

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO*



**CONSERVACIÓN DE CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS MEDIANTE LA
APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS**

presentado por

BLANCA MARTÍNEZ INDA

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

Junio 2018

RESUMEN

La caseína constituye el 80 % del total de las proteínas de la leche de vaca, esta proteína se encuentra dispersa en la leche formando agregados coloidales denominados micelas. La caseína micelar tiene múltiples aplicaciones alimentarias debido a sus propiedades tecnológicas (retención de agua, propiedades emulsionantes y espumantes) y su alto valor nutricional.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de dos tratamientos térmicos de pasteurización (*High Temperature-Short Time* y *Low Temperature-Long Time*) en dispersiones de caseína micelar a dos concentraciones, 4 % y 8 %. Se determinarán sus propiedades físico-químicas (pH, acidez, color, estabilidad de la dispersión) y su estabilidad microbiológica (mesófilos y psicrótrofos) para en último término aumentar su vida útil sin afectar significativamente a sus propiedades físico-químicas.

El efecto de ambos tratamientos térmicos, tanto en la estabilidad físico-química como en la estabilidad microbiológica, es similar para las dos concentraciones de caseína micelar. Las propiedades físico-químicas apenas se ven afectadas tras los tratamientos manteniéndose estables tras 7 días de almacenamiento a 10 °C. La carga microbiana de mesófilos disminuyó considerablemente en comparación con las muestras no tratadas termicamente obteniéndose valores inferiores a 10^5 UFC/ml tras 7 días de almacenamiento a 10 °C. Respecto a los psicrótrofos no hubo apenas desarrollo en las muestras tratadas térmicamente.

Palabras clave: caseína micelar, tratamientos térmicos, pasteurización, tiempo, temperatura, estabilidad físico-química, estabilidad microbiológica

ABSTRACT

Casein constitutes 80% of the total proteins of cow's milk, this protein is dispersed in the milk forming colloidal aggregates named micelles. Micellar casein has multiple food applications due to its technological properties (water retention, emulsifying and foaming properties) and its high nutritional value.

The objective of this work is to evaluate the effect of two pasteurization thermal treatments (*High Temperature-Short Time* and *Low Temperature-Long Time*) in dispersions of micellar casein at two concentrations, 4% and 8%. Its physico-chemical properties (pH, acidity, color, stability of the dispersion) and its microbiological stability (mesophiles and psychrotrophs) will be determined in order to increase its shelf life without significantly affecting its physico-chemical properties.

The effect of both heat treatments, in term of physico-chemical stability and microbiological stability, is similar for the two concentrations of micellar casein. The physico-chemical properties are hardly affected after the treatments, remaining stable after 7 days of storage at 10 °C. The microbial load of mesophiles decreased considerably compared to not heated samples, obtaining values lower than 10^5 CFU / ml after 7 days of storage at 10 °C. Regarding the psychrotrophs, there was hardly any development in the heated samples.

Key words: casein micelle, heat treatments, pasteurization, time, temperature, physico-chemical stability, microbiological stability

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Leche	7
1.2. Proteínas lácteas	8
1.2.1. Caseínas.....	9
1.2.2. Proteínas del suero	13
1.2.4. Empleo de las proteínas lácteas.....	13
1.3. Conservación de la leche	16
1.3.1. Estabilidad microbiológica de la leche.....	16
1.3.2. Los tratamientos térmicos empleados en la industria láctea	16
1.3.3. Efecto de los tratamientos térmicos en la estabilidad fisico-química de la leche.....	18
2. OBJETIVOS	21
3. PLAN EXPERIMENTAL	21
4. MATERIAL Y MÉTODOS	22
4.1. Aislado de proteína de leche (Caseína micelar).....	22
4.2. Reconstitución del aislado de proteína de leche (Caseína micelar).....	22
4.3. Tratamiento térmico del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)	23
4.4. Caracterización fisico-química del aislado de proteína de leche (Caseína micelar).....	23
4.4.1. pH y acidez.....	23
4.4.2. Color.....	24
4.4.3. Caracterización de la dispersión con Turbiscan®	25
4.4.4. Tamaño de partícula y potencial ζ	26
4.5. Análisis microbiológico del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)	26
4.6. Análisis estadístico	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29

5.1. Caracterización inicial del aislado de proteína de leche (Caseína micelar).....	29
5.2. Tratamientos térmicos del aislado de proteína de leche (Caseína micelar).....	31
5.2.1. Efecto de los tratamientos térmicos en la estabilidad físico-química del aislado de proteína de leche (Caseína micelar).....	33
5.2.2. Efecto de los tratamientos térmicos en la estabilidad microbiológica del aislado de proteína de leche (Caseína micelar).....	42
6. CONCLUSIONES.....	45
7. BIBLIOGRAFÍA.....	46
8. ANEXO: Ficha técnica del aislado de proteína de leche PRODIET87 B.....	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las principales propiedades de los dos grupos de proteínas lácteas.	8
Tabla 2. Contenido en caseína de la leche bovina.	9
Tabla 3. Concentración de las proteínas del suero en la leche de vaca (g/l), sus funciones biológicas y algunas aplicaciones.....	13
Tabla 4. Algunas de las principales aplicaciones de los concentrados de proteína de leche (MPCs).	15
Tabla 5. Tratamientos térmicos más empleados en la industria láctea.....	17
Tabla 6. Parámetros de termorresistencia de los microorganismos de referencia empleados en la pasteurización de la leche.	18
Tabla 7. Composición química del aislado de proteína de leche Prodiel 87 B.....	22
Tabla 8. Valores de pH y color en la caseína micelar al 4 % (CM-4 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a dos temperaturas (T) de almacenamiento (4 °C y 10 °C).....	29
Tabla 9. Valores de pH en la caseína micelar al 8 % (CM-8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a dos temperaturas (T) de almacenamiento (4 °C y 10 °C).....	30
Tabla 10. Valores de P obtenidos en cada microorganismo de referencia mediante los dos ensayos de tratamiento térmico para la dispersión de CM a diferentes concentraciones.....	32
Tabla 11. Condiciones de los dos ensayos de tratamiento térmico.....	33
Tabla 12. P-valores de los parámetros estudiados respecto a los factores tratamiento y tiempo obtenidos mediante un ANOVA de los datos de la CM-4 %.	33
Tabla 13. P-valores de los parámetros estudiados respecto a los factores tratamiento y tiempo obtenidos mediante un ANOVA de los datos de la CM-8 %.	34
Tabla 14. Valores de pH de la caseína micelar (CM) con dos concentraciones distintas (4 y 8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) almacenadas a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados.....	34
Tabla 15. Coordenadas de color (L*, a*, b*) de la caseína micelar al 4 % (CM-4 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) almacenadas a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados.....	36

Tabla 16. Coordenadas de color (L^* , a^* , b^*) de la caseína micelar al 8 % (CM-8 %) a tiempo 0 (t_0) y transcurridos 7 días (t_7) almacenadas a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados	36
Tabla 17. Turbiscan Stability Index (TSI) de la parte baja, media y alta de la muestra para el Control y los dos tratamientos (HTST y LTLT).....	37
Tabla 18. Potencial ζ de la CM-4 % a tiempo 0 y tiempo 7 para el Control y los dos tratamientos.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición química promedio (%) de la leche bovina.....	7
Figura 2. Empleo de leche en la elaboración de productos alimentarios.....	8
Figura 3. Micela de caseína compuesta por submicelas ricas en κ -caseína en la parte externa y submicelas pobres en κ -caseína en la parte interior unidas mediante fosfato de calcio.	12
Figura 4. Modelo nanocluster de Holt (A) y modelo de doble unión de Horne (B).	12
Figura 5. Número de nuevos productos lanzados al mercado en 2013 que incorporan MPCs (azul) y MPIs (rojo) como ingrediente.....	15
Figura 6. Cambios en el color de la leche tras el tratamiento térmico a 100 °C/3min. Leche sin tratar (izquierda) y leche tratada (derecha).....	19
Figura 7. Fenómenos de desestabilización de una dispersión.	20
Figura 8. Esquema del plan experimental.	21
Figura 9. Agitación de 3 muestras de caseína micelar (A) y sonicación de una muestra de caseína micelar en el ultrasonidos (B).....	22
Figura 10. Baño UNITRONIC-ORBITAL 6032011 (A), muestras en el interior del baño (B) y bandeja con hielo y agua para enfriar las muestras (C).....	23
Figura 11. Sistema de titulación HI901C1 Potentiometric Titrator, a la izquierda se encuentra el reactivo de NaOH 0,1 N y a la derecha la muestra con el sensor de temperatura, el electrodo de pH y el agitador.	24
Figura 12. Espacio de color CIELAB en el que se representa la luminosidad (L^*), las coordenadas cromáticas (a^* y b^*) (A) y la diferencia total de color (ΔE^*); espectrofotómetro y cubeta con la muestra (B) y la muestra tapada con un vaso blanco de cata (C).....	25
Figura 13. Turbiscan® LAB.....	25
Figura 14. Celda cilíndrica de vidrio con 20 ml de muestra.	25
Figura 15. Interpretación de una gráfica obtenida mediante Turbiscan en la que se observan distintos fenómenos de desestabilización física. A la izquierda se representa la celda de vidrio sobre la que se ha realizado el análisis.....	26
Figura 16. Perlitas de vidrio empleadas en la siembra en superficie empleadas para extender el inóculo y placa sembrada mediante este método (A), sembradora automática y placa sembrada en espiral mediante el método de siembra automática (B).	27
Figura 17. Plantilla de recuento de la siembra en espiral.....	27

