

# Desarrollo de un dispositivo para monitoreo en la línea del proceso de coagulación de la leche

SBODIO, O.A.<sup>1</sup>; MARTÍNEZ, E.D.A.<sup>2</sup>; TERCERO, E.J.<sup>1</sup>; DIDIER, M.J.J.<sup>3</sup>; REVELLI, G.R.<sup>4</sup>

## RESUMEN

Este trabajo describe el estudio de un dispositivo para monitorizar la coagulación enzimática o ácida de la leche. El instrumento está compuesto por un calefactor/sensor de platino, un sensor de temperatura por termoresistencia de platino, un electrodo de pH, una fuente de corriente continua constante, un sistema de adquisición de señales analógicas ligado a un programa de aplicación desarrollado que corre sobre un ordenador personal. El calefactor/sensor se construyó con un alambre de platino de 0,025 mm de diámetro, bobinado alrededor de una base cerámica cilíndrica y embebida en una termovaina protectora, lo cual permite monitorizar los cambios físicos de la leche. Las pruebas realizadas bajo condiciones de aire quieto y temperatura ambiente (25 °C), mostraron que el calefactor/sensor puede soportar una corriente continua de, por lo menos, 190 mA. Ensayos a diferentes valores de corriente continua permitieron seleccionar la corriente constante apropiada de 130 mA. Con esta corriente continua constante el experimento probó ser altamente reproducible y con una baja relación señal/ruido. El análisis de la transferencia de calor sobre la superficie de la vaina protectora del calefactor/sensor demostró que la temperatura superficial es menor a 50 °C, con lo cual no existe riesgo de desnaturalizar proteínas solubles. Los efectos de la temperatura, pH, concentración enzimática y el agregado de CaCl<sub>2</sub> sobre las respuestas tiempo de coagulación –CT–, T<sub>max</sub> y firmeza “viscosidad” fueron similares a las obtenidas con otros métodos. El tamaño reducido del sensor lo hace no intrusivo, robusto, fácil de limpiar *in situ* o esterilizar por medio de vapor, para lo cual no necesita ser removido durante las operaciones de elaboración. Cumple con las normas sanitarias 3-A y EHEDG, lo cual permite que sea usado tanto en las líneas de producción de queso como de yogurt.

**Palabras clave:** instrumento, sensor, comportamiento, queso, yogurt.

## ABSTRACT

*In this investigation we studied a device for monitoring the enzymatic or acid coagulation of milk. The instrument consists of a platinum heater/sensor, a Platinum Resistance Temperature Detector (PRTD) temperature sensor, a pH electrode, a direct constant current source, a digital acquisition system that, with the developed software runs on a Personal Computer. The heater/sensor was build with a 0.025 mm diameter platinum wire coiled around a ceramic structure and immersed in a small protective thermowell, allowed monitoring the physical changes of milk. Under conditions of quiet air and room temperature (25°C), tests showed that this probe was able to withstand a DC current of at least 190 mA. Different tests performed with different values of*

<sup>1</sup>Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), Facultad de Ingeniería Química (UNL), Universidad Nacional del Litoral (UNL). 1° de Mayo 3250, 3000 Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup>CCT-CONICET Santa Fe, Ruta Nac. 168 S/N, Pje. El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina.

<sup>3</sup>INTEC (UNL-CONICET), Güemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina.

<sup>4</sup>Cooperativa Tambara y Agropecuaria Nueva Alpina Ltda., Ceres, Pcia. de Santa Fe, Argentina. Correo electrónico: lisa@cotana.com.ar

DC constant current allowed to select the appropriate current (130 mA). Using this DC constant current, this experiment proved to be highly reproducible, with low signal to noise ratio. Heat transfer analysis also showed temperatures of  $<50^{\circ}\text{C}$  on the heater/sensor thermowell surface, with no risk of soluble protein denaturation. The effects of temperature, pH, enzyme concentration and  $\text{CaCl}_2$  addition, on the responses CT,  $T_{\text{max}}$  and firmness, were similar to those obtained with other methods. The small size of this sensor make it a non-invasive, though robust enough device, easy to clean in place or to sterilize using steam in place, which does not need to be removed during cheesemaking operations. In addition, the instrument meets the sanitary requirements of the 3-A and EHEDG standard, which allows it to be used on cheese or yogurt production lines.

**Keywords:** instrument, sensor, behavior, cheese, yogurt.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas surgió un interés creciente en el desarrollo de técnicas, métodos, dispositivos e instrumentos capaces de monitorizar adecuadamente el proceso de coagulación enzimática de la leche. Estos desarrollos se han usado no solo para realizar controles continuos del proceso y estudiar la influencia de variables críticas como pH, temperatura, concentración de enzimas y el agregado de  $\text{CaCl}_2$ , sino también para optimizar el tiempo de corte de la cuajada, evitar la pérdida de "finos", mejorar los rendimientos y homogeneizar la calidad del queso.

Bynum y Olson (1982) demostraron que el control de la firmeza de la cuajada y el tiempo de corte pueden mejorar la recuperación de caseína y de grasa. Posteriormente Ustunol y Hicks (1990) revelaron que el control del proceso de elaboración del queso puede contribuir a mejorar el rendimiento del producto final y su calidad.

Teniendo en cuenta los aspectos económicos, se han desarrollado y estudiado numerosos métodos para medir el tiempo de coagulación y la firmeza. A su vez, se realizaron cuantiosos trabajos presentando las ventajas y desventajas de los diferentes dispositivos e instrumentos, usados en el control del proceso de coagulación por quimosina; entre ellos pueden ser mencionados los de Tomasow y Voss (1977), Kowalchyk y Olson (1978), Hatfield (1981), Marshall *et al.* (1982), Mc Mahon y Brown (1982), Richardson *et al.* (1985), Hori (1985), Van Hooydonk y Van Den Berg (1988), Ustunol y Hicks (1990), Fox *et al.* (2000), O'Callaghan *et al.* (2000).

En Argentina, Sbodio *et al.* (2002) mostraron que el uso de un método objetivo y no destructivo (método del hilo caliente) en el control de la formación del coágulo, con la ayuda de la metodología de superficie de respuesta puede ser recomendado para optimizar la coagulación enzimática de la leche.

En los últimos años también ha habido avances en el control de la sinéresis de la cuajada, un paso esencial en la elaboración del queso. Varios autores, entre ellos Fagan *et al.* (2007a, 2007b) investigaron un novedoso sensor de luz de retrodispersión para monitorizar en forma continua la coagulación y la sinéresis, de manera de mejorar el control

del contenido de humedad de la cuajada. Esta tecnología mostró un buen potencial no solo para controlar la coagulación y la sinéresis, sino que además podría ser usada para controlar las pérdidas de grasa de la cuajada y su rendimiento, mejorando así el control del proceso durante la elaboración de queso (Fagan *et al.*, 2008). Taifi *et al.* (2006) usaron un método ultrasónico no intrusivo para caracterizar la sinéresis y la firmeza del gel de leche. Mateo *et al.* (2009) informaron sobre la validación de un sensor de sinéresis de la cuajada en un rango de la composición de la leche y de los parámetros del proceso.

Lucey (2002) y O'Callaghan *et al.* (2002) analizaron diferentes sistemas para monitorizar la firmeza de la cuajada durante la elaboración del queso y revisaron la bibliografía existente en relación con el desarrollo de un dispositivo adecuado para monitorizar el proceso de coagulación y predecir el tiempo apropiado de corte. En su análisis, demostraron que un dispositivo para hacer el seguimiento de la formación de cuajada en la elaboración comercial de queso necesita requisitos adicionales en comparación con aquellos que se usan en experimentos de laboratorio.

De hecho, deberían ser instalados en la tina quesera, no ser intrusivos para evitar su remoción durante las operaciones de corte y agitación, tener robustez, y es necesario que sean rápidos y seguros en la predicción del tiempo de corte para que los fabricantes puedan monitorizar la formación de la cuajada en la tina quesera. Además, al ser un dispositivo en línea, debe ser posible lavarlo *in situ*. El dispositivo para desarrollar debería tener alta sensibilidad en la respuesta y una baja relación señal/ruido.

Los instrumentos que se encontraron para trabajar en línea pueden agruparse como onda de compresión, torsión, hilo caliente o sonda óptica. Sin embargo, solo dos tipos de sondas (hilo caliente y reflectancia de fibra óptica) fueron usados en la fabricación comercial de queso (O'Callaghan *et al.*, 2002).

El objetivo de este desarrollo fue evaluar el potencial de un dispositivo para el control en línea de la coagulación de la leche de vaca, diseñado con un termoelemento de plati-

no como calefactor/sensor para monitorizar la coagulación, un termoelemento de platino para medir la temperatura del medio y un electrodo de pH sanitario.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Instalación experimental

Se diseñó un prototipo del sensor en la Universidad Nacional del Litoral (UNL), junto con INTEC-UNL-CONICET. La figura 1 muestra el diseño esquemático.

El sensor consiste de un termoelemento de platino doble de  $100 \Omega$  (W. C. Heraeus 2Pt100 KN 3045), de 4,5 mm de diámetro y 30 mm de longitud, conectado en paralelo en una configuración de cuatro hilos con alambres de extensión de plata 1000, y una longitud de 30 cm cada uno.

La elección de este tipo de termoelemento radica en que ofrece una mejor distribución de la energía térmica para ser transmitida, debido a que el alambre enrollado helicoidalmente es distribuido a través de cuatro orificios realizados a  $90^\circ$  en la circunferencia de la estructura de cerámica, dos orificios para cada elemento que, a su vez, en la etapa de construcción deja cada devanado en contrafase, lo que conduce a una inductancia mínima.

Teniendo en cuenta la alta corriente de excitación del termoelemento, la configuración de cuatro hilos (figura 2) evita la caída de potencial en los cables de extensión, y en consecuencia, la medición errónea. Dos de los cables llevan la excitación de corriente continua (CC) al termoele-

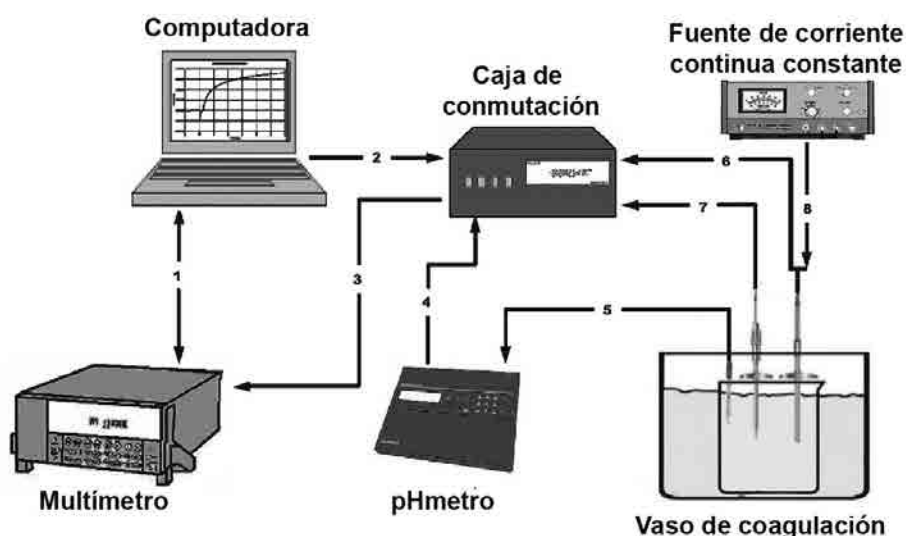
mento, mientras que los otros dos cables permiten la medición de la diferencia de voltaje a través de un instrumento de muy alta impedancia, despreciando así la resistencia de los alambres de extensión.

