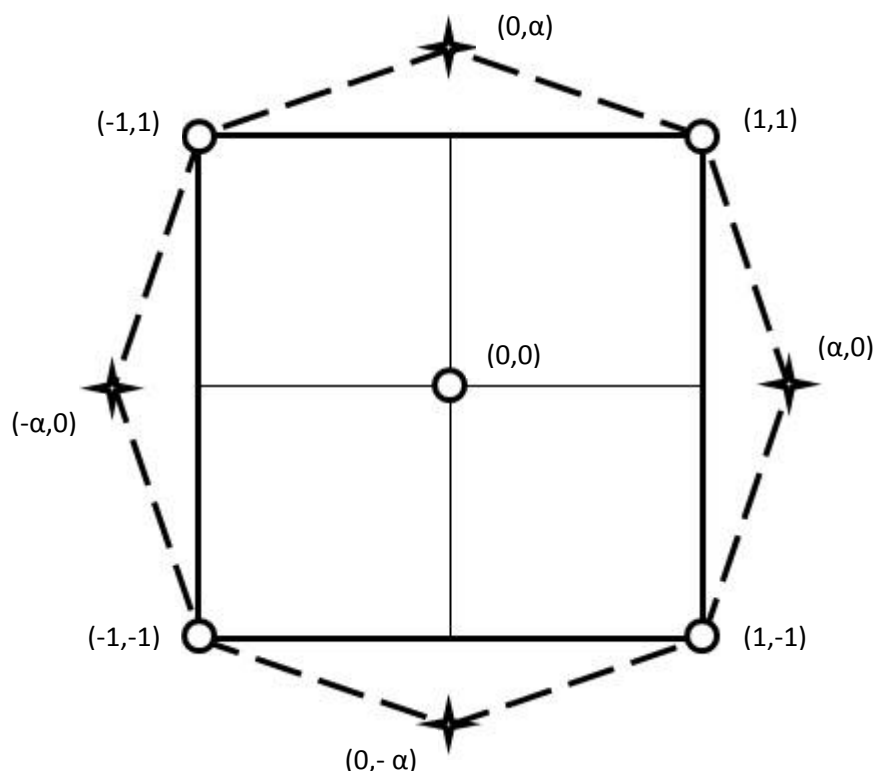
**Figura 2.1 Recipiente enchaquetado para sonicación de leche.**

Después del tratamiento de US, la leche fue pasteurizada a 63 °C, 30 min utilizando un Mini Eco Pasteurizador por lotes FJ 15 (Milky, Austria) y en seguida se enfrió rápidamente sumergiendo el recipiente en un baño de hielo hasta que la muestra alcanzara la temperatura de  $32 \pm 0.5$  °C. Se realizaron diferentes tratamientos de TS; 100 %, 5 min; 64 %, 10 min y 5 min; 28 %, 5 min (Tabla 2.1). Las condiciones de amplitud y tiempo

propuestas fueron delimitadas de acuerdo a un diseño aleatorizado de caras centradas descrito en la Figura 2.2, del cual se eligieron los puntos externos con la finalidad de exponer los valores máximos y mínimos de potencia de salida. Un queso elaborado con leche pasteurizada térmicamente sin tratamiento de US fue utilizado como control.

**Tabla 2.1** Tratamientos de US aplicados.

| Tratamiento | Amplitud (%) | Tiempo De Sonicación (Min) |
|-------------|--------------|----------------------------|
| Control     | -            | -                          |
| 1           | 100          | 5                          |
| 2           | 64           | 10                         |
| 3           | 64           | 5                          |
| 4           | 28           | 5                          |



**Figura 2.2** Diseño de caras centradas de los tratamientos ultrasónicos aplicados. Los valores utilizados (Tabla 2.1) corresponden a los ubicados en los paréntesis que contienen  $\alpha$  y el punto central.

### 2.1.3 DETERMINACIÓN DE POTENCIA ULTRASÓNICA EFECTIVA POR CALORIMETRÍA

La potencia efectiva de los tratamientos fue calculada a partir de un método calorimétrico (Torkamani *et al.*, 2014). Se colocaron 2 L de leche bovina cruda descremada sin estandarizar en el mismo reactor enchaquetado y se sonicó bajo las mismas condiciones descritas en la Sección 2.2. Durante los tratamientos de US, no se recurrió a la recirculación en el reactor enchaquetado para controlar la temperatura, sólo se registró el incremento de temperatura con ayuda de una sonda acoplada al controlador del dispositivo ultrasónico (UPCCTRL V3.2 WIN) conectado a una computadora personal. Los tratamientos se realizaron por duplicado bajo las condiciones descritas en la Tabla 2.1. El cálculo de la potencia efectiva de cada tratamiento se realizó mediante la Ecuación 1:

$$P = m * C_p * (dT/dt) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

P = Potencia efectiva determinada para el tratamiento en W

m = Masa de leche (kg )

C<sub>p</sub> = Calor específico (J/ (kg °C))

(dT/dt) = Pendiente de la relación tiempo/temperatura obtenida para cada tratamiento de sonicación.

El C<sub>p</sub> para la composición específica de leche (determinada mediante Lactoscan LA) se obtuvo mediante la sumatoria (Ec. 2) de las ecuaciones de Choi y Okos para cada *i* componente (ver Apéndice I), a la temperatura de operación (Singh y Heldman, 2009).

$$C_p = \sum_{i=1}^n C_{p_i} X_i \quad (\text{Ec. 2})$$

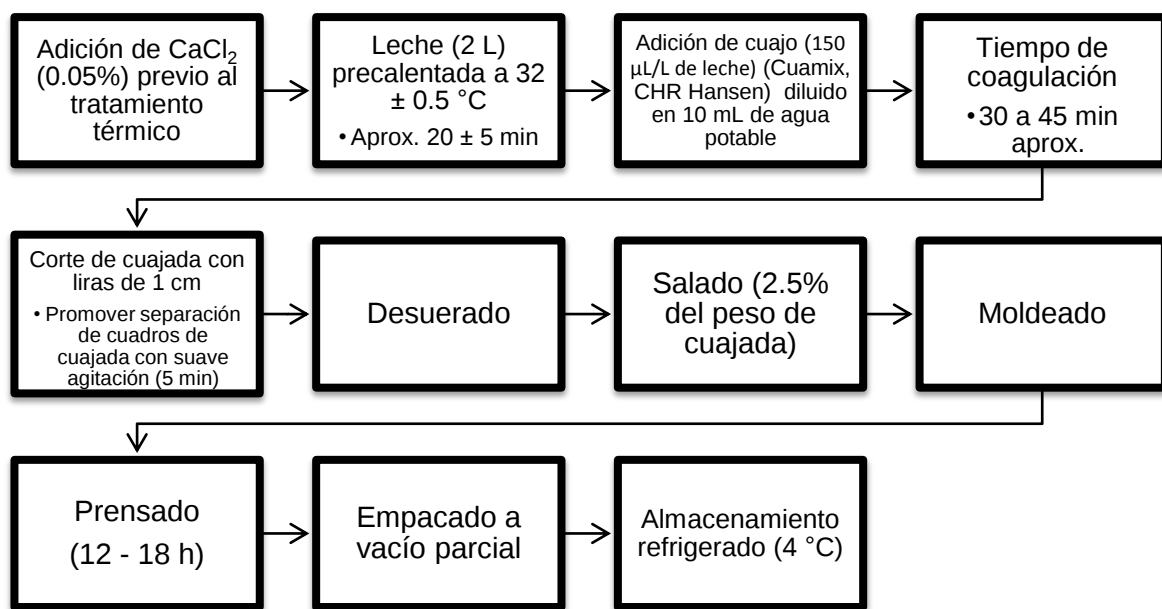
Donde:

$C_p$  = Es el calor específico para el componente  $i$

$X_i$  = Es la fracción peso del componente  $i$

#### **2.1.4 ELABORACIÓN DE QUESO TIPO PANELA**

Los quesos fueron elaborados siguiendo una adaptación a escala laboratorio del procedimiento estándar de fabricación (Ruiz Espinosa, 2017), el cual se esquematiza en la Figura 2.3. Previo a su coagulación enzimática, la temperatura de la leche se mantuvo a  $32 \pm 0.5$  °C por aproximadamente  $20 \pm 5$  min. Posteriormente, se añadió cuajo líquido estandarizado termoresistente de origen microbiano (Cuamix, Chr. Hansen México) en una proporción de 150  $\mu$ L/L de leche, previamente diluido en 10 mL de agua, y se dejó coagular por un intervalo de 25 – 35 min, hasta alcanzar una firmeza apropiada. El corte de cuajada se realizó con liras de 1 cm de ancho; los cubos de cuajada se agitaron suavemente en el suero durante 5 min. Después, se desueró la cuajada usando manta de cielo. Por último, se pesó la cuajada resultante y se añadió sal al 2.5 % del peso total. El queso se prensó de 12 a 18 h y se empacó en bolsas de polipropileno, sellándolas con un vacío moderado para minimizar la sinéresis, almacenándose finalmente bajo refrigeración (4 °C).



**Figura 2.3 Diagrama de elaboración de Queso Panela.**

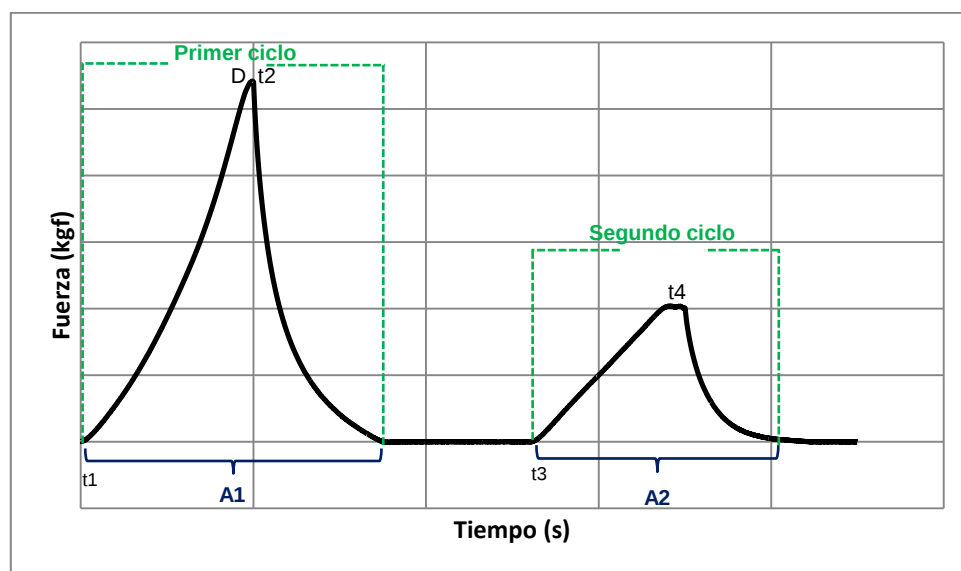
### 2.1.5 ANALISIS DE PERFIL DE TEXTURA (TPA)

El TPA de queso se realizó con un Texturómetro TAXT-Plus (Texture Technologies, Surrey, Reino Unido) (Figura 2.4) utilizando cilindros de queso de 17 mm de diámetro y 20 mm de alto. Las muestras fueron colocadas en el equipo y comprimidas dos veces a temperatura ambiente con una sonda de 25 mm a 1 mm/s hasta un 50 % de su altura original (Caro *et al.*, 2011). Los parámetros utilizados en la prueba fueron: modo de prueba colocado como compresión, velocidad de prueba de 1 mm/s, compresión de 10 mm (la mitad del tamaño de las muestras colocadas), realizándose los dos ciclos necesarios en cada muestra y con una fuerza aplicada de 0.005 N. El equipo se calibró antes de cada prueba. A partir de los gráficos de fuerza contra tiempo (Figura 2.6), se calcularon las propiedades mecánicas de dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad (Caro *et al.*, 2011). Los términos de TPA se definieron de la siguiente forma: Dureza (D) como la fuerza requerida para comprimir la muestra al 50 % de su altura original durante el primer ciclo de compresión. Cohesividad (C) como el cociente entre las áreas bajo las curvas del segundo

y primer ciclo de compresión ( $A2/A1$ ). Elasticidad ( $E$ ) como el cociente entre los tiempos que toma comprimir la muestra hasta un 50 % de su altura original en el segundo y primer ciclo de compresión ( $t_4-t_3/t_2-t_1$ ). Gomosidad ( $G$ ) como el producto de la dureza y la cohesividad ( $D \times C$ ). Masticabilidad ( $M$ ) como el producto de la gomosidad por elasticidad ( $G \times E$ ) (O'Mahony *et al.*, 2005).



**Figura 2.4** Texturómetro TAXT-Plus (Texture Technologies, Surrey, Reino Unido).



**Figura 2.5** Diagrama Fuerza vs Tiempo del Análisis de Perfil de Textura

### 2.1.6 EVALUACIÓN DE COLOR EN QUESO

Se realizó el análisis de color colocando la superficie del queso completo directamente sobre el lente de medición de un colorímetro triestímulo, Colorflex EZ (Hunterlab, Virginia, E.U.A.) y utilizando parámetros en el espacio de color CIELAB, donde  $L^*$  indica luminosidad (0 a 100),  $a^*$  tonalidad de rojo(+) a verde(-) y  $b^*$  tonalidad de amarillo (+) a azul (-) (Rynne *et al.*, 2008). El equipo se estandarizó con 2 tejas (negra y blanca) previo al inicio de las mediciones. Los resultados de las mediciones de color de los quesos experimentales fueron comparados con aquellos elaborados con leche pasteurizada. Empleando las medidas mencionadas se calcularon parámetros derivados. El ángulo de tonalidad (*hue*,  $h$ ) fue calculado mediante la Ecuación 3:

$$h = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Ec. 3})$$

Por su parte, el índice de saturación (croma,  $C^*$ ) se calculó mediante la Ecuación 4:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Ec. 4})$$

### 2.1.7 ACTIVIDAD DE AGUA

La actividad de agua ( $a_w$ ) del queso se determinó colocando una muestra previamente rallada de aproximadamente 2-3 g en un higrómetro de punto de rocío Decagon Aqualab Series 3 (Pullman, Washington) a una temperatura promedio de medición de  $24.5 \pm 0.1$  °C.

### 2.1.8 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se determinó de acuerdo a métodos estándar (Wehr y Frank, 2004), pesándose 2 g de muestra en una charola de aluminio previamente puesta a peso constante, la cual se

colocó en el horno de vacío (VO-400, Memmert, Alemania) a 131 mbar y 100 °C por 4.5 h hasta alcanzar un peso constante, para después transferirlas a un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesaron. La proporción de humedad, expresada en porcentaje, fue determinada mediante la siguiente ecuación y:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P - P_1}{P_2} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

P = Peso del recipiente con muestra húmeda (g).

P<sub>1</sub> = Peso del recipiente con muestra seca (g).

P<sub>2</sub> = Peso de la muestra (g).

#### **2.1.9 DETERMINACIÓN DE pH**

El pH del queso fue determinado de acuerdo a métodos estándar (Wehr y Frank, 2004), utilizando un potenciómetro UB-10 (Denver Instruments, Colorado, E.U.A.) calibrado con soluciones buffer 4 y 7). Para esto, se rallaron 5 g de queso y el pH fue determinado mediante el contacto directo con el electrodo de base plana hasta la estabilización de la lectura durante 30 s.

### **2.2 ETAPA II**

En esta etapa se realizaron pruebas para determinar el grado de desnaturalización proteica en leche sometida a tratamientos de TS a través de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) de acuerdo al método estándar de la Federación Internacional de la Leche (FIL) y empleando una curva estándar de β-LG pura ≥90 % (Sigma–Aldrich, EUA). Los resultados de las pruebas de HPLC se compararon con determinaciones indirectas de desnaturalización proteica mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Asimismo, se llevaron a cabo pruebas

predictivas en leche bovina descremada tratada por TS para evaluar su potencial tecnológico, comparado con leche HTST.

### **Análisis Estadístico**

Las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía empleando un software de análisis estadístico (Minitab 16.0).

#### **2.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS DE LECHE**

Para esta etapa la leche se procesó de manera similar a lo descrito en la sección 2.1.1. Los resultados obtenidos en esta sección se vieron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía empleando el software de análisis estadístico Minitab 16.0 con comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

#### **2.2.2 TRATAMIENTOS DE TERMOSONICACIÓN**

Se utilizó el procesador ultrasónico y el reactor descrito en la sección 2.1.2 y con base en el volumen utilizado, en esta ocasión el sonotrodo quedó inmerso a una profundidad de 3 cm en la leche. En cada tratamiento de TS se colocó 1 L de leche en el reactor. Durante el proceso de TS la temperatura de los tratamientos fue registrada y se ajustó la temperatura de la mayoría de los tratamientos, con excepción de las pruebas preliminares, con ayuda de un baño de circulación con controlador digital de temperatura Polyscience AD07R-20 (Illinois, E.U.A) dependiendo de la temperatura a la cual los tratamientos debían ser llevados a cabo. Después del tratamiento de US los tratamientos preliminares, fueron pasteurizados LTLT (63 °C, 30 min) ya que se retomaron los tratamientos de la Etapa I, pero al observar que los tratamientos no mostraron gran impacto sobre la matriz, se propuso un modelo en el cual se pudiera estudiar y cuantificar la cantidad de desnaturalización en proteínas séricas de leche bovina descremada aplicando diferentes tratamientos térmicos; el incremento en la temperatura de tratamiento durante el US y la

severidad del tratamiento térmico se debió a que se buscaba provocar un mayor grado de desnaturalización que el mostrado en la etapa anterior en las muestras tratadas (Tabla 2.2). Finalmente, con base en los resultados obtenidos, se optó por aplicar un tratamiento térmico más severo y es así como el resto de los tratamientos se sometieron a pasteurización a 72 °C por 15 s en un recipiente de acero inoxidable con capacidad de 2 L y monitoreando la temperatura constantemente. Posterior al tratamiento térmico, las muestras se enfriaron rápidamente sumergiendo el recipiente en un baño de hielo hasta que la muestra alcanzara la temperatura ambiente aproximadamente.

**Tabla 2.2** Tratamientos preliminares de TS.

| <b>Tratamiento</b> | <b>Tratamiento térmico</b> | <b>Amplitud (%)</b> | <b>Tiempo De Sonicación (min)</b> |
|--------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Cruda              | -                          | -                   | -                                 |
| 1                  | -                          | 100                 | 5                                 |
| 2                  | 63 °C / 30 min             | 100                 | 5                                 |
| 3                  | 63 °C / 30 min             | -                   | -                                 |
| 4                  | 72 °C , 15 s               | -                   | -                                 |
| 5                  | 85 °C , 30 s               | -                   | -                                 |
| 6                  | 85 °C , 1 min              | -                   | -                                 |

Los diferentes tratamientos de TS considerados como modelo resultaron a partir de los datos obtenidos en la Etapa I y los resultados obtenidos de las pruebas preliminares evaluadas por HPLC (Tabla 2.2). Dichos tratamientos se muestran en la Tabla 2.3, los cuales fueron considerados para todas las pruebas subsecuentes en esta Etapa.