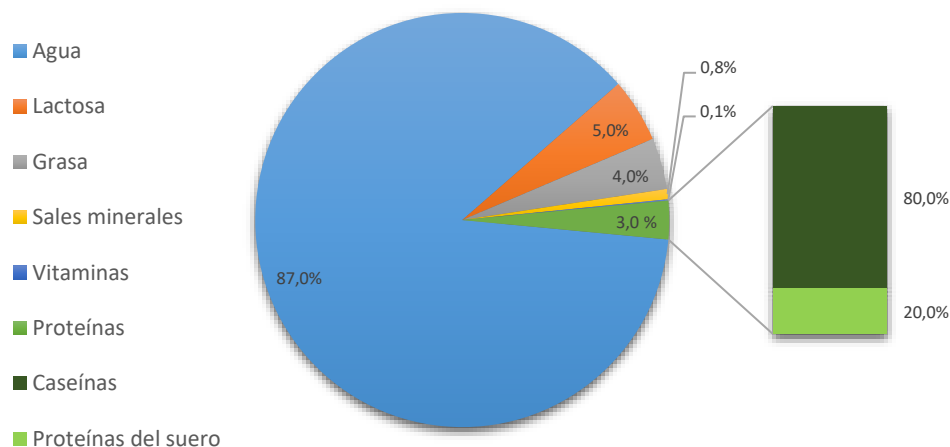
<i>Figura 18. Logaritmo de la carga microbiana (C) de mesófilos y psicrótrofos en la caseína micelar al 4 % (CM-4 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a dos temperaturas (T) del almacenamiento (4 °C y 10 °C).</i>	30
<i>Figura 19. Logaritmo de la carga microbiana (C) de mesófilos y psicrótrofos en la caseína micelar al 8 % (CM-8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a dos temperaturas (T) del almacenamiento (4 °C y 10 °C).</i>	31
<i>Figura 20. Curva de penetración de calor en el tratamiento HTST para la CM-4 %.</i>	32
<i>Figura 21. Curva de penetración de calor en el tratamiento LTLT para la CM-4 %.</i>	32
<i>Figura 22. Acidez expresada en g de ácido láctico/100 ml de la caseína micelar (CM) con dos concentraciones distintas (4 y 8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) almacenadas a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados.</i>	35
<i>Figura 23. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-4 % a t7 para el Control.</i>	38
<i>Figura 24. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-8 % a t7 para el Control.</i>	38
<i>Figura 25. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-4 % a t7 para el tratamiento HTST.</i>	39
<i>Figura 26. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-8 % a t7 para el tratamiento HTST.</i>	39
<i>Figura 27. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-4 % a t7 para el tratamiento LTLT.</i>	39
<i>Figura 28. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-8 % a t7 para el tratamiento LTLT.</i>	40
<i>Figura 29. Tamaño de partícula (nm) de la CM-4 % a tiempo 0 y tiempo 7 para el Control y los dos tratamientos.</i>	40
<i>Figura 30. Polidispersión de la CM-4 % a tiempo 0 y 7 para el Control y los dos tratamientos.</i>	41
<i>Figura 31. Logaritmo de la carga microbiana (C) de mesófilos en la caseína micelar (CM) con dos concentraciones distintas (4 y 8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados.</i>	42
<i>Figura 32. Placas de Petri con 4 diluciones consecutivas para el recuento de microorganismos mesófilos a tiempo 7 del tratamiento HTST en la muestra CM-4 % (A) y CM-8 % (B).</i>	43
<i>Figura 33. Placas de Petri con 4 diluciones consecutivas para el recuento de microorganismos mesófilos a tiempo 7 del tratamiento LTLT en la muestra CM-4 % (A) y CM-8 % (B).</i>	43
<i>Figura 34. Placas de Petri con 4 diluciones consecutivas para el recuento de psicrótrofos de la CM-8 % a tiempo 7 del Control (A), del tratamiento HTST (B) y del tratamiento LTLT (C).</i>	44

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leche

La leche es un alimento complejo desde el punto de vista de su composición físico-química, se trata de una solución que consiste en una emulsión de glóbulos grasos en una fase acuosa. Esta fase acuosa tiene distintos componentes en disolución y en suspensión como las micelas de caseína, las proteínas del suero, la lactosa, los minerales y las vitaminas (Raikos et al, 2010). En esta solución se encuentran dispersas partículas coloidales de tres rangos de tamaño; las partículas más grandes son las proteínas del suero que se encuentran disueltas en la fase acuosa, con un menor tamaño están las caseínas dispersas como grandes agregados coloidales de entre 50 y 500 nm denominados micelas, por último se encuentran los lípidos emulsificados en grandes glóbulos de entre 1 y 20 μm . La leche es secretada por los mamíferos con la función de alimentar al neonato suministrándole todos sus requerimientos nutricionales, además de cubrir otros requerimientos de defensa y fisiológicos (Fox, 2008).

Los componentes principales de la leche son agua, lípidos, azúcar (lactosa) y proteínas. Otros componentes minoritarios son los minerales, las vitaminas, las hormonas y las enzimas. La concentración en la que se presentan los principales componentes de la leche varía ampliamente entre las distintas especies dependiendo principalmente de las necesidades de energía y la tasa de crecimiento del neonato, de este modo los lípidos varían en un rango de 2 a 55 %, la lactosa de un 0 a un 10 % y las proteínas de 1 a 20 % (Fox, 2008). Los factores de variación de la composición química de la leche son principalmente la especie y genética del animal, las condiciones ambientales, la etapa de lactancia y el estado nutricional del animal. La leche bovina (Figura 1) está compuesta en promedio de un 87 % de agua, entre un 4-5 % de lactosa, 3 % de proteína, entre un 3-4 % de grasa, 0,8 % de minerales y 0,1 % de vitaminas (Pereira, 2014).

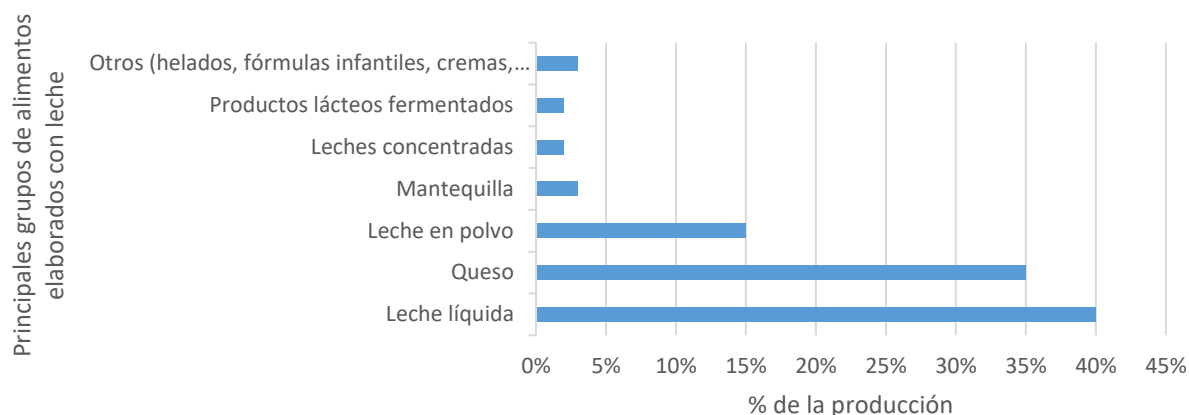


Fuente: Pereira, 2014

Figura 1. Composición química promedio (%) de la leche bovina.

La vaca es la especie lechera más importante ya que supone el 85 % del total de la producción de leche, otras especies importantes son el búfalo con un 11 %, la cabra con un 2 % y la oveja con un 2 %. Existen otras especies que son importantes en determinadas regiones o por ciertos propósitos como el camello, el yak o el caballo (Fox, 2008).

El procesado de la leche es practicado a nivel mundial especialmente en Europa y Norte América, la leche es una materia prima a partir de la cual pueden fabricarse un amplio rango de productos diferentes (Fox, 2008). Los principales grupos de productos alimentarios fabricados a partir de leche se muestran en la Figura 2.



Fuente: Fox, 2008

Figura 2. Empleo de leche en la elaboración de productos alimentarios.

1.2. Proteínas lácteas

La leche es generalmente considerada como una fuente importante de proteínas aportando aproximadamente 32 g de proteína/l (Pereira, 2014). Las proteínas presentes en la leche se dividen según su estado de dispersión en dos grandes grupos, las caseínas que representan el 80 % del total y las proteínas del suero que suponen el 20 % restante (Figura 1). Ambos grupos de proteínas se encuentran estabilizados por diferentes mecanismos y su separación puede realizarse de forma sencilla empleando parámetros como el pH, la temperatura y la fuerza iónica, también pueden emplearse sustancias como la urea (Badui Dergal, 2006). Para separar las fracciones proteicas es preferible emplear leche desnatada ya que la grasa se encuentra ocluida en la caseína isoelectrica e interfiere en este proceso (Fox, 2008).

Tabla 1. Comparación de las principales propiedades de los dos grupos de proteínas lácteas.

Propiedad	Caseínas	Proteínas del suero
Solubilidad a pH 4.6	Insolubles	Solubles
Estabilidad térmica	Alta, resiste a 140 °C para un máximo de 20-25 min a pH 6,7	Se desnaturalizan completamente si permanecen a 90 °C durante 10 min.
Composición en aminoácidos	Altos niveles de prolina y están fosforiladas	Las principales proteínas del suero no están fosforiladas
Cantidad de azufre	Baja (0.8 %)	Relativamente alta (1.7 %)
Lugar de biosíntesis	Glándula mamaria	Glándula mamaria y procedentes de la sangre
Estado físico en la leche	Grandes agregados conocidos como micelas (masa de $\approx 10^8$ Da y compuesto por unas 5000 moléculas)	Monómeros o pequeñas estructuras cuaternarias

Fuente: Fox, 2008

1.2.1. Caseínas

Las caseínas se definen como las fosfoglicoproteínas (contienen residuos de hidratos de carbono y de fosfatos) de la leche que precipitan a 20 °C y pH 4,6. Prácticamente todas las caseínas se encuentran formando micelas aunque una pequeña parte se encuentra en solución. La estabilidad de estas proteínas en la leche, como se describe posteriormente en las características, se debe a su fuerte carga eléctrica negativa (Badui Dergal, 2006). Las moléculas de caseína tienen carga negativa a pH neutro, cuando el medio se acidifica éstas van uniéndose a protones perdiendo cada vez más carga negativa hasta tener una carga neutra a su pH isoelectrico (4,6). A este pH la solubilidad de las micelas de caseína es mínima y se agregan (Broyard et al., 2015). Existen varias técnicas para separar las caseínas del resto de proteínas, algunas de ellas son: precipitación isoelectrica a 20 °C y pH \approx 4,6, ultracentrifugación, métodos de salazón, ultrafiltración y microfiltración, filtración de gel, precipitación con etanol, crioprecipitación, coagulación y formación del cuajo, formación de caseinatos (Fox, 2008).