El termoelemento que aparece en la figura 2 fue instalado en una vaina sanitaria modelo TW810-C-DF-SA-045-015-T20-ED-SF-N (Intempco Controls Ltd., Montreal, Canadá) hecha de acero inoxidable 316 L, con una punta reducida para un rápido tiempo de respuesta, aprobado por los estándares sanitarios 3-A (Sanitary Standards, Inc. 74-03 Sensor), (figura 3).

Estas características permiten tanto su limpieza *in situ* (CIP) y la esterilización *in situ* con vapor (SIP). Para rellenar el espacio entre el termoelemento y la vaina de forma de asegurar la mejor transferencia de calor, se fabricó una camisa de cobre electrolítico de la misma longitud que el termoelemento con seis surcos longitudinales de profundidad 0,2 mm sobre su circunferencia exterior, con un diámetro interno de 4,5 mm y un diámetro externo de 6,3 mm, ya que el acero inoxidable (SS 316 L), de la vaina tiene un coeficiente de expansión similar.

Los surcos facilitan el drenaje del compuesto térmico utilizado para rellenar los espacios entre los componentes cuando se inserta el calefactor/sensor. La camisa de cobre tiene un extremo en forma de bayoneta que permite la remoción y separación del termoelemento de la vaina. Para ello se diseñó y fabricó una herramienta especial.

El material conductor utilizado para rellenar el espacio entre el termoelemento y la camisa de cobre, y entre esta y



**Figura 1.** Diseño esquemático: 1. Control y adquisición de datos. 2. Control digital. 3. Señal analógica del conmutador. 4. Señal analógica de pH. 5. Señal del electrodo de pH. 6. Señal del sensor de coagulación. 7. Señal analógica del termómetro RTD. 8. Fuente de corriente continua (CC).

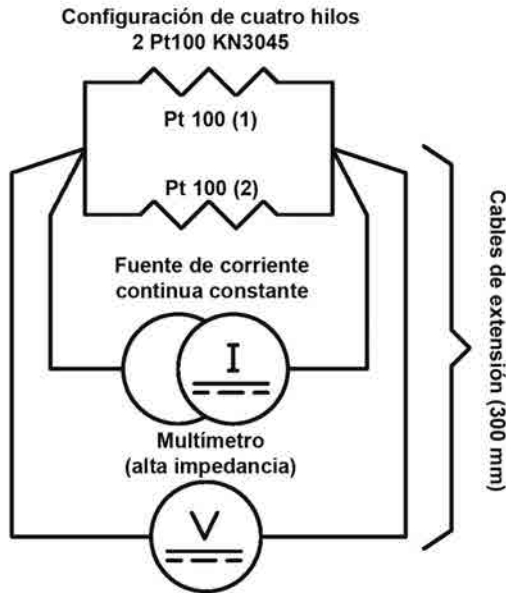


Figura 2. Configuración de cuatro hilos.

la vaina, es un compuesto térmico especial (Arctic Silver 5-Arctic Silver Incorporated - Visalia, CA, EE. UU.), con una conductividad térmica cercana a  $-9 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , muy cercana a la del acero inoxidable 316 L. Soporta una temperatura constante de  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  y picos mayores a los  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  durante un corto período sin perder sus propiedades o "sangrado". Se llamó entonces sensor de coagulación "CS" (\*patente pendiente) al dispositivo desarrollado usando un PRTD como un calefactor/sensor.

El CS deberá estar ubicado a la mitad de la altura de la tina quesera, donde se perforan agujeros en la doble pared para colocar y soldar conexiones de acero inoxidable 316 L con bridas Tri-clamp, según cada uno de los sensores y cuyas dimensiones permitan que la parte sensible esté a nivel con el interior de la tina.

La temperatura del proceso se midió con un RTD (Pt100),  $100 \text{ } \Omega$  a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\alpha = 0,00385 \text{ } \Omega/\Omega \text{ }^\circ\text{C}$  de acuerdo con la norma DIN EN 60751, clase AA, tolerancia de  $\pm 0,04\%$  ( $\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) en una configuración de cuatro hilos, enfundados en una vaina sanitaria de acero inoxidable 316 L, 115 mm de largo, diámetro de  $\frac{1}{4}$ ", con una brida de 2" Tri-Clamp y una punta reducida de  $\frac{1}{8}$ " para una alta velocidad de respuesta (3-4

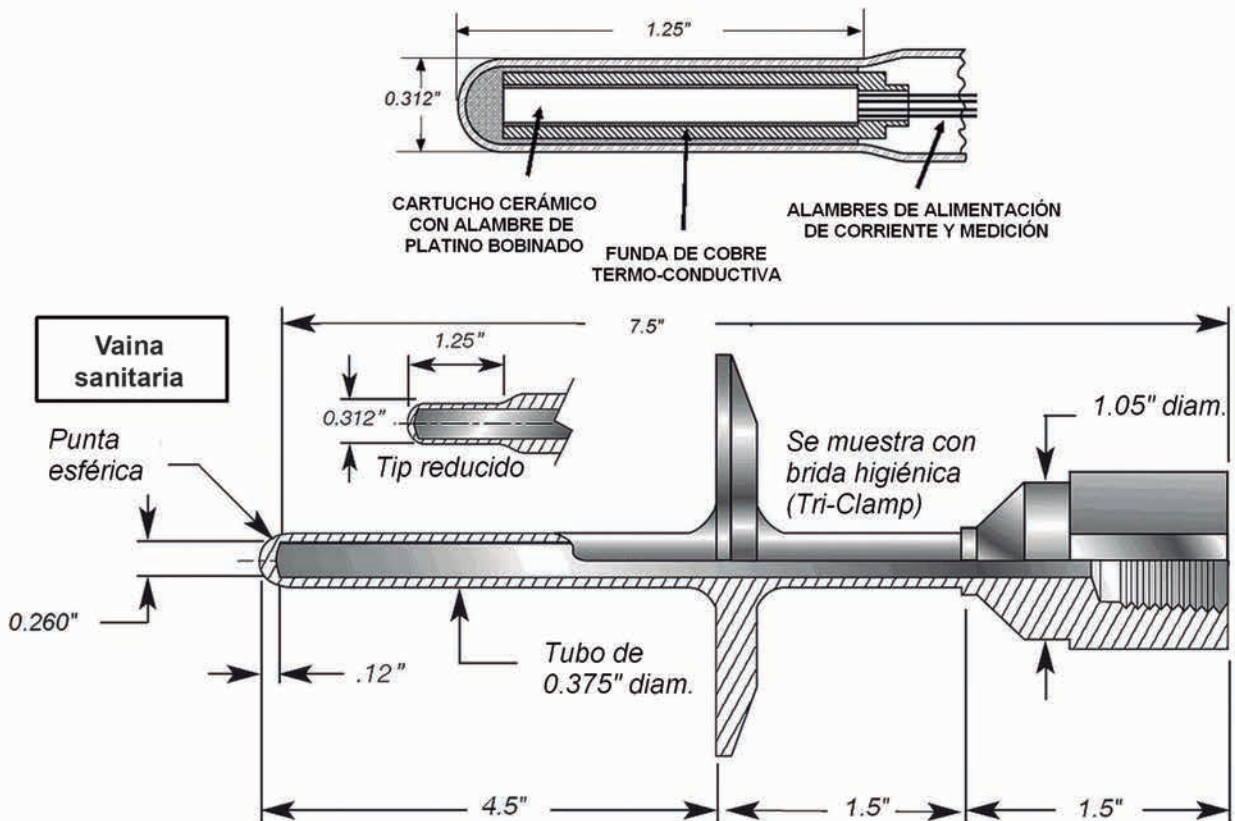


Figura 3. Detalles mecánicos del CS.

segundos), especialmente diseñada para el control de la pasteurización de la leche de acuerdo con los requisitos HTST, Ordenanza de Pasteurización de Leche de Grado A Revisión 2001, certificado por 3-A Sanitary Standards, Inc. (sensor 74-03) de Intempeco Controls Ltd., Montreal, Canadá (3-A Sanitary RTD – RS25-L-P-3-S4-DB-S-045-N10-0-T20-MC-B2-SF).

Se usó un pH-metro Orion Research EA 940 (Orion Research, Inc., Beverly, MA, EE. UU.), equipado con electrodo sanitario combinado, con sensor de temperatura incorporado marca Hamilton, modelo Easyferm Food VP 120 N° 243632 para controlar el pH. El potencial se midió contra el electrodo de referencia, y el sensor de temperatura integrado Pt100 para corrección del pH y electrólitos de relleno presurizados para evitar la difusión de la muestra en el sensor. El electrodo se construyó para estar en contacto con alimentos, para ser inocuo para los microorganismos fermentadores y cuenta con un certificado de aptitud de acuerdo con los estándares de las normas EHEDG (European Hygienic Engineering Design Group).

Estas propiedades hacen que su uso sea apto para la industria farmacéutica, alimentaria, cervecera y biotecnológica. El electrodo tiene un intervalo de pH de 0 a 14, sensibilidad 57 a 59 mV/pH a 25 °C, limpieza *in situ* (CIP), esterilización por vapor *in situ* (SIP), temperatura de trabajo de 0° a 135° C, rango de presión hasta 6 bar con conector Variopin y rosca de montaje PG 13,5. Este electrodo especial, preparado para soluciones proteína-grasas (sensores electroquímicos Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Suiza) se calibró con tres soluciones buffer (pH: 4,01, 7,00 y 10,00) (Hamilton Bonaduz, Suiza).

El electrodo de pH está montado sobre un portaelectrodo construido en acero inoxidable 316L para montaje en línea (Unifit H, Endress+Hauser modelo CPA442-E1A2A11), con brida de 2" Tri-Clamp, rosca hembra para electrodo PG13,5, certificado por EHEDG y 3-A Sanitary Standards, Inc. (74-03), rango de temperatura de trabajo entre -15 y 140 °C, presión de trabajo de hasta 10 bar con un *o-ring* sellador de electrodos reemplazable de Viton, aprobado por la FDA, y guarda protectora de electrodo.

La corriente continua (CC) fue proporcionada por una fuente de corriente constante modelo 6177C DC (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, EE.UU.), con rango de voltaje regulable de 0 a 50 V y tres rangos de corriente (0 a 5 mA, 0 a 50 mA y 0 a 500 mA), controlado por un potenciómetro Helipot de 10 vueltas.