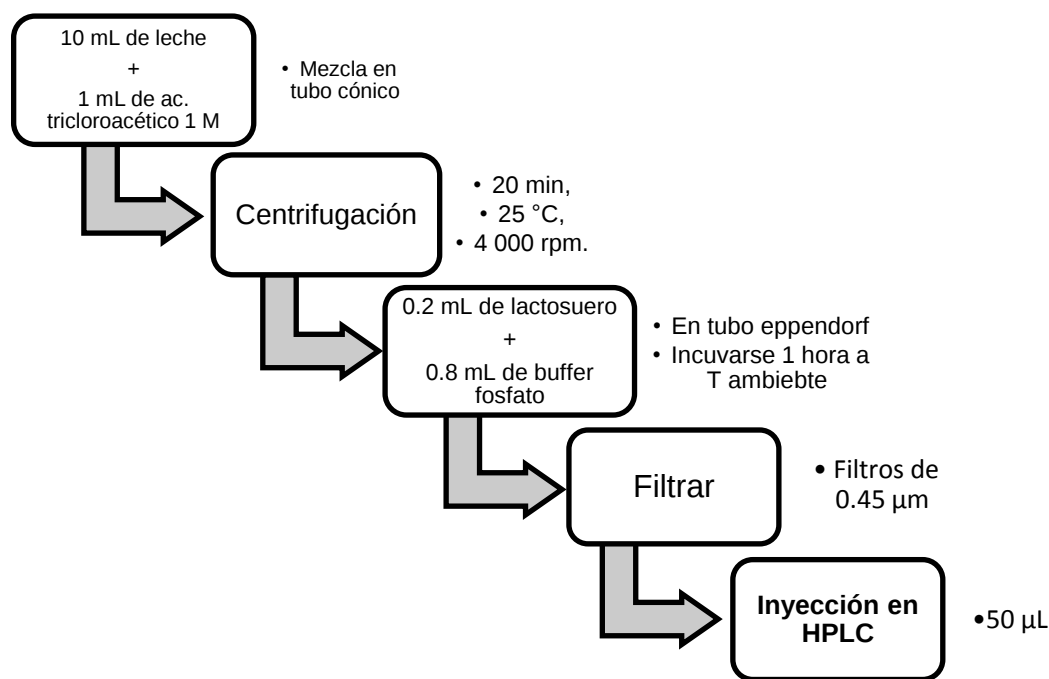
**Tabla 2.3** Tratamientos propuestos de TS.

| Tratamiento | US           |         |        | HTST |
|-------------|--------------|---------|--------|------|
|             | Amplitud (%) | t (min) | T (°C) |      |
| Control     | -            | -       | -      | -    |
| 1           | -            | -       | -      | SI   |
| 2           | 100          | 10      | 45     | NO   |
| 3           | 100          | 10      | 45     | SI   |
| 4           | 100          | 10      | 65     | NO   |
| 5           | 100          | 10      | 65     | SI   |
| 6           | 100          | 20      | 65     | SI   |
| 7           | 100          | 30      | 65     | SI   |

### 2.2.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DEL SUERO POR HPLC

Se realizó empleando el método estándar de la Federación Internacional de la Leche (IDF en inglés) (Van Boekel, 1999). Se utilizó una solución buffer de fosfato 0.1 M como diluyente, la cual se preparó mezclando 5.7 mL de fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2 M y 4.3 mL de fosfato de sodio dibásico 12-hidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.2 M. Las muestras se prepararon de acuerdo al resumen gráfico mostrado en la Figura 2.6. Se colocaron muestras de 10 mL de leche previamente tratadas en tubos de fondo cónico a las cuales se les añadió 1 mL de ácido tricloroacético 1 M. Después se centrifugaron por 20 min a 25 °C a 4000 rpm (Hettich Universal 320 R; Tufflingen, Alemania). Posteriormente, se colocaron en tubos eppendorf 0.2 mL del lactosuero obtenido de la centrifugación agregando 0.8 mL del buffer diluyente, para después incubarse por 1 h a temperatura ambiente, pasarse por filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  y finalmente, colocarse en viales (Agilent, Alemania) de 2 mL, recuperándose en promedio 0.5 mL por

muestra. Las muestras se analizaron en un HPLC Agilent 1260 Infinity (Alemania) empleando una columna 300SB – C18 (150 x 4.6 mm) con un diámetro de partícula de 5  $\mu\text{m}$  y un ancho de poro de 300 Å (Agilent, EUA) como fase estacionaria. Se utilizó un volumen de inyección 50  $\mu\text{L}$ , empleando un flujo de elución de 0.5 mL / min y leyendo a 220 nm de longitud de onda con un detector de arreglo de diodos. Como eluyentes, se emplearon dos fases móviles codificadas como A (0.1 % ácido trifluoroacético en agua grado HPLC) y B (0.1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo grado HPLC). Se utilizó el gradiente de elución descrito en la Tabla 2.5, a temperatura constante de  $40 \pm 0.8$  °C. Los niveles residuales de  $\beta$ -LG fueron cuantificados mediante curvas de calibración empleando estándares de esta proteína (Sigma–Aldrich, EUA) en el intervalo de 500 – 5000 ppm.



**Figura 2.6 Diagrama para preparación de las muestras.**

**Tabla 2.4** Gradiente de elución binario.

| Tiempo (min) | Solvente A | Solvente B |
|--------------|------------|------------|
| 0            | 65         | 35         |
| 1            | 65         | 35         |
| 8            | 62         | 38         |
| 16           | 58         | 42         |
| 22           | 54         | 46         |
| 22.5         | 0          | 100        |
| 23           | 0          | 100        |
| 23.5         | 65         | 35         |
| 33           | 65         | 35         |

#### **2.2.4 ELABORACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN**

Se elaboraron dos curvas, una correspondiente a la  $\beta$ -Lactoglobulina A ( $\beta$ -LG A) y otra para  $\beta$ -Lactoglobulina B ( $\beta$ -LG B). Dichas curvas se realizaron usando  $\beta$ -Lactoglobulina pura  $\geq 90$  % (Sigma-Aldrich, EUA) para la elaboración de 10 soluciones que poseían diferentes valores de concentración proteica desde los 500 hasta los 5000 ppm con intervalos de 500 ppm (Apéndice II).

#### **2.2.5 DETERMINACIÓN DE GRADO DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEINAS POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)**

La determinación se realizó empleando el método modificado de Frydenberg *et al.*, (2016). Se colocaron inicialmente dos crisoles de aluminio vacíos y previamente pesados; uno se tomó como referencia y al otro se le colocaron las muestras respectivas. Con base en esos datos se realizó una calibración en el programa *Proteus Measurement Version 5.0* (Netzsch-Gerätebau GmbH, Alemania). Posteriormente, en el crisol destinado para contener las muestras se pesaron  $10 \pm 5$  mg de las muestras de leche tratadas. Los crisoles con muestra se colocaron en el DSC (Netzsch-Gerätebau GmbH, Alemania) junto con el

crisol vacío de referencia. El rango de temperatura utilizado fue de 30 a 140 °C con un escaneo de 10 °C /min durante ~40 min para cada uno de los termogramas realizados; las pruebas se realizaron por duplicado para cada tipo de leche tratada.

### 2.2.6 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

La CRA en las muestras se determinó por el método modificado de centrifugación (Pandey *et al.*, 2000). A las muestras de leche se les añadió  $\text{CaCl}_2$  después del tratamiento de sonicación en una proporción de 400  $\mu\text{L/L}$  de una dilución de 1.46 g de  $\text{CaCl}_2$  en 2 mL de agua (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2012). Se colocaron 130 mL de las muestras de leche tratadas en frascos de vidrio. Se ajustó el pH de las muestras a 6.15 con HCl 0.1 N, para después calentarse hasta 37 °C y se les añadieron 215  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de cuajo líquido estandarizado termoresistente de origen microbiano (Cuamix, Chr. Hansen México). De manera casi inmediata se vertió en tubos de fondo cónico aproximadamente 30 g de muestra de leche con cuajo añadido. Se dejó coagular las muestras en un baño termostático durante 45 min. Cada muestra coagulada fue centrifugada a 4000 rpm por 40 min a 10 °C en una centrífuga Hettich Universal 320 R (Tufflingen, Alemania), pesando cada uno de los tubos con y sin muestra, midiendo mL de suero expelido y el peso de los tubos con la cuajada al fondo del tubo centrifugado. La CRA se determinó mediante la Ec. 6 (Pandey *et al.*, 2000). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía empleando un software de análisis estadístico (Minitab 16.0) con comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

$$CRA = \left( \frac{M \times m_0}{100} - E \right) \left( \frac{100}{M - E} \right) \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

M = Peso de muestra antes de centrifugar (diferencia de pesos de tubo con muestra – peso tubo sin muestra)

E = Masa de exudado

$m_0$  = Porcentaje inicial de contenido de humedad de la cuajada (base húmeda)

### **2.2.7 DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE COAGULACIÓN**

El tiempo de coagulación se determinó utilizando el método de Berridge modificado (Zobrist *et al.*, 2005). Se pesaron 18 g de leche en un tubo de ensayo y se colocó en un baño de calentamiento constante en un recipiente de acero inoxidable (15 cm × 13.5 cm × 14.7 cm) a una temperatura de 37 °C; el agua debía cubrir por lo menos el 90 % del contenido de los tubos. Después se añadieron 29.7 µL de una dilución 1:10 de quimosina (Cuamix, Chr. Hansen México) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se agitó y se consideró el tiempo desde la adición del cuajo hasta la formación de flóculos de cuajada visibles en las paredes del tubo, después de realizar una agitación leve.

### **2.2.8 FIRMEZA DE GEL**

La firmeza de geles elaborados con las muestras de leche tratadas se determinó utilizando un texturómetro Texture Technologies, TAXT-Plus (Surrey, Reino Unido) con celda de carga de 30 kg de capacidad (Mizuno & Lucey, 2007). Se añadió CaCl<sub>2</sub> a leche después del tratamiento de TS en una proporción de 400 µL/L de una dilución de 1.46 g de en 2 mL de agua (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2012). Se colocaron 280 mL de las muestras de leche tratadas en frascos de vidrio. Se ajustó el pH de las muestras a 6.15 con HCl 0.1 N. Se calentaron hasta una temperatura de 37 °C y se les añadieron 462 µL de una dilución 1:10 de cuajo líquido antes empleado (Cuamix, Chr. Hansen México). De manera inmediata se vertió la mezcla (~70 g) en frascos de vidrio y se dejaron coagular las muestras durante 45 min manteniendo la temperatura constante, tras lo cual se colocaron en un baño frío (10 °C) y se les evaluó la firmeza del gel se determinó mediante la inserción de una sonda cilíndrica de 2.5 cm de diámetro a una profundidad de 10 mm en la muestra fría de gel a una velocidad de 1 mm/s.

## **2.3 ETAPA III**

En esta etapa, se evaluaron cambios durante la manufactura y el almacenamiento refrigerado de quesos tipo Panela elaborados con leche descremada sometida a tratamientos de TS previamente seleccionados. Todos los resultados obtenidos durante las evaluaciones de esta etapa se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía empleando un software de análisis estadístico (Minitab 16.0) con comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

### **2.3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS DE LECHE**

Para esta etapa la leche se procesó de manera similar a lo descrito en la sección 2.1.1 y 2.21. Los resultados obtenidos en esta sección se vieron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía empleando el software de análisis estadístico Minitab 16.0 con comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ).

### **2.3.2 TRATAMIENTOS DE TS**

Se utilizó el procesador ultrasónico y el reactor bajo las condiciones descritas en la sección 2.1.2 por lo que el sonotrodo quedó sumergido a una profundidad de 9.5 cm en la leche. Para cada tratamiento de TS se utilizaron 2 L de leche en el reactor (Figura 2.1) y adaptándose de la misma forma descrita en la sección antes mencionada. Durante los procesos de TS, la temperatura de los tratamientos fue registrada y se ajustó con ayuda de un baño de recirculación con controlador digital de temperatura AD07R-20 (Polyscience, Illinois, E.U.A), dependiendo de la temperatura a la cual los tratamientos debían ser llevados a cabo. Después del tratamiento de TS, los tratamientos se pasteurizaron (HTST) en lotes de 2 L, para posteriormente enfriarlos de manera inmediata en un baño de hielo hasta alcanzar 32 °C. Posteriormente, se realizaron diferentes tratamientos de TS (Tabla 2.5) considerados a partir de los resultados obtenidos en la Etapa II. Se siguió un diseño aleatorizado de bloques con el día de elaboración como variable de bloque. Las variables

dependientes fueron los parámetros a evaluar en los quesos, las cuales se describen en las secciones siguientes. Se reprodujeron los 3 tipos de tratamiento en cada día de elaboración. Todos los parámetros se evaluaron a los días 1, 7 y 14 de elaboración de los quesos con excepción de las pruebas de composición (Determinación de cloruros y proteína) que sólo se realizaron al día 1. Los resultados de los tratamientos aplicados fueron comparados con un queso utilizado como control, pasteurizado térmicamente sin tratamiento de US.

**Tabla 2.5** Tratamientos de TS aplicados en la Etapa III.

| Tratamiento | US           |         |        | HTST |
|-------------|--------------|---------|--------|------|
|             | Amplitud (%) | t (min) | T (°C) |      |
| Control (1) | -            | -       | -      | SI   |
| 2           | 100          | 10      | 45     | SI   |
| 3           | 100          | 10      | 65     | SI   |

### 2.3.3 ELABORACIÓN DE QUESO TIPO PANELA

Los quesos se elaboraron siguiendo una adaptación a escala laboratorio del procedimiento estándar de elaboración para este tipo de queso; el procedimiento se describe en la sección 2.1.4 y se resume en la Figura 2.3 (Ruiz Espinosa, 2017).

### 2.3.4 PRUEBAS EN QUESO

Las metodologías empleadas para la evaluación de textura (TPA), color, determinación de humedad y pH en los quesos elaborados en esta etapa se describen en las secciones 2.1.5, 2.1.6, 2.1.8 y 2.1.9 respectivamente.

### 2.3.5 RENDIMIENTO SIMPLE

El rendimiento simple de los quesos se expresó como kilogramos de queso obtenidos por kg de leche empleada (San Martín-González *et al.*, 2007).

### 2.3.6 DETERMINACIÓN DE CLORURO DE SODIO

Se calculó el contenido de sal en el queso de acuerdo a métodos estándar (Wehr & Frank, 2004). Se pesaron 2 g de queso triturado en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se añadieron 25 mL de  $\text{AgNO}_3$  0.1 N, 10 mL de  $\text{HNO}_3$  (s.g. 1.42, 64-66 %) y 50 mL de agua destilada, se calentó la mezcla hasta que hirviera con agitación constante y bajo adecuada ventilación. Posteriormente se añadieron 15 mL de  $\text{KMnO}_4$  al 5 % y se siguió calentando hasta que el color café de la solución desapareció y se dejó enfriar. Pasando este tiempo, se añadieron 2 mL de indicador sulfato amónico férrico al 8 % y se tituló con  $\text{KSCN}$  0.1 N hasta el vire a color café claro que perduraba por 30 s. Los resultados se reportaron de acuerdo a la Ecuación 7.

$$\% \text{ Cloruro de sodio} = \frac{((\text{mL AgNO}_3 * N \text{ AgNO}_3) - (\text{mL KSCN} * N \text{ KSCN})) * 0.0585 * 100}{\text{peso de la muestra en gramos}} \quad (\text{Ec. 7})$$

### 2.3.7 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La proteína en los quesos elaborados se determinó por medio de la metodología modificada de micro Kjeldahl de acuerdo a lo descrito en la NOM-155-SCFI-2003. Se colocaron 0.5 g de muestra en un tubo de ensayo 250 mL y se añadieron 10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98 % y una tableta catalizadora (Kjeldahl tablets Missouri Catalyst, Alemania). Los tubos se colocaron en un digestor Kjeldahl (Prendo, México) y se calentaron de acuerdo a la siguiente curva de calentamiento: 150 °C por media hora, 270 °C por media hora, 400 °C por una hora y media. El calentamiento se llevó a cabo hasta que la apariencia del

contenido fuera clara y sin restos de material por digerir (3 – 3.5 h aproximadamente, en total). Después se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se colocaron en un destilador micro Kjeldahl (Prendo, México) añadiéndole a cada tubo 40 mL de NaOH al 40 %. El destilado se recibió en un matraz de 250 mL con 10 mL de ácido bórico  $H_3BO_3$  al 4 % y cinco gotas de solución indicadora (indicador Shiro Tashiro) y se continuó la destilación hasta alcanzar un volumen aproximado de 100 mL en el matraz. El destilado se tituló con solución de HCl 0.1 N. El contenido de nitrógeno y el % de proteína se reportó como se muestra a continuación utilizando un factor de conversión de proteína para la leche de 6.38. Cada determinación se realizó por duplicado.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(1.4007)(ml \text{ gastados de HCl})(Normalidad de HCl)}{\text{peso en gramos de la muestra}} \quad (\text{Ec. 8})$$

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 DETERMINACIÓN DE POTENCIA EFECTIVA Y pH

Los resultados de los análisis de la potencia y la energía efectiva entregada para los tratamientos ultrasónicos implementados se muestran en la Tabla 3.1. Los valores de composición promedio necesarios para el cálculo obtenidos en g/100 g en leche fueron: grasa  $0.31 \pm 0.04$ , proteína  $3.00 \pm 0.05$ , sólidos no grasos  $8.12 \pm 0.12$ ; asimismo, el valor promedio de  $C_p$  calculado fue de  $3766.08 \pm 18.29$  J/(kg °C). En la Tabla 3.1 se puede observar que no existe una relación proporcional entre la amplitud de onda ultrasónica empleada y la potencia efectiva de salida. A pesar de que se obtuvieron valores similares de potencia efectiva entre los tratamientos de mayor amplitud (64 y 100 %), al evaluar la energía efectiva entregada, se aprecia una variación significativa ( $P < 0.05$ ) entre los valores alcanzados. Así, el tratamiento con una amplitud de 64 % a 10 min reportó la energía efectiva entregada más alta y el de menor amplitud (28 %) reportó la menor cantidad de energía obtenida. Las diferencias en energía entregada neta se deben a la cantidad de energía transformada en calor durante el proceso ultrasónico y al tiempo de tratamiento, independientemente de la amplitud aplicada; viendo así que una amplitud de 64 % por el doble de tiempo que el tratamiento 1 (100 %, 5 min) supera notablemente la cantidad de energía entregada con respecto a este último. En este sentido, Lombana *et al.* (2014) establecieron que, a mayor cantidad de tiempo de tratamiento ultrasónico, mayor será la cantidad de calor liberado y, por consiguiente, menor será la cantidad de energía ultrasónica entregada sobre la leche. Por otro lado, Gallegos Pineda (2015), menciona que al determinar la potencia efectiva de sus tratamientos en el procesador ultrasónico descrito en la sección 2.1.2 en un volumen de 1 L de leche (3 % grasa) se obtuvo una potencia efectiva de  $43.80 \pm 1.84$  W para una amplitud de 50 % por 6 min y de  $94.12 \pm 3.86$  W para 100 % de amplitud por 4 min, comparando estos resultados con los valores obtenidos en el presente trabajo se puede notar que estas potencias se

encuentran un poco reducidas. Por el contrario, Pérez Mata (2014) en tratamientos con un volumen de 3 L de leche ( $3.74 \pm 0.2$  % grasa) en el procesador ultrasónico con las mismas características obtuvo como potencia efectiva  $238.60 \pm 1.76$  W para una amplitud de 50 % por 18 min y  $353.91 \pm 7.23$  W con amplitud de 100 % por 12 min, lográndose observar que estos datos están muy elevados en comparación a lo obtenido en este trabajo. Las diferencias podrían deberse a la composición de la leche empleada, al volumen de leche utilizado, a recipientes contenedores y de medición, a la diferencia entre los tiempos de aplicación de US, así como a diferencias en la calibración del equipo.

**Tabla 3.1** Potencia real de salida y energía entregada en tratamientos ultrasónicos selectos en leche\*.

| Tratamiento <sup>1</sup> |              |                   |                    |
|--------------------------|--------------|-------------------|--------------------|
| Amplitud (%)             | Tiempo (min) | Potencia (W)      | Energía (kJ)       |
| 100                      | 5            | $130.28 \pm 2.54$ | $39.08 \pm 0.76^A$ |
| 64                       | 10           | $103.55 \pm 2.45$ | $62.13 \pm 1.47^B$ |
| 64                       | 5            | $109.26 \pm 5.37$ | $32.78 \pm 1.61^A$ |
| 28                       | 5            | $56.46 \pm 14.30$ | $16.94 \pm 4.29^C$ |

\*Los valores reportados son las medias  $\pm$  desviación estándar (n = 2). <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz  
 Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0.05).

Por otra parte, los resultados de la evaluación de pH en los quesos elaborados se muestran en la Tabla 3.2. No se presentaron cambios significativos (P < 0.05) en el pH de los quesos a lo largo del almacenamiento refrigerado, aunque si se observó una pequeña disminución (no significativa) en el pH de casi todos los quesos al día 14, obteniéndose un incremento de pH del tratamiento 4 (28 %, 5 min) en el día 14 de su almacenamiento, aunque este incremento puede deberse a un error en la medición.

La disminución de pH en el día 1 de almacenamiento se puede atribuir a modificaciones en la estructura de las caseínas, las cuales son las principales responsables de mantener el

pH del queso. Por otro lado, se observó presencia de sinéresis y se ha demostrado también que está potenciada por diversos cambios bioquímicos que se traducen en una reducción del pH durante el almacenamiento refrigerado aunado a una variación en el equilibrio de minerales (Ruiz Espinosa, 2017). Adicionalmente, la disminución del pH durante el almacenamiento puede deberse principalmente al crecimiento de microorganismos psicrótrofos en el queso (Walstra *et al.*, 1987). Además, Bermúdez Aguirre *et al.* (2010) mencionan que al procesar *queso fresco* con leche TS (500 mL, 24 KHz, 129 mW/mL, 0-30 min, 63 y 72 °C) el cambio en el pH fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) al día 0 en todos los sistemas de acuerdo al tratamiento aplicado, sin embargo, no observaron ninguna tendencia con respecto a los tipos de tratamientos realizados. A pesar de la falta de información con respecto al efecto de TS en el pH del queso, otras tecnologías emergentes han demostrado cambios en la composición y contenidos de nutrientes similares a los presentados en TS, por tanto, es posible comparar sus efectos. En este sentido Evert (2013), evaluó el efecto de la alta presión hidrostática (300 y 400 MPa por 5 y 6 min) en quesos frescos, detectando que la presurización no cambió el contenido de proteínas y grasas totales ni los valores de pH tanto en los quesos tratados con HPP. Este comportamiento del pH puede deberse a la liberación de fosfato de calcio coloidal o a que la HPP no redujo los recuentos iniciales de mesófilos y específicamente el recuento de *Lactococcus*, cuyo origen en el queso estaba probablemente asociado con lactococos residuales resistente a tratamiento térmico y a una posible contaminación post proceso.