Se distinguen cuatro tipos principales de caseína denominados α , β y γ . A su vez la α -caseína puede dividirse en proteínas sensibles al calcio o α_s -caseínas, que a su vez se dividen en α_{s1} -caseínas y α_{s2} -caseínas, y en proteínas no sensibles al calcio κ -caseínas. Estas últimas representan aproximadamente el 12 % de la caseína total y son las responsables de la formación y estabilidad de las micelas de caseína (Fox, 2008).

Tabla 2. Contenido en caseína de la leche bovina.

	g/l	% de la proteína total
Proteína total	33,0	100,0
Caseína	26,0	79,5
α_{s1}	10,0	30,6
α_{s2}	2,6	8,0
β	9,3	28,4
κ	3,3	10,1

Fuente: Raikos et al, 2010

- α_{s1} -caseína: es la que se encuentra en mayor proporción en la leche de vaca y está compuesta por 199 aminoácidos con 8 o 9 grupos fosfato. Esta caseína tiene una zona muy polar donde se encuentran todos sus grupos fosfato menos uno lo que le aporta una carga neta negativa al pH de la leche, posee dos regiones hidrofóbicas dos de ellas en los extremos. Tiene pocas zonas con estructura secundaria organizada (Quispe Guachalla, 2010).
- α_{s2} -caseína: tiene un total de 207 aminoácidos y es más hidrofílica que la α_{s1} -caseína. Tiene tres regiones con carga negativa, una de ellas en el extremo N-terminal. En el extremo C-terminal se encuentran aminoácidos hidrofóbicos y con carga neta positiva (Quispe Guachalla, 2010).
- β -caseína: de estructura flexible está compuesta por 209 aminoácidos y carece de enlaces covalentes cruzados internos como los enlaces disulfuro. Esta caseína tiene propiedades tecnológicas en el diseño de alimentos al ser un buen surfactante y estabilizador, además puede emplearse como precursora para producir péptidos bioactivos con propiedades opioides, antihipertensivas o de unión a minerales (Post et al., 2012).
- κ -caseína: es la única caseína glicosilada (Fox, 2008) y también la única soluble en presencia de iones de calcio. Es considerada un péptido bioactivo y se comercializa en forma de suplementos con diferentes

propiedades (anticarcinogénicos, reguladores de la presión arterial alta, antimicrobianos...). Su desestabilización enzimática es la base para la elaboración de yogures y quesos (Guevara-Garay et al., 2014).

- γ -caseína: se trata de una mezcla de tres fracciones obtenidas de la hidrólisis parcial de la zona más hidrófila de la caseína β (Badui Dergal, 2006).

Las micelas de caseína tienen forma esférica con un diámetro de entre 50 y 500 nm y una masa comprendida entre $1 \cdot 10^6$ y $3 \cdot 10^9$ Da. Las micelas enlazan aproximadamente 2 g de agua/g de proteína y se pueden encontrar entre 10^{14} y 10^{16} micelas/ml de leche. La materia seca de las micelas se compone aproximadamente de un 94 % de proteínas y un 6 % de especies de bajo peso molecular, principalmente fosfato de calcio con algo de magnesio, citrato y cantidades traza de otras especies. Estas especies de bajo peso molecular presentes en la leche se denominan de forma conjunta fosfato de calcio coloidal (*colloidal calcium phosphate*, CCP), la solubilidad del CCP aumenta al disminuir el pH siendo totalmente soluble cuando el pH es 4,9 (Fox, 2008). El CCP permite transportar el calcio y el fósforo, función principal de las micelas de caseína (Guevara-Garay et al., 2014), ya que mediante su formación es posible solubilizar cantidades mucho más altas de calcio y fosfato (Fox, 2008).

A continuación se describen las características físico-químicas de las caseínas:

- Estabilidad: las caseínas mantienen una carga negativa que las estabiliza al repelerse entre ellas. Esta carga se debe a su alto contenido en ácidos glutámico y aspártico cuyos grupos carboxilo se encuentran ionizados al pH de la leche (6,7) (Badui Dergal, 2006). La coagulación de la caseína es causada por cambios provocados por el calor como la desfosforilación de las caseínas, el descenso del pH debido a la pirolisis de lactosa a ácidos, la precipitación del fosfato de calcio soluble en las micelas... Las micelas son estables a la compactación por lo que pueden ser sedimentadas mediante ultracentrifugación y ser redispersadas por una agitación suave, también son estables a la homogeneización comercial y a concentraciones de Ca^{2+} hasta al menos 200 mM a temperaturas de hasta 50 °C. Las micelas se desestabilizan en la congelación debido a la disminución del pH y el incremento en la concentración de Ca^{2+} en la fase de leche no congelada (Fox, 2008).
- Resistencia a los tratamientos térmicos: todas las caseínas, a excepción de la κ -caseína, carecen prácticamente de estructura secundaria y tienen una conformación al azar debido a la presencia del aminoácido prolina. Son por tanto “proteínas desnaturalizadas de origen” por lo que son resistentes a tratamientos térmicos severos al no sufrir desnaturalización (Badui Dergal, 2006).
- Alta hidrofobicidad superficial: en el interior de su estructura primaria tienen zonas apolares debido a su mayor contenido en aminoácidos hidrófobos que en hidrófilos (Badui Dergal, 2006). Al carecer de estructura secundaria y terciaria estable, la mayor parte de sus residuos hidrófobos están expuestos (Fox, 2008).
- Estructura anfipática: los residuos hidrófobos e hidrófilos no se encuentran distribuidos de forma uniforme en la secuencia de aminoácidos que constituye las caseínas (Fox, 2008).

- Buena actividad superficial y buenas propiedades espumantes y emulsionantes: la característica anterior junto con su estructura molecular flexible y abierta hacen de la caseína una proteína funcional con muchas aplicaciones (Fox, 2008).
- Alto volumen específico: las caseínas, debido a su estructura abierta, poseen un alto volumen específico por lo que forman soluciones altamente viscosas (Fox, 2008).
- Fuerte tendencia a agregarse: esta característica se debe principalmente al enlace hidrofóbico y dificulta el fraccionamiento de las caseínas por lo que se requiere de un agente de disociación como urea o dodecilsulfato sódico (SDS). La tendencia de las caseínas a asociarse es importante para algunas aplicaciones funcionales y para la formación y estabilización de las micelas de caseína (Fox, 2008).
- Tienen regiones cargadas mediante las que pueden unirse electrostáticamente y regiones fosforiladas que facilitan sus interacciones con el calcio. (Badui Dergal, 2006) Las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β tienen un alto contenido de grupos fosfato por lo que tienen una fuerte tendencia para unir iones metálicos, principalmente iones de calcio (Ca^{2+}). Estas tres proteínas representan de forma aproximada el 85 % del total de caseínas y son insolubles a concentraciones de calcio superiores a $\approx 6 \text{ Mm}$ para temperaturas inferiores a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. En cambio, la κ -caseína contiene únicamente un grupo orgánico de fosfato que se une al calcio débilmente y es soluble para todas las concentraciones de calcio encontradas en los productos lácteos (Fox, 2008).

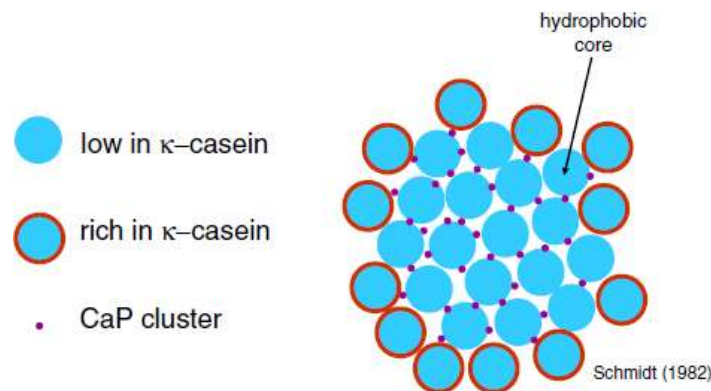
La estructura de las micelas de caseína tiene que ver con 3 funciones biológicas:

- 1) Permiten que la glándula mamaria no calcifique al secretar grandes cantidades de calcio y fosfato.
- 2) Secreción segura en la glándula mamaria de altas concentraciones de proteínas de caseína fibrinógenas.
- 3) Digestión y absorción de los nutrientes mediante la retención de las micelas en el estómago del recién nacido (Holt et al., 2013).

Para poder emplear las caseínas en la elaboración de productos lácteos resulta fundamental conocer su estructura ya que en ella se ven reflejadas sus propiedades tecnológicas (Ferrandini et al., 2008). Existen varios modelos acerca de la estructura de las micelas de caseína, estos modelos se fundamentan en las principales características observadas en las micelas y en la caracterización individual de las caseínas. Los tres principales modelos son el de la submicela de Slattery, Evard y Schmidt; el modelo nanocluster de Holt y el modelo de doble unión propuesto por Horne (Horne, 2008).

El modelo de la submicela propone que las caseínas están compuestas por submicelas unidas entre sí mediante CCP, lo que proporciona a la micela una estructura abierta y porosa (Fox, 2008). Las submicelas consisten en un grupo de entre 15 y 20 caseínas unidas mediante interacciones hidrofóbicas (Horne, 2006). Según este modelo las regiones polares de las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β están orientadas hacia el exterior de la micela para reducir la repulsión electrostática de los grupos colindantes cargados y cada submicela está rodeada de una capa de κ -caseína, estando toda la micela rodeada por esta caseína. Existen variantes de este modelo, por ejemplo algunos autores difieren en esta última suposición y sugieren que las submicelas no

están recubiertas completamente de esta caseína (Fox, 2008). Otras variantes proponen la existencia de dos tipos principales de submicelas (Figura 3) por un lado las submicelas compuestas por caseínas con abundante κ -caseína se encuentran en la superficie de la micela mientras que aquellas con menor cantidad de κ -caseína o que carecen de ella se colocan en el interior (Horne, 2006).