Los voltajes de salida de las señales del CS, el sensor de temperatura y del electrodo de pH fueron seleccionados por una caja de conexiones (switch box) controlada a través de un programa de aplicación en una computadora personal (PC), que conmuta la entrada de un multímetro digital de 6 1/2 dígitos (Keithley modelo 2000, Test Instrumentation Group, Keithley Instruments, Inc. de Cleveland, Ohio, EE. UU.), conectado directamente a la PC. El conmutador electrónico, la adquisición de datos y el programa de aplicación de control en la PC fueron desarrollados por el equipo de investigación.

El sensor de coagulación, y las sondas de temperatura y pH se ensamblan sobre una placa de acero inoxidable, y pueden monitorizar simultáneamente el proceso de coagulación de la leche, ya sea por acción de la quimosina o acidificación, al registrar parámetros como "viscosidad", temperatura y evolución del pH.

### Comportamiento del CS en el aire

Como el termoelemento, componente primario del sensor de coagulación, está hecho de un alambre fino (0,0254 mm) de platino (Sensor Magazine, 2003), fue crucial determinar su comportamiento frente a flujos de alta intensidad de corriente. Para eso se realizaron pruebas en el rango de 70-190 mA, en condiciones de aire quieto, a 25 °C y el CS en posición horizontal. Como el CS se construyó a partir de un PRTD doble de 100  $\Omega$  en paralelo y con configuraciones de cuatro hilos (dos para la alimentación de CC y dos para la medición) su valor nominal a 0 °C es 50  $\Omega$ .

Para determinar la temperatura del CS y compararla con las tablas ITS-90 (DIN 43 760), se usó el valor teórico de resistencia, que se obtuvo dividiendo la diferencia de potencial entre sus extremos por la corriente constante CC y multiplicando el factor por dos. La temperatura del termoelemento PRTD del CS, expuesto a aire quieto, alcanza valores de 100 °C con el pasaje de corrientes mayores a 170 mA. Sin embargo, no se observaron cambios físicos o alteraciones en las propiedades eléctricas en el PRTD.

### Preparación experimental de la leche descremada

La leche descremada en polvo (WPNI) <1,4; proteína 35,1% (P/P); grasa 1,2% (P/P) y humedad 3,2% (P/P) obtenida de Milkaut S.A. (Franck, Argentina), reconstituida a 10,45% (P/P) en agua destilada (GT Lab., Rosario, Argentina), se usó para la coagulación ácida y, con el agregado de azida sódica (0,02%) como conservante, se utilizó para los ensayos de coagulación enzimática. Se obtuvo la disolución rápida del polvo agitando vigorosamente el recipiente de reconstitución durante 20 segundos. Después de la disolución del polvo, se añadió  $\text{CaCl}_2$ . Se agitaron las muestras por dos horas con un agitador magnético y se dejó que se reconstituía durante la noche, completando así un total de 22 horas a temperatura ambiente. Este es el tiempo necesario para la reconstitución teniendo en cuenta las pruebas de firmeza del gel, según Martin (2008).

### Selección y comportamiento de la corriente apropiada del CS

En experiencias anteriores se monitorizó la coagulación enzimática con alambres de platino desnudo de 0,1 mm de diámetro (sección transversal  $7,85398 \times 10^{-9} \text{m}^2$ ) y una longitud de 110 mm, de acuerdo con Sbodio *et al.* (2002), pureza 99,95%, calidad comercial tipo Duro, la resistividad  $\rho = 13,335 [\Omega/\text{m}]$  a 0 °C, con un coeficiente de temperatura  $\text{TC} = 0,00375 [\Omega \Omega^{-1} \text{C}^{-1}]$  en el rango de 0-100 °C (Sigmund Cohn Corporation, Mont Vernon, NY, EE. UU.). Cuando es excitado con una corriente constante de 500 mA, el dispo-

sitivo podría monitorizar el proceso de coagulación promovida por renina.

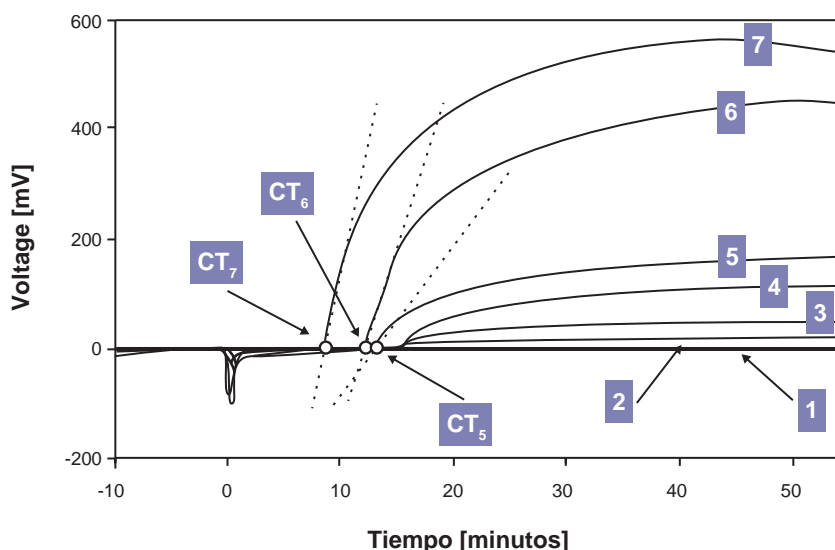
Teniendo en cuenta las caídas de voltaje en siete pruebas (realizadas por duplicado) al comienzo de la coagulación (leche fluida), la resistencia total promedio del alambre de platino fue 1,955966  $\Omega$  y la potencia total transferida a la leche, 0,4889 Watt. Cuando el coágulo alcanza su firmeza máxima, la resistencia promedio del alambre de platino es 1,961796  $\Omega$  y la potencia total transferida al coágulo es de 0,4904 Watt.

La potencia transferida, por unidad de área, por el alambre al inicio de la coagulación (leche fluida) y al momento de máxima firmeza corresponde a 14.147,42 Watt/m<sup>2</sup> y 14.190,83 Watt/m<sup>2</sup>, respectivamente. Con el valor de la resistividad del alambre calculamos su resistencia a 0 °C (1,466850  $\Omega$ ), para la cual el coeficiente de temperatura entre 0 y 100 °C es 0,005501  $\Omega/^\circ\text{C}$ . Este nivel de resistencia nos permite determinar 88,92 °C como la temperatura del alambre sumergido en la leche fluida, y 89,98 °C para el coágulo en su máxima firmeza, con una variación de 1,06 °C. Al final de cada experiencia, se vio una fina capa de proteínas aparentemente solubles precipitar sobre la superficie del alambre. Las temperaturas antes mencionadas, calculadas sobre la superficie del alambre tanto en la leche y coágulos superiores a 88 °C, pueden llevar a la desnaturalización de las proteínas solubles en la superficie del alambre, lo que podría modificar la respuesta de la señal.

Para evaluar el desempeño inicial del nuevo CS excitado con diferentes corrientes constantes se realizaron siete pruebas (por duplicado) de la coagulación enzimática por quimosina. Se utilizó leche descremada en polvo reconstituida como sustrato.

Al comienzo de cada prueba, las variables se ajustaron a las condiciones estándar que se utilizan por la industria quesera (pH 6,6, T 35 °C, 0,0015 R.U./ml de leche (Chymax 950 IMCU), sin adición de CaCl<sub>2</sub>). Los niveles de corriente continua aplicados fueron 30, 70, 90, 115, 130, 160 y 190 mA, (figura 4). Estos perfiles de firmeza (en mV) versus tiempo, evidencia que cuando el CS es alimentado por corrientes superiores a 130 mA se obtienen CT más cortos que cuando se trabaja a 130 mA. Estos resultados también se podrían atribuir al desarrollo de altas temperaturas en la superficie del sensor, lo que induciría a la desnaturalización de la proteína soluble. Al adherirse al alambre desnudo de platino o a la punta del CS, estas proteínas desnaturalizadas interferirían y por lo tanto modificarían la señal. Las respuestas de señales a corrientes inferiores a 130 mA no mostraron una sensibilidad adecuada a la medición de la firmeza. Una corriente constante de 130 mA da un CT y una respuesta de firmeza con muy buena capacidad de repetición ("r"), expresada como DS (desviación estándar). En dos mediciones se obtuvieron valores de r=0,022 min y r=0,0056 voltio para CT y la máxima firmeza, respectivamente. La relación señal/ruido, calculada como el cociente entre el valor máximo de la señal (máxima firmeza de la cuajada) y el error estándar para la estimación de la línea recta de la señal cuando el sustrato se encuentra en el estado fluido o líquido, está en el intervalo de 250-500.

La evaluación subjetiva del tiempo de coagulación (CT) se llevó a cabo mediante la observación de la formación de pequeños flóculos sobre las paredes de un tubo de ensayo girado manualmente. El promedio de los tres ensayos replicados simultáneamente muestra que el CT es muy cercano al tiempo de coagulación medido por el sensor (<1 segundo).



**Figura 4.** Perfiles de ensayos para monitorizar la detección de corriente continua óptima: firmeza de la cuajada vs. tiempo. CT<sub>5</sub>, CT<sub>6</sub> y CT<sub>7</sub> muestran el tiempo de coagulación a 130, 160 y 190 mA, respectivamente. (1), (2), (3), (4), (5), (6) y (7) son perfiles característicos de alimentaciones a corrientes de 30, 70, 90, 115, 130, 160 y 190 mA, respectivamente.

Corrida	Corriente (A)	Voltaje (Volts)	Resistencia eléctrica calculada ( $\Omega$ )	Resistencia equivalente ( $\Omega$ )(*)	Temperatura equivalente del alambre PRTD ( $^{\circ}\text{C}$ ) (*)	$\Delta T$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) (**)	Energía disipada (Watt)
1	0,030	1,7103	57,0094	114,0188	36,07	1,07	0,051
2	0,070	3,9969	57,0994	114,1989	36,54	1,54	0,279
3	0,090	5,1318	57,0199	114,0398	36,13	1,13	0,462
4	0,115	6,7084	58,3342	116,6683	42,92	7,92	0,772
5	0,130	7,5916	58,3966	116,7932	43,25	8,25	0,987
6	0,160	9,5055	59,4096	118,8192	48,51	13,51	1,521
7	0,190	11,4488	60,2568	120,5136	52,91	17,91	2,175

**Tabla 1.** Parámetros medidos al inicio de la coagulación.

(\*) ITS-90 (DIN 43 760). (\*\*)  $\Delta T = T$  (Tabla ITS-90, DIN 43 760) –  $T$  leche ( $35^{\circ}\text{C}$ ).

A partir de estas observaciones se concluyó que la corriente de excitación de 130 mA fue el valor apropiado para los ensayos de coagulación. En esta condición, la temperatura desarrollada en el interior por el alambre del CS en el coágulo correspondió a  $<51^{\circ}\text{C}$  (tabla 2). Esta temperatura evitaría la desnaturalización de las proteínas que podrían llegar a adherirse al sensor. Sin embargo, son necesarias más experiencias en el rango cercano a 130 mA para optimizar el valor de la corriente de excitación del CS.