Asimismo, se ha reportado que el procesamiento a alta presión (HPP) tiene efectos en diversos factores de conservación, funcionalidad y aceptabilidad sensorial de leche, incluyendo reducción de carga microbiana (y su comportamiento durante almacenamiento refrigerado) inactivación enzimática, cambios en componentes lácteos (caseínas, proteínas séricas, GG, balance mineral, volátiles), propiedades de coagulación enzimática y ácida, color, entre otros (Ruiz Espinosa, 2017).

**Tabla 3.2** pH promedio de queso panela elaborado con leche TS durante su almacenamiento refrigerado\*.

| Tratamiento <sup>1</sup> |              | Día de almacenamiento      |                            |                           |
|--------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Amplitud (%)             | Tiempo (min) | 1                          | 7                          | 14                        |
| 100                      | 5            | 6.23 ± 0.05 <sup>Aa</sup>  | 6.21 ± 0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.15 ± 0.02 <sup>Aa</sup> |
| 64                       | 10           | 6.22 ± 0.01 <sup>Aab</sup> | 6.22 ± 0.011 <sup>Aa</sup> | 6.17 ± 0.01 <sup>Ab</sup> |
| 64                       | 5            | 6.24 ± 0.06 <sup>Aa</sup>  | 6.20 ± 0.04 <sup>Aa</sup>  | 6.13 ± 0.00 <sup>Aa</sup> |
| 28                       | 5            | 6.25 ± 0.01 <sup>Aa</sup>  | 6.25 ± 0.00 <sup>Aa</sup>  | 6.28 ± 0.08 <sup>Aa</sup> |
| LTLT                     |              | 6.29 ± 0.00 <sup>Aa</sup>  | 6.28 ± 0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.23 ± 0.05 <sup>Aa</sup> |

\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar (n=2). <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz  
 Letras mayúsculas diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05)  
 Letras minúsculas diferentes en una misma fila representan diferencia significativa (P < 0.05).

### 3.2 HUMEDAD EN QUESOS ELABORADOS CON LECHE TRATADA POR TS

En la Tabla 3.3 se muestra el porcentaje de humedad obtenido en el día 1 de elaboración de los quesos. Se observa que no existe una variación significativa en el contenido de humedad (P < 0.05) de los quesos elaborados con leche tratada por diferentes procesos de TS. Sin embargo, se aprecia que todos los quesos TS (con excepción a los elaborados con el tratamiento de TS menos intenso) presentan valores de humedad por encima del control. Damodaran *et al.* (2008) mencionaron que esta variación puede deberse en su mayoría a un incremento en la CRA (o capacidad de hidratación) de las proteínas, optimizando la interacción de aminoácidos polares y no polares y su interacción con las moléculas de agua, que puede implicar un cambio en la estructura de las caseínas. Bermúdez-Aguirre *et al.* (2010) reportaron un incremento en el contenido de humedad de queso fresco elaborado con leche sonicada, en comparación con el queso elaborado con leche TS (24 kHz, 500 mL, 129 mW/mL, 0 – 30 min, 63 y 72 °C). En ese estudio, se observó una relación entre el tiempo de sonicado y el contenido de humedad, mostrando que éste aumentaba con el tiempo de sonicación y la cantidad de energía entregada, lo cual se

atribuía a una posible reorganización de las proteínas en el interior del queso, probablemente relacionada con una mayor incorporación de proteínas de suero desnaturalizadas, las cuales retienen más agua. Se presume que esta incorporación es posible por la unión de K-CN y  $\beta$ -LG a través de un complejo de enlaces disulfuro (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2010).

**Tabla 3.3** Contenido de humedad de queso panela elaborado con leche TS \*.

| Tratamiento <sup>1</sup> |              | Humedad                       |
|--------------------------|--------------|-------------------------------|
| Amplitud (%)             | Tiempo (min) |                               |
| 100                      | 5            | 63.43 $\pm$ 0.61 <sup>A</sup> |
| 64                       | 10           | 63.37 $\pm$ 2.07 <sup>A</sup> |
| 64                       | 5            | 62.40 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup> |
| 28                       | 5            | 56.49 $\pm$ 3.97 <sup>B</sup> |
| LTLT                     |              | 59.36 $\pm$ 0.19 <sup>B</sup> |

\*Los valores reportados son las medias  $\pm$  desviación estándar. (n=2) <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz

Letras mayúsculas diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05).

### 3.3 ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ )

La  $a_w$  reportada en la elaboración de quesos se muestra en la Tabla 3.4. El análisis de los datos muestra que no existe diferencia significativa (P < 0.05) con respecto al tratamiento aplicado. Sin embargo, la relación entre actividad de agua y el contenido de agua es compleja y son dos conceptos y valores diferentes. Un incremento en la primera está generalmente acompañado de un incremento en el contenido de agua, pero no en una forma lineal (Peribáñez, 2014). Con base en lo anterior, al analizar la Tabla 3.4 se puede observar que en su mayoría los tratamientos TS obtuvieron valores altos tanto de humedad como de  $a_w$ . Es importante destacar que los quesos TS y control sufrieron

sinéresis la cual también está altamente ligada al contenido de humedad y actividad de agua durante el almacenamiento del queso; no obstante, la sinéresis fue menor en los quesos TS por lo que presentaron en su mayoría valores más altos de  $a_w$  que el queso tratado térmicamente ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3.4** Actividad de agua obtenida en queso panela bajo tratamientos de TS\*.

| Tratamiento <sup>1</sup> |              | $a_w$              |
|--------------------------|--------------|--------------------|
| Amplitud (%)             | Tiempo (min) |                    |
| 100                      | 5            | $0.955 \pm 0.01^A$ |
| 64                       | 10           | $0.959 \pm 0.00^A$ |
| 64                       | 5            | $0.961 \pm 0.00^A$ |
| 28                       | 5            | $0.959 \pm 0.00^A$ |
| LTLT                     |              | $0.956 \pm 0.00^A$ |

\*Los valores reportados son las medias  $\pm$  desviación estándar (n=2) <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz  
 Letras mayúsculas diferentes en una misma columna representan diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Caro *et al.* (2011) mencionaron que al usar leche descremada en la elaboración de *queso fresco* tipo Oaxaca el contenido de humedad del queso, proteína y humedad en sustancia sin grasa no se vieron afectados significativamente por la variación del tipo de leche (leche entera con adición de leche descremada o leche entera con adición de un concentrado de proteína de leche en polvo comercial). Por su parte, en queso tratado por HPP, Evert (2013) observó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en  $a_w$  de *queso fresco* entre los tratamientos aplicados (300 and 400 MPa por 5 min a 6 °C) y el control. Igualmente, no se detectó una pérdida importante de suero en los quesos HPP. Bermúdez-Aguirre *et al.* (2010) mencionaron que, al elaborar *queso fresco* con leche TS (24 KHz, 129 mW/mL), éstos presentaron un mayor grado de sinéresis; sin embargo, el tratamiento TS con menor sinéresis fue el de mayor duración.

### 3.4 COLOR

En la Tabla 3.5 se muestran los parámetros evaluados para la determinación de color en quesos elaborados con leche TS y el control. En términos generales, no se observaron cambios significativos en el color de los quesos elaborados con leche tratada por TS en comparación con los fabricados con leche HTST inmediatamente después del proceso o durante el almacenamiento refrigerado. Con excepción de la luminosidad de los quesos elaborados con leche tratada por el proceso de TS menos intenso (28 % amplitud, 5 min), se puede observar que los quesos TS fueron más luminosos y verdes y menos amarillos que los HTST. Se considera que estos cambios, aunque no fueron significativos, están relacionados con modificaciones propias de la homogeneización de leche. Otros estudios llevados a cabo con leche TS, muestran resultados similares. Bermúdez-Aguirre *et al.* (2008) atribuyeron el incremento en el parámetro  $L^*$  en quesos TS elaborados con leche entera a la disminución del tamaño del GG por la cavitación, lo cual permite una mejor dispersión de la luz obteniendo una muestra más uniforme, de manera análoga a lo que ocurre con los procesos de homogeneización tradicional. Asimismo, los parámetros de Croma ( $C^*$ ) y hue ( $h$ ) no mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el tiempo de almacenamiento y los tratamientos aplicados. El cambio neto de color de los quesos TS en comparación con el LTLT no mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al día de almacenamiento y al tipo de tratamiento aplicado siendo que los cambios no se hicieron visibles a simple vista. Sin embargo, se puede notar un ligero aumento progresivo de los valores en la mayoría de los tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento. Gallegos Pineda (2015) menciona que al elaborar queso chihuahua con leche TS el cambio neto de color de los quesos TS en comparación con el LTLT fue diferente en el día 1 y tuvo magnitudes similares para ambas amplitudes el resto del periodo. En el tratamiento a 100 % de amplitud por 4 min no mostró cambios a lo largo del tiempo de almacenamiento y en el TS a 50 % por 6 min presentó variación entre los días 1-21.

**Tabla 3.5** Cambios en color de queso panela elaborado con leche TS durante su almacenamiento refrigerado\*.

| Parámetro | Tratamiento <sup>1</sup> |              | Día de almacenamiento      |                            |                             |
|-----------|--------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|           | Amplitud (%)             | Tiempo (min) | Día 1                      | Día 7                      | Día 14                      |
| L*        | 100                      | 5            | 91.24 ± 1.29 <sup>Aa</sup> | 91.17 ± 0.05 <sup>Aa</sup> | 91.77 ± 0.10 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 10           | 91.52 ± 0.83 <sup>Aa</sup> | 91.02 ± 0.70 <sup>Aa</sup> | 90.95 ± 1.33 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 5            | 91.59 ± 0.56 <sup>Aa</sup> | 91.07 ± 1.90 <sup>Aa</sup> | 91.13 ± 0.21 <sup>Aa</sup>  |
|           | 28                       | 5            | 87.24 ± 2.32 <sup>Aa</sup> | 85.88 ± 3.72 <sup>Aa</sup> | 85.44 ± 4.23 <sup>Aa</sup>  |
|           | LTLT                     |              | 90.63 ± 1.40 <sup>Aa</sup> | 89.95 ± 1.33 <sup>Aa</sup> | 89.75 ± 1.10 <sup>Aa</sup>  |
| a*        | 100                      | 5            | -0.95 ± 0.36 <sup>Aa</sup> | -0.96 ± 0.35 <sup>Aa</sup> | -0.82 ± 0.18 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 10           | -0.69 ± 0.06 <sup>Aa</sup> | -0.79 ± 0.08 <sup>Aa</sup> | -0.78 ± 0.20 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 5            | -0.92 ± 0.60 <sup>Aa</sup> | -0.81 ± 0.72 <sup>Aa</sup> | -0.55 ± 0.25 <sup>Aab</sup> |
|           | 28                       | 5            | -1.01 ± 0.01 <sup>Aa</sup> | -1.22 ± 0.03 <sup>Aa</sup> | -1.16 ± 0.10 <sup>Ba</sup>  |
|           | LTLT                     |              | -0.37 ± 0.21 <sup>Aa</sup> | -0.34 ± 0.14 <sup>Aa</sup> | -0.32 ± 0.25 <sup>Aa</sup>  |
| b*        | 100                      | 5            | 11.39 ± 0.20 <sup>Aa</sup> | 11.98 ± 0.10 <sup>Aa</sup> | 12.25 ± 0.45 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 10           | 11.69 ± 1.15 <sup>Aa</sup> | 12.31 ± 0.70 <sup>Aa</sup> | 13.06 ± 0.98 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 5            | 12.56 ± 0.63 <sup>Aa</sup> | 13.16 ± 1.36 <sup>Aa</sup> | 13.98 ± 1.01 <sup>Aa</sup>  |
|           | 28                       | 5            | 14.06 ± 2.27 <sup>Aa</sup> | 15.34 ± 3.03 <sup>Aa</sup> | 15.84 ± 2.86 <sup>Aa</sup>  |
|           | LTLT                     |              | 13.24 ± 1.27 <sup>Aa</sup> | 14.21 ± 1.24 <sup>Aa</sup> | 14.90 ± 1.10 <sup>Aa</sup>  |
| C*        | 100                      | 5            | 11.43 ± 0.23 <sup>Aa</sup> | 12.02 ± 0.13 <sup>Aa</sup> | 12.28 ± 0.46 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 10           | 11.72 ± 1.15 <sup>Aa</sup> | 12.33 ± 0.70 <sup>Aa</sup> | 13.08 ± 0.99 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 5            | 12.59 ± 0.59 <sup>Aa</sup> | 13.19 ± 1.31 <sup>Aa</sup> | 13.99 ± 0.99 <sup>Aa</sup>  |
|           | 28                       | 5            | 14.09 ± 2.27 <sup>Aa</sup> | 15.39 ± 3.02 <sup>Aa</sup> | 15.88 ± 2.85 <sup>Aa</sup>  |
|           | LTLT                     |              | 13.24 ± 1.28 <sup>Aa</sup> | 14.22 ± 1.24 <sup>Aa</sup> | 14.90 ± 1.10 <sup>Aa</sup>  |
| H         | 100                      | 5            | 85.27 ± 1.73 <sup>Aa</sup> | 85.45 ± 1.63 <sup>Aa</sup> | 86.18 ± 0.70 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 10           | 86.62 ± 0.70 <sup>Aa</sup> | 86.35 ± 0.18 <sup>Aa</sup> | 86.59 ± 0.60 <sup>Aa</sup>  |
|           | 64                       | 5            | 85.74 ± 2.92 <sup>Aa</sup> | 86.29 ± 3.50 <sup>Aa</sup> | 87.70 ± 1.19 <sup>Aa</sup>  |
|           | 28                       | 5            | 85.82 ± 0.73 <sup>Aa</sup> | 85.38 ± 1.01 <sup>Aa</sup> | 85.72 ± 1.15 <sup>Aa</sup>  |
|           | LTLT                     |              | 88.42 ± 0.76 <sup>Aa</sup> | 88.63 ± 0.46 <sup>Aa</sup> | 88.82 ± 0.89 <sup>Aa</sup>  |
| ΔE        | 100                      | 5            | 2.17±1.13 <sup>Aa</sup>    | 2.74±1.56 <sup>Aa</sup>    | 3.41±1.73 <sup>Aa</sup>     |
|           | 64                       | 10           | 2.33±0.90 <sup>Aa</sup>    | 2.53±1.26 <sup>Aa</sup>    | 2.25±0.04 <sup>Aa</sup>     |
|           | 64                       | 5            | 1.56±0.51 <sup>Aa</sup>    | 1.70±0.69 <sup>Aa</sup>    | 1.76±0.67 <sup>Aa</sup>     |
|           | 28                       | 5            | 3.92±3.04 <sup>Aa</sup>    | 4.43±2.62 <sup>Aa</sup>    | 4.64±3.20 <sup>Aa</sup>     |

\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar (n=2) <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz

Letras mayúsculas diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05)

Letras minúsculas diferentes en una misma fila representan diferencia significativa (P < 0.05).

### 3.5 ANÁLISIS DE PERFIL DE TEXTURA

Los resultados del TPA de los quesos TS y HTST al día 1 y durante el almacenamiento refrigerado se muestran en la Tabla 3.6. No se apreciaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los parámetros evaluados de textura en quesos TS con respecto al control, con excepción del queso elaborado con leche TS a menor intensidad, el cual exhibió diferencias significativas en dureza y cohesividad al día 1, con valores mayores al resto de los promedios. Esto pudo deberse a que el tratamiento ultrasónico puede funcionar como un proceso de homogeneización, el cual reduce el tamaño del GG y permite la formación de una red más compacta y continua de caseínas en el gel, dado que los glóbulos se integran a la matriz proteica. Con respecto a la evolución de los parámetros de textura durante el almacenamiento refrigerado, no se observó ninguna variación significativa ( $P < 0.05$ ) en ninguno de los parámetros evaluados. Se sabe que las variaciones texturales en los quesos frescos durante el almacenamiento están relacionadas con su CRA (reflejada en la ocurrencia de sinéresis) y en cambios proteolíticos, dependientes del mantenimiento de la actividad enzimática tras la aplicación de un proceso de conservación en leche. En este sentido, Rubio *et al.* (2014) observaron que quesos elaborados con leche tratada con US mostraron un aumento significativo en la capacidad de retención de agua, lo cual influenció la textura inicial de los quesos y su evolución durante el almacenamiento. En lo que respecta a lo estudiado por Bermúdez–Aguirre y Barbosa–Cánovas, 2010, al elaborar *queso fresco* con leche TS (400 W, 24 kHz, 120  $\mu$ m) observaron que los quesos tuvieron menor dureza que los quesos elaborados con leche tratada térmicamente o sin tratamiento aplicado. También observaron que los quesos tratados con US por tiempos de procesamiento más cortos mostraron valores de elasticidad más altos que los no tratados o tratados sólo térmicamente por tiempos más largos. En cuanto a la gomosidad y la masticabilidad, mencionan que la gomosidad se redujo con la sonicación, siendo el valor más bajo observado con el tiempo de sonicación más largo (30 min), y la masticabilidad también se vio afectada observándose nuevamente que el valor más bajo fue para el tratamiento con tiempo de sonicación más largo.

**Tabla 3.6** Análisis de perfil de textura de queso panela elaborado con tratamientos selectos de TS durante su almacenamiento refrigerado\*.

| Tratamiento <sup>1</sup>   |              | Día de almacenamiento     |                             |                           |
|----------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Amplitud (%)               | Tiempo (min) | Día 1                     | Día 7                       | Día 14                    |
| DUREZA (kg fuerza)         |              |                           |                             |                           |
| 100                        | 5            | 2.34 ± 0.45 <sup>Aa</sup> | 2.03 ± 0.18 <sup>Aa</sup>   | 2.75 ± 0.56 <sup>Aa</sup> |
| 64                         | 10           | 2.30 ± 0.57 <sup>Aa</sup> | 1.89 ± 0.18 <sup>Aa</sup>   | 2.32 ± 0.29 <sup>Aa</sup> |
| 64                         | 5            | 2.61 ± 0.44 <sup>Aa</sup> | 2.77 ± 0.15 <sup>Aa</sup>   | 3.66 ± 0.62 <sup>Aa</sup> |
| 28                         | 5            | 4.34 ± 0.77 <sup>Aa</sup> | 6.69 ± 0.83 <sup>Aa</sup>   | 5.85 ± 1.71 <sup>Ba</sup> |
| LTLT                       |              | 1.95 ± 0.18 <sup>Aa</sup> | 3.08 ± 1.09 <sup>Aa</sup>   | 3.17 ± 0.73 <sup>Aa</sup> |
| COHESIVIDAD                |              |                           |                             |                           |
| 100                        | 5            | 0.37 ± 0.14 <sup>Aa</sup> | 0.33 ± 0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.40 ± 0.17 <sup>Aa</sup> |
| 64                         | 10           | 0.40 ± 0.05 <sup>Aa</sup> | 0.49 ± 0.28 <sup>Aa</sup>   | 0.46 ± 0.05 <sup>Aa</sup> |
| 64                         | 5            | 0.44 ± 0.12 <sup>Aa</sup> | 0.55 ± 0.10 <sup>Aa</sup>   | 0.41 ± 0.17 <sup>Aa</sup> |
| 28                         | 5            | 0.72 ± 0.06 <sup>Aa</sup> | 0.64 ± 0.16 <sup>Ba</sup>   | 0.69 ± 0.21 <sup>Ba</sup> |
| 5                          |              | 0.29 ± 0.01 <sup>Aa</sup> | 0.32 ± 0.05 <sup>Aa</sup>   | 0.42 ± 0.09 <sup>Aa</sup> |
| ELASTICIDAD                |              |                           |                             |                           |
| 100                        | 5            | 0.93 ± 0.11 <sup>Aa</sup> | 0.98 ± 0.08 <sup>Aa</sup>   | 0.90 ± 0.02 <sup>Aa</sup> |
| 64                         | 10           | 0.94 ± 0.06 <sup>Aa</sup> | 0.89 ± 0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.87 ± 0.04 <sup>Aa</sup> |
| 64                         | 5            | 0.88 ± 0.07 <sup>Aa</sup> | 0.87 ± 0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.84 ± 0.01 <sup>Aa</sup> |
| 28                         | 5            | 0.83 ± 0.02 <sup>Aa</sup> | 0.86 ± 0.03 <sup>Aa</sup>   | 0.86 ± 0.01 <sup>Aa</sup> |
| LTLT                       |              | 0.99 ± 0.03 <sup>Aa</sup> | 0.95 ± 0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.93 ± 0.07 <sup>Aa</sup> |
| GOMOSIDAD (kg fuerza)      |              |                           |                             |                           |
| Tratamiento*               |              | Día 1                     | Día 7                       | Día 14                    |
| 100                        | 5            | 2.15 ± 1.91 <sup>Aa</sup> | 0.68 ± 0.02 <sup>Aa</sup>   | 1.15 ± 0.72 <sup>Ba</sup> |
| 64                         | 10           | 0.93 ± 0.34 <sup>Aa</sup> | 0.99 ± 0.67 <sup>Aa</sup>   | 1.07 ± 0.25 <sup>Ba</sup> |
| 64                         | 5            | 1.17 ± 0.50 <sup>Aa</sup> | 1.50 ± 0.37 <sup>Aa</sup>   | 1.43 ± 0.40 <sup>Aa</sup> |
| 28                         | 5            | 3.15 ± 0.81 <sup>Aa</sup> | 4.38 ± 1.57 <sup>Aa</sup>   | 4.25 ± 2.41 <sup>Aa</sup> |
| LTLT                       |              | 0.56 ± 0.08 <sup>Aa</sup> | 1.05 ± 0.55 <sup>Aa</sup>   | 1.35 ± 0.59 <sup>Ba</sup> |
| MASTICABILIDAD (kg fuerza) |              |                           |                             |                           |
| Tratamiento                |              | Día 1                     | Día 7                       | Día 14                    |
| 100                        | 5            | 2.00 ± 1.87 <sup>Aa</sup> | 0.66 ± 0.08 <sup>Aa</sup>   | 1.03 ± 0.65 <sup>Ba</sup> |
| 64                         | 10           | 0.87 ± 0.26 <sup>Aa</sup> | 0.87 ± 0.58 <sup>Bba</sup>  | 0.92 ± 0.18 <sup>Ba</sup> |
| 64                         | 5            | 1.02 ± 0.36 <sup>Aa</sup> | 1.30 ± 0.31 <sup>Abba</sup> | 1.19 ± 0.35 <sup>Ba</sup> |
| 28                         | 5            | 2.61 ± 0.62 <sup>Aa</sup> | 3.76 ± 1.47 <sup>Aa</sup>   | 3.65 ± 2.07 <sup>Aa</sup> |
| LTLT                       |              | 0.55 ± 0.07 <sup>Aa</sup> | 0.96 ± 0.49 <sup>Abba</sup> | 1.24 ± 0.45 <sup>Ba</sup> |

\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar (n=2) <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia.