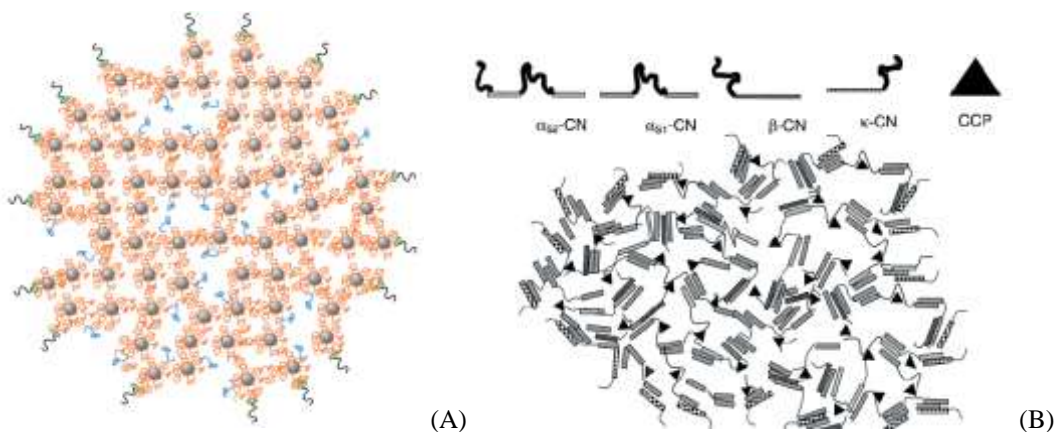


Fuente: De Kruijff et al., 2012

Figura 3. Micela de caseína compuesta por submicelas ricas en κ -caseína en la parte externa y submicelas pobres en κ -caseína en la parte interior unidas mediante fosfato de calcio.

En el modelo nanocluster de Holt (Figura 4A) la micela consiste en un entramado flexible de caseína fuertemente hidratado y mineralizado con forma aproximadamente esférica. Las moléculas de caseína forman una estructura gelatinosa con nanogránulos (nanoclusters) de CCP (representados como esferas grises en la Figura 4A) que constituyen el centro de crecimiento de la micela. La κ -caseína se encuentra en el exterior de la superficie micelar y la β -caseína se une a los nanogránulos estabilizándolos y regulando su tamaño.

El modelo de doble unión propuesto por Horne (Figura 4B) defiende que la responsable de la polimerización y estructura de las micelas de caseína se debe a la naturaleza anfifílica de éstas. La cohesión y estabilidad de las micelas se consigue principalmente mediante dos tipos de uniones, las interacciones hidrofóbicas y las repulsiones de tipo electrostático. Según este modelo el CCP puede extraerse de las micelas de caseína mediante acidificación de la leche sin provocar alteraciones en la estructura de la micela (Ferrandini et al., 2008).



Fuente: Dalgleish y Corredig, 2012 (A), Ferrandini et al., 2008 (B)

Figura 4. Modelo nanocluster de Holt (A) y modelo de doble unión de Horne (B).

1.2.2. Proteínas del suero

Las proteínas del suero son proteínas globulares con estructuras secundarias y terciarias bien definidas (Anema, 2008). Las funciones y el uso de las principales proteínas del suero se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de las proteínas del suero en la leche de vaca (g/l), sus funciones biológicas y algunas aplicaciones.

Proteínas del suero	Concentración en la leche de vaca (g/l) (Pereira, 2014)	Función/Uso
α - Lactoalbúmina	1,2	Producción de lactosa, transporte de calcio, inmunomodulador; anticarcinógeno (Pereira, 2014)/ Suele emplearse purificada para la elaboración de fórmulas infantiles para lactantes (Hernández-Rojas et al., 2014).
β -Lactoglobulina	3,2	Unión de ácidos grasos y retinol; posible antioxidante (Pereira, 2014)/ Buenas propiedades termogelificantes que determinan la gelificación de los concentrados de proteína del suero (WPCs). (Fox, 2008)
Inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgE, IgG)	0,7	Protegen la mucosa intestinal de los microorganismos patógenos (Edwards et al., 2008)
Albumina sérica	0,4	Transporte de ácidos grasos (Badui Dergal, 2006), prevención del cáncer, función antimutagénica (Hernández-Rojas et al., 2014)
Lactoferrina	0,1	Antimicrobiano, antioxidante, inmunomodulador, absorción de hierro, anticancerígeno (Pereira, 2014)/ Nutracéuticos en suplementos para la salud, formulas infantiles, alimentos para animales, productos para el cuidado bucal...(Edwards et al., 2008)
Lactoperoxidasa	0,03	Antimicrobiano (Pereira, 2014)
Lisozima	0,0004	Antimicrobianos, acciones de sinergia con inmunoglobulinas y lactoferrina (Pereira, 2014)

1.2.4. Empleo de las proteínas lácteas

Las proteínas lácteas son una fuente de aminoácidos con alta biodisponibilidad lo que las hace un ingrediente potencial para el desarrollo de alimentos funcionales. Estas proteínas son comúnmente utilizadas en alimentos diseñados para las necesidades nutricionales de un grupo específico de la población como las fórmulas infantiles, los alimentos para deportistas y los destinados a la tercera edad.

Algunas características beneficiosas de las proteínas lácteas son las siguientes:

- Son ingredientes ideales para el diseño de alimentos para bajar de peso y tienen un efecto saciante.

- Aportan lisina biodisponible por lo que son un buen complemento a los cereales.
- Algunas de las proteínas lácteas como la lactoferrina o las inmunoglobulinas y los péptidos tienen funciones fisiológicas (propiedades antibacterianas, modulación de la motilidad gastrointestinal, actividad antitrombótica...) (Moughan, 2008).

Las proteínas del suero así como las caseínas tienen múltiples aplicaciones en la industria agroalimentaria, por ejemplo las proteínas del suero tienen un alto contenido en aminoácidos de cadena lateral ramificada que promueven el crecimiento muscular y la regeneración de tejidos por lo que son idóneas para su empleo como suplementos en la dieta de los deportistas (Hernández-Rojas et al., 2014). Por otro lado las caseínas son ampliamente utilizadas como ingredientes en los alimentos ya que poseen las siguientes propiedades funcionales y físico-químicas: alto valor nutricional, sabor suave, buena capacidad de retención de agua, propiedades emulsionantes y espumantes... (Belicium et al., 2012). Las aplicaciones más importantes de los productos de caseína son la elaboración de quesos como los empleados en las pizzas, como emulsionantes en blanqueadores de café, en cremas batidas sintéticas y licores cremosos, en cereales y en alimentos dietéticos (Huppertz et al., 2018)... Una de las posibles aplicaciones de los concentrados de caseína micelar es la elaboración de bebidas nutricionales de alto valor proteico (Sauer y Moraru, 2012).

Existen una serie de concentrados de proteínas lácteas (*Milk Protein Concentrates*, MPCs) y aislados de proteínas lácteas (*Milk Protein Isolates*, MPIs) que contienen principalmente caseínas en una forma próxima su estado nativo (Huppertz et al., 2018). Estos concentrados se consiguen generalmente mediante la ultrafiltración, este método de separación permite retener la proteína de la leche eliminando la mayor parte de los minerales solubles y de la lactosa. Tras la ultrafiltración se realiza un secado por atomización. Para conseguir estos concentrados se suele emplear leche desnatada por lo que el contenido graso es menor del 3 %. El contenido proteico de los MPCs que se comercializan es de entre un 42 y un 85 %.

La solubilidad de los MPCs es una propiedad crítica en su comercialización ya que la disolución del concentrado proteico es necesario para la expresión de sus propiedades funcionales (Agarwal et al., 2015). La baja solubilidad de los concentrados con alto contenido proteico como MPC80 (80 % de proteína) y los MPIs limita su empleo en la industria láctea (Sikand et al., 2011). Al aumentar la temperatura aumenta la solubilidad de los MPCs mientras que al aumentar la concentración de proteínas la solubilidad disminuye (Uluko et al., 2016). La insolubilidad de los MPCs se produce con mayor facilidad a temperaturas de almacenamiento más altas y conforme mayor es la humedad relativa (Gazi y Huppertz, 2015). La pérdida de la solubilidad puede deberse a varios motivos: interacciones proteína-proteína excesivas en la superficie de las partículas, modificaciones conformacionales de las proteínas e interacciones agua-proteína, dificultad en la rehidratación de las proteínas por formación de puentes de calcio entre las diferentes caseínas...

Estos concentrados se suelen emplear para la fabricación de alimentos ricos en proteínas, bebidas nutritivas, nutrición pediátrica, nutrición médica (alimentos enterales), productos para el control del peso, nutrición geriátrica, suplementos dietéticos en polvo y productos para nutrición deportiva (Agarwal et al., 2015). En la Tabla 4 aparecen algunas categorías de productos en las que se emplean los MPCs por sus propiedades funcionales y beneficios.

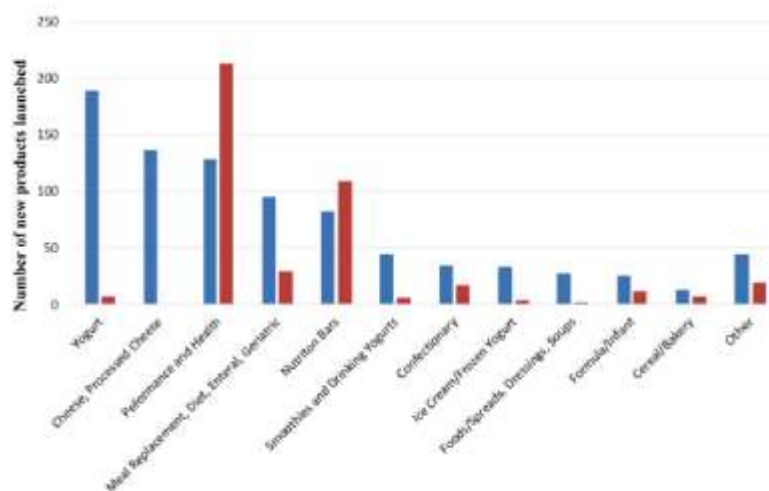
Tabla 4. Algunas de las principales aplicaciones de los concentrados de proteína de leche (MPCs).