Las tablas 1 y 2 muestran los parámetros medidos: corriente continua constante de excitación del CS, voltajes, resistencias, temperaturas según las tablas ITS-90 (DIN 43 760), diferencia de temperatura ( $\Delta T$ ) –equivalente menos la temperatura de la leche ( $35^{\circ}\text{C}$ )– y la potencia disipada al comienzo de la coagulación y cuando el coágulo alcanza su máxima firmeza, respectivamente.

### Ensayos de coagulación ácida y enzimática

Después de 22 horas de almacenamiento a temperatura ambiente, se colocaron dos litros de la leche preparada para

los ensayos, en un baño termostático (Haake F2-C, Karlsruhe, Alemania, con una precisión de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ) a 30, 33, 35, 38 y  $40^{\circ}\text{C}$  para cada experimento. Después de la adición de  $\text{CaCl}_2$  se ajustó el pH con ácido láctico concentrado al 85% (Mallinckrodt Chemical Work, Buenos Aires, Argentina) o con 0,1N NaOH (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) a los diferentes niveles de pH propuestos para la experiencia. Al verificar que el sensor de coagulación alcanzó un nivel de disipación de calor estacionario, la enzima fue agregada (Chymax 950 IMCU, Chr. Hansen S.A.I.C., Quilmes, Argentina) y la leche se agitó durante 1 min. La adquisición de datos comenzó después de la adición de la quimosina.

El dispositivo permite realizar el perfil de voltaje en función del tiempo. El tiempo de coagulación (CT) se definió como la tangente al punto de inflexión en la grafica de la salida de voltaje versus tiempo, de acuerdo con Kopelman y Cogan (1975), donde  $t_{\text{max}}$  es el tiempo de la pendiente máxima del perfil de voltaje,  $V_{30}$  se definió como la "firmeza" obtenida 30 minutos después de la adición de la enzima y  $V_{\text{max}}$  fue la firmeza máxima alcanzada a los 60 minutos.

Corrida	Corriente (A)	Voltaje (Volts)	Resistencia eléctrica calculada ( $\Omega$ )	Resistencia equivalente ( $\Omega$ )(*)	Temperatura equivalente del alambre PRTD ( $^{\circ}\text{C}$ ) (*)	$\Delta T$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) (**)	Energía disipada (Watt)
1	0,030	1,7122	57,0728	114,1457	36,40	1,40	0,051
2	0,070	4,0195	57,4209	114,8418	38,19	3,19	0,281
3	0,090	5,1822	57,5798	115,1597	39,02	4,03	0,466
4	0,115	6,8279	59,3728	118,7456	48,30	13,30	0,785
5	0,130	7,7645	59,7272	119,4543	50,20	15,20	1,009
6	0,160	9,8533	61,5834	123,1668	59,81	24,81	1,577
7	0,190	12,0091	63,2060	126,4120	68,24	33,24	2,282

**Tabla 2.** Parámetros medidos al momento de máxima firmeza del coágulo.

(\*) ITS-90 (DIN 43 760). (\*\*)  $\Delta T = T$  (Tabla ITS-90, DIN 43 760) –  $T$  leche ( $35^{\circ}\text{C}$ ).

Para el seguimiento del proceso de coagulación ácida, característico de la elaboración de yogur, el sustrato reconstituido (leche descremada 10,45%, P/P), sin adición de conservantes, se inoculó con 7 ml de una preparación madre con 0,2 gramos de starter Lyofast SLH (Sacco srl, Cadorago, CO, Italia) y se incubó a 42 °C durante 5 horas. La concentración del inóculo fue 1 x 10<sup>5</sup> CFU/ml.

**Diseño experimental para evaluar el proceso de coagulación enzimática**

Dado que, la temperatura, la concentración del cuajo, el pH y la concentración de cloruro de calcio son los factores más importantes que afectan a la coagulación enzimática de la leche (Hori, 1985; Tarodo de la Fuente *et al.*, 1999; Benguigui *et al.*, 1994; Sbodio *et al.*, 2002) se consideraron cinco niveles de estos factores para los experimentos.

Para la evaluación de la aptitud del sensor en condiciones de elaboración de queso, se realizaron 5 ensayos en los que se añadió quimosina en diversas concentraciones (0,002; 0,003; 0,004; 0,005 y 0,008 R.U./ml de leche) a la leche descremada reconstituida, fijando los otros parámetros a las condiciones estándar usadas en el industria del queso (T: 35 °C, pH: 6,60 y adición de CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM); 5 ensayos a diferentes temperaturas (30, 33, 35, 38 y 40 °C), manteniendo la concentración de quimosina en 0,004 R.U./ml de leche, pH: 6,60 y adición de 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>; 5 ensayos a diferentes niveles de pH (6,2; 6,4; 6,5; 6,6 y 6,8), manteniendo la concentración de quimosina en 0,004 R.U./ml de leche, temperatura 35 °C, y adición de 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>; y finalmente 5 ensayos con adición de diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> (0; 0,9; 1,8; 3,6 y 5,4 mM), manteniendo la temperatura a 35 °C, concentración de quimosina 0,004 R.U./ml de leche, y pH ajustado a 6,60 después de la adición de CaCl<sub>2</sub>, por duplicado.

**Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados por regresión lineal simple utilizando Statgraphics Package versión 7.1 (1994).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Análisis de transferencia de calor**

El análisis de transferencia de calor involucró cinco experiencias de coagulación enzimática a 34,8 °C, 34,5 °C y 35 °C, utilizando el mismo sustrato. Estas pruebas permitieron determinar los promedios de potencia disipada del sensor tanto en la leche fluida como en el coágulo. La tabla 3 muestra los valores promedio de ΔV (voltaje medido en el CS) para la leche en polvo reconstituida fluida y el coágulo, las temperatura de la leche y el coágulo, la resistencia del sensor, T del sensor de acuerdo con la tabla ITS-90 DIN 43760:1980, diferencia entre T de la tabla y las temperaturas de la leche y el coágulo desde una capa límite teórica (ΔT<sub>1</sub> + ΔT<sub>2</sub>) y la potencia disipada del sensor.

Las potencias medias desarrolladas por el sensor para leche líquida y coágulo fueron 0,98376 Watt y 1,00246 Watt, respectivamente.

Para calcular la diferencia de temperatura (ΔT<sub>1</sub>) desde la superficie del alambre PRTD a la superficie exterior de la vaina se consideró como una capa plana a cada una

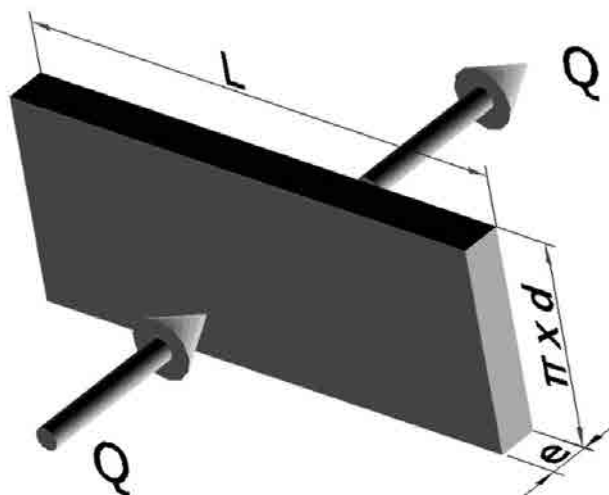


Figura 5. Modelo de capa plana considerado para cada material.

	Experiencia	ΔV Voltios	T <sub>milk</sub> °C	R (Ω)	R <sub>50 x 2</sub>	T <sub>(Table)</sub> °C (*1)	ΔT <sub>1</sub> +ΔT <sub>2</sub> (°C)	P <sub>sensor</sub> (Watt)
Leche fluida	Promedio	7,5675	34,8	58,210	116,422	42,28	7,48	0,9838
	Coefficiente de variación %	0,0997	0,787	0,0977	0,099	0,774	1,743	0,0977
Coágulo	Promedio	7,7112	34,8	59,317	118,634	48,03	13,23	1,0025
	Coefficiente de variación %	0,0878	0,787	0,0878	0,088	0,561	3,057	0,0877

Tabla 3. ΔV para leche líquida y coágulo, temperatura de la leche y del coágulo, temperatura del sensor de acuerdo con las tablas (\*1), resistencia, ΔT<sub>1</sub> + ΔT<sub>2</sub> y P, potencia del sensor. (\*1) PRTD IEC 751-1995 – Clase A e ITS 90 – DIN 43760.

ΔT<sub>1</sub>: diferencia de temperatura entre el alambre de platino bobinado y la superficie externa del sensor.

ΔT<sub>2</sub>: diferencia de temperatura entre la superficie externa del sensor y la superficie externa estimada denominada capa límite.

ΔV Volts: voltaje medido para leche fluida y valor de máxima firmeza del coágulo.



de las capas cilíndricas de materiales: polvo de cerámica, estructura de cerámica, compuesto térmico, cobre y acero inoxidable 316 L (figura 5).

La ecuación básica de la conducción de calor a través de una placa sólida en estado de equilibrio (Scott, 1974), para cada capa se puede expresar como:

$$\Delta T = \frac{Q \times \lambda}{\kappa \times \alpha} \quad (1)$$

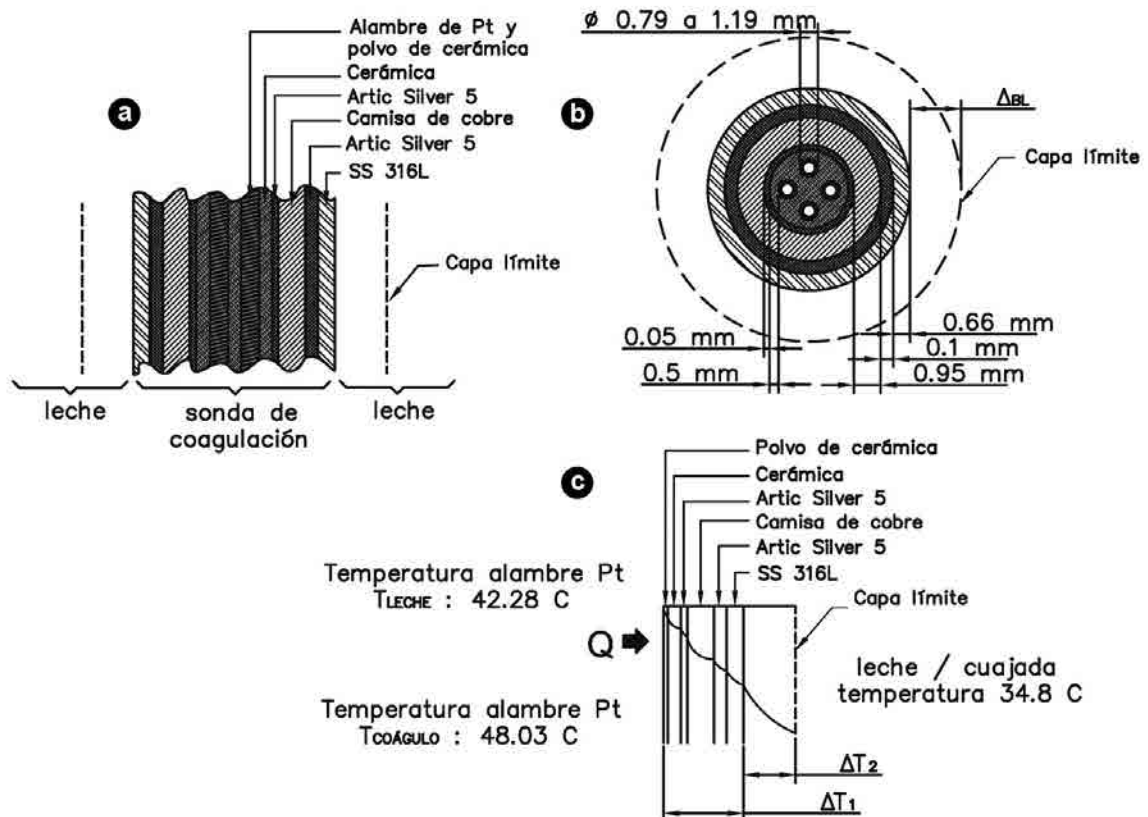
Donde:

$\Delta T$ : diferencia de temperatura requerida para conducir el calor (°C).