Letras mayúsculas diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05)

Letras minúsculas diferentes en una misma fila representan diferencia significativa (P < 0.05)

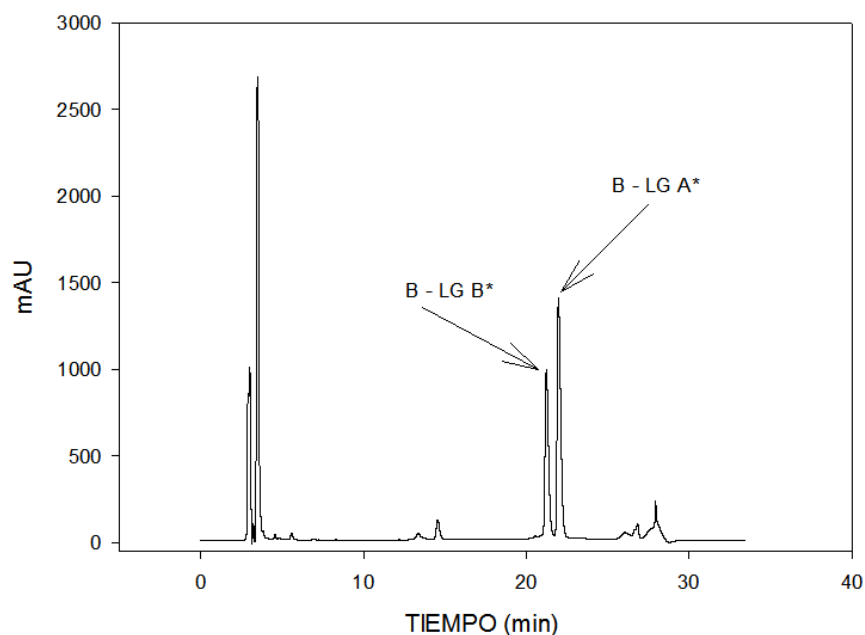
Finalmente, en esta etapa se pudo observar que los quesos elaborados a partir de leche tratada con TS evidencian mejoras en los parámetros de porcentaje de humedad,  $a_w$ ,

luminosidad y dureza durante el tiempo de almacenamiento de los quesos. Por el contrario, el pH de los quesos no mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) y la energía neta entregada demostró ser mayor en los tratamientos de US de tiempo prolongado de aplicación (10 min). Es posible que la mayor parte de los cambios observados se deban a una mayor incorporación de agua a la matriz del queso. Los datos recabados permitieron ampliar el panorama de investigación del proyecto, determinando nuevos parámetros y retomando los ya utilizados para determinar el grado de desnaturalización de los tratamientos ya aplicados por método de HPLC y DSC y así cuantificar el grado de desnaturalización alcanzado, corroborando así la afectación de ciertas características funcionales en leche.

## ETAPA II

### 3.6 PRUEBAS PRELIMINARES PARA ESTANDARIZAR DETERMINACIÓN DE BLG POR HPLC

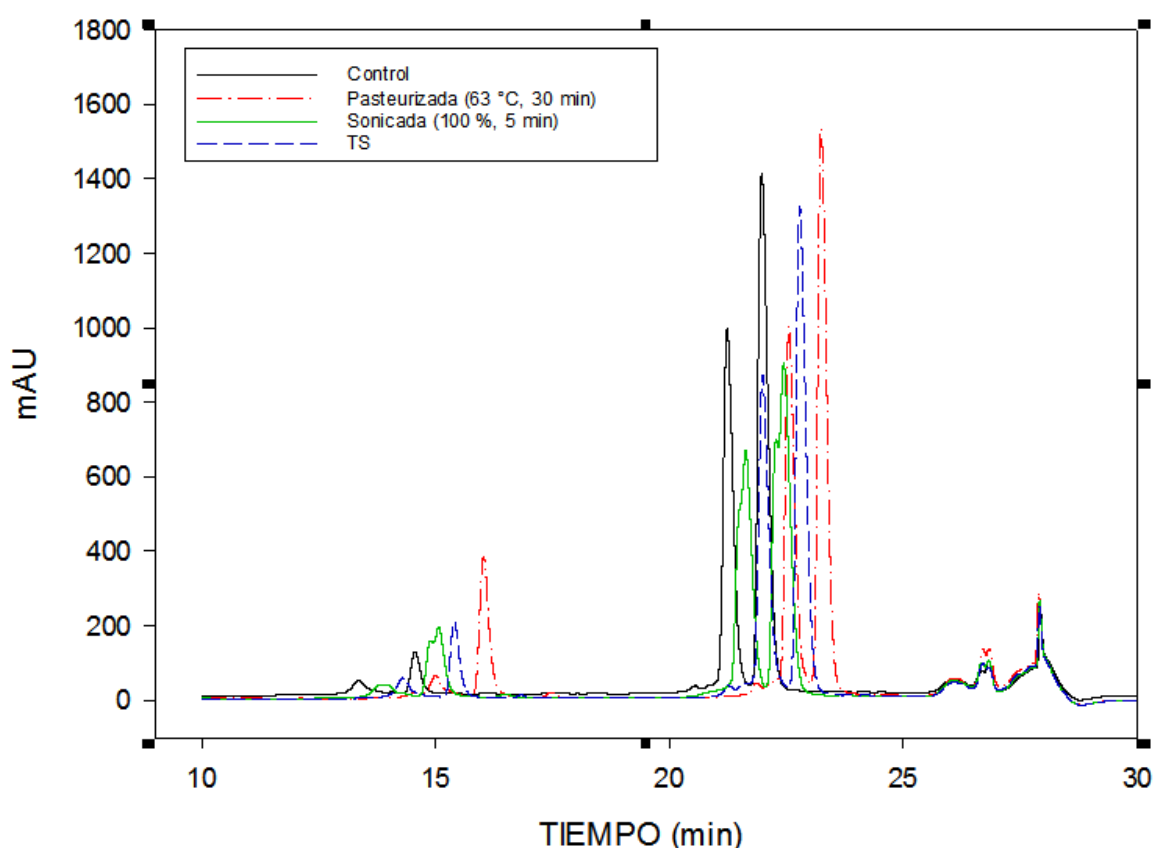
Un cromatograma típico de HPLC para identificar  $\beta$ -LG en leche descremada como prueba preliminar para determinar el grado de desnaturalización de la misma por efecto de tratamientos selectos de TS se muestra en la Figura 3.1. Al comparar esta Figura con aquellas reportadas por Parris y Baginski (1991) y Morales *et al.* (2000) es posible establecer la identificación correcta de las dos variantes de  $\beta$ -LG, las cuales se reconocen dentro del intervalo de 20-25 min de tiempo de retención, apareciendo primero  $\beta$ -LG B, seguida de  $\beta$ -LG A.



**Figura 3.1** Cromatograma de leche bovina descremada mostrando variantes de  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$  - LG A y B).

Posterior al análisis sobre la pertinencia del método cromatográfico, se realizaron pruebas adicionales con leche bovina descremada a la que se le aplicaron los tratamientos descritos en la Tabla 2.2 (leche cruda, pasteurizada LTLT, pasteurizada LTLT+ US 100% amplitud, 5 min y sólo US bajo mismas condiciones). Todos los tratamientos se hicieron

por cuadruplicado. Asimismo, en la Figura 3.2 se pueden observar los diferentes tiempos de retención para  $\beta$ -LG B y  $\beta$ -LG A para cada tratamiento aplicado, identificando pequeñas variaciones en los tiempos de retención de los mismos entre réplicas. Sin embargo, dado que las áreas correspondientes a dichas variantes proteicas permanecen dentro del intervalo de tiempo correspondiente, se consideró que el método generaba resultados reproducibles y podía emplearse en etapas subsecuentes del proyecto.



**Figura 3.2 Cromatograma de los diferentes tratamientos de TS aplicados.**

De acuerdo a lo reportado por Parris y Baginski, (1991) las áreas de integración obtenidas correspondieron a los tiempos de retención reportados para las principales proteínas de suero. Asimismo, se observaron variaciones en la intensidad de los picos correspondientes como consecuencia del tipo de tratamiento aplicado. Los valores obtenidos de las áreas definidas para  $\beta$ -LG B y  $\beta$ -LG A en los cromatogramas, sirvieron para dar indicio de la

pérdida de estructura de las proteínas del suero sometidas a los diferentes tratamientos de TS implementados, por lo que se procedió a su cuantificación. Para ello se elaboró una curva estándar de  $\beta$ -LG aislada ( $\geq 90$  % pureza) (Sigma-Aldrich, EUA).

Posteriormente, de acuerdo a lo mencionado en la sección 2.2.2, el método de HPLC se implementó con leche tratada térmicamente empleando procesos de pasteurización (HTST) y sobrepasteurización indicados en la Tabla 2.2 y cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.7. Como era esperado, el incremento en la intensidad del tratamiento térmico aumento la proporción de proteína desnaturalizada, observándose proporciones de  $\beta$ -LG A y  $\beta$ -LG B desnaturalizadas del orden del 11.63 y 13.6 %, en leche HTST y proporciones cercanas al 90 % para ambas fracciones en los tratamientos de sobrepasteurización, aunque estos no exhibieron diferencias significativas entre ellos ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3.7** Valores de concentración en ppm de las variantes de  $\beta$ -LG obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos aplicados\*.

| Tratamiento   | $\beta$ – LG B                   | %<br>Desnaturalización | $\beta$ – LG A                   | %<br>Desnaturalización |
|---------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Control       | 4248.78 $\pm$ 30.11 <sup>A</sup> | -                      | 4078.27 $\pm$ 16.70 <sup>A</sup> | -                      |
| HTST          | 3671.36 $\pm$ 9.81 <sup>B</sup>  | 13.6                   | 3604.31 $\pm$ 2.08 <sup>B</sup>  | 11.63                  |
| 85 °C , 30 s  | 370.21 $\pm$ 3.92 <sup>C</sup>   | 91.29                  | 448.56 $\pm$ 2.50 <sup>D</sup>   | 88.92                  |
| 85 °C , 1 min | 417.06 $\pm$ 0.77 <sup>C</sup>   | 90.19                  | 540.32 $\pm$ 0.04 <sup>C</sup>   | 86.66                  |

\*Los valores reportados son las medias  $\pm$  desviación estándar. n=2 réplicas.

Letras mayúsculas diferentes en una misma columna exhiben diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Los resultados mostrados se asemejan a lo reportado por Parris y Baginski (1991) quienes consideran que la desnaturalización térmica de las proteínas de suero de leche descremada comienza a partir de 40 °C y continúa lentamente hasta que alcanza un punto de desnaturalización mínimo a 65 °C, para proceder a mayor velocidad hasta lograr un 95 % de desnaturalización a 85 °C debido, probablemente, a cambios conformacionales asociados a una mayor exposición de residuos de aminoácidos aromáticos. De manera análoga, Morales *et al.* (2000) relacionaron el grado de desnaturalización térmica de

proteínas de suero con la intensidad del tratamiento. Las proteínas de suero exhiben diferentes grados de sensibilidad al calor, las más termolábiles como la  $\beta$ -LG y albúmina sérica fueron parcialmente desnaturalizadas al exponerse a tratamientos de termización y sobrepasteurización (65 °C, 10 s y 85 °C, 30 s respectivamente), encontrando así que la  $\beta$ -LG tuvo una desnaturalización del 11.8 % durante la termización mientras que al someterse a sobrepasteurización exhibió una desnaturalización del orden del 60 %, datos que se asemejan a los obtenidos en el presente trabajo.

### 3.7 DETERMINACIÓN DE DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUERO POR HPLC

La Tabla 3.8 muestra la cantidad residual de proteína de suero en leche bovina descremada sometida a diferentes tratamientos de termosonicación (TS).

**Tabla 3.8**  $\beta$ -LG desnaturalizada por diferentes tratamientos de TS de leche bovina descremada.

| Tratamiento <sup>1</sup> | US          |        | HTST | $\beta$ - LG B (%)             | $\beta$ - LG A (%)             |
|--------------------------|-------------|--------|------|--------------------------------|--------------------------------|
|                          | t (min)     | T (°C) |      |                                |                                |
| Leche cruda              | Leche cruda |        | -    | 100 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>    | 100 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>    |
| 1                        | -           | -      | SI   | 88.83 $\pm$ 0.58 <sup>B</sup>  | 92.40 $\pm$ 0.35 <sup>B</sup>  |
| 2                        | 10          | 45     | NO   | 92.07 $\pm$ 4.51 <sup>B</sup>  | 92.74 $\pm$ 5.03 <sup>AB</sup> |
| 3                        | 10          | 45     | SI   | 87.23 $\pm$ 0.48 <sup>BC</sup> | 89.71 $\pm$ 0.75 <sup>BC</sup> |
| 4                        | 10          | 65     | NO   | 80.34 $\pm$ 1.15 <sup>CD</sup> | 83.95 $\pm$ 1.84 <sup>CD</sup> |
| 5                        | 10          | 65     | SI   | 76.01 $\pm$ 2.88 <sup>D</sup>  | 80.94 $\pm$ 2.05 <sup>D</sup>  |
| 6                        | 20          | 65     | SI   | 74.52 $\pm$ 3.70 <sup>D</sup>  | 77.58 $\pm$ 4.43 <sup>D</sup>  |
| 7                        | 30          | 65     | SI   | 63.50 $\pm$ 3.73 <sup>E</sup>  | 68.03 $\pm$ 3.62 <sup>E</sup>  |

\*Los valores reportados son medias  $\pm$  desviación estándar, n = 3 réplicas. <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia al 100%.

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0.05).

En la Tabla 3.8 se puede observar que el daño provocado por la pasteurización HTST y los tratamientos de TS a baja temperatura (45 °C) es similar entre sí, observándose una disminución mínima de proteína en comparación a la leche cruda que va de un 7.26% a 12.77%, considerando ambas variantes proteicas. Por otra parte, el aumento en la temperatura afecta significativamente ( $P < 0.05$ ) la magnitud de desnaturalización proteica logrando reducciones adicionales de  $\beta$ -LG nativa en el orden de 16 a 24%. La aplicación de US, aunque aumentó la magnitud de desnaturalización (todos los tratamientos TS exhibieron menores cantidades de  $\beta$ -LG nativa que sus contrapartes tratadas sólo térmicamente), no presentó diferencias significativas. Los resultados obtenidos se pueden comparar con lo reportado por Almanza-Rubio *et al.* (2016), quienes mencionan que al elaborar quesos crema con leche sonicada a distintas combinaciones de potencia ultrasónica (0 – 100 W), temperatura (4 – 63 °C) y tiempo (0 – 30 min) la cantidad de proteína residual en los quesos crema no cambió significativamente por el pre-tratamiento de la leche con TS.

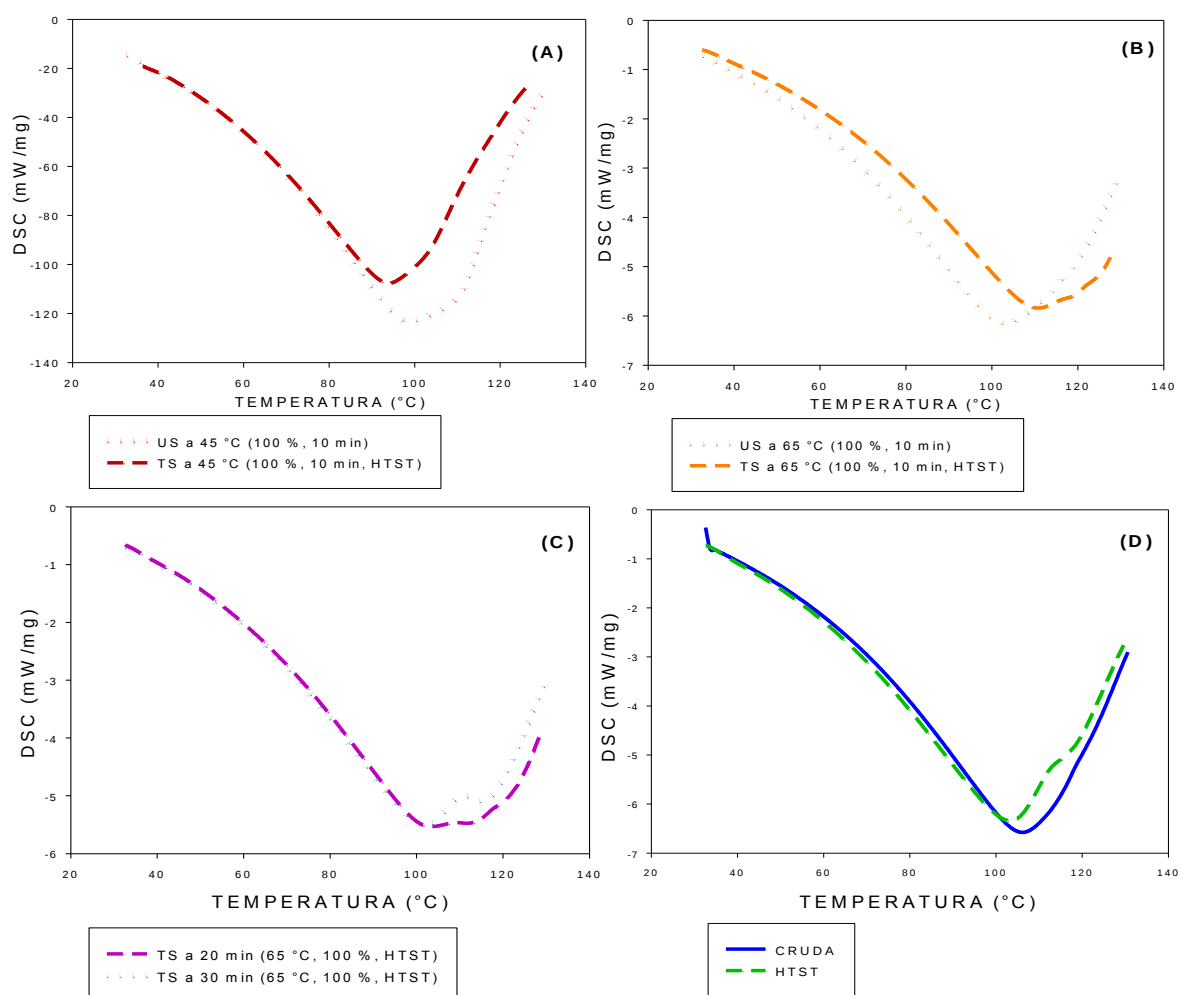
Por otra parte, se consideró evaluar con fines exploratorios, la influencia de tiempos más largos de proceso ultrasónico a 65 °C, incrementando el tiempo de sonicación a 20 y 30 min, se observó una pérdida significativamente mayor de  $\beta$ -LG nativa, del orden de 25.48 % y 22.42 %, y 36.50 % y 31.97 % para las variantes A y B, respectivamente. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Shanmugam *et al.* (2012) donde evaluaron leche ultrasonificada a 15, 30, 45 y 60 min a potencias de 20 y 41 W y temperaturas de 40 °C. En ese estudio se observó que la cantidad de proteínas nativas de suero de leche se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) hasta los 30 min de tratamiento con ultrasonido y luego esta disminución aumentó al prolongarse el tiempo de sonicación, mostrando que tanto el ultrasonido como las altas temperaturas inducen la desnaturalización de proteínas de suero (Almanza-Rubio *et al.*, 2016). La cantidad de proteína residual que se observa se debe a que, dentro de las proteínas globulares, las proteínas de suero se ven afectadas por el US en mayor medida. Asimismo, la posibilidad de desnaturalización de las proteínas del suero se ve sujeta a la influencia significativamente alta de grandes fuerzas

de cizalla, debidas a la cavitación acústica (Thomas y Geer, 2011). Además, las nuevas superficies que se crean constantemente durante la cavitación, pueden dañar fácilmente las proteínas en la interface de solución de burbujas y causar su desnaturalización. Esta interface posee un carácter hidrófobo, en donde los monómeros parcialmente desnaturalizados interactúan entre sí dando como resultado la formación de agregados (Shanmugam *et al.*, 2012).