Categoría de producto	Propiedades funcionales	Principales beneficios
Yogurt/Productos lácteos fermentados	Solidificación, retención de agua, viscosidad, espesante	Textura, proteína, estabilidad
Queso: procesado, crema y fresco	Gelificación y emulsificación	Sólidos de leche, emulsificación, textura
Bebidas nutricionales y para mejorar el rendimiento, bebidas sustitutivas de comida	Estabilidad térmica, sabor, color	Proteína, bajo contenido/sin lactosa, sabor
Productos de nutrición geriátrica, médica y clínica	Viscosidad, estabilidad térmica	Proteína, sabor, bajo contenido/sin lactosa, opacidad
Barritas nutricionales	Retención de agua, propiedades espumantes y de batido	Proteína, textura
Comida y bebida para el control de peso	Estabilidad térmica, sabor, retención de agua, viscosidad	Proteína, sabor
Preparados de continuación, leches de crecimiento	Estabilidad térmica, sabor, color	Proteína, sabor

Fuente: Agarwal et al., 2015

El empleo de MPIs está más enfocado a la obtención de beneficios nutricionales específicos (rendimiento deportivo, suplementos nutricionales, alimentos para uso médico...). En comparación con los MPCs el contenido en lactosa es muy bajo, en torno al 1 % (Agarwal et al., 2015). La composición típica de los MPIs en materia seca es: 91,4 % de proteína, 6,1 % de ceniza, 1,5 % de grasa y un 1 % de lactosa. Esta composición (alto contenido en proteína, bajo en lactosa y grasa) los hace idóneos para distintas aplicaciones nutricionales como los preparados para lactantes, la nutrición médica, la nutrición deportiva y el control de peso. Además los MPIs tienen importantes propiedades funcionales en relación con la viscosidad, la formación de espuma y la mejora de la emulsificación (Ryan et al., 2018).

En la Figura 5 se observan las categorías de alimentos en las que se incorporan este tipo de concentrados como ingrediente. La gran mayoría de los nuevos productos desarrollados dentro de la categoría de yogures incorporaban MPCs mientras que en la categoría de productos relacionados con el rendimiento y la salud predominan los MPIs.



Fuente: Agarwal et al., 2015

Figura 5. Número de nuevos productos lanzados al mercado en 2013 que incorporan MPCs (azul) y MPIs (rojo) como ingrediente.

1.3. Conservación de la leche

1.3.1. Estabilidad microbiológica de la leche

La leche es un medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos ya que contiene todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y proporciona además un entorno físico adecuado, por este motivo se considera un alimento perecedero (Smiddy et al., 2007). Entre los principales grupos de bacterias que pueden desarrollarse en la leche están las bacterias ácido lácticas, coliformes, psicrótrofos, bacterias termodúricas y bacterias esporuladas (*Bacillus spp.* y *Clostridium spp.*).

- Bacterias ácido lácticas: producen ácido láctico fundamentalmente a partir de lactosa, pueden ser eliminadas con un tratamiento de pasteurización baja.
- Coliformes: crecen con rapidez sobre todo a temperaturas superiores a los 20 °C y para su destrucción suele ser suficiente con un tratamiento de pasteurización.
- Psicrótrofos: son capaces de crecer a 4 °C, pueden producir lipasas y proteasas resistentes al calor que originen sabores anómalos durante el almacenamiento de la leche.
- Bacterias termodúricas: no forman esporas pero sus células vegetativas sobreviven a la pasteurización de baja intensidad, aun así su crecimiento en condiciones de refrigeración es limitado (Pereda, 2009).

1.3.2. Los tratamientos térmicos empleados en la industria láctea

Los productos lácteos poseen una gran importancia comercial y nutricional, por este motivo se han desarrollado procesos de fabricación para su conservación (Anema, 2008). Para garantizar la inocuidad y prolongar la vida útil de la leche se emplea principalmente la pasteurización térmica, la pasteurización HTST (*high temperature short time*) es la más empleada comercialmente. Un método alternativo a la pasteurización es el procesamiento a alta presión (HPP) entre 300 y 600 MPa. (Bogahawaththa et al., 2018)

El procesado térmico de los alimentos puede conllevar efectos negativos como cambios en el sabor y en el color, sin embargo los tratamientos térmicos son los más empleados comercialmente en la industria láctea (Considine et al., 2007).

La pasteurización es un tratamiento térmico de baja intensidad a temperaturas inferiores a 100 °C. Los objetivos de este tratamiento en alimentos poco ácidos son la reducción de la flora banal y la destrucción de la flora patógena obteniendo un producto con una corta vida útil pero con una calidad organoléptica muy similar al alimento de partida. En la leche los microorganismos patógenos más importantes son: *Salmonella typhi* y *paratyphi* (productores del tifus), bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*), *Brucella melitensis* (bacilo de la fiebre de Malta)... Todos los microorganismos mencionados son destruidos mediante un tratamiento térmico ligero. (Casp y Abril, 2003)

Inicialmente el proceso de pasteurización era de 61,5 °C durante 30 min ya que se tomaba como referencia al microorganismo *Mycobacterium tuberculosis*, la temperatura se incrementó a 63 °C con el fin de destruir a *Coxiella burnetii* (responsable de la fiebre Q o fiebre de Queensland) ya que se vio que es más termorresistente y que estaba presente en la leche en algunos casos. El objetivo de la pasteurización es la reducción de 12 ciclos logarítmicos del microorganismo *Coxiella burnetii* (Badui Dergal, 2006). Según (Cerf y Condon, 2006) aunque no existe certeza sobre el número real de reducciones decimales de *Coxiella burnetii* tras la pasteurización de la leche se pueden asumir valores de entre 4,7 y 8.

La combinación de los parámetros tiempo y temperatura en la pasteurización pueden ser de dos tipos:

- Baja temperatura durante un tiempo largo (LTLT, *Low Temperature-Long Time*). En el caso de la leche la pasteurización tendría una duración de 30 minutos a 63 °C si se tiene en cuenta el microorganismo de referencia.
- Alta temperatura durante un tiempo corto (HTST, *High Temperature-Short Time*). En la leche este tratamiento tendría una duración de 15-20 segundos manteniendo a una temperatura de 72-75°C. En este caso es importante que el tratamiento sea homogéneo ya que la duración es muy corta (Casp y Abril, 2003).

Los tratamientos térmicos se clasifican según su intensidad (Tabla 5) que viene determinada por la combinación de los parámetros tiempo-temperatura (Pereda, 2009).

Tabla 5. *Tratamientos térmicos más empleados en la industria láctea.*

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo	Objetivo	Vida útil
Termización	60 – 65	10 – 20 s	Aumentar el tiempo de almacenamiento en refrigeración de la leche mediante la reducción del número de bacterias, en especial los psicrótrofos	Hasta 3 días a 7 °C
Pasteurización baja				
LTLT (low temperature long time)	62 - 65	30 min	Al principio estos tratamientos tenían como objetivo asegurar la destrucción de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (una de las bacterias patógenas no esporuladas más termorresistentes) influyendo lo mínimo posible en las propiedades físico-químicas, nutritivas y sensoriales de la leche. En la actualidad se busca destruir a <i>Coxiella burnetii</i> que es el patógeno más resistente al calor hasta el momento	5 – 10 días en refrigeración
HTST (high temperature short time)	72 - 75	15 – 30 s		
Pasteurización alta	85 - 100	20 s	Destrucción de la mayoría de los microorganismos vegetativos pero no de las esporas	14 – 18 días en refrigeración
Ultrapasteurización	138	2 s	Reducción significativa de la carga microbiana evitando la alteración sensorial que produciría un tratamiento térmico de mayor intensidad	Aproximadamente 90 días en refrigeración (< 7 °C)
Esterilización				
UHT (ultra high temperature)	135 - 150	20 – 2 s	Asegurar la destrucción de todos los microorganismos alterantes durante el almacenamiento incluyendo las esporas	Estable durante más de 6 meses a temperatura ambiente
en envase	105 - 120	10 – 40 min		

Fuente: Pereda, 2009

Para ver el efecto del tiempo y de la temperatura de los tratamientos térmicos sobre la termorresistencia de los microorganismos se emplean los siguientes parámetros cinéticos:

- D: tiempo de reducción decimal (min). Es el tiempo que se requiere para reducir el número de microorganismos viables en un 90 %.
- z: termorresistencia característica de cada microorganismo en un medio de composición definida (°C). Significa que al elevar la temperatura z grados el tiempo necesario para conseguir la misma destrucción térmica es 10 veces menor (Casp y Abril, 2003).

Tabla 6. Parámetros de termorresistencia de los microorganismos de referencia empleados en la pasteurización de la leche.

Microorganismo de referencia	Temperatura de referencia (°C)	D (min)	z (°C)
Bacilo de Koch (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	72	0,018	4,8
<i>Coxiella burnetii</i>	72	0,022	5,0

Existen una serie de ecuaciones que permiten determinar el efecto del tratamiento térmico sobre la destrucción de los microorganismos. El valor P determina la intensidad/letalidad/valor pasteurizante del tratamiento (min). Se trata del tiempo requerido para reducir la carga microbiana por un múltiplo de D. Para cada microorganismo el valor P se calcula sumando el producto de las letalidades de cada temperatura por el intervalo de tiempo entre una y otra. (Casp y Abril, 2003)

$$P_z^{T_{ref}} = \int_0^t 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} dt = \sum 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} \Delta t_i = \sum L_i \Delta t_i \quad \text{Ecuación 1}$$

1.3.3. Efecto de los tratamientos térmicos en la estabilidad físico-química de la leche

La pasteurización HTST (72 °C 15 s) en la leche tiene poco o ningún efecto sobre las micelas de caseína sin embargo los tratamientos a mayor temperatura provocan la desnaturalización de las proteínas del suero y su interacción con las micelas de caseína. El calentamiento severo, especialmente en leche concentrada provoca alteraciones como el oscurecimiento por la reacción de Maillard, la disminución del pH, la disociación de la κ -caseína y finalmente la coagulación (Fox y Brodkorb, 2008).

Las caseínas presentan una alta estabilidad a los tratamientos térmicos, al pH normal de la leche únicamente precipitan en condiciones tiempo-temperatura drásticas que no suelen emplearse comercialmente (Badui Dergal, 2006). La conformación y agregación de las caseínas está controlada por un equilibrio de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y repulsión electrostática que dependen de la temperatura, el pH y la fuerza iónica (Post et al., 2012). En el estudio llevado a cabo por Sauer et al., 2012 para determinar la estabilidad térmica de concentrados de caseína micelar se concluyó que para incrementar su estabilidad se requiere o bien aumentar el pH o bien disminuir la temperatura del tratamiento térmico.

El tratamiento térmico de la leche puede causar la disociación de las caseínas de las micelas dependiendo del pH, la temperatura de calentamiento, la duración del tratamiento y la composición de la leche. Si el valor de pH de la leche es 6,7 o inferior la disociación es muy pequeña independientemente de la temperatura o duración del tratamiento térmico. La disociación de las caseínas aumenta conforme lo hace el pH, así para un pH de 7,1 pueden disociarse de las micelas niveles significativos de caseína (Considine et

al., 2007). Estudios sobre el efecto del pH en la estabilidad térmica de las leches concentradas han demostrado que la estabilidad térmica se reduce con la disminución del pH (Beliciu et al., 2012). La acidificación de la leche provoca la protonación progresiva del fosfato orgánico e inorgánico causando la disolución progresiva del CCP hasta que todo el fosfato se solubiliza a $\text{pH} < 5,3$ (Gonzalez-Jordan et al., 2015).