Capa de material	$\lambda$ : (m)	$\alpha$ : (m <sup>2</sup> )	$\kappa$ : W m <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup>		$\Delta T$ (°C) Leche fluida	$\Delta T$ (°C) Coágulo
Polvo cerámico	0,00119	4,48 x 10 <sup>-4</sup>	15	40 °C	0,03866	0,17752
Cerámica	0,00050	4,241 x 10 <sup>-4</sup>	30	40 °C	0,17420	0,03939
1.ª capa Artic Silver 5 (Cerámica cobre)	0,00005	4,382 x 10 <sup>-4</sup>	8,7	25 °C	0,01290	0,01315
Cobre	0,00095	6,032 x 10 <sup>-4</sup>	400	40 °C	0,00387	0,00395
2.ª capa Artic Silver 5 (Acero inoxidable cobre)	0,00010	6,22 x 10 <sup>-4</sup>	8,7	25 °C	0,01818	0,01852
Acero inoxidable	0,00066	6,22 x 10 <sup>-4</sup>	14,6	20-100 °C	0,07149	0,07287
Suma ( $\Delta T_i$ )					$\Sigma = 0,31931$	$\Sigma = 0,32541$

**Tabla 4.**  $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\kappa$ ,  $\Delta T$  para leche fluida y coágulo, correspondientes a las diferentes capas de los materiales del sensor.

La ecuación (1) y los datos de la tabla 4 llevan a los parámetros resumidos en la tabla 5.



**Figura 6.** Vista de las secciones transversales del CS (a y b) y perfiles de temperatura (c).

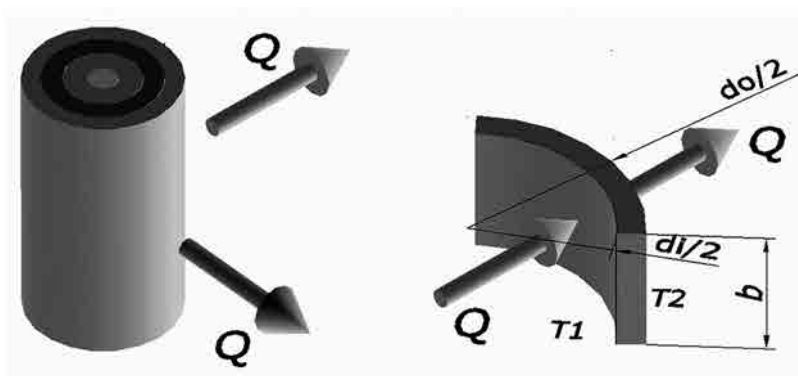


Figura 7. Sección del sensor de coagulación (izquierda). Modelo de geometría radial de transferencia de calor por conducción (derecha).

Q: calor para ser conducido (Watt).

$\lambda$ : longitud a través de la cual el calor debe ser conducido (m), para el caso de este modelo.  $\lambda = e$  (espesor del tubo).

$\kappa$ : conductividad térmica del material ( $W\ m^{-1}\ ^\circ C^{-1}$ )

$\alpha$ : sección transversal del material a través del cual se conduce el calor ( $m^2$ ), para el caso de este modelo,  $\alpha = \pi \times d \times l$ , d: diámetro, l: longitud.

La tabla 4 muestra  $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\kappa$ ,  $\Delta T$  para leche fluida y coágulo, correspondientes a las diferentes capas de los materiales del sensor.

Las figuras 6a y 6b muestran los esquemas de las diferentes capas del sensor, y la figura 6c muestra las diferencias de temperatura entre el alambre y la superficie del sensor ( $\Delta T_1$ ), y entre la superficie del sensor y la denominada capa límite ( $\Delta T_2$ ).

Para calcular el perfil de temperatura de la superficie exterior de la vaina a la capa límite (teórica) de transferencia de calor en la leche y en el coágulo, se consideró al sensor como un cilindro que tiene que disipar el calor constante generado por el alambre PRTD al medio (leche/coágulo).

Este desarrollo se centra principalmente en el instante en el cual la leche empieza a coagularse y a adquirir el carácter de un fluido estructurado en transición a un sólido viscoelástico. Por lo tanto, a fines prácticos, se considera un modelo de transferencia de calor simplificado, en el que el calor se transfiere principalmente por conducción (figura 7). Con la ecuación (2), que corresponde al flujo de calor por conducción en una geometría radial en estado estacionario, se puede calcular el diámetro límite exterior (do). A partir de esta distancia, el perfil de temperatura de la leche

que rodea la punta del sensor alcanza un valor constante en una capa límite radial teórica. Esta capa radial se desplaza durante la coagulación.

De la ecuación de transferencia (Scott, 1974).

$$\Delta T = \frac{Q}{2 \times \pi \times \kappa \times l} \times \ln\left(\frac{do}{di}\right) \quad (2)$$

Donde:

$\Delta T$ : diferencia de temperatura entre el alambre de platino y la superficie exterior del CS: 7,16  $^\circ C$  (leche fluida) y 12,91  $^\circ C$  (coágulo), respectivamente (tabla 5).

Q: calor transferido por conducción: 0,98376 Watt (leche fluida) y 1,00246 Watt (coágulo).

di: diámetro interno del modelo (diámetro externo de la vaina):  $7,925 \times 10^{-3}$  m.

do: diámetro externo, para ser calculado, de la capa límite radial teórica que rodea la punta de la vaina, en mm.

l: longitud axial de la vaina:  $3,21 \times 10^{-2}$  m.

$\kappa$ : conductividad térmica: 0,573  $W\ m^{-1}\ ^\circ C^{-1}$  a 35  $^\circ C$  para leche fluida (Spells, 1961) y 0,530  $W\ m^{-1}\ ^\circ C^{-1}$  a 32  $^\circ C$  para el coágulo (Passos, 1999).

$\ln (do/di)$ : logaritmo natural de la relación de diámetros.

Después de aplicar la ecuación anterior, se obtuvieron  $do=18,4$  mm,  $\Delta BL=5,2$  mm para la leche fluida y  $do=31,4$  mm,  $\Delta BL=11,6$  mm para el coágulo. Las variaciones en la disipación de energía y las variaciones de resistencia fueron 0,019 Watt y 1,107  $\Omega$ , respectivamente. La disipación de potencia de la vaina, con una superficie externa de 8,0  $cm^2$ , se puede expresar como 0,122 Watt/ $cm^2$  para la leche líquida al inicio de la coagulación y como 0,124 Watt/ $cm^2$  para el coágulo en su máxima firmeza, con una variación de 0,0024 Watt/ $cm^2$ .

El análisis de transferencia de calor del nuevo sensor muestra que el paso de una corriente continua de 130 mA disipa una potencia de mínimo impacto (0,122 Watt/ $cm^2$ ) y una temperatura de alambre de 42,28  $^\circ C$  en el estado

	$\Sigma \Delta T_1$ ( $^\circ C$ )	$T_{PT}$	$T_{SE}$ ( $^\circ C$ )	$\Delta T_2$ ( $^\circ C$ )
Leche fluida	0,319	42,28	41,96	7,16
Coágulo	0,326	48,03	47,71	12,91

Tabla 5. Temperatura en el extremo del terminal del alambre de platino ( $T_{PT}$ ), temperatura de la superficie externa ( $T_{SE}$ ) del sensor CS.

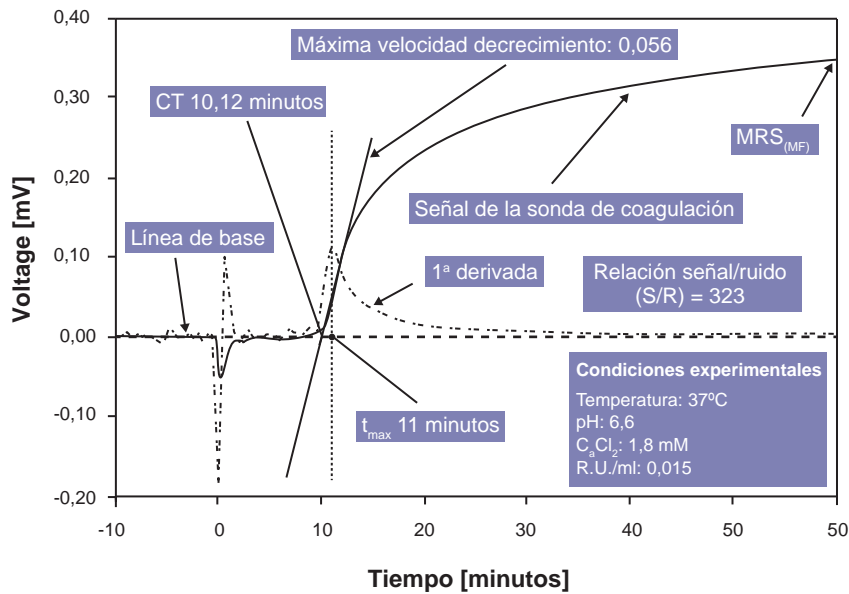


Figura 8. Ensayo de coagulación enzimática de la leche.