### **3.8 EVALUCION DE DESNATURALIZACIÓN POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)**

El análisis para la determinación de cambios en la estructura proteica fue realizado por DSC, técnica que permite la medición de la capacidad calorífica en función de la temperatura, así como monitorear transiciones conformacionales y transiciones de fase como una función de la temperatura (Kaletunç, 2009). Las muestras analizadas se indican en la Tabla 2.3. En cada día de medición se evaluaron: una muestra control (leche cruda, descremada), una muestra pasteurizada (HTST) y dos tratamientos de TS, equivalentes a los evaluados en la sección previa. Los termogramas obtenidos de los análisis se muestran en la Figura 3.3. En estos análisis se pueden observar picos o puntos de inflexión que reflejan las transiciones de las proteínas inducidas térmicamente. La dirección del pico corresponde a la naturaleza de la transición, ya sea de absorción de calor (endotérmica) o liberación de calor (exotérmica). En este caso, al igual que sucede en la fusión de los sólidos, la desnaturalización de las proteínas mostró un comportamiento endotérmico (Kaletunç, 2009). Los termogramas observados corresponden a aquellos de leche sometida a pasteurización HTST y diferentes tratamientos de US y TS y es posible notar que sus puntos de transición se encuentran a temperaturas en el rango de 90 a 120 °C. Las temperaturas de desnaturalización para leches cruda, HTST y tratada por US y TS obtenidas de la Figura 3.3 se muestran en la Tabla 3.9. Como era de esperarse, las proteínas exhiben por lo regular una menor temperatura de desnaturalización conforme aumenta la intensidad del tratamiento aplicado previamente, debido a un efecto aditivo. Las muestras tratadas por US y TS a 45 °C, 10 min mostraron un pico de transición que va

de 98 °C a 93 °C, respectivamente (Figura 3.3a). Una disminución en el punto de transición indica que la proteína fue sometida a un daño previo, por lo que requiere menos tiempo alcanzar su desnaturalización completa. En este sentido, se observa que la temperatura necesaria para provocar este cambio en proteínas de leche tratadas por ultrasonido fue menor que aquella requerida para la muestra de leche cruda (Figura 3.3d). Asimismo, la muestra US a 65 °C (Figura 3.3c) requirió de una T de desnaturalización cercana a la de la muestra HTST para poder detectar su punto de transición, pero necesitó ligeramente menos energía para hacerlo.



**Figura 3.3** Termogramas de leche sometida a tratamiento térmico y diferentes tratamientos de TS. \*Gráficas resultantes de 2 termogramas de cada experimento indicado.

Lo anterior puede deberse a un daño en las proteínas de suero de leche ligeramente superior, al originado por el tratamiento térmico debido a la temperatura mayor final que alcanzó el tratamiento, pudiendo focalizar dicha temperatura a los efectos provocados por la cavitación. Por su parte, la muestra TS a 65 °C mostró un comportamiento distinto a todos los tratamientos aplicados, observándose una mayor temperatura para lograr la transformación de la estructura proteica, inclusive mayor que la leche cruda, pudiendo deberse a un error en la medición. No obstante, utilizó menos energía que los tratamientos restantes a 65 °C (20, 30 min) para efectuar la transformación de estructura.

**Tabla 3.9** Temperaturas de desnaturalización de proteínas séricas en leche tratada por TS de acuerdo a prueba DSC.

| Tratamiento <sup>1</sup> | US      |        | HTST | Temperatura de desnaturalización (°C) |
|--------------------------|---------|--------|------|---------------------------------------|
|                          | t (min) | T (°C) |      |                                       |
| Leche cruda              | -       | -      | 0    | 106.61 ± 0.03 <sup>B</sup>            |
| 1                        | 0       | 0      | SI   | 103.60 ± 0.00 <sup>C</sup>            |
| 2                        | 10      | 45     | NO   | 98.62 ± 0.04 <sup>F</sup>             |
| 3                        | 10      | 45     | SI   | 93.42 ± 0.28 <sup>G</sup>             |
| 4                        | 10      | 65     | NO   | 102.62 ± 0.01 <sup>D</sup>            |
| 5                        | 10      | 65     | SI   | 110.62 ± 0.02 <sup>A</sup>            |
| 6                        | 20      | 65     | SI   | 103.61 ± 0.02 <sup>C</sup>            |
| 7                        | 30      | 65     | SI   | 101.62 ± 0.06 <sup>E</sup>            |

\*Los valores reportados son medias ± desviación estándar, n = 3 réplicas. <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia al 100%.

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (P < 0.05).

En las muestras TS a 65 °C por 20 min y 30 min (Figura 3.3c) se puede observar un comportamiento distinto al reportado en las Figuras 3.3(a), (b) y (d). Es posible notar que ambos tratamientos de TS muestran la formación de varios picos de transición y que se necesitó una temperatura elevada, pero no superior a la de los tratamientos control (cruda descremada y HTST), para comenzar las modificaciones de la estructura proteica correspondiente. Éstas temperaturas de desnaturalización se asemeja a la utilizada por la leche cruda, que requirió un poco más de 100 °C. En este sentido, la cantidad de energía

utilizada por los tratamientos de TS fue ligeramente menor que la requerida por la leche cruda y la leche pasteurizada HTST. Finalmente, se puede notar que la muestra pasteurizada HTST revela un punto de transición menor al de la leche cruda, lo cual es de acuerdo a lo esperado y puede deberse al daño recibido por el tratamiento térmico aplicado, provocando la ruptura de la estructura proteica nativa de la leche cruda.

La generación de calor debida a la reacción requerida aparente para la transición térmica se determina a partir del área entre el pico y una línea base de la muestra obtenida a partir de temperaturas que corresponden a la pre y post transiciones (cantidad máxima de proteínas en los estados inicial y final, respectivamente), dividido por la cantidad de materiales que reaccionan en el recipiente de la muestra (Kaletunç, 2009). En estos tratamientos TS prolongados (20 y 30 min), al consumirse menos energía para lograr la transición proteica, se muestra que la cantidad de proteína de suero sin desnaturalizar es menor que la contenida en la muestra control. Es importante destacar que bajo la suposición de que los tratamientos US de 20 y 30 min provocarían un daño excesivo en la estructura proteica se esperaba un termograma en el que se mostrara un comportamiento similar a lo registrado en los incisos a y b de la Figura correspondiente por lo que se puede observar que sí refleja daño inducido por los tratamientos aplicados

Un estudio de DSC de Relkin (2009) sobre transformaciones inducidas por calor en dispersiones de un aislado de proteína de suero de leche reporta una desviación máxima de flujo de calor correspondiente a la desnaturalización de  $\beta$ -LG. La forma de las señales del análisis reveló un solo pico endotérmico de la pendiente de temperatura contra tiempo menor a 0.5 °C/min, lo que para valores más altos similares a los del presente trabajo e ilustrado en la Figura 3.3, en donde las señales de DSC presentan un pico endotérmico mayor y una ligera reacción exotérmica. La disminución en los valores del gráfico por la aparente generación de calor asociada con el desarrollo de la reacción y el incremento de los valores de temperatura del pico con un aumento de la concentración de proteína, se pueden atribuir a un incremento en las interacciones hidrofóbicas, como

resultado de las reacciones endotérmicas simultáneas de desdoblamiento (desnaturalización) que se desarrollan en las proteínas y las interacciones (exotérmicas) proteína–proteína que pueden hacerse presentes. La mayor parte de las proteínas desnaturalizadas se puede convertir de forma irreversible en agregados y el comportamiento térmico del sistema es controlado por la velocidad en la etapa de la reacción de desnaturalización (Relkin, 2009).

### **3.9 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA**

Los resultados de los análisis de la capacidad de retención de agua (CRA) obtenidos en el presente trabajo se muestran en la Tabla 3.9. Los tratamientos aplicados mostraron resultados que exhibieron una diferencia significativa entre sí ( $P < 0.05$ ). Se observó que el ultrasonido (US) impacta positivamente la CRA ya que, a mayor tiempo de sonicación la CRA aumenta. También, es posible observar un efecto significativo de la temperatura en los tratamientos implementados; por tanto, puede apreciarse un aumento progresivo de la CRA, en función al incremento tanto de tiempo de sonicación como de la temperatura del sistema.

Entre las dos primeras muestras, es decir, el tratamiento control (leche descremada cruda) y la muestra pasteurizada (HTST; 72 °C, 15 s), es notable la influencia de la temperatura sobre la CRA aumentando ésta un 406.3% con respecto al tratamiento control. Los tratamientos US con el mismo tiempo de sonicación (10 min), mostraron que el proceso a mayor temperatura (65 °C) obtuvo mayor CRA atribuyéndose este resultado nuevamente a la temperatura.

En cuanto a los tratamientos TS se observa que el tratamiento TS de menor tiempo y menor temperatura (10 min, 45 °C) superó 7.71 veces al control (leche descremada sin tratamiento aplicado) y el tratamiento TS a 65 °C y 10 min aumentó 9.34 veces con

respecto a la misma muestra control a pesar de compartir tiempo de sonicación con el antes mencionado.

**Tabla 3.10** Valores de CRA obtenidos para cada tratamiento aplicado<sub>1\*\*</sub>

| CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA |        |      |                            |
|--------------------------------|--------|------|----------------------------|
| TS                             |        | HTST | Promedio (%)               |
| t (min)                        | T (°C) |      |                            |
| -                              | -      | -    | 2.69 ± 0.08 <sup>*A</sup>  |
| -                              | -      | Si   | 13.62 ± 2.53 <sup>B</sup>  |
| 10                             | 45     | No   | 13.94 ± 0.37 <sup>CB</sup> |
| 10                             | 45     | Si   | 20.75 ± 0.06 <sup>DC</sup> |
| 10                             | 65     | No   | 25.13 ± 2.47 <sup>ED</sup> |
| 10                             | 65     | Si   | 30.84 ± 0.33 <sup>FE</sup> |
| 20                             | 65     | Si   | 35.46 ± 2.94 <sup>F</sup>  |
| 30                             | 65     | Si   | 36.74 ± 1.52 <sup>F</sup>  |

<sup>1</sup>Los valores reportados son las medias ± desviación estándar. <sup>\*\*</sup>Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia al 100%. Los datos se presentan como gramos de agua contenida en 100 gramos de cuajada

\*Leche bovina descremada

Letras mayúsculas diferentes en una misma columna son significativamente diferentes (P < 0.05) n=2 réplicas.

Los tratamientos TS con tiempos prolongados de tratamiento US (20 y 30 min), ambos sujetos a 65 °C, muestran un aumento progresivo en los valores de CRA en comparación a los tratamientos anteriores. Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Wu *et al.* (2001) y Riener *et al.* (2009), quienes en la elaboración de yogurt, obtuvieron una CRA superior en los tratamientos TS, en comparación a la del control, al aplicar tratamientos de TS a 20 kHz con 450, 225 y 90 W por 1, 6 y 10 min, y 24 kHz, 400 W por 10 min, respectivamente. Los autores argumentan que la cavitación provoca un excelente efecto de homogeneización que conlleva a una conveniente reducción de tamaño del GG

y así se expone una mayor área de contacto de la MGG. El aumento del área de contacto de la MGG incluye una nueva cantidad de caseína unida a ella provocando una estructura más estable e hidrofílica. Esta podría ser la razón principal sobre el aumento en la CRA para los tratamientos TS. La capacidad de retención de agua se debe a la capacidad de las proteínas para retener el agua dentro de la estructura lo que hace probable que los nuevos tipos de interacciones proteína-proteína propuestos son las responsables de promover una unión mejorada de agua dentro de la red tridimensional y en consecuencia un efecto benéfico sobre la CRA (Wu *et al.*, 2001; Riener *et al.*, 2009).

### **3.10 TIEMPO DE COAGULACIÓN**

En la Tabla 3.11 se muestran los valores obtenidos en la determinación de tiempo de coagulación (TC) para los diferentes tratamientos aplicados. Se observó una diferencia significativa en los valores de TC para los diferentes tratamientos de TS aplicados ( $P < 0.05$ ). De ellos, el que presentó el menor TC fue el de US a 45 °C por 10 min, obteniendo una reducción del TC mayor al 50 % en comparación con aquel obtenido para el control (leche cruda descremada). Por otra parte, la aplicación del tratamiento térmico (HTST) en la leche tratada por US incrementa el TC, en 1.37 min en los tratamientos de US a 45, así como 5 min en los tratamientos a 65 °C por 10 min. Asimismo, el tiempo de tratamiento de TS entre 10 y 20 min con US a 65 °C no muestra un incremento significativo ( $P > 0.05$ ) del TC; sin embargo, al incrementar el tiempo de tratamiento a 30 min, el aumento del TC es significativo ( $P < 0.05$ ), llegando a ser de 43 %. Por otra parte, valores similares de TC fueron observados entre el control con la leche pasteurizada, leche US a 65 °C por 10 min y leche TS a 45 °C.

Los cambios en el tiempo de coagulación pueden atribuirse en gran medida a la transformación del tamaño del GG de la fracción restante de grasa (tratamientos aplicados en leche bovina descremada, 0.5 % - 0.9 % grasa) de la leche, desencadenado por la acción de la cavitación sobre la MGG, siendo este el mecanismo principal detrás de

la ruptura del mismo al homogeneizarse la leche por la aplicación de ultrasonido (Bermúdez–Aguirre *et al.*, 2008). Por su parte, el cambio mínimo que se manifiesta entre el tratamiento térmico (HTST) y la muestra control (descremada cruda) puede deberse a una afectación mínima en la membrana del GG. Según Corredig y Dalgleish (1998), se menciona que no hay cambios importantes en el tamaño de los GG que tienen lugar durante el calentamiento de la matriz láctea y en consecuencia el tiempo de coagulación entre dichas muestras resultó semejante.

**Tabla 3.11** Tiempos de coagulación obtenidos a partir de diferentes tratamientos de TS aplicados\*

| TIEMPO DE COAGULACIÓN |       |             |                             |
|-----------------------|-------|-------------|-----------------------------|
| US**                  |       | HTST        | Tiempo de coagulación (min) |
| t(min)                | T(°C) |             |                             |
| -                     | -     | Leche cruda | 2.25 ± 0.35 <sup>1C</sup>   |
| -                     | -     | Si          | 2.00 ± 0.00 <sup>C</sup>    |
| 10                    | 45    | No          | 1.13 ± 0.18 <sup>C</sup>    |
| 10                    | 45    | Si          | 2.50 ± 0.71 <sup>C</sup>    |
| 10                    | 65    | No          | 2.50 ± 0.71 <sup>C</sup>    |
| 10                    | 65    | Si          | 7.50 ± 0.71 <sup>B</sup>    |
| 20                    | 65    | Si          | 8.13 ± 1.59 <sup>B</sup>    |
| 30                    | 65    | Si          | 14.25 ± 1.06 <sup>A</sup>   |

\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar. \*\* Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia al 100%. <sup>1</sup>Leche bovina descremada  
Letras mayúsculas diferentes en una misma columna son significativamente diferentes (P < 0.05), n=2 réplicas.

Bermúdez – Aguirre *et al.* (2008) mencionaron que, en la elaboración del queso, se prefiere la presencia de pequeños GG debido a que ésta característica física puede reducir el tiempo de coagulación del cuajo así como el índice de firmeza de la cuajada. El efecto del US sobre la disminución del GG es debido al aumento de la presión causada por el

colapso violento de las burbujas. La homogeneización por US mostró que el tamaño de los GG se puede reducir por debajo de 1  $\mu\text{m}$  cuando el tratamiento TS se lleva a cabo a 60 °C. Al mismo tiempo, los glóbulos tienen más sitios de unión en la membrana, favoreciendo la fusión con caseínas y proteínas del suero y produciendo así un ingrediente ideal para la fabricación de quesos debido a la mejora de la nueva gran superficie (red de GG – caseína). Calentar la leche al mismo tiempo que el tratamiento de US reduce la viscosidad, mejorando la acción del US en la reducción del tamaño del GG. Con temperaturas entre los 55 y 75.5 °C más una sonicación a flujo continuo se puede alcanzar una reducción mayor al 81.5 % en el tamaño de los GG (Bermúdez – Aguirre *et al.*, 2008).

Los GG con diámetros más pequeños modifican el tiempo de coagulación del cuajo, y el US da como resultado dicha reducción. Tosh y Dalgleish (1998) en su estudio sobre el efecto del tamaño de partícula sobre las propiedades de la adición de cuajo y los GG formados en la leche homogeneizada por microfluidización (leche cruda y leche reconstituida; 14 – 35 MPa, 2 a 5 recirculaciones) destaca que a mayor reducción de tamaño del glóbulo se acelera el tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación para las muestras tratadas por TS se ubicó en un rango de tiempo de 20.8 a 24.1 min y dichos tiempos resultaron significativamente más cortos que el tiempo de coagulación de su muestra control. Asimismo, muestras con tamaño de partícula de GG de 412 nm disminuyeron 2.8 min el tiempo en comparación a la muestra control, mientras que un cambio de tamaño a 359 nm causó la disminución del tiempo de coagulación de 6.1 min en comparación a la muestra control.

Nassar *et al.* (2004) concluyeron que la gelificación es acelerada por la temperatura. En ese sentido, se pudo notar que los cambios en el medio, en este caso la formación del gel, están fuertemente relacionados con los efectos del ultrasonido y a su vez es posible monitorear la evolución o progreso de esos cambios. La reacción enzimática llevada a cabo tiene un fuerte efecto sobre las propiedades físicas de la formación de gel que inducen una reducción del TC y por consiguiente se optimiza la elaboración de queso.

La fuerte dependencia del proceso de coagulación de leche de la temperatura, confirma la hipótesis de que los enlaces entre micelas y paracaseínas son hidrófobos. Los cambios pueden atribuirse a una modificación inducida a la estructura de la micela de caseína debido a que el inicio de la formación del gel depende de la hidrólisis de  $\kappa$ -caseínas localizadas en la micela y así, la masa micelar se va a formar con la disminución de sus cargas negativas. Este fenómeno involucra cambios de los complejos micelares, provocando la agregación de las micelas, provocando el desarrollo de interacciones entre mayor cantidad de masa, dando como resultado un aumento de la resistencia mecánica del medio (Tosh y Dalgleish, 1998; Nassar *et al.*, 2004).

Por su parte, Pérez Mata (2014) al evaluar el TC en leche tratada por TS (50, 75 y 100 % de amplitud por 2, 4 y 6 min) observó que el TC disminuía dependiendo el tiempo de sonicación y el porcentaje de amplitud aplicado. Igualmente, menciona que la disminución podría ser un resultado de la interacción entre las proteínas de suero de la leche y las micelas de CN, que no permiten la unión entre las micelas de CN formando un gel débil debido a las frágiles uniones entre las moléculas. Este resultado también puede atribuirse a la interacción entre los GG y las proteínas debido a la presencia de proteínas de suero en la MGG y la reducción de las partículas presentes en leche. Gallegos Pineda (2015) también indica que al incrementar el contenido de proteína promueve una agregación más rápida y resulta en una estructura de gel más abierta ésta, asimismo, la disminución en el TC puede asociarse con un efecto de dilución de  $\kappa$ -CN pues las micelas se encuentran unidas a la MGG y una menor cantidad de  $\kappa$ -CN queda expuesta disminuyendo el grado de hidrólisis requerido para iniciar la coagulación, además de que los efectos de corte generados por la cavitación son capaces de romper algunos enlaces de  $\kappa$ -CN con la micela, provocando su separación parcial.

### 3.11 FIRMEZA DE GEL

Los resultados de la evaluación de firmeza de gel (FG) en los tratamientos aplicados se muestran en la Tabla 3.11. En esta Tabla, es posible observar que los tratamientos selectos de TS exhibieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en FG con respecto al control mostrando un comportamiento variado en los datos obtenidos. Asimismo, se puede observar que el tratamiento de pasteurización HTST (72 °C, 15 s) aumenta la FG en comparación a la FG obtenida en el tratamiento control (leche descremada cruda). Además, se observa que el tratamiento US a 45 °C, 10 min aumenta en un 37.33 % la FG en comparación a la muestra de leche cruda. Igualmente, se puede observar un efecto aditivo del tratamiento térmico HTST y el US, debido a que en el tratamiento de TS realizado a la misma temperatura (45 °C, 10 min, HTST) la FG aumenta, esta vez en un 64.25 %, en comparación con la firmeza observada en el gel elaborado con leche cruda. Hasta este punto se muestra un incremento progresivo de la firmeza de los geles elaborados. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 65 °C y US por 10 min se obtuvo una disminución de la FG en comparación con el valor observado en el tratamiento térmico y a los tratamientos de US a 45 °C. A pesar de lo anterior, la FG en estas muestras fue mayor que la FG observada en la muestra control.