El color blanco de la leche se debe en gran parte a la dispersión de la luz por las micelas de caseína. Si las micelas se rompen el color blanco de la leche desaparece (Fox, 2008). Cuanto más pequeñas son las micelas mayor es el área de dispersión de la luz y como consecuencia la leche se ve más blanca. Si las partículas se asocian y forman agregados la dispersión disminuye causando una tonalidad ligeramente azul. Los carotenoides y la riboflavina influyen un poco en el color aportando tonalidades amarillas y verdes respectivamente (Badui Dergal, 2006). Tras el tratamiento térmico, el color se vuelve más blanco (Figura 6) y durante el almacenamiento el color blanco permanece independientemente de las condiciones (Considine et al., 2007).



Fuente: Considine et al., 2007

Figura 6. Cambios en el color de la leche tras el tratamiento térmico a $100\text{ }^{\circ}\text{C}/3\text{min}$. Leche sin tratar (izquierda) y leche tratada (derecha).

Respecto al tamaño de partícula, el calentamiento a temperaturas superiores a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ aumenta el tamaño de las micelas de caseína, tanto en la leche como en los concentrados de proteína láctea (Beliciu et al., 2012). La carga neta de las micelas de caseína disminuye conforme baja el pH desde 6,7 (pH de la leche) hasta el punto isoeléctrico de las caseínas con un pH de 4,6 (Gonzalez-Jordan et al., 2015).

Los tratamientos de mayor intensidad como los de esterilización afectan a la estabilidad coloidal, viscosidad y comportamiento de flujo de los concentrados de caseína micelar. Las altas temperaturas pueden provocar la desfosforilación de las micelas de caseína alterando la estructura micelar ya que ésta se mantiene unida en gran parte por los enlaces de fosfato de calcio (Beliciu et al., 2012). En el estudio llevado a cabo por (Sauer y Moraru, 2012) se llegó a la conclusión de que los concentrados de caseína micelar son inestables a los tratamientos térmicos en el rango de temperaturas de esterilización, siendo la inestabilidad mayor conforme aumenta la temperatura del tratamiento.

La integridad coloidal de las micelas de caseína puede alterarse observándose fenómenos como la floculación, la solidificación y la separación proteica. (Sauer y Moraru, 2012). A continuación se describen algunos fenómenos de desestabilización física:

- Cremado: se da cuando la fase dispersa de una dispersión tiene una densidad menor que la fase continua. Este fenómeno puede combinarse con otros como la floculación o la coalescencia dando lugar a una separación de fases.
- Sedimentación: se produce cuando la densidad de la fase dispersa es mayor que la densidad de la fase continua.
- Coalescencia y floculación: se trata de dos fenómenos muy diferentes pero ambos llevan a un aumento del tamaño de las partículas. La coalescencia es irreversible mientras que la floculación es solo una agregación de las partículas, en el caso de que la floculación sea irreversible esta se llama coagulación. En algunos casos la floculación puede dar lugar a la coalescencia. (Turbiscan® LAB, 2014)

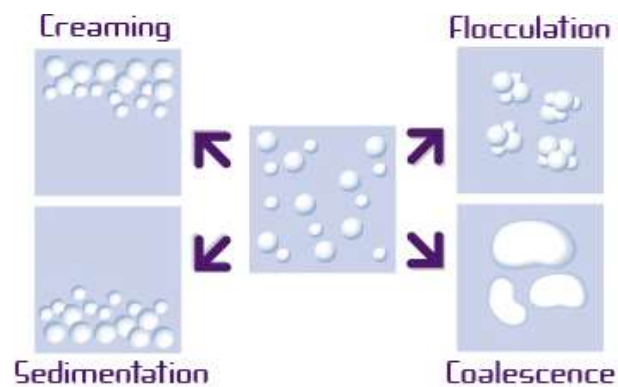


Figura 7. Fenómenos de desestabilización de una dispersión.

2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo principal prolongar la vida útil de dispersiones de caseína micelar en estado líquido mediante la aplicación de tratamientos térmicos de pasteurización con diferentes condiciones de tiempo y temperatura.

Los objetivos específicos del trabajo son:

- Determinar el efecto que ejercen diferentes combinaciones de tiempo y temperatura (63 °C 30 min y 72 °C 0 minutos) sobre la estabilidad físico-química de las dispersiones a diferentes concentraciones.
- Comparar la reducción de la carga microbiana de los dos tratamientos térmicos aplicados respecto del Control (sin tratamiento).

3. PLAN EXPERIMENTAL

Se realizaron dos tratamientos térmicos de pasteurización (HTST: *High Temperature-Short time* y LTLT: *Low Temperature- Long time*) con diferentes combinaciones tiempo-temperatura que aseguren una letalidad equivalente, cada tratamiento se realizó por duplicado. Las condiciones de los tratamientos se ajustaron mediante ensayos previos de modo que los valores de P (Ecuación 1) obtenidos sean lo más similares posibles. Para determinar este valor se tomaron como referencia los dos microorganismos empleados en la pasteurización de la leche (*Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii*).

En cada tratamiento se prepararon un total de 6 muestras, 3 muestras de caseína micelar al 4 % y 3 muestras de caseína micelar al 8 %. Para cada concentración, una de las muestras se empleó para el registro de la temperatura mediante una sonda, otra de las muestras se almacenó a 10 °C durante 7 días y otra muestra se analizó tras la aplicación del tratamiento térmico. Todas las muestras se prepararon el día anterior al tratamiento almacenándose en refrigeración a 4 °C. En primer lugar se realizó el ensayo con caseína micelar al 4 % y una vez finalizado se realizó el de la caseína micelar al 8 % utilizando las mismas sondas para registrar la temperatura. Por último se realizaron los análisis físico-químicos (pH, color, acidez, estabilidad física con Turbiscan) y microbiológicos (mesófilos y psicrótrofos).

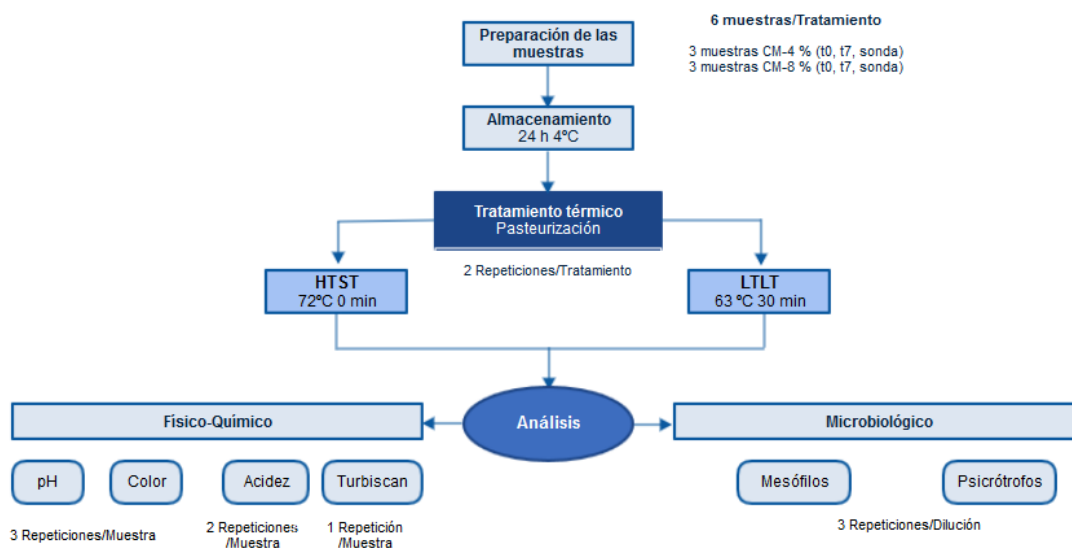


Figura 8. Esquema del plan experimental.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se ha llevado a cabo principalmente en el Laboratorio de Investigación 2 y el Laboratorio 5 de microbiología del Departamento de Tecnología de alimentos.

4.1. Aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

Para el trabajo se utilizó el aislado de proteína de leche (*Milk Protein Isolate*, MPI) Prodiet 87 B (Ingredia, Francia). Este aislado tiene un contenido proteico superior al 87 % en materia seca según las especificaciones del fabricante (ver ficha técnica del producto en el Anexo). Este concentrado contiene principalmente caseína micelar (92 % del contenido de proteína) por este motivo a lo largo del trabajo se ha denominado caseína micelar. En la Tabla 7 se especifica la composición química del aislado de proteína de leche empleado.

Tabla 7. Composición química del aislado de proteína de leche Prodiet 87 B.

	Valor Típico	Valor garantizado
Humedad total	5,0 %	≤ 6,0 %
Proteína total	83,0 %	
Proteína en materia seca	87,5 %	≥ 87,0 %
Grasa total	1,5 %	≤ 2,5 %
Carbohidratos totales	2,0 %	
de los cuales azúcares	2,0 %	
Lactosa	2,0 %	
Ceniza total	8,5 %	≤ 9,0 %

4.2. Reconstitución del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

El producto se reconstituyó en forma líquida al 4 y al 8% (p/p) en agua desionizada. Se empleó un volumen de 150 ml que se agito sobre una placa agitadora MultiStirrer 15 (VELP® Scientifica, Italia) en posición 4 (entre 500 y 600 vueltas/min) a temperatura ambiente durante una hora (Figura 9 A). Tras la agitación, se aplicó ultrasonidos con el sonotrodo Tip H7 acoplado al aparato UP400S (Hielscher – Ultrasound Technology, Alemania) y con la mínima amplitud (20 %) durante media hora (Figura 9 B).