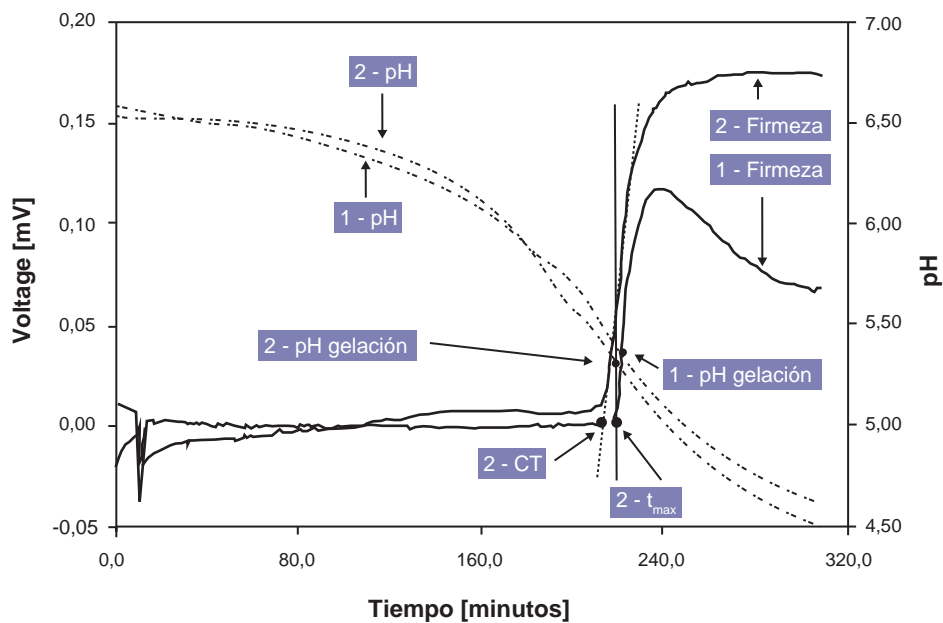


Figura 9. Perfiles de coagulación ácida de la leche. Firmeza y evolución del pH en función del tiempo.

líquido. La disminución del 10% en la conductividad térmica de la leche durante el proceso de transición de fluido a gel, de  $0,573 \text{ W m}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  (Spells, 1961) a  $0,530 \text{ W m}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  (Passos, 1999), respectivamente, produce un aumento de la disipación de potencia de solamente  $0,0024 \text{ Watt/cm}^2$ , que se atribuye al autocalentamiento y al aumento de  $5,75 \text{ }^\circ\text{C}$  en la temperatura del alambre de platino. Este aumento de temperatura corresponde a una diferencia de la resistencia de  $1,107 \Omega$ , que es un parámetro clave en la sensibilidad del sensor.

Con este nuevo dispositivo, la temperatura en la superficie del sensor no es suficiente para causar la desnaturalización de las proteínas solubles que se podrían adherir a la superficie y que podrían interferir con la señal. Como la desnaturalización de las proteínas solubles de la leche se produce a  $T > 70 \text{ }^\circ\text{C}$ , sin otras interferencias las respuestas de este sensor son muy repetitivas. A la inversa, cuando usan valores mayores de CC, por ejemplo 190 mA, hay mayores temperaturas en la superficie del sensor (tablas

1 y 2), aunque son significativamente más bajas que las calculadas en el alambre de platino desnudo excitado con 500 mA (alrededor de 89-90 °C).

La figura 8 muestra el perfil típico del voltaje en función del tiempo para un ensayo de coagulación con quimosina (Chymax, 950 IMCU/ml, ChR Hansen Argentina SAIC) en las condiciones estándar que se usan en la industria quesera (pH: 6,6, T: 37 °C, 0,0015 R.U./ml de leche y agregado de 1,8 mM de  $\text{CaCl}_2$ ), llevado a cabo utilizando leche fluida (leche cruda, grasa 3,5% (P/P); proteína verdadera 3,25% (P/P) y lactosa 4,8% (P/P), suministrada por la Cooperativa Tambara y Agropecuaria Nueva Alpina Ltda., (Ceres, Santa Fe, Argentina).

Este perfil corresponde a un promedio de tres repeticiones. De la misma figura se pueden observar el tiempo de coagulación (CT), tiempo de la pendiente máxima del perfil de voltaje ( $t_{\text{max}}$ ), voltaje a los 30 min de la adición de enzimas ( $V_{30}$ ) y el voltaje máximo ( $V_{\text{max}}$ ) de la coagulación. Por el bajo nivel de ruido de la señal que muestra el perfil, se puede calcular la primera derivada con bastante facilidad.

La figura 9 muestra el perfil del voltaje en función del tiempo durante el proceso de coagulación ácida en condiciones estándar de elaboración de yogur, con leche descremada en polvo reconstituida (10,45% p/v), de acuerdo con lo expuesto en Materiales y Métodos. El Perfil (1) corresponde a leche reconstituida sin tratamiento térmico, mientras que el Perfil (2) representa el proceso con leche reconstituida sometida a calentamiento a 85 °C durante 30 minutos. El control simultáneo de la temperatura, el pH y la "viscosidad" con los tres sensores permite medir y registrar el tiempo de gelificación, el pH de la gelificación y la firmeza obtenida (voltaje) y pequeñas oscilaciones en la temperatura de alrededor de  $\pm 0,1$  °C.

Por una parte, esta información podría ser usada por la industria para monitorizar y optimizar el tiempo de fermentación en la elaboración de cada tipo de yogurt. La subsiguiente reducción de la señal de viscosidad en el perfil (1) indicaría la presencia de micro sinéresis (desuerado). Por otra parte, son necesarias más experiencias para determinar la relación entre la expulsión espontánea de suero y la caída de la señal. Una limitación potencial de este punto podría ser la diferencia en la disipación de calor a través de una mezcla de suero y coágulo en comparación con la producida en un gel homogéneo. Finalmente, las respuestas de los sensores se ajustan adecuadamente a los procesos de coagulación ácidos y enzimáticos.

En la tabla 6 se presentan cuatro respuestas: CT,  $t_{\text{max}}$ ,  $V_{30}$  y  $V_{\text{max}}$  para cinco niveles de pH (6,2; 6,4; 6,5; 6,6 y 6,8), cinco niveles de concentración de enzima (0,002; 0,003; 0,004; 0,005 y 0,008 R.U./ml de leche), cinco niveles de temperatura (30, 33, 35, 38 y 40 °C) y cinco niveles de  $\text{CaCl}_2$  añadido (0; 0,9; 1,8; 3,6 y 5,4 mM). Cada valor es la media de dos repeticiones.

La figura 10a muestra la evolución del voltaje para diferentes pH y la concentración estándar de cuajo usado en la industria quesera (0,0025 R.U./ml de leche, temperatura 35 °C y añadido de  $\text{CaCl}_2$  1,8 mM).

El análisis de varianza (ANOVA) y la regresión lineal que describe la relación entre CT y pH tuvo un nivel de significancia de  $p < 0,05$  ( $p$ : 0,0392), lo cual indica que existe una relación estadísticamente representativa en un nivel de confianza del 95%.

La ecuación ajustada que relaciona CT y pH es  $\text{CT} = -131,663 + 21,8086 \times \text{pH}$ . El coeficiente de determinación  $R^2$  (0,9227) muestra que el modelo ajustado constituye el 92,27% de la variabilidad del CT.

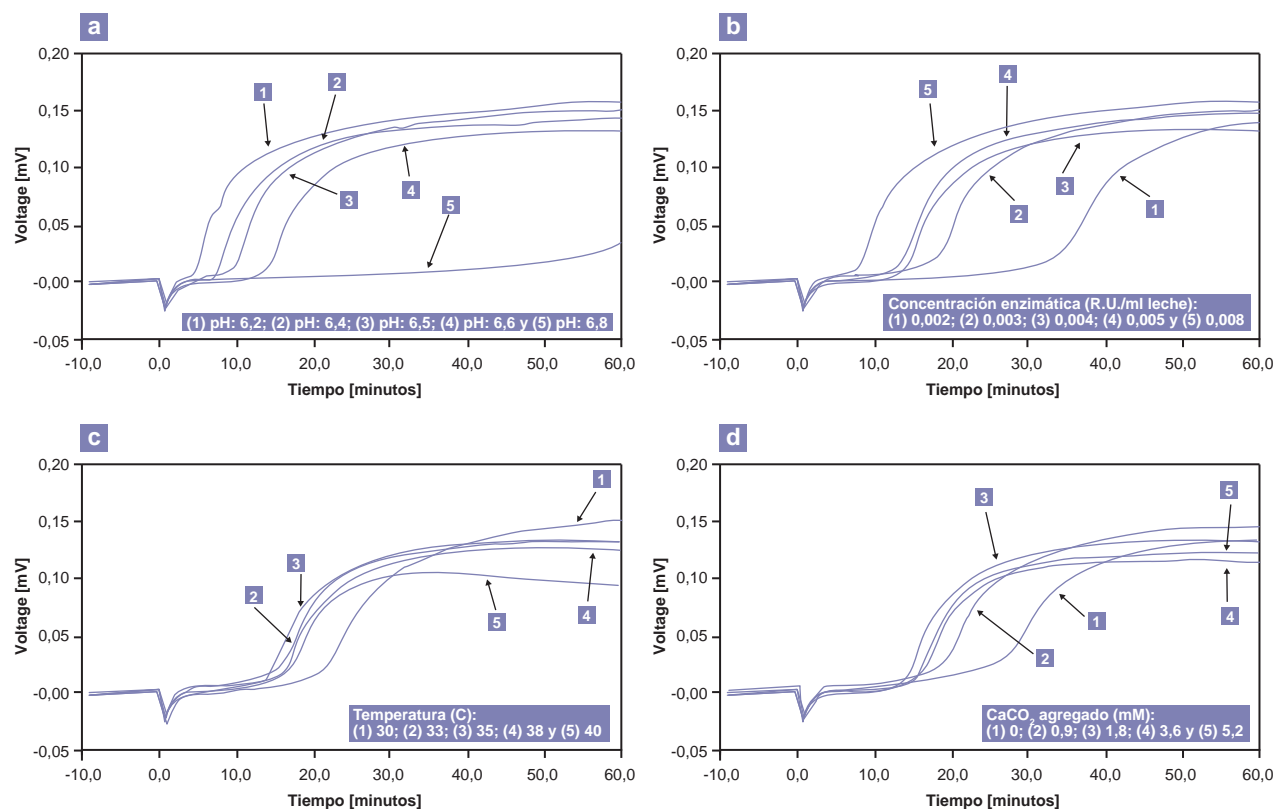
El modelo ajustado correspondiente a  $t_{\text{max}} = -150,673 + 25,0114 \times \text{pH}$ , con  $p < 0,05$  ( $p$ : 0,0309) indica que existe una relación significativa a un nivel de confianza del 95%. El coeficiente de determinación  $R^2$  representa el 93,91% de la variabilidad de  $t_{\text{max}}$ .

La tabla 6 muestra que el CT más bajo (4,2 min) y  $t_{\text{max}}$  (5,1 min) se obtienen a pH 6,2, mientras que el CT más alto (13,4 min) y  $t_{\text{max}}$  (15,6 min), se obtiene a pH 6,6. Las pendientes positivas para ambas respuestas indican que el aumento del pH también aumentan los valores del CT y  $t_{\text{max}}$ . Mientras se mantiene constante la temperatura, la concentración enzimática y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  añadido, el valor máximo de  $V_{30}$  y  $V_{\text{max}}$  se obtiene a pH de 6,2. El CS no detectó coagulación a pH de 6,8 (no hay datos sobre CT,  $t_{\text{max}}$  y  $V_{30}$ ). La regresión simple de los indicadores  $V_{30}$  y  $V_{\text{max}}$  versus pH no dio como resultado una relación estadísticamente significativa.