De igual manera, el tiempo de tratamiento de US tiene un efecto de disminución de la FG. Esto se comprueba al revisar los resultados obtenidos en los tratamientos de TS a 65 °C por 10, 20 y 30 min, en los cuales, se observa una disminución progresiva de la FG entre las muestras, en función del tiempo de sonicación. En este sentido, la disminución de la FG es mayor en los tratamientos TS a 20 y 30 min con respecto al control (leche descremada cruda), en los cuales, la disminución de la FG fue del 6.15 % y 25 % respectivamente, siendo el tratamiento a 65 °C por 30 min y asistido con HTST el menos firme de todas las muestras evaluadas.

En este sentido, Nassar *et al.* (2004) quienes aplicaron US de potencia a leche bovina con diferentes concentraciones de proteína para evaluar posibles cambios en FG concluyeron que la resistencia mecánica del gel se encuentra en función de la densidad de la red de proteínas y que esta última propiedad puede ser modificada por el US dependiendo de la intensidad del tratamiento. Por otro lado, al evaluar al efecto que tiene la temperatura en la FG, se puede decir que, un aumento de la temperatura induce un aumento en la firmeza del gel, dentro de un intervalo de temperatura favorable para el proceso de coagulación. Este fenómeno puede verse afectado cuando la temperatura de reacción se hace mayor que un valor crítico por encima del cual las enzimas pierden su actividad. La fuerte dependencia de la coagulación de la leche con la temperatura confirma la hipótesis de que los vínculos entre las micelas y para-caseínas son hidrofóbicos. Temperaturas inferiores a 20 °C promueven los enlaces iónicos y de hidrógeno en la leche, y así, los valores medidos con respecto al efecto del ultrasonido parecen muy sensibles a la variación de parámetros clave de la cinética de gelificación.

**Tabla 3.12** Firmeza de Gel de leche tratada por TS en condiciones selectas\*.

| FIRMEZA DE GEL |       |      |                            |
|----------------|-------|------|----------------------------|
| US             |       | HTST | Firmeza (g-fuerza)         |
| t(min)         | T(°C) |      |                            |
| Leche Cruda    |       |      | 76.58 ± 2.23 <sup>1C</sup> |
| -              | -     | Si   | 86.01 ± 0.51 <sup>C</sup>  |
| 10             | 45    | No   | 105.17 ± 4.10 <sup>B</sup> |
| 10             | 45    | Si   | 125.78 ± 2.95 <sup>A</sup> |
| 10             | 65    | No   | 82.52 ± 6.76 <sup>C</sup>  |
| 10             | 65    | Si   | 80.95 ± 3.87 <sup>C</sup>  |
| 20             | 65    | Si   | 71.87 ± 6.71 <sup>C</sup>  |
| 30             | 65    | Si   | 57.43 ± 6.30 <sup>D</sup>  |

\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar.

<sup>1</sup>Leche bovina descremada.

Letras mayúsculas diferentes en una misma columna son significativamente diferentes (P < 0.05), n=2 réplicas.

Cabe destacar que el pH de las muestras evaluadas fue ajustado a 6.15, con lo cual también podemos destacar que esto causa un efecto sobre la FG. Nassar *et al.* (2004) mencionaron que la disminución del pH en el cuajo reduce el TC, aumenta FG y tiene influencia sobre la resistencia mecánica máxima del gel. Esto se debe en primer lugar por el efecto de aumentar la actividad de la enzima de coagulación, que incrementa la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína. La influencia del pH en el cuajo también se refleja en la organización del gel mediante la disminución de la estabilidad de las micelas, por medio de la neutralización de cargas negativas y la solubilización de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Asimismo, menciona que un incremento en la velocidad de reacción provocado por la disminución del pH incrementa de modo significativo la velocidad de formación y la FG. Hasta pH 5.7 estas variaciones pueden ser explicadas por un aumento del calcio ionizado. Por el contrario, por debajo de este valor crítico del pH, las caseínas están desmineralizada y su estructura micelar desaparece. De lo contrario, un aumento de temperatura, combinado con una disminución de pH del cuajo, podría inducir un aumento en el poder reafirmante del gel.

Asimismo, los resultados reportados pueden ser comparados con lo demostrado por Tosh y Dalglish (1998), quienes en su estudio sobre el efecto del tamaño de partícula sobre las propiedades de la adición de cuajo y los GG formados en la leche homogeneizada por microfluidización (leche cruda y leche reconstituida; 14 – 35 MPa, 2 a 5 recirculaciones) atribuyen el cambio en la FG a la disminución en el tamaño del GG. Como se ha mencionado previamente, el efecto de la cavitación sobre el GG provoca la disminución en el tamaño del mismo (Bermúdez–Aguirre *et al.*, 2008), comportamiento similar al que produce la leche microfluidizada estudiada por Tosh y Dalglish (1998), quienes indican que un deterioro general de la estructura del gel se produjo conforme el tamaño del GG disminuyó. De acuerdo a su muestra control, los geles hechos de leche microfluidizada (reducción de tamaño de GG) fueron más frágiles. En las muestras de leche microfluidizada con los GG más pequeños (359 nm) el gel rompió tan pronto como fue perturbado. Ahora bien, a mayor tiempo de US mayor es el efecto sobre la reducción del

tamaño del GG (Bermúdez–Aguirre *et al.*, 2008) por lo que se puede asumir que los geles con mayor tiempo de sonicación mostraron valores reducidos de la FG debido a una reducción considerable del tamaño del GG, aun en concentraciones bajas de grasa. Los resultados muestran que la influencia de la modificación de la estructura de las micelas de caseína por adsorción a la interfase grasa–suero afecta el comportamiento durante la adición de cuajo en la leche así como el diámetro de los GG afectan las propiedades físicas de la leche. Las micelas de caseína que están libres en solución se rompen parcialmente a medida que se adsorben en la interfase grasa – agua. Cuando los GG son reducidos, los puentes entre ellos se rompen y más fragmentos de caseína micelar son adsorbidos a la nueva interfase creada. Algunos otros complejos ricos en caseína son formados con *clusters* o grupos de glóbulos muy pequeños, lo cual a su vez puede afectar las propiedades del gel formado.

## ETAPA III

### 3.12 RENDIMIENTO

En la Tabla 3.12 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación del rendimiento en los quesos tipo Panela elaborados con leche tratada a diferentes condiciones de TS y con leche pasteurizada térmicamente (QP). El rendimiento verde de quesos TS se incrementó de manera significativa ( $P < 0.05$ ) con relación al observado en QP; el tratamiento TS a menor temperatura (45 °C) aumentó el rendimiento verde en un 12 % en relación al control, mientras que el queso TS a 65 °C se incrementó en un 27 %, probablemente atribuible a una mayor incorporación de proteínas séricas. Por otra parte, el rendimiento húmedo también reflejó un aumento en comparación al QP, de tal forma que el queso TS a 45 °C presentó un 14 % de aumento en rendimiento sobre el calculado para el queso control mientras que el queso TS a 65 °C mostró un incremento del 21 % en promedio, aunque sólo este último exhibió una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Los resultados obtenidos se asemejan a lo reportado por Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas (2010) cuyos valores de rendimiento obtenidos en quesos elaborados con leche ultrasonificada fueron siempre mayores a los del control pasteurizado. Así, por ejemplo, el queso fabricado con leche US tiempo de sonicación más largo (30 min) reportó un rendimiento húmedo de 20.6 %, significativamente mayor al de la muestra control (9 %). Posteriormente, con muestras diferentes, el uso del ultrasonido produjo nuevamente un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el rendimiento del queso, aunque sin efecto del tiempo de proceso. Debido a que incluso con tiempos cortos de sonicación (15 s) el rendimiento del queso fue diferente en comparación al control (leche sin tratamiento aplicado, HTST). Por su parte, Gallegos Pineda (2015) observó que los rendimientos (verde y húmedo) obtenidos de los quesos TS tuvieron un incremento con respecto a los tratados térmicamente (LTLT). Los valores del rendimiento fueron mayores para el tratamiento de TS a 100 % de amplitud de onda, 24 kHz y 12 min de sonicación ya que se tuvo un incremento en rendimiento verde de 1.22 % y 0.96 % en rendimiento húmedo con respecto al tratamiento térmico.

**Tabla 3.13** Valores obtenidos de rendimiento verde y húmedo de quesos elaborados con leche sometida a tratamiento térmico y de TS\*.

| US <sup>1</sup> |        | HTST | Rendimiento Peso                            | Rendimiento                                 |
|-----------------|--------|------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| t (min)         | T (°C) |      | en Verde %                                  | húmedo %                                    |
|                 |        |      | (kg <sub>queso</sub> /kg <sub>leche</sub> ) | (kg <sub>queso</sub> /kg <sub>leche</sub> ) |
| -               | -      | SI   | 13.98 ± 1.32 <sup>A</sup>                   | 11.46 ± 0.40 <sup>A</sup>                   |
| 10              | 45     | SI   | 15.68 ± 0.25 <sup>B</sup>                   | 13.10 ± 2.56 <sup>AB</sup>                  |
| 10              | 65     | SI   | 17.76 ± 0.19 <sup>C</sup>                   | 13.97 ± 1.10 <sup>B</sup>                   |

\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar. Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia al 100%.

Letras mayúsculas diferentes en una misma columna son significativamente diferentes (P < 0.05), n=4 réplicas.

Este incremento en el rendimiento puede atribuirse a la nueva estructura en la leche después del tratamiento de ultrasonido. Los GG y las moléculas de caseína cambian su forma y tamaño como consecuencia de la cavitación generada por las ondas de ultrasonido en la leche, produciendo nuevos complejos caseína – grasa y dando a la leche mejores características fisicoquímicas, así como también a la incorporación de proteínas de suero a la superficie de las micelas de caseína. Además de la adición de las proteínas de suero, los GG, al estar mejor integrados en la matriz, pueden obstruir parcialmente la red proteica, lo cual reduce la pérdida de suero a través de los poros y evita que la matriz se contraiga (Bermúdez–Aguirre y Barbosa–Cánovas, 2010; Gallegos Pineda, 2015).

### 3.13 EVALUACIÓN DE pH Y COMPOSICIÓN EN QUESO

Los resultados de la evaluación de pH en los quesos elaborados se muestran en la Tabla 3.13. En esta Tabla es posible apreciar los efectos significativos (P < 0.05) en cuanto al día de almacenamiento de los quesos evaluados. Los resultados muestran para cada tratamiento una disminución progresiva del pH en función al día de evaluación del queso,

observándose que al día 1 de almacenamiento a pesar de no haber diferencia significativa entre los tipos de tratamiento, los quesos TS tuvieron valores de pH menores en comparación al tratamiento control (HTST). Sin embargo, los valores de los tres tratamientos se encuentran dentro del parámetro habitual alcanzado en queso tipo Panela que va de 5.6 a 6.4 (Ramírez – López y Vélez – Ruiz, 2012). Posteriormente, al determinar el pH al día 7 y al día 14, se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) del pH para los tres tratamientos analizados. Asimismo, en el día 7 los tratamientos TS disminuyeron el pH en un 11.2 % en comparación al día 1 mientras que el tratamiento HTST disminuyó el pH en un 16.6 % el mismo día. Por otra parte, en el día 14 de almacenamiento los tres tratamientos alcanzaron un valor de pH promedio de 5.03.

En la fabricación tradicional de queso, el ácido producido por los microorganismos presentes en la leche cruda disminuye el pH de la leche a un nivel suficiente para promover su posterior coagulación. Sin embargo, si la leche se somete a un tratamiento térmico, cultivos selectos de bacterias ácido – lácticas deben ser añadidos. El tipo de bacterias añadidas depende del tipo de queso y del protocolo de fabricación utilizado. En la elaboración del queso tipo Panela no es necesaria la utilización de cultivos; por tanto, el pH del sistema debería permanecer cercano al valor inicial, siendo su reducción producto del crecimiento microbiano normal de estos productos (Gunasekaran y Mehmet, 2003; Huppertz y Kelly, 2009). No obstante, cabe mencionar que durante el almacenamiento de los quesos la temperatura del refrigerador no fue constantemente baja (4 °C), por lo que los cambios en pH se atribuyen en gran parte a dicha variación. Asimismo, Bermúdez–Aguirre y Barbosa–Cánovas (2010) al evaluar 7 sistemas diferentes (1 sin tratamiento aplicado y 6 tratados a 63 °C/30 min; 63 °C/10 min + sonicación; 63 °C/30 min + sonicación; 72 °C/15 s; 72 °C/15 s + sonicación y 72 °C / 1 min + sonicación) (400 W, 24 kHz) sobre la elaboración de *queso fresco* mencionan que el cambio en el pH fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) disminuyendo en todos los sistemas evaluados como consecuencia del tratamiento aplicado; sin embargo, esta disminución permaneció casi constante al final de los 23 días de almacenamiento.

**Tabla 3.14** Valores promedio obtenidos de la evaluación de pH en quesos tipo Panela bajo tratamientos de pasteurización y TS durante su almacenamiento por 14 días\*\*.

| Tratamiento* <sup>1</sup> | pH                        |                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                           | Día 1                     | Día 7                     | Día 14                    |
| HTST                      | 6.30 ± 0.04 <sup>Aa</sup> | 5.25 ± 0.12 <sup>Bb</sup> | 5.06 ± 0.06 <sup>Ac</sup> |
| US 10 min a 45 °C + HTST  | 6.23 ± 0.00 <sup>Aa</sup> | 5.51 ± 0.04 <sup>Ab</sup> | 5.05 ± 0.06 <sup>Ac</sup> |
| US 10 min a 65 °C + HTST  | 6.26 ± 0.00 <sup>Aa</sup> | 5.51 ± 0.09 <sup>Ab</sup> | 4.98 ± 0.07 <sup>Ac</sup> |

1) Pasteurización (HTST) (72 °C, 15s); 2) TS a 100% Amplitud 24 kHz 400 W. \*\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar. Las letras mayúsculas superíndices diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05). Las letras minúsculas superíndices diferentes en una misma fila representan diferencia significativa (P < 0.05); n= 3 réplicas.

Por otro lado, en la Tabla 3.15 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la composición de quesos Panela. En este caso, se mostraron diferencias significativas (P < 0.05) con respecto al tipo de tratamiento aplicado tanto como al contenido de cloruros y de proteína, observándose variaciones mínimas entre los resultados obtenidos.

En el caso del salado, además de proporcionar sabor al producto, evita la proliferación de microorganismos y contribuye a la formación de la corteza del queso. En el proceso, se utiliza sal cristalizada o salmueras de diferentes concentraciones, de acuerdo con el tipo de queso (Ramírez – López *et al.*, 2012). Asimismo, los quesos TS obtuvieron los valores más altos de contenido de cloruros en comparación al queso elaborado con leche tratada térmicamente (HTST). Resultados similares fueron obtenidos por Pérez Mata (2014) y Gallegos Pineda (2015) al incrementarse un poco el contenido de cloruros en los quesos elaborados con leche TS (Tratamientos a 400 W, 24kHz, a 50 % de amplitud por 18 min y 100 % de amplitud por 12 min).

**Tabla 3.15** Porcentaje de proteína y cloruro de sodio en los queso Tipo Panela bajo tratamientos selectos de TS\*\*.

| Tratamiento* <sup>1</sup> | Cloruro de sodio (g / 100 g queso) | Proteína (g / 100 g queso) |
|---------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| HTST                      | 2.35 ± 0.05 <sup>B</sup>           | 19.88 ± 0.01 <sup>B</sup>  |
| US 10 min a 45 °C + HTST  | 2.46 ± 0.05 <sup>AB</sup>          | 22.00 ± 0.37 <sup>A</sup>  |
| US 10 min a 65 °C + HTST  | 2.55 ± 0.04 <sup>A</sup>           | 22.12 ± 0.46 <sup>A</sup>  |

\*Los tratamientos efectuados: 1) Control pasteurización (HTST) (72 °C, 15 s); 2) 100% Amplitud por 10 min a 45 °C + HTST y 3) 100% Amplitud por 10 min a 65 °C + HTST.

<sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia al 100%. \*\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar.

Las letras superíndices diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05); n= 2 réplicas.

Por otra parte, se puede observar un incremento en el contenido de proteína de los tratamientos TS a 45 °C y 65 °C de un 10.66 % y 11.26 %, respectivamente, en comparación queso elaborado con leche tratada térmicamente. De acuerdo a la evaluación previa realizada sobre el porcentaje de proteína desnaturizada de  $\beta$ -LG en leche por HPLC puede asumirse que los tratamientos de TS pueden causar la desnaturización de las proteínas de suero y parte de esta proteína desnaturizada puede estar integrada en la cuaja del queso, lo cual incrementa el contenido de proteína. Resultados similares fueron los obtenidos por Almanza-Rubio *et al.* (2016), quienes mencionaron que en la elaboración de quesos crema con leche sonicada (0–100 W, 4–63 °C y 0–30 min), el contenido de proteína en los quesos crema no cambió significativamente por el pre-tratamiento de la leche con TS. Asimismo, resultados semejantes fueron los obtenidos por Pérez Mata (2014) (50 % de amplitud por 18 min y 100 % de amplitud por 12 min, 24 kHz), quien menciona que este aumento en el contenido proteico puede ser consecuencia de la nueva red estructural de la cuajada producto de los fenómenos que se llevan a cabo con el US, lo cual permite una mayor retención de las proteínas séricas en la masa de queso. Lo anterior se demostró al evaluar el rendimiento, la composición del suero y el contenido de proteína en los diferentes quesos elaborados.

### 3.14 HUMEDAD

En la Tabla 3.14 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de humedad en quesos panela elaborados con leche sometida a tratamiento térmico y de TS. Los tratamientos aplicados resultaron ser significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) en cuanto al tiempo de almacenamiento de los quesos. Por otra parte, entre los resultados obtenidos en el día de almacenamiento y tipo de tratamiento aplicado no se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Es posible observar que, al contrario de lo obtenido en la evaluación de humedad en la Etapa I y en las pruebas preliminares de CRA, donde se observó un efecto positivo sobre retención de agua, la humedad de los tratamientos TS es similar a los valores obtenidos en el tratamiento control (HTST) en cada día de evaluación, y al mismo tiempo, se aprecia una disminución progresiva de este parámetro en función del tiempo de almacenamiento de los quesos.

Bermúdez–Aguirre y Barbosa–Cánovas (2010) resaltan que los quesos frescos elaborados con leche sonicada muestran un contenido de humedad mayor en comparación al queso elaborado con leche tratada térmicamente. Asimismo, mencionan que conforme el tiempo de sonicación aumentó, también se incrementó el contenido de humedad. En este sentido, los autores sugieren una posible reorganización de las moléculas dentro del queso facilitando una mayor retención de agua. Asimismo, también puede deberse a la incorporación de proteínas de suero de leche en la superficie de las micelas de caseína, las cuales pueden incorporar una mayor cantidad de agua en la matriz formada. Por su parte, Monsalve *et al.* (2010), al aplicar en bloques de queso blanco tratamientos de TS de menor potencia y con temperaturas más bajas que los del presente trabajo (50 kHz y 75 W; 5 °C, 10 °C y 22 °C; 5, 10 y 15 min), señalaron que se ve disminuido el desuerado durante el almacenamiento, suponiéndose así una mejora en la retención de agua, que conlleva a un contenido de humedad representativamente alto en comparación a su muestra control (HTST).

**Tabla 3.16** Valores promedio obtenidos de la evaluación del porcentaje de humedad en quesos tipo Panela sujetos a tratamiento de pasteurización y TS durante su almacenamiento por 14 días\*\*.

| Tratamiento*             | Humedad                    |                            |                            |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                          | Día 1                      | Día 7                      | Día 14                     |
| HTST                     | 68.01 ± 0.08 <sup>Aa</sup> | 60.69 ± 0.49 <sup>Ab</sup> | 57.67 ± 0.34 <sup>Ab</sup> |
| US 10 min a 45 °C + HTST | 66.70 ± 1.28 <sup>Aa</sup> | 60.08 ± 0.73 <sup>Aa</sup> | 56.35 ± 0.13 <sup>Aa</sup> |
| US 10 min a 65 °C + HTST | 67.32 ± 0.54 <sup>Aa</sup> | 61.26 ± 2.19 <sup>Ab</sup> | 57.09 ± 1.59 <sup>Ab</sup> |

\*Tratamientos efectuados: 1) Control pasteurización (HTST) (72 °C, 15s); 2) 400 W por 10 min a 45 °C y 3) 400 W por 10 min a 65 °C.

\*\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar.