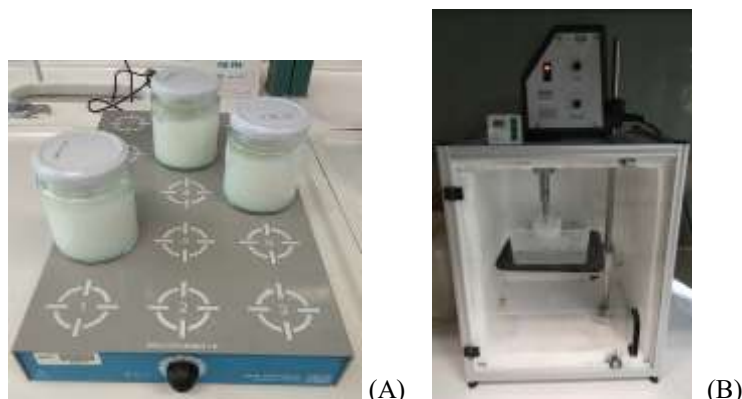


Figura 9. Agitación de 3 muestras de caseína micelar (A) y sonificación de una muestra de caseína micelar en el ultrasonidos (B).

4.3. Tratamiento térmico del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

Los ensayos para el tratamiento térmico se realizaron en el baño UNITRONIC-ORBITAL 6032011 (J.P.Selecta, España) que cuenta con agitación y regulación electrónica digital de la temperatura, velocidad de agitación y tiempo de funcionamiento (Figura 10 A y B). Se trata de un baño termostático con movimiento de vaivén en la bandeja de soporte, la velocidad de agitación se fijó en 33 oscilaciones/min. Para el tratamiento HTST la temperatura del baño se programó a 90 °C para aumentar la velocidad del calentamiento, en el tratamiento LTLT esta temperatura fue de 65 °C. Por otro lado se empleó el baño termostático ED-27 (Julavo, Alemania) para calentar las muestras almacenadas a 4 °C a la temperatura de inicio de los tratamientos (alrededor de 20 °C). La última etapa del tratamiento, el enfriamiento, culmina cuando las muestras alcanzan los 12 °C. Para enfriar las muestras se empleó una bandeja de plástico con hielo y agua (Figura 10 C), ésta se agito manualmente para mejorar la transferencia de calor.

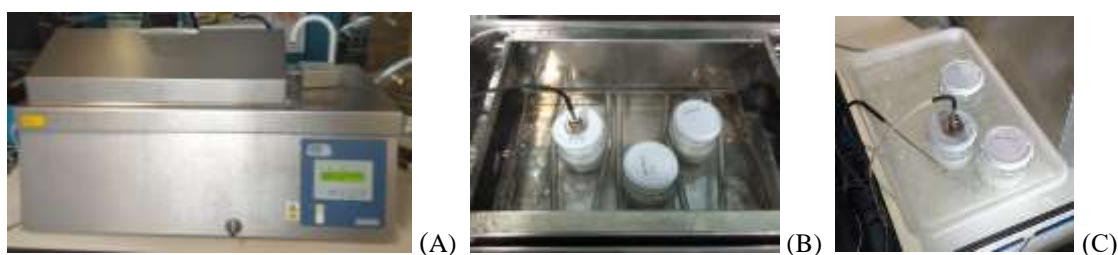


Figura 10. Baño UNITRONIC-ORBITAL 6032011 (A), muestras en el interior del baño (B) y bandeja con hielo y agua para enfriar las muestras (C).

Los recipientes empleados para las muestras fueron frascos de vidrio (Tapas y Envases Rioja, España) de 11,5 cm de altura y 6,5 cm de diámetro. Los frascos se cerraron con una tapa para proteger la muestra de posibles contaminaciones como por ejemplo la entrada de agua durante los tratamientos.

El registro de la temperatura, tanto de la muestra como de los baños, se tomó mediante dos sondas Pt 100 acopladas al equipo de adquisición de datos Datenlogger ALMEMO® 3290-8 (AHLBORN, Alemania). En el tratamiento HTST la temperatura se registró cada segundo mientras que en el tratamiento LTLT se tomó cada 5 segundos para disminuir el número de datos ya que el tratamiento es de mayor duración. Los datos de las temperaturas registradas por las sondas para realizar las gráficas de los tratamientos se obtuvieron del Software Data Control 4.1. A partir de los datos de la temperatura de las muestras se calculó la letalidad y el valor P (Ecuación 1) de cada tratamiento.

4.4. Caracterización físico-química del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

4.4.1. pH y acidez

- **pH**

El pH se midió con un pH-metro Basic 20 (Crison, España), previamente calibrado con dos soluciones tampón a pH 4,01 y pH 7,01. La lectura se realizó por triplicado, a una temperatura de 20 ± 2 °C y en agitación.

- **Acidez**

La acidez se determinó de manera automática con el sistema de titulación HI901C1 Potentiometric Titrator (HANNA® instruments, Estados Unidos). El método empleado es el descrito en la ISO/TS 22113:2012 para la valoración de la acidez de la leche y derivados. Se han introducido algunos cambios para

adaptar el método a las soluciones de caseína y a la valoración automática. La fórmula empleada para determinar la acidez es la siguiente:

$$\text{Acidez} \left(\frac{\text{g ácido láctico}}{100 \text{ ml}} \right) = \frac{V_{\text{NaOH gastado}} (\text{ml}) \cdot N \cdot 0,09}{V_{\text{muestra}} (\text{ml})} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

V: Volumen

N: Normalidad del reactivo de hidróxido de sodio (NaOH) empleado en la valoración, en este caso 0,1.

El sistema de titulación (Figura 11) realiza una valoración dinámica, es decir, al comienzo de la titulación el sistema proporciona una dosis mayor y cerca del punto final de la valoración las dosis son más pequeñas y precisas. La valoración se fijó a pH 8,4 con una agitación previa de un minuto. Se realizaron dos repeticiones con 40 ml de muestra.



Figura 11. Sistema de titulación HI901C1 Potentiometric Titrator, a la izquierda se encuentra el reactivo de NaOH 0,1 N y a la derecha la muestra con el sensor de temperatura, el electrodo de pH y el agitador.

4.4.2. Color

El color se determinó mediante el método CIE $L^*a^*b^*$ (CIELAB) en el que la localización de los colores en el espacio viene determinada por tres coordenadas de color: L^* (luminosidad, eje y: claridad del color, representa la diferencia entre la luz ($L^*=100$) y la oscuridad ($L^*=0$)), a^* (eje z: diferencia entre el verde ($-a^*$) y el rojo ($+a^*$)), b^* (eje x: representa la diferencia entre el azul ($-b^*$) y el amarillo ($+b^*$)) (Figura 12 A). La diferencia total de color (ΔE^*) es la distancia entre las localizaciones de color en el espacio CIE (Sahin et al., 2006). Esta distancia se puede expresar como:

$$\Delta E^* = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

ΔL^* : diferencia de luminosidad ($L^*_{\text{muestra}} - L^*_{\text{estándar}}$).

Δa^* : diferencia rojo/verde ($a^*_{\text{muestra}} - a^*_{\text{estándar}}$).

Δb^* : diferencia amarillo/azul ($b^*_{\text{muestra}} - b^*_{\text{estándar}}$).

Se utilizó el espectrofotómetro de mano CM-2600d/2500d (Konica Minolta, Japón) (Figura 12 B y C) con iluminante D65, ángulo de observación 10° y en el modo SCI (componente especular incluido). El aparato fue previamente calibrado, según las indicaciones, con un cero y un blanco mediante la placa de calibración del blanco CM-A145.

Para las medidas, una cubeta cilíndrica de vidrio que incorpora el equipo como accesorio fue rellenada con 20 ml de muestra y ésta se cubrió con una superficie blanca, en este caso un vaso blanco de cata (Figura 12 B y C). En total, se realizaron 3 repeticiones para cada muestra a temperatura $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

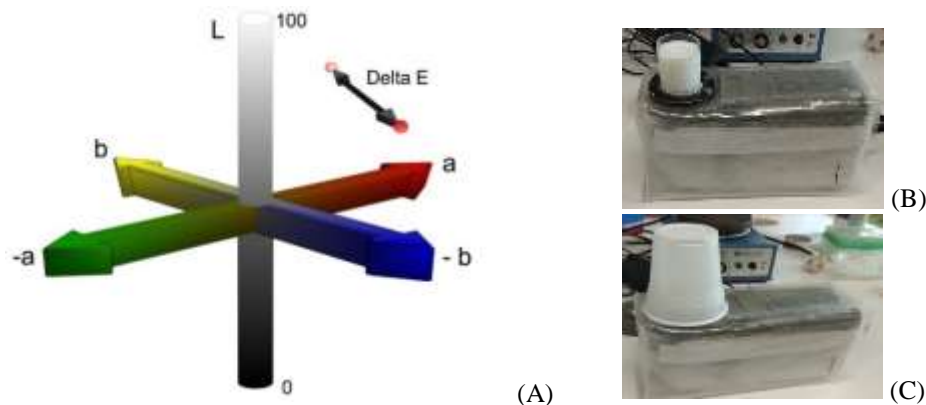


Figura 12. Espacio de color CIELAB en el que se representa la luminosidad (L^*), las coordenadas cromáticas (a^* y b^*) (A) y la diferencia total de color (ΔE^*); espectrofotómetro y cubeta con la muestra (B) y la muestra tapada con un vaso blanco de cata (C).

4.4.3. Caracterización de la dispersión con Turbiscan®

La estabilidad física se determinó con Turbiscan® LAB (Formulation Smart scientific analysis, Francia), equipo empleado para el análisis de caracterización de dispersiones concentradas (Figura 13). El equipo es capaz de medir tanto la absorbancia como la transmitancia, en este caso la solución de caseína es opaca por lo que se empleó la absorbancia. La tecnología integrada en este aparato se basa en la técnica de dispersión de luz múltiple (*Multiple Light Scattering, MLS*), la fuente de luz es un diodo electroluminiscente en el infrarrojo cercano (longitud de onda de 880 nm).



Figura 13. Turbiscan® LAB

Este equipo realiza medidas en toda la largura del recipiente (Figura 14) cada cierto tiempo. Con este tipo de análisis, se pueden observar fenómenos de sedimentación, *creaming* y/o floculación. La cantidad de muestra analizada fue de 20 ml y se realizaron escaneos cada 5 min con una duración de 2 horas y 25 segundos. Los resultados fueron analizados con el programa Turbisoft-2.1.0.52. Este programa permite calcular el *Turbiscan Stability Index* (TSI) según la ecuación 3:

$$TSI = \frac{\sum_h |scan_i(h) - scan_{i-1}(h)|}{H} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

- H: altura total de la muestra.
- h: posición de la medida.