Los cambios en el pH que muestran una relación significativa con el CT son detectados por el sensor y están de acuerdo con los resultados reportados por Storry y Ford (1982) e Imafidon y Farkye (1993). El pH de la leche sería el factor más importante que debe ser controlado estrictamente durante el proceso de elaboración de la cuajada (Hori, 1985). Van Hooydonk *et al.* (1986) encontraron que al disminuir el pH aumentan las acciones enzimáticas y de agregación, tal como se observó con el sensor CS.

La figura 10b muestra la notable influencia de la concentración enzimática en los perfiles de voltaje versus tiempo. La tabla 6 muestra los valores promedio de las cuatro respuestas (CT,  $t_{\text{max}}$ ,  $V_{30}$  y  $V_{\text{max}}$ ). Las respuestas CT y  $t_{\text{max}}$  disminuyen a medida que aumenta la concentración enzimática. Trazando CT frente a la inversa de la concentración enzimática (ml de leche/R.U.) muestra que se aplica la Ley de Holter, como se describe por la ecuación  $\text{CT} = k \times 1/C$  ( $k$ : constante y  $C$ : concentración enzimática). La regresión lineal que describe la relación entre CT y  $t_{\text{max}}$  y concentración enzimática (ANOVA) muestra un nivel de significancia  $p > 0,05$ , lo que indica que no hay relación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

Por este motivo se modificaron los resultados experimentales a través de la transformación matemática, adoptando  $\log \text{CT}$  y  $\log t_{\text{max}}$  en vez de CT y  $t_{\text{max}}$ , como los valores de mejor ajuste para ambas respuestas. La ecuación modelo ajustada es para  $\log \text{CT} = 3,66741 - 222,11 \times \text{concentración de enzima}$ . El valor de  $p$ : 0,0181 (ANOVA) muestra relaciones estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%, donde el  $R^2$  indica que el modelo da cuenta de 88,0982% de la variabilidad del log CT. Estas



**Figura 10.** Perfiles comparativos de coagulación de la leche. a. Variación del pH. b. Variación de la concentración de la enzima. c. Variación de la temperatura y d. Variación del  $\text{CaCl}_2$  agregado.

observaciones coinciden con Hori (1985), quien informó que la medición del voltaje mostró que el CT de la leche descremada disminuía exponencialmente con el aumento de la concentración de cuajo.

El modelo ajustado para  $\log t_{\max} = 3,75558 - 204,929 \times$  concentración de la enzima, y el valor de  $p: 0,0210$  demuestran que existe una relación estadísticamente significativa entre el  $\log t_{\max}$  y la concentración de la enzima. El  $R^2$  para el modelo ajustado da cuenta del 86,88% de la variabilidad del  $\log t_{\max}$ , aunque los niveles de  $V_{30}$  y  $V_{\max}$  de la tabla 6 y su evolución en la figura 10b muestran que a medida que aumenta la concentración enzimática, también aumentan ambas respuestas. ANOVA, sin embargo, muestra que los niveles de significancia son  $p > 0,05$ , lo que indica que no hay relación estadísticamente diferente entre la concentración enzimática y  $V_{30}$  y la concentración enzimática y  $V_{\max}$ .

Por un lado, el análisis de regresión lineal de CT,  $t_{\max}$  y  $V_{30}$  a diferentes temperaturas (30, 33, 35, 38 y 40 °C) presentados en la tabla 6 muestra que, en las condiciones establecidas para el conjunto de variables (concentración enzimática, pH y adición de  $\text{CaCl}_2$ ), los valores de  $p$  en la tabla ANOVA son  $> 0,05$ , lo que lleva a la conclusión de que no existe una relación estadísticamente significativa entre las respuestas CT,  $t_{\max}$  y  $V_{30}$  y la variable temperatura, con un nivel de confianza del 95% o superior.

Por otro lado, el modelo de ecuación ajustada que describe la relación entre  $V_{\max}$  y temperatura ( $V_{\max} = 0,266493 - 0,00390077 \times$  Temperatura), da un valor de  $p (0,0192)$ , que significa una relación estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95%. El  $R^2$  estadístico indica que el modelo ajustado representa 87,6378% de la variabilidad en la  $V_{\max}$ . Los indicadores de viscosidad más altos y más bajos (voltaje) son obtenidos a 30 °C y 40 °C, respectivamente, donde el incremento porcentual de  $V_{\max}$  entre el valor a 30 °C y aquel a 40 °C es del 30,5%.

La figura 10c muestra que a 30 °C el voltaje aumenta indefinidamente durante los 60 min de la ensayo, mientras que a 33 y 35 °C el voltaje alcanza un máximo y luego se mantiene constante. En cuanto a su comportamiento a 40 °C, el voltaje alcanza un máximo y luego cae, posiblemente debido a la ocurrencia de microsinéresis.

Se ha informado que la temperatura afecta tanto la fase primaria (hidrólisis) como la fase secundaria (agregación), aunque el efecto sobre la hidrólisis enzimática es sustancialmente inferior. Ramet y Weber (1980), Storry y Ford (1982) y Van Hooydonk y Van Den Berg (1988) mostraron que la fuerza del coágulo se redujo notablemente por el aumento de la temperatura, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestra experiencia. Recientemente, Sbdio *et al.* (2013) usando un dispositivo similar, un diseño com-

Variables	CT (min)	t <sub>max</sub> (min)	V <sub>30</sub> (mV)	V <sub>max</sub> (mV)
<b>pH</b>				
6,2	4,2 ± 0,020	5,1 ± 0,016	144,4 ± 3,5	157,3 ± 5,9
6,4	7,1 ± 0,025	8,5 ± 0,025	132,0 ± 3,2	143,9 ± 5,5
6,5	9,1 ± 0,022	10,9 ± 0,020	134,1 ± 3,1	150,5 ± 6,0
6,6	13,4 ± 0,021	15,6 ± 0,027	118,8 ± 4,2	132,8 ± 5,2
6,8	--	--	--	33,5 ± 5,4
<b>C.E. (R.U./ml leche)</b>				
0,002	32,8 ± 0,023	36,7 ± 0,022	127,0 ± 3,8	137,2 ± 5,0
0,003	17,1 ± 0,022	19,9 ± 0,028	119,1 ± 3,6	149,0 ± 6,1
0,004	13,4 ± 0,022	15,6 ± 0,019	118,9 ± 3,1	132,8 ± 5,4
0,005	12,7 ± 0,019	15,2 ± 0,023	126,4 ± 3,0	146,1 ± 5,9
0,008	7,3 ± 0,024	9,1 ± 0,018	138,2 ± 4,0	155,9 ± 5,6
<b>Temperatura (°C)</b>				
30	19,9 ± 0,018	23,8 ± 0,022	109,4 ± 3,9	150,1 ± 5,5
33	14,3 ± 0,025	17,4 ± 0,021	120,8 ± 3,6	132,6 ± 4,9
35	13,4 ± 0,019	15,6 ± 0,026	118,8 ± 3,5	132,8 ± 6,3
38	15,1 ± 0,020	17,6 ± 0,017	112,7 ± 3,5	126,1 ± 5,1
40	15,5 ± 0,028	18,4 ± 0,024	101,8 ± 3,0	104,3 ± 6,2
<b>CaCl<sub>2</sub> (mM)</b>				
0	24,4 ± 0,022	29,0 ± 0,015	80,6 ± 4,1	133,5 ± 5,8
0,9	17,0 ± 0,026	20,6 ± 0,018	117,6 ± 3,9	145,4 ± 4,8
1,8	13,4 ± 0,021	15,6 ± 0,023	118,8 ± 3,2	132,8 ± 6,2
3,6	13,4 ± 0,017	15,6 ± 0,024	106,8 ± 3,0	114,6 ± 4,7
5,4	14,6 ± 0,024	16,6 ± 0,030	110,5 ± 3,3	121,1 ± 6,5

**Tabla 6.** Efecto del pH, concentración de enzima, temperatura y adición de CaCl<sub>2</sub> al CT, t<sub>max</sub>, V<sub>30</sub> y V<sub>max</sub> de la leche descremada en polvo reconstituida durante la coagulación enzimática.

C.E: concentración de enzimas.

puesto rotacional y metodología de superficie de respuesta, mostró que es posible estudiar los efectos de las variables críticas en la coagulación por acción de la quimosina en leche en polvo reconstituida.

Los modelos de segundo orden obtenidos usando análisis de regresión lineal predijeron eficazmente los efectos de la temperatura, concentración de enzima y pH en la CT, t<sub>max</sub> y V<sub>30</sub>. El estudio de toda la coagulación enzimática de la leche y con el mismo sensor mostró que la temperatura es el principal factor que afecta el desarrollo de la firmeza.

En cuanto al efecto de las diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> añadido (0; 0,9; 1,8; 3,6 y 5,4 mM) con condiciones fijas de pH (6,6), temperatura (35 °C) y concentración enzimática (0,004 R.U./ml de leche), las cuatro respuestas (CT, t<sub>max</sub>, V<sub>30</sub> y V<sub>max</sub>) se muestran en la tabla 6. Los análisis de regresión lineal correspondientes a las cuatro respuestas muestran relaciones estadísticamente no significativas cuando se varía la adición de CaCl<sub>2</sub>.

Sin embargo, es interesante hacer notar que el tiempo necesario para alcanzar el voltaje máximo está significati-

vamente relacionado (p: 0,0262) con la concentración de CaCl<sub>2</sub>. La regresión lineal es Tiempo de V<sub>max</sub> = 60,5021-0,016531 x CaCl<sub>2</sub>, que muestra que a medida que aumenta la concentración de CaCl<sub>2</sub>, el tiempo que se tarda en alcanzar V<sub>max</sub>, disminuye. La figura 10d muestra la evolución del voltaje para diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub>. La comparación entre estas evoluciones muestra que los mayores CT y t<sub>max</sub> y el más bajo V<sub>30</sub>, se observan sin adición de CaCl<sub>2</sub>.

Sin embargo, el nivel más alto de V<sub>max</sub> se logra con la adición de 0,9 mM de CaCl<sub>2</sub>, y los más bajos cuando se usan concentraciones más altas (3,6 y 5,4 mM de CaCl<sub>2</sub>). Los resultados obtenidos con el nuevo dispositivo están de acuerdo con los resultados reportados por Okigbo *et al.* (1985) que mostró que la adición de CaCl<sub>2</sub> en la coagulación por quimosina es innecesaria si se pueden ajustar adecuadamente otros factores (pH, temperatura y concentración de quimosina). A la inversa, Taifi *et al.* (2006) muestran que el aumento de la concentración de CaCl<sub>2</sub> produce un aumento en la firmeza del gel de leche y también acelera la aparición de sinéresis.

El dispositivo desarrollado y patentado por Hori utiliza el mismo principio, sin embargo, así como se presenta no es

utilizable para una tina de elaboración de queso. En cuanto al desarrollado y patentado por el INRA, este consistía en un analizador térmico diferencial.