Las letras mayúsculas superíndices diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05). Las letras minúsculas superíndices diferentes en una misma fila representan diferencia significativa (P < 0.05); n= 3 réplicas.

Asimismo, Almanza–Rubio *et al.* (2016) al elaborar queso crema con leche sonicada a distintas combinaciones de potencia ultrasónica (0 – 100 W), temperatura (4 – 63 °C) y tiempo (0 – 30 min), señalaron que el contenido de humedad fue incrementado significativamente de un 55 % a un 60 % en los quesos elaborados con leche termosonicada, observando también que sólo la temperatura a la cual se llevó a cabo el tratamiento de termosonicación tuvo un efecto significativos (P = 0.0104) en la CRA de los quesos crema. Los autores comentan que este comportamiento puede deberse a que cuando se eleva la temperatura de la leche, las proteínas de suero desnaturalizadas se asocian con las  $\kappa$ -caseínas. Además, la unión de  $\beta$  – LG y  $\alpha$  – LA (en menor grado) con las micelas de caseína incrementa la CRA de la matriz proteica y por consiguiente el contenido de humedad del queso.

### 3.15 COLOR

Los resultados obtenidos del análisis de color en los quesos elaborados se muestran en la Tabla 3.15. Los valores obtenidos mostraron cambios sin efectos significativos (P < 0.05) en cuanto al tiempo de almacenamiento. En este caso, se puede observar al día 1 de

almacenamiento valores altos de luminosidad en los quesos elaborados con leche TS, alcanzando valores más altos los quesos tratados térmicamente (HTST). Asimismo, se puede observar una disminución mínima y progresiva de dicho parámetro en relación al día de almacenamiento de los quesos. Datos similares a los obtenidos en este trabajo fueron los obtenidos por Bermúdez – Aguirre *et al.* (2008); Bermúdez – Aguirre y Barbosa – Cánovas, 2010 y Gallegos Pineda, 2015. En este caso, se menciona que el color más blanco de la leche observado a simple vista en las muestras después de la TS se corroboró con valores más altos de  $L^*$ , lo que significa una mayor luminosidad de la muestra. Estos valores podrían estar relacionados con el proceso de homogeneización observado en las muestras por medio de la sonicación, obteniéndose GG más pequeños a causa de la cavitación, lo cual genera una muestra que refleja mejor la luz. La homogeneización por cavitación podría ser lograda por eliminación o destrucción de grumos de grasa de tamaño más pequeño que algunas veces están presentes en leche cruda (Bermúdez – Aguirre *et al.*, 2008). Por consiguiente, los cambios en la luminosidad de la leche TS se ven reflejados en los quesos elaborados con esa leche, obteniéndose un queso con apariencia más blanca. Asimismo, Gallegos Pineda (2015) sugiere que el aumento de la luminosidad, está relacionado con la disminución del tamaño del GG por efecto de cavitación y a que los glóbulos de grasa más pequeños disminuyen la profundidad de penetración de la luz incidente, en comparación con los quesos elaborados con leche en la cual la grasa no ha sido homogeneizada. Por otra parte, en todos los quesos los valores del parámetro  $a^*$  disminuyeron conforme el tiempo de almacenamiento, con una tendencia hacia los colores rojizos. Asimismo, los valores del parámetro  $b^*$  mostraron el mismo comportamiento, observándose una tendencia hacia una tonalidad amarilla. Bermúdez – Aguirre y Barbosa – Cánovas, 2010 mencionan que el valor  $a^*$  en *queso fresco* se mantuvo constante para algunos de los tratamientos aplicados (tratamientos térmicos con y sin US) con variaciones mínimas durante el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, en el resto de las muestras que no mostraron este comportamiento, hubo un aumento de dicho parámetro durante el tiempo de almacenamiento tendiendo hacia la tonalidad rojiza, la cual es observada también en el presente trabajo. Los autores concluyen que este cambio

en el color es atribuido a crecimiento microbiano observado en la superficie de esos quesos. En cuanto al parámetro  $b^*$ , se observó que este valor se mantuvo constante en la mayoría de los tratamientos, mostrando una importante tendencia hacia la región amarilla. Por su parte, Gallegos Pineda (2015) también observó que todos los quesos evaluados tendieron hacia tonalidades rojizas y amarillas durante el almacenamiento, atribuyendo que, el color de los quesos y los cambios durante su almacenamiento dependieron de factores como la presencia de carotenoides, proteínas de membrana y cambios en la hidratación de la proteína, que afectaron la cantidad de agua libre y con ello las propiedades de dispersión de la luz del queso.

El parámetro  $h$  permite definir un estímulo de color de acuerdo a la siguiente clasificación: rojizo ( $0^\circ$ ), amarillento ( $90^\circ$ ), verdoso ( $180^\circ$ ) y azulado ( $270^\circ$ ) (Gallegos Pineda, 2015). Con base en esto, se puede decir que los quesos mostraron gran tendencia a la tonalidad amarilla ya que los valores se encuentran en el rango de  $84 - 87^\circ$ . Asimismo, dichos valores se incrementaron con el almacenamiento denotando un incremento en la tonalidad sin observarse diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Por otra parte, el índice de saturación de color  $C^*$  mostró un incremento con respecto al tiempo de almacenamiento en todos los tratamientos evaluados, sin observarse diferencias significativas entre ellos ( $P < 0.05$ ).

### **3.16 ANÁLISIS DE PERFIL DE TEXTURA**

Para el consumidor, la textura juega un rol importante en términos de inferir la calidad de un alimento. Particularmente en el queso, la textura es uno de los atributos más importantes que ayudan a determinar la identidad del mismo (Ramírez – López y Vélez – Ruiz, 2012). Los resultados obtenidos del análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés) realizado a los quesos elaborados con leche pasteurizada y TS se muestran en la Tabla 3.16. Los valores obtenidos mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en relación al tiempo de almacenamiento y al tipo de tratamiento aplicado. En esta Tabla se

puede observar un incremento progresivo en cuanto a la dureza de los quesos con respecto al tiempo de almacenamiento, observándose al día 1 de almacenamiento que el tratamiento de TS a 45 °C y 10 min mostró mayor firmeza en comparación al tratamiento control (HTST) y al tratamiento de TS a 65 °C por 10 min. Al evaluar la firmeza al día 7 de almacenamiento se notó un aumento de este parámetro en los tres quesos al igual que al día 14 de almacenamiento. No obstante, la dureza durante los días 7 y 14 de evaluación resultó ser mayor en el tratamiento térmico (HTST) en comparación a los TS. En cuanto a la cohesividad, en relación al tiempo de almacenamiento, se observó un incremento casi constante del queso sometido al tratamiento de pasteurización (HTST) y un ligero aumento en la cohesividad de los quesos TS, siendo el tratamiento a 65 °C, el queso que mostró los valores más altos de este parámetro al día 7 y 14 de almacenamiento. La elasticidad del queso pasteurizado fue mayor en comparación a los quesos TS al evaluarse al día 1 de almacenamiento. Posteriormente, su valor disminuyó y se mantuvo constante al día 7 y 14 de almacenamiento. Por su parte, los tratamientos TS mostraron un comportamiento inflexivo de la elasticidad durante el tiempo de almacenamiento, observándose un incremento de este parámetro al día 7 de almacenamiento y posteriormente una disminución al día 14 de almacenamiento. Los datos de gomosidad y masticabilidad muestran un incremento continuo en función al día de almacenamiento de los quesos TS a 45 °C, siendo este tratamiento el que obtuvo al día 1 de almacenamiento los valores mayores en ambos parámetros. En cuanto a la gomosidad y masticabilidad del tratamiento TS a 65 °C, se observó un comportamiento similar al observado en la elasticidad. En este sentido, Bermúdez – Aguirre y Barbosa – Cánovas (2010), elaboró *queso fresco* con leche termosonicada (400 W, 24 kHz, 120  $\mu$ m), mencionando que los resultados de la evaluación de TPA mostraron que los quesos elaborados con leche sonicada tuvieron menor dureza que los quesos elaborados con leche tratada térmicamente o sin tratamiento aplicado, siendo similar a los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, durante los días 7 y 14 de almacenamiento. Asimismo, observaron que los quesos tratados con ultrasonido por tiempos de procesamiento más cortos mostraron valores de elasticidad más altos que los no tratados o tratados

térmicamente. En cuanto a la gomosidad y masticabilidad, mencionan que ambos parámetros se redujeron con la sonicación, obteniéndose los valores más bajos con los tiempos de sonicación más largos (30 min), siendo este un resultado similar al observado en el presente trabajo, pero al emplear una temperatura mayor en el tratamiento (de 45 a 65 °C).

Se sabe que el mayor constituyente para la formación de la estructura en el queso es la matriz de caseína en la que se atrapan GG. Asimismo, agua o suero son a su vez unidos a la caseína y llenan hendiduras de la matriz. Esta red estructural se ve afectada críticamente por el contenido relativo de proteína, grasa y agua, así como por las actividades bioquímicas que se producen casi continuamente durante el almacenamiento. Igualmente, durante la elaboración del queso, hay varios factores que pueden contribuir a la textura del queso, y que afectan el contenido de humedad de la cuajada (temperatura de cocción, tamaño del corte, tiempo de agitación, entre otros), acidez y pH. Por ejemplo, temperaturas altas en la cocción de la cuajada dejan una cuajada elástica y por consiguiente generan un queso gomoso. pH bajos en la leche en el momento de la adición de enzimas resulta en un queso duro o muy firme. Además, la baja acidez debilita los enlaces proteicos a través de cargas de repulsión provocando que el queso sea gomoso, mientras las cargas negativas en las moléculas de caseínas incrementan con el pH y las interacciones hidrofóbicas, importantes para una estructura estable de la matriz de caseína, son debilitadas por la adsorción de agua de las proteínas para disolver las cargas iónicas. Por otro lado, con valores altos de pH en el queso provoca la absorción de agua por las proteínas y limita la cantidad de agua en las hendiduras de la matriz (Gunasekaran y Ak, 2003).

**Tabla 3.17** Color en quesos Tipo Panela bajo tratamientos selectos de TS durante su almacenamiento por 14 días\*\*.

| Parámetro | Tratamiento* <sup>1</sup> | Color                      |                            |                            |
|-----------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|           |                           | Día 1                      | Día 7                      | Día 14                     |
| L*        | HTST                      | 92.57 ± 0.26 <sup>Aa</sup> | 91.16 ± 0.07 <sup>Aa</sup> | 90.15 ± 0.36 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 45 °C + HTST  | 92.17 ± 0.15 <sup>Aa</sup> | 91.17 ± 0.06 <sup>Aa</sup> | 91.18 ± 0.60 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 65 °C + HTST  | 92.41 ± 0.33 <sup>Aa</sup> | 91.18 ± 0.04 <sup>Aa</sup> | 90.91 ± 0.84 <sup>Aa</sup> |
| a*        | HTST                      | -1.07 ± 0.12 <sup>Aa</sup> | -0.69 ± 0.00 <sup>Aa</sup> | -0.59 ± 0.11 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 45 °C + HTST  | -0.97 ± 0.02 <sup>Aa</sup> | -0.50 ± 0.00 <sup>Aa</sup> | -0.50 ± 0.07 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 65 °C + HTST  | -1.04 ± 0.13 <sup>Aa</sup> | -0.50 ± 0.27 <sup>Aa</sup> | -0.39 ± 0.21 <sup>Aa</sup> |
| b*        | HTST                      | 11.26 ± 0.27 <sup>Aa</sup> | 11.57 ± 0.58 <sup>Aa</sup> | 13.00 ± 0.14 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 45 °C + HTST  | 11.45 ± 0.16 <sup>Aa</sup> | 11.90 ± 0.34 <sup>Aa</sup> | 13.32 ± 0.79 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 65 °C + HTST  | 11.14 ± 0.19 <sup>Ab</sup> | 11.20 ± 0.48 <sup>Ab</sup> | 12.86 ± 0.19 <sup>Aa</sup> |
| c*        | HTST                      | 11.32 ± 0.26 <sup>Aa</sup> | 11.59 ± 0.58 <sup>Aa</sup> | 13.01 ± 0.15 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 45 °C + HTST  | 11.51 ± 0.16 <sup>Aa</sup> | 11.93 ± 0.33 <sup>Aa</sup> | 13.35 ± 0.78 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 65 °C + HTST  | 11.20 ± 0.21 <sup>Ab</sup> | 11.22 ± 0.50 <sup>Ab</sup> | 12.89 ± 0.21 <sup>Aa</sup> |
| H         | HTST                      | 84.53 ± 0.74 <sup>Aa</sup> | 86.54 ± 0.17 <sup>Aa</sup> | 87.33 ± 0.53 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 45 °C + HTST  | 84.84 ± 0.09 <sup>Aa</sup> | 86.10 ± 0.26 <sup>Aa</sup> | 85.65 ± 0.60 <sup>Aa</sup> |
|           | US 10 min a 65 °C + HTST  | 84.67 ± 0.61 <sup>Aa</sup> | 87.18 ± 1.66 <sup>Aa</sup> | 86.88 ± 1.49 <sup>Aa</sup> |

\*Tratamientos efectuados: 1) Control pasteurización (HTST) (72 °C, 15s); 2) 100% Amplitud por 10 min a 45 °C y 3) 100% Amplitud por 10 min a 65 °C.

\*\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar. <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia.

Las letras mayúsculas superíndices diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05). Las letras minúsculas superíndices diferentes en una misma fila representan diferencia significativa (P < 0.05); n= 3 réplicas.

**Tabla 3.18** Textura en queso Tipo Panela bajo tratamientos selectos de TS durante su almacenamiento en refrigeración por 14 días\*\*.

| Textura                   |                             |                             |                             |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| DUREZA (kg fuerza)        |                             |                             |                             |
| Tratamiento* <sup>1</sup> | Día 1                       | Día 7                       | Día 14                      |
| 1                         | 0.674 ± 0.01 <sup>Bb</sup>  | 2.027 ± 0.02 <sup>Aa</sup>  | 1.753 ± 0.44 <sup>Aa</sup>  |
| 2                         | 0.959 ± 0.04 <sup>Ac</sup>  | 1.688 ± 0.04 <sup>Aa</sup>  | 1.410 ± 0.05 <sup>Ab</sup>  |
| 3                         | 0.484 ± 0.06 <sup>Cb</sup>  | 1.988 ± 0.18 <sup>Aa</sup>  | 1.005 ± 0.17 <sup>Ab</sup>  |
| COHESIVIDAD               |                             |                             |                             |
| Tratamiento               | Día 1                       | Día 7                       | Día 14                      |
| 1                         | 0.475 ± 0.03 <sup>Aa</sup>  | 0.538 ± 0.00 <sup>Aa</sup>  | 0.515 ± 0.02 <sup>Aa</sup>  |
| 2                         | 0.529 ± 0.02 <sup>Aa</sup>  | 0.534 ± 0.04 <sup>Aa</sup>  | 0.648 ± 0.11 <sup>Aa</sup>  |
| 3                         | 0.463 ± 0.06 <sup>Aa</sup>  | 0.582 ± 0.04 <sup>Ab</sup>  | 0.662 ± 0.03 <sup>Ac</sup>  |
| ELASTICIDAD               |                             |                             |                             |
| Tratamiento               | Día 1                       | Día 7                       | Día 14                      |
| 1                         | 0.903 ± 0.00 <sup>Aa</sup>  | 0.878 ± 0.01 <sup>Aa</sup>  | 0.878 ± 0.01 <sup>Aa</sup>  |
| 2                         | 0.852 ± 0.00 <sup>Ba</sup>  | 0.887 ± 0.01 <sup>Aa</sup>  | 0.869 ± 0.02 <sup>Aa</sup>  |
| 3                         | 0.874 ± 0.01 <sup>Aba</sup> | 0.878 ± 0.00 <sup>Aa</sup>  | 0.859 ± 0.00 <sup>Aa</sup>  |
| GOMOSIDAD                 |                             |                             |                             |
| Tratamiento               | Día 1                       | Día 7                       | Día 14                      |
| 1                         | 0.340 ± 0.06 <sup>ABb</sup> | 1.207 ± 0.03 <sup>Aab</sup> | 1.995 ± 0.59 <sup>Aa</sup>  |
| 2                         | 0.509 ± 0.01 <sup>Ab</sup>  | 0.901 ± 0.05 <sup>Aab</sup> | 1.239 ± 0.26 <sup>Aa</sup>  |
| 3                         | 0.236 ± 0.07 <sup>Ba</sup>  | 1.171 ± 0.13 <sup>Aa</sup>  | 1.004 ± 0.37 <sup>Aa</sup>  |
| MASTICABILIDAD            |                             |                             |                             |
| Tratamiento               | Día 1                       | Día 7                       | Día 14                      |
| 1                         | 0.298 ± 0.04 <sup>Aba</sup> | 1.047 ± 0.03 <sup>Aa</sup>  | 1.011 ± 0.49 <sup>Aa</sup>  |
| 2                         | 0.434 ± 0.01 <sup>Ab</sup>  | 0.795 ± 0.05 <sup>Aab</sup> | 1.081 ± 0.25 <sup>Aa</sup>  |
| 3                         | 0.204 ± 0.05 <sup>Bb</sup>  | 1.026 ± 0.12 <sup>Aa</sup>  | 0.866 ± 0.31 <sup>Aab</sup> |

\*Los tratamientos efectuados: 1) Control pasteurización (HTST) (72 °C, 15 s); 2) 100 % Amplitud por 10 min a 45 °C + HTST y 3) 100 % Amplitud por 10 min a 65 °C + HTST. \*\*Los valores reportados son las medias ± desviación estándar. <sup>1</sup>Tratamiento TS: 24 kHz con 400 W de potencia. Las letras superíndices mayúsculas diferentes en una misma columna representan diferencia significativa (P < 0.05). Las letras superíndices minúsculas diferentes en una misma fila representan diferencia significativa (P < 0.05); n= 2 réplicas.

De lo mencionado anteriormente, podemos atribuir que la textura de los quesos TS se vio afectada por la disminución de tamaño del GG de la leche, el efecto de la homogeneización de los GG de la leche provocada por y por el contenido de humedad del queso. En este caso, la microestructura de un queso bajo en grasa tiene una matriz de proteína más compacto con espacios menos abiertos, los que habrían sido ocupados de

otra manera por GG, lo cual se asocia con una textura dura incluso cuando el contenido de humedad es alto. Asimismo, mayor contenido de grasa y agua tiende a debilitar la estructura de la proteína y viceversa. Igualmente, las interacciones hidrofóbicas que mantienen la matriz de caseína se debilitan por la absorción de agua de las proteínas para solvatar las cargas iónicas. Los quesos con alto contenido de humedad tienden a ser menos firmes debido a que las submicelas de CN se hinchan al incrementar la proporción de caseína-humedad (Gunasekaran y AK, 2003; Bermúdez-Aguirre *et al*, 2008, Gallegos Pineda, 2015).

Por otra parte, Bermúdez – Aguirre *et al*. (2010) observaron que, al elaborar *queso fresco* con leche sonicada, el contenido de humedad de los quesos era más alto comparándolo con el queso hecho con leche tratada térmicamente lo cual modificó la textura de los quesos. Igualmente, mencionan que a medida que aumentaba el tiempo de sonicación, el contenido de humedad también aumentaba, lo que no sólo sugiere una posible reorganización de las moléculas dentro del queso al retener más agua, sino también por la posible incorporación de proteínas de suero con la superficie de las micelas de caseína, lo cual se ha observado en el queso elaborado a partir de leche tratada térmicamente.

El comportamiento provocado por el US en leche es semejante al comportamiento observado al aplicar alta presión. En este sentido, Pandey *et al*. (2000), reportaron que a mayores intensidades del tratamiento se producía una disminución de la firmeza de los geles lácteos debido al aumento en la capacidad de hidratación de la red tridimensional. Los tratamientos a alta presión se asemejan a los de TS debido a que producen efectos físicos parecidos en las matrices sobre las que actúan (por efectos de cizalla, cavitación, etc.) y producen efectos similares en leche, incluyendo incorporación de proteínas de suero y agua a la cuajada, así como cambios en las interacciones entre GG y CN, los cuales en conjunto generan una estructura proteica menos micelas de CN disponibles, generando una estructura del gel más abierta y porosa y por lo tanto una estructura proteica débil (Zamora et al., 2007)

## IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar los efectos del tratamiento de TS de leche bovina descremada sobre la desnaturalización de proteínas séricas y su aplicación en queso tipo Panela, para lo cual el proyecto se clasificó en tres etapas diferentes.

Al evaluar el grado de desnaturalización de proteínas de suero por técnicas de cromatografía se observó que el método utilizado generaba resultados reproducibles; asimismo, todos los tratamientos TS aplicados exhibieron menores cantidades de  $\beta$ -LG nativa que sus contrapartes tratadas sólo térmicamente. Por otro lado, la influencia de tiempos más largos de proceso ultrasónico a 65 °C, incrementando el tiempo de sonicación a 20 y 30 min, reveló una pérdida significativamente mayor de  $\beta$ -LG nativa. La cantidad de proteína residual que se observa en los tratamientos de TS aplicados se debe a que, dentro de las proteínas globulares, las proteínas de suero se ven afectadas por el US en mayor medida. Por otra parte, la posibilidad de desnaturalización de las proteínas del suero se ve sujeta a la influencia significativamente alta de grandes fuerzas de cizalla, debidas a la cavitación acústica. También se pudo observar que las muestras TS mostraron mejor CRA, obteniéndose un menor tiempo de coagulación y una mayor firmeza de gel, como consecuencia de la modificación en el tamaño de membrana de GG, así como a modificaciones en la capacidad de las proteínas para retener agua dentro de la estructura.