Cabe mencionar que en su fase final, este dispositivo ha sido diseñado y desarrollado para aplicaciones industriales.

Sin embargo, la diferencia entre el dispositivo desarrollado y patentado por el INRA según FR2626371 (A1) y FR2626371 (B1) también publicado como: WO8906794 (A1) NZ227709 (A) JPH03503449 (A) FI91330 (B) FI91330 (C) EP0389568 (A1) EP0389568 (B1) DK175990 (a) CA1297178 (C) AU2940489 (a) patente de Estados Unidos US5064294 (a) es que el dispositivo se basa en una medición térmica diferencial, similar a un calorímetro diferencial, que tiene dos sondas construidas con alambre de platino, uno para medir la temperatura del medio y el otro lejos del primero, calefaccionado por una corriente constante, para medir la disipación térmica en soluciones de gelatina y de la leche cuajada en frío a 10 °C, con el fin de seguir la evolución de la coagulación de la leche a medida que se calienta hasta 30 °C.

En nuestro caso, una única sonda construida con alambre de platino, se calienta con una corriente constante para medir la disipación térmica con una temperatura de leche dentro de un rango experimental de 30 °C a 40 °C, a la que se añade el cuajo para la coagulación enzimática. Así, la disipación de calor por unidad de área en nuestro caso es 1220W/m<sup>2</sup> frente a 1600W/m<sup>2</sup> del dispositivo del INRA, con un aumento significativo en la sensibilidad.

En conclusión, la medición de la coagulación enzimática a través de nuestro dispositivo muestra que el sensor es sensible a los cambios de las variables críticas que caracterizan el proceso. El efecto del pH, la concentración de enzima, la temperatura y CaCl<sub>2</sub> en las respuestas CT,  $t_{max}$ ,  $V_{30}$  y  $V_{max}$  fueron consistentes con los resultados obtenidos por otras metodologías. Las señales emitidas por el sensor producen bajo nivel de ruido y las respuestas de CT y  $V_{max}$  dan muy buena repetibilidad. Cuando se alimenta al sensor con 130 mA, el análisis de transferencia de calor muestra que el desarrollo de la temperatura en la superficie es cercano a los 49-50 °C, sin riesgo de desnaturalización de las proteínas solubles.

Teniendo en cuenta sus dimensiones, el dispositivo es no intrusivo, lo que significa que no interfiere con el corte del gel y las operaciones de agitación. Tiene suficiente robustez y puede ser limpiado (CIP) y esterilizado con vapor (SIP) *in situ*. El sensor de temperatura CS y RTD cumplen con los requisitos sanitarios (normativa sanitaria 3A, Inc. 74-03). El electrodo de pH y el soporte del electrodo de pH también cumplen con los estándares EHEDG (European Hygienic Engineering Design Group). En consecuencia, se puede inferir que el dispositivo puede ser apto para el uso en línea de la elaboración del queso.

Hay que mencionar también el uso de este dispositivo en el proceso de desarrollo de yogures "set-type", que nos ha permitido estudiar la influencia de las variables temperatura y de concentración de diferentes aditivos de suero sobre el tiempo de gelificación y consistencia. El modelo obtenido nos permite predecir con precisión el tiempo de gelificación en un cierto rango de variables (datos no publicados).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen el apoyo financiero para este trabajo al INTEC-UNL-CONICET. Agradecemos al Dr. Mario Chiovetta su valiosa ayuda. Agradecemos también a Milkaut S.A. y a la Cooperativa Tambara y Agropecuaria Nueva Alpina Ltda. por proveer las muestras de leche.

## BIBLIOGRAFÍA

- BENGUIGUI, L.; EMERY, J.; DURAND, D.; BUSNEL, J.P. 1994. Ultrasonic study of milk clotting. *Lait* (74), 197–206.
- BYNUM, D.G.; OLSON, N.F. 1982. Influence of curd firmness at cutting on cheddar cheese yield and recovery of milk constituents. *J Dairy Sci* (65), 2281–2290.
- FAGAN, C.C.; LEEDY, M.; CASTILLO, M.; PAYNE, F.A.; O'DONNELL, C.P.; O'CALLAGHAN, D.J. 2007a. Development of a light scatter sensor technology for on-line monitoring of milk coagulation and whey separation. *J Food Eng* 83(1), 61–67.
- FAGAN, C.C.; CASTILLO, M.; PAYNE, F.A.; O'DONNELL, C.P.; LEEDY, M.; O'CALLAGHAN, D.J. 2007b. Novel online sensor technology for continuous monitoring of milk coagulation and whey separation in cheesemaking. *J Agric Food Chem* (55), 8836–8844.
- FAGAN, C.C.; CASTILLO, M.; O'DONNELL, C.P.; O'CALLAGHAN, D.J.; PAYNE, F.A. 2008. On-line prediction of cheese making indices using backscatter of near infrared light. *International Dairy Journal* (18), 120–128.
- FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MC SWEENEY, P.L.H. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- HATFIELD, D.S. 1981. A new instrument to measure cheese curd rigidity, and preliminary trials in cheesemaking. *J of Society of Dairy Technology* (34), 139–142.
- HORI, T. 1985. Objective Measurements of the Process of Curd Formation during Rennet Treatment of Milks by the Hot Wire Method. *J Food Sci* (50), 911–917.
- IMAFIDON, G.I.; FARKYE, N.Y. 1993. Rennet coagulability of high-heat treated milk influenced by time of pH adjustment. *J Food Sci* 58 (6), 1300–1302.
- KOPELMAN, I.J.; COGAN, U. 1975. Determination of clotting powder of milk clotting enzymes. *J Dairy Sci* (59), 196–199.
- KOWALCHYK, A.W.; OLSON, N.F. 1978. Firmness of enzymatically-formed milk gels measured by resistance to oscillatory deformation. *J Dairy Sci* (61), 1375–1379.
- LUCEY, J.A. 2002. Formation and Physical properties of milk protein gels. *J Dairy Sci* (85), 281–294.
- MARSHALL, R.J.; HATFIELD, D.S.; GREEN, M.L. 1982. Assessment of two instruments for continuous measurement of the curd-firming of renneted milk. *J Dairy Research* (49), 127–135.
- MARTIN, G.J.O.; WILLIAMS, R.P.W.; CHOONG, C.; LEE, B.; DUNSTAN, D.E. 2008. Comparison of rennet gelation using raw and reconstituted skim milk. *International Dairy Journal* (18), 1077–1080.
- MATEO, M.J.; O'CALLAGHAN, D.J.O.; EVERARD, C.D.; CASTILLO, M.; PAYNE, F.A.; O'DONNELL, C.P. 2009. Validation of curd-syneresis sensor over a range of milk composition and process parameters. *J Dairy Sci* (92), 5386–5395.
- MC MAHON, D.J.; BROWN, R.J. 1982. Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. *J Dairy Sci* (65), 1639–1642.
- NOEL, Y.; BELLON, J.L.; HENRY, J.-M.; CERF, O.; PAIN, J.P.; ANTONINI, G. Process and device for investigating and controlling

- changes of state of a liquid or gelatinized medium by differential thermal analysis. INRA Patents FR2626371 (B1); WO8906794 (A1); US5064294 (A); NZ227709 (A); JPH03503449 (A); F191330 (B); F191330 (C); EP0389568 (A1); EP0389568 (B1); DK175990 (A); CA1297178 (C); AU2940489 (A).
- O'CALLAGHAN, D.J.; O'DONNELL, C.P.; PAYNE, F.A. 2000. On-line sensing techniques for coagulum setting in renneted milks. *J Food Eng* (43), 155–165.
- O'CALLAGHAN, D.J.; O'DONNELL, P.O.; PAYNE, F.F. 2002. Review of systems for monitoring curd setting during cheesemaking. *J Dairy Technology* (55), 65–74.
- OKIGBO, L.M.; RICHARDSON, G.H.; ERNSTROM, C.A. 1985. Interactions of calcium, pH, temperature and chymosin during milk coagulation. *J Dairy Sci* (68), 3135–3142.
- PASSOS, E.F.; MONTEIRO, P.S.; OLIVEIRA, R.C.; MARTINS, J.G.O.; ALVES, H.G.; BRANDÃO, S.C.C. 1999. Predicting the cutting time of coagulating milk for cheese production using a heated thermistor. *J Food Sci* 64(5), 879–882.
- RAMET, J.P.; WEBER, F. 1980. Influence of environmental factors on the enzymatic coagulation of reconstituted milk. *Lait* (60), 1–13.
- RICHARDSON, G.H.; OKIGBO, L.M.; THORPE, J.D. 1985. Instrument for measuring milk coagulation in cheese vats. *J Dairy Sci* (68), 32–36.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; COUTAZ, R.; MARTÍNEZ, E. 2002. Optimizing processing conditions for milk coagulation using the hot wire method and response surface methodology. *J Food Sci* 67(3), 1097–1102.
- SBODIO, O.A.; TERCERO, E.J.; MARTINEZ, E.D.; DIDIER, M.J.J.; REVELLI, G.R. 2013. Caracterización de la coagulación enzimática de leche en polvo entera. *Revista Argentina de Producción Animal* 33(2), 117–128.
- SCOTT, A.W. 1974. *Cooling of Electronic Equipment*. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc.
- SENSOR MAGAZINE. 2003. 52.
- SPELLS, K.E. 1961. The Thermal Conductivities of Some Biological Fluids. *Physics in Medicine and Biology*. 5(2), 139–153.
- STATGRAPHICS PLUS version 7.1. 1994. Users guide reference. Statistical Graphics Corp., Manguistics Inc., México, DF 63–73.
- STORRY, J.E.; FORD, G.D. 1982. Some factors affecting the post clotting development of coagulum strength in renneted milk. *J Dairy Research* (49), 469–477.
- TAIFI, N.; BAKKALI, F.; FAIZ, B.; MOUDDEN, A.; MAZE, G.; DÉCULTOT, D. 2006. Characterization of the syneresis and the firmness of the milk gel using an ultrasonic technique. *Meas Sci Tech* (17), 281–287.
- TOMASOW, J.; VOSS, E. 1977. Methods for the determination of firmness of milk coagulum. *IDF Bulletin N° 99*. International Dairy Federation. Bruselas.
- TARODO DE LA FUENTE, B.; CUQU, J.L.; LABLÉE, J. 1999. Le lait-coagulation et synérèse. *Ind Aliment Agric* (116), 19–26.
- USTUNOL, Z.; HICKS, C.L. 1990. Effect of a coagulation monitoring device on experimental cheese yield. *J Dairy Sci* (73), 1–7.
- VAN HOOYDONK, A.C.M.; BOERRIGTER, I.J.; HAGEDOORN, H.G. 1986. pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Netherlands Milk Dairy J* (40), 297–313.
- VAN HOOYDONK, A.C.M.; VAN DEN BERG, G. 1988. Control and determination of the curd-setting during cheesemaking. *IDF Bulletin N° 225*. International Dairy Federation. Bruselas.