Al evaluar los cambios durante la manufactura y el almacenamiento de queso tipo *Panela* elaborado con leche descremada TS fue posible notar un incremento en el rendimiento de los quesos elaborados con leche TS (aumento del 14 % y 21 % en tratamientos TS a 45 °C y 65 °C, respectivamente). Por otra parte, a pesar del fallo inesperado en el sistema de refrigeración durante el almacenamiento de los quesos, se mostró una disminución progresiva de pH en todos los quesos elaborados. De igual manera, se observaron incrementos en el porcentaje de humedad y luminosidad, así como en contenido de

cloruros y proteína, los cuales pueden ser atribuidos a cambios en las interacciones entre micelas de caseína, proteínas de suero y la MGG.

Cabe mencionar que se requiere realizar más pruebas que ayuden a verificar los parámetros de tratamiento que modifican las propiedades del queso elaborado con leche TS, dichas pruebas sugeridas pueden ser la evaluación de la sinéresis en quesos TS durante su almacenamiento, evaluar la composición de suero expelido, pruebas de electroforesis, adicionar la evaluación de la estructura de queso elaborado con leche sometida a TS por medio de microscopía electrónica de barrido y evaluación sensorial. Asimismo, se recomienda que se verifiquen constantemente y de manera rutinaria los instrumentos y material que se utiliza en el laboratorio para la manufactura y el almacenamiento de los quesos para que así tengan una menor variación en los resultados de los parámetros a evaluar en las pruebas que se les realice al producto terminado.

## V. REFERENCIAS

Almanza–Rubio, J.L., Gutiérrez–Méndez, N., Leal–Ramos, M.Y., Sepulveda, D., Salmeron, I. (2016). Modification of the textural and rheological properties of cream cheese using thermosonicated milk. *Journal of Food Engineering*, 168, 223 – 230.

Ashokkumar, M., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., Lee, J., Palmer, M., Zisu, B. (2010). The ultrasonic processing of dairy products – An overview. *Dairy Science and Technology*, 90, 147 – 168.

Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación.

Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G.V. (2010). Processing of soft Hispanic cheese (“*Queso Fresco*”) using thermo-sonicated milk: A study of physicochemical characteristics and storage life. *Journal of Food Science*, 75 (9), S548 – S558.

Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., Barbosa-Cánovas, G.V. (2008) Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. *Journal of Food Science*, 73(7), E325 – E332.

Bertocchi, L., Vitali, A., Lacetera, N., Nardone, A., Varisco, G., Bernabucci, U. (2014). Seasonal variations in the composition of Holstein cow’s milk and temperature–humidity index relationship. *Animal*, 8(4), 667–674.

Brew, K. (2011)  $\alpha$  – Lactalbumin. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2da. ed., pp. 780 – 786). Reino Unido: Elsevier.

Caro, I., Soto, S., Franco, M. J., Meza-Nieto, M., Alfaro-Rodríguez, R. H., Mateo, J. (2011) Composition, yield and functionality of reduced-fat Oaxaca cheese: effects of using skim milk or a dry milk protein concentrate. *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 94(2), 580 – 588.

Chandrapala, J., Martin, G. J. O., Zisu, B., Kentish, S. E., Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on casein micelle integrity. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6882 – 6890.

Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813–835.

Chobert, J. M. (2012). Milk protein tailoring to improve functional and biological properties. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 1(3), 171-197.

Chouliara, E., Georgogianni, K.G., Kanellopoulou, N., Kontominas, M.G. (2010). Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of raw, thermized and pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 20, 307–313.

Corredig, M., Dalgleish, D. G. (1998). Effect of heating of cream on the properties of milk fat globule membrane isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2533 – 2540.

Creamer, L. K., Loveday, S. M., Sawyer, L. (2011)  $\beta$  – Lactoglobulin. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2da. ed., pp. 787 – 794). Reino Unido: Elsevier.

Dalgleish, D. G. (1999). The enzymatic coagulation of milk. En P. F. Fox (Ed.) *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 1). E.U. A., Aspen Publishers.

Damodaran, S., Parkin, K. L., Fennema, O. R. (Eds.). (2008). Fennema's Food Chemistry. (4th ed.). USA: CRC Press.

Dolatowski, Z. J., Stadnik, J., Stasiak, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 89–99.

Dupont, D., Grappin, R., Pochet, S., Lefier, D. (2011) Milk Proteins. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2da. ed., pp. 741 – 750). Reino Unido: Elsevier.

Eck, A. (2000) What is a cheese?. En A. Eck y J. C. Gilis (Eds.) *Cheesemaking: From Science to Quality Assurance* (pp. 661 – 662). Lavoisier Publishing.

Edwards, P. B., Creamer L. K., Jameson, G. B. (2009) Structure and Stability of Whey Proteins. En A. Thompson, M. Boland y H. Singh (Eds.) *Milk Proteins: From Expression to Food*. (2da. ed., pp. 772 – 779). USA: Elsevier.

Ertugay, M.F., Sengul, M., Sengul, M. (2004). Effect of ultrasound treatment on milk homogenization and particle size distribution of fat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28, 303 – 308.

Evert, K. (2013). Effect of high pressure processing (HPP) on starter-free fresh cheese shelf-life. (Tesis doctoral no publicada). Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).

FAO/OMS. (2008). Leche y productos lácteos. 2da edición. Norma General del Codex para el queso. Codex Stan 283–1978. Revisión 1999, Enmienda 2006.

Fellows, P. (2000). Food Processing Technology – Principles and Practice. (2da ed.) Cambridge: Woodhead Publishing.

Feng, H., Barbosa – Cánovas, G. V., y Weiss, J. (Eds.). (2011). Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing. USA: Springer

Fox, F. P., McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. Food Reviews International, 12, 457 – 509.

Fox, P. F. (2009) Milk: An overview. En A. Thompson, M. Boland y H. Singh (Eds.) Milk Proteins: From Expression to Food. (2da. ed., pp. 1 – 54). USA: Elsevier.

Fox, P. F., Guinne, T. P., Timothy, M. C., McSweeney P. L. H. (2000). Fundamentals of cheese science. E.U.A., Aspen Publishers.

Fox, P. F., McSweeney, P.L.H. (1998). Dairy Chemistry and Biochemistry. Cork, Ireland: Blackie Academic & Professional.

Fox, P.F. (2011). Milk. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.) Encyclopedia of Dairy Sciences (2da. ed., pag. 458–466). Reino Unido: Elsevier.

Gallegos P., A. B. (2015). Efectos del pretratamiento de termosonicación en la elaboración y maduración de queso chihuahua. (Tesis de maestría no publicada). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Gaucheron, F. (2011) Milk salts. Distribution and Analysis. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.) Encyclopedia of Dairy Sciences (2da. ed., pp. 649–654). Reino Unido: Elsevier.

Goff, H. D., Hill, A. R. (1993) Chemistry and Physics. En Y. H. Hui (Ed.), Dairy Science and Technology Handbook. (Vol. 1, pp. 1 – 62). USA: Wiley-VCH.

Gunasekaran, S., Mehmet AK, M. (2003). Cheese Rheology and Texture. EUA: CRC Press.

Gutiérrez-Méndez, N., Chávez-Garay, D. R., Jiménez-Campos, H. (2012). Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. Cavanilles. *Journal of Food Science*, 71(1), C89 – C94.

Horne, D. S. (2011) Casein, Micellar Structure. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2da. ed., pp. 772 – 779). Reino Unido: Elsevier.

Hui, Y. H. (Ed.). (1993). *Dairy Science and Technology Handbook*. USA: Wiley-VCH.

Huppertz, T., Kelly, A. L. (2009). Properties and constituents of cow's milk. En A. Y. Tamime (Ed.) *Milk processing and quality management* (pp. 23 – 47). Singapore: Wiley – Blackwell.

Johnson, M. Law, B. A. (2011). The fundamentals of cheese technology. En B. A. Law, A. Y. Tamime (Eds.) *Technology of cheesemaking* (2da ed) Wiley Blackwell, Reino Unido.

Kaletunç, G. (2009). Calorimetric methods as applied to food: An Overview. En G. Kaletunç (Ed.) *Calorimetry in food processing, Analysis and design of food systems* (pp. 5 – 13). Singapore: Wiley – Blackwell.

Kentish, S., Ashokkumar, M. (2011) The Physical and Chemical Effects of Ultrasound. En H. Feng, G. V. Barbosa – Cánovas, y J. Weiss (Eds.) *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing* (pp. 1 – 12) USA: Springer.

Lombana, A. M., Ramos, S. C., Serna, J. A., Sotelo, L. I. (2014). Análisis de energía emitida y potencia disipada en un sistema de ultrasonido por sonda en una matriz láctea. En P. Fito, A. M. Andrés, Á. L. Argüelles y M. D. Ortolá (Eds.) Libro de Actas (Vol. 3, pp. 71 – 77). Valencia (España): Universitat Politècnica de València.

Mason, T.J., L. Paniwnyk, J.P. Lorimer (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 253–260.

McClements, D. J. (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 293 – 299.

McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2–3), 127 – 144.

Mizuno, R., Lucey, J. A. (2007). Properties of milk protein gels formed by phosphates. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4524 – 4531.

Morales, F. J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S. (2000). Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 193–200.

Nassar, G., Nongaillard, B., Noel, Y. (2004). Study by ultrasound of the impact of technological parameters changes in the milk gelation process. *Journal of Food Engineering*, 63, 229 – 236.

Ng-Kwai-Hang, K. F. (2011) Heterogeneity, Fractionation and Isolation. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2da. ed., pp. 751 – 764). Reino Unido: Elsevier.

NOM-121-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias para lácteos y sus derivados.

NOM-155-Scfi-2012. Norma Oficial Mexicana. Leche Denominaciones, Especificaciones Fisicoquímicas, Información Comercial Y Métodos De Prueba.

O'Mahony, J. A., Lucey, J. A., McSweeney, P. L. H. (2005). Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization and texture development during the ripening of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3101 – 3114.

Pandey, P. K., Ramaswamy, H. S., St-gelais, D. (2000). Water-holding capacity and gel strength of rennet curd as affected by high-pressure treatment of milk. *Food Research International*, 33, 655 – 663.

Parris, N., Baginski, M. A. (1991). A rapid method for the determination of whey protein denaturation. *Journal of Dairy Science*, 74(1), 58 – 64.

Ramírez-López, C., Vélez – Ruiz, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 131 – 148.

Relkin, P. (2009). Heat-Induced phase transformations of protein solutions and fat droplets in Oil-in-Water emulsions: A thermodynamic and kinetic study. En G. Kaletunç (Ed.) *Calorimetry in food processing, Analysis and design of food systems* (pp. 119 – 145). Singapore: Wiley – Blackwell.

Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Lyng, J. G. (2009) The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation. *Food Chemistry*, 114, 905 – 911.

Rubio, J. L., Gutiérrez, N., Leal, M. Y., Sepúlveda, D. (2014). Modificación de las propiedades reológicas del queso crema mediante la aplicación del ultrasonido de alta potencia. En P. Fito, A. M. Andrés, Á. L. Argüelles y M. D. Ortolá (Eds.), Libro de Actas (Vol. 1, pp. 114-120). Valencia (España): Universitat Politècnica de València.

Ruiz Espinosa, H. (2017). Homogeneización de leche a alta presión y su efecto sobre características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de queso fresco (Tesis doctoral no publicada). Instituto Tecnológico de Veracruz, H. Veracruz, Ver.

Rynne, N. M., Beresford, T. P., Guinee, T. P., Sheehan, E., Delahunty, C. M., Kelly, A. L. (2008). Effect of high-pressure treatment of 1 day-old full-fat Cheddar cheese on subsequent quality and ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(4), 429 – 440.

San Martín-González, M. F., Rodríguez, J. J., Gurram, S., Clark, S., Swanson, B. G., Barbosa-Cánovas, G. V. (2007). Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. *LWT – Food Science and Technology*, 40(4), 697 – 705.

Savadkoobi, S. (2013). Molecular understanding of high pressure effects on the structural properties and microbial/enzymatic inactivation in condensed globular proteins. (Tesis doctoral no publicada). RMIT University, Melbourne, Australia.

Scott, R., Robinson, R. K., Wilbey, R.A. (1998). Cheese varieties. En R. Scott, R. K. Robinson, R. A. Wilbey (Eds.) *Cheesemaking Practice* (3ra ed., pp 449). Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

SFA SAGARPA perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011-2020 subsecretaría de fomento a los agronegocios sagarpa

Shanmugam, A., Chandrapala, J., Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 251 – 258.

Singh, R. P., Heldman, D. R. (2009). *Introduction to food engineering* (4th ed.). New York: Academic Press.

Taylor, M.W., MacGibbon, A.K.H. (2011). Milk Lipids. En J. W. Fuquay, P. F. Fox, y P. L. H. McSweeney (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2da. ed., pp. 649–654). Reino Unido: Elsevier.

Thomas, C. R., Geer, D. (2011). Effects of shear on proteins in solution (Review). *Biotechnology Letters*, 33(3), 443 – 456.

Torkamani, A. E., Juliano, P., Ajlouni, S., Singh, T. K. (2014). Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. *Ultrason Sonochem*, 21(3), 951 – 957.

Tosh, S. M., Dalgleish, D. G. (1998). The physical properties and renneting characteristics of the synthetic membrane on the fat globules of microfluidized milk. *Journal of Dairy Science*, 81(7), 1840 – 1847.

Udayarajan, C. (2007). *Relating physicochemical characteristics of cheese to its functional performance*. (Tesis doctoral no publicada). Universidad de Wisconsin–Madison, EE.UU.

Van Boekel, M. A. J. S. 1999. Determination of acid soluble [Beta]-lactoglobulin content: reversed-phase HPLC method. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.

Veisseyre, R. (1988). *Lactología Técnica*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.

Walstra, P., Jenness, R. (1987). *Química y física lactológica*. Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology* (2da ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Wehr, H. M., Frank, J. F. (2004). *Standard methods for the examination of dairy products* (17th ed.). American Public Health Association.

Wu, H., Hulbert, G. J., Mount, J. R. (2001). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 211 – 218.

Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 13 – 23.

Zobrist, M. R., Huppertz, T., Uniacke, T., Fox, P. F., Kelly, A. L. (2005). High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 655 – 662.

# APÉNDICE I

## DETERMINACIÓN DE POTENCIA ULTRASÓNICA EFECTIVA POR CALORIMETRÍA

Los calores específicos para los componentes en la leche se determinaron con las siguientes fórmulas (Singh & Heldman, 2009) utilizando la temperatura promedio (T) registrada en cada tratamiento:

|          |                                                                    |
|----------|--------------------------------------------------------------------|
| Proteína | $C_p = 2.0082 + 1.2089 \times 10^{-3}T - 1.3129 \times 10^{-6}T^2$ |
| Grasa    | $CP = 1.9842 + 1.4733 \times 10^{-3}T - 4.8008 \times 10^{-6}T^2$  |
| Lactosa  | $CP = 1.5488 + 1.9625 \times 10^{-3}T - 5.9399 \times 10^{-6}T^2$  |
| Cenizas  | $C_p = 1.0926 + 1.8896 \times 10^{-3}T - 3.6817 \times 10^{-6}T^2$ |
| Agua     | $C_p = 4.1762 - 9.0864 \times 10^{-5}T + 5.4731 \times 10^{-6}T^2$ |

## APÉNDICE II

Se obtuvo una relación de concentración contra el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas de cada solución, tanto para  $\beta$ -LG A como para  $\beta$ -LG B como se muestra en las Tablas A1. Posteriormente se graficaron dichas relaciones. Se utilizó el programa OriginPro 8 para graficar ambas relaciones. Ambas gráficas se muestran en las figuras A1 y A2. Se logró obtener un valor de  $r^2$  adecuado.

**Tabla A1** Áreas bajo las curvas obtenidas a diferentes concentraciones de  $\beta$ -LG pura

| $\beta$ -LG B |         | $\beta$ -LG A |            |
|---------------|---------|---------------|------------|
| Ppm           | Área    | Ppm           | Área       |
| 5000          | 18396.6 | 5000          | 19009      |
| 4500          | 14789   | 4500          | 1.4671E+04 |
| 4000          | 12552.8 | 4000          | 12501.4    |
| 3500          | 11904.3 | 3500          | 1.2034E+04 |
| 3000          | 9333    | 3000          | 9197.5     |
| 2500          | 7944.8  | 2500          | 7.6576E+03 |
| 2000          | 5962.5  | 2000          | 6009.8     |
| 1500          | 4481.4  | 1500          | 4.3889E+03 |
| 1000          | 2499.3  | 1000          | 2474.9     |
| 500           | 678.5   | 500           | 6.6080E+02 |

A partir de las gráficas se logró cuantificar la proteína sérica desnaturalizada en las pruebas posteriores.

1

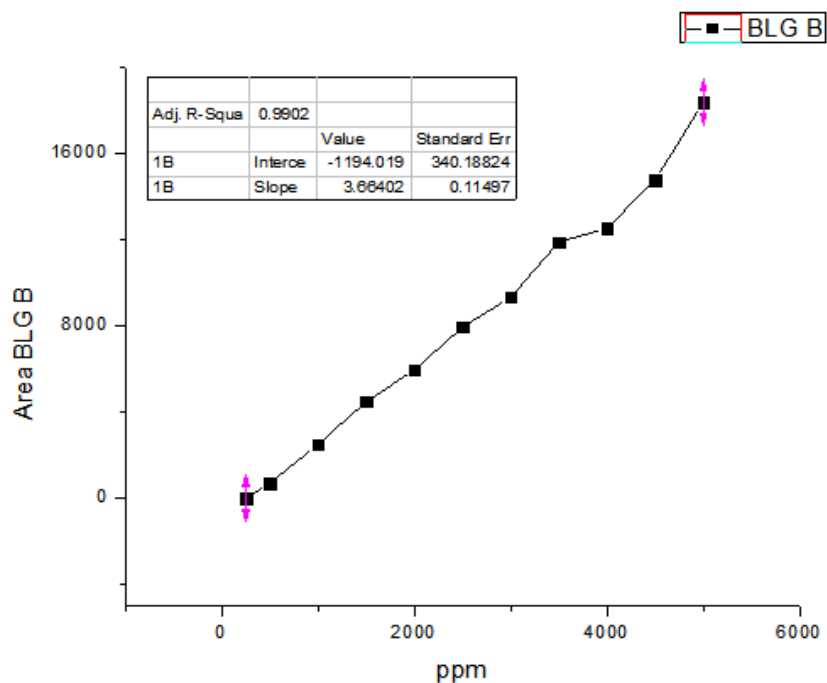


Figura A 1 Gráfica de curva estándar de  $\beta$ -LG B.

1

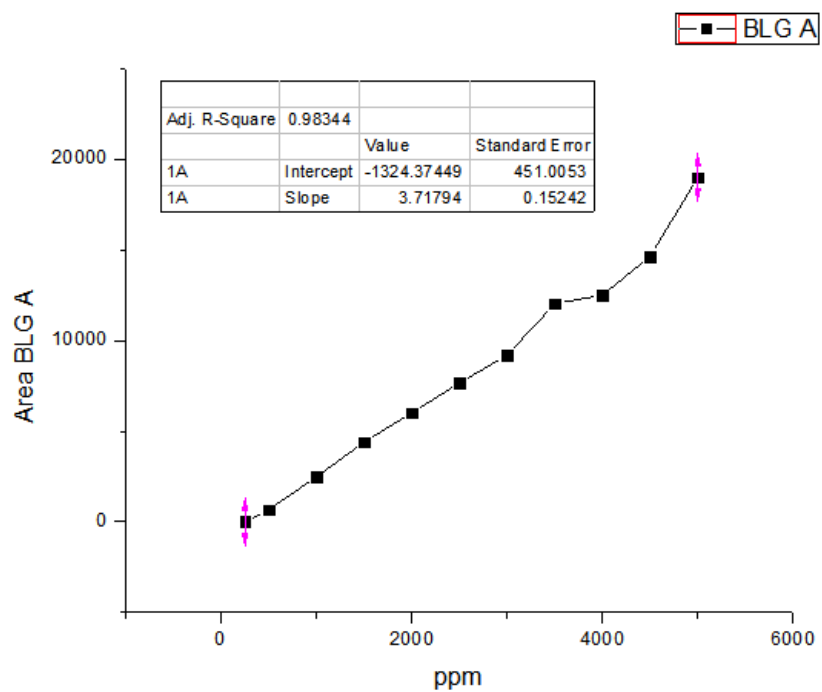


Figura A 2 Gráfica de curva estándar de  $\beta$ -LG A.