El TSI resume todas las variaciones de la muestra y sirve para comparar y caracterizar de forma rápida la estabilidad física de varias formulaciones, conforme mayor es el valor de TSI menos estable es la muestra. Este parámetro fue calculado en la parte alta (de 0 a 13 mm), media (de 13 a 26 mm) y baja (de 26 a 40 mm) de la muestra.



Figura 14. Celda cilíndrica de vidrio con 20 ml de muestra.

Las gráficas obtenidas mediante Turbiscan (Figura 15) representan el incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) en % (eje y) frente a la altura de la muestra en mm (eje x). Los colores que se observan representan las medidas tomadas a lo largo del análisis, desde los tonos azules al inicio hasta los tonos rojos.

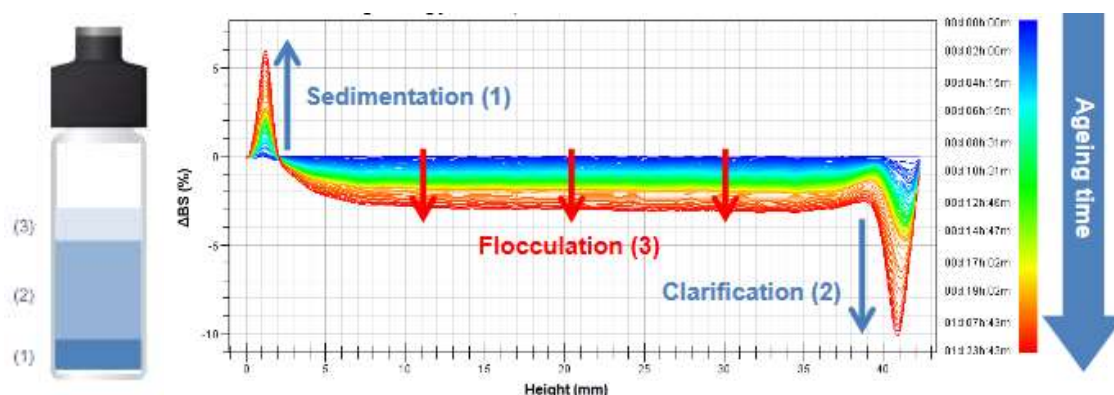


Figura 15. Interpretación de una gráfica obtenida mediante Turbiscan en la que se observan distintos fenómenos de desestabilización física. A la izquierda se representa la celda de vidrio sobre la que se ha realizado el análisis.

4.4.4. Tamaño de partícula y potencial ζ

Las medidas del tamaño de partícula (nm) y del potencial ζ (mV) fueron realizadas para los ensayos llevados a cabo con la reconstitución de caseína micelar al 4% por el laboratorio de Área de Materiales del Centro Multidisciplinar de Tecnologías para la Industria (CEMITEC, Noáin, Navarra).

Estos dos parámetros físicos son medidos gracias al Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments GmbH, UK) basándose en la técnica DLS (Dynamic Light Scattering). El potencial ζ se calcula a partir de la movilidad electroforética y usando el modelo teórico de Smoluchowski. Las diluciones empleadas para la preparación de muestra fueron de 0,2 ml muestra en 20 ml agua desionizada. Cada muestra fue analizada por triplicado.

4.5. Análisis microbiológico del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

El análisis microbiológico se realizó mediante recuento en placa sobre 3 tipos de bacterias: aerobios mesófilos, psicrótrofos y bacterias ácido-lácticas.

Los medios empleados para el cultivo fueron PCA (*Plate Count Agar*, VWR International Eurolab, España) en el caso de mesófilos y psicrótrofos y un medio específico (MRS) Medio para el aislamiento y enumeración de lactobacilos según Man, Rogosa y Sharpe (ISO 9232:1999, ISO 15214:1998).

Los medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones del fabricante y se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos en el autoclave Presoclave II, (J.P.Selecta, España). Cuando los medios alcanzaron los 45-50 °C, fueron dispensados en placas Petri de diámetro de 100 mm (VWR International Eurolab, España) dentro de una cabina de flujo laminar INDELAB (LABOLAN, España). En cada placa se vertió un volumen aproximado de entre 15 y 20 ml. Las placas se prepararon al menos 24 horas antes de la siembra.

La siembra se realizó para cada microorganismo con cuatro diluciones de la muestra y por triplicado en la cabina de flujo laminar, se empleó un mechero de etanol para asegurar que las condiciones fueran asépticas. La dilución inicial es la muestra de la que partimos, de esta dilución se coge 1 ml y se introduce

en un tubo Falcon® esterilizado que contiene 9 ml de agua de peptona (*Buffered peptone water*, VWR Internatinal Eurolab, España) obteniendo la dilución 10^{-1} . Las diluciones restantes se realizaron en cascada siguiendo el mismo procedimiento, tras cada dilución ésta se agito con el agitador-vibrador HEIDOLPH REAX 2000 (J.P.Selecta, España).

Se emplearon dos técnicas diferentes de siembra, el método de siembra en superficie y el método de siembra automática en espiral.

El método de siembra en superficie consiste en extender el volumen inoculado mediante unas perlititas de vidrio estériles (Figura 16 A). Para la siembra automática en espiral se empleó el sembrador automático Eddy Jet 2 (IUL, España) (Figura 16 B). Esta técnica se basa en extender el inóculo formando una espiral de Arquímedes en la que se produce un gradiente de concentración que va decreciendo desde el centro de la placa hacia los bordes (Figura 16 B).

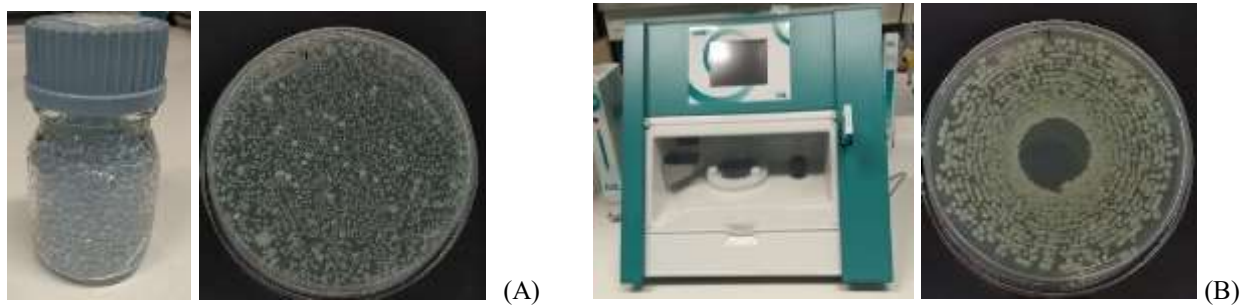


Figura 16. Perlititas de vidrio empleadas en la siembra en superficie empleadas para extender el inóculo y placa sembrada mediante este método (A), sembradora automática y placa sembrada en espiral mediante el método de siembra automática (B).

La temperatura y el tiempo de incubación de las placas para cada microorganismo fueron:

- Mesófilos: 48 h a una temperatura de 30 °C en la estufa Thermo Scientific Heraeus® Typ I-42.
- Bacterias lácticas: 5 días a 30 °C en la estufa Thermo Scientific Heraeus® Typ I-42.
- Psicrótrofos: 7 días a 5 °C en el frigorífico.

Para el recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de las placas se utilizó la lupa Colony Counter (J.P.Selecta, España), el cálculo y expresión de los resultados obtenidos se realizaron conforme a la norma UNE-EN-ISO 7218:2008/A1. La fórmula empleada para determinar la concentración de microorganismos en el caso de la siembra automática fue:

$$C \text{ (UFC/ml)} = \frac{N' + N''}{\frac{V \cdot 10^{-3}}{4}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

N': UFC en el primer sector

N'': UFC en el sector opuesto

V: volumen del inóculo, depende del sector al que se ha llegado en el conteo.

La plantilla empleada para el recuento de microorganismos en la siembra en espiral (Figura 17) está dividida en 8 sectores, cada uno de ellos divididos a su vez en 4 arcos. Se comienza a contar de fuera hacia dentro de la plantilla, de mayor dilución a menor dilución.

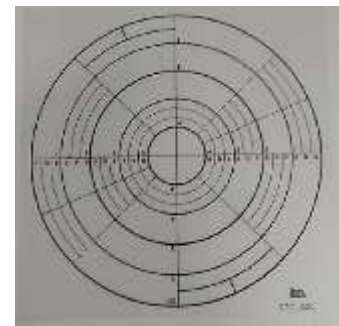


Figura 17. Plantilla de recuento de la siembra en espiral

En el caso de la siembra en superficie el número de microorganismos (N) se calcula como la media ponderada de dos diluciones consecutivas mediante la fórmula:

$$N \text{ (UFC/ml)} = \frac{C' + C''}{V \cdot 1,1 \cdot d} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

- C': n° de colonias contadas en la placa escogida de una de las diluciones;
- C'': n° de colonias contadas en la placa escogida de la dilución consecutiva a la anterior;
- V: volumen de inóculo utilizado (ml);
- d: dilución correspondiente a la primera dilución escogida.

Según el número de colonias que presenten las placas los resultados se expresan de distinta forma:

- Entre 10 y 200 colonias: se emplean las formulas mencionadas anteriormente dependiendo del tipo de siembra.
- $4 < n^\circ \text{ de colonias} < 10$:

$$N \text{ (UFC/ml)} = \frac{C}{v \cdot d} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

- C: n° de colonias;
 - V: volumen de inóculo utilizado (ml);
 - d: dilución escogida.
- N° de colonias < 4: “Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a $4/V \cdot d$ por ml o g”.
 - N° de colonias = 0: “Menos de $1/V \cdot d$ microorganismos por mL o g”.

4.6. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el programa Statgraphics, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) a un nivel de significación del 95 % con todos los datos del análisis físico-químico (3 factores y 9 variables dependientes). Tras este análisis se decidió separar los datos por concentración eliminando este factor del análisis y se realizó de nuevo un ANOVA al 95 % de significación.

Para ver diferencias entre grupos se realizó un análisis post-hoc HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey al 95 % de confianza con el factor tratamiento separando los datos por concentración y tiempo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a lo largo del trabajo se discuten a continuación ordenados en base a los objetivos específicos. En primer lugar se realizó una caracterización de la caseína micelar para determinar las condiciones de almacenamiento del plan experimental y obtener los resultados de las muestras empleadas como Control.

Una vez realizados los ensayos de las muestras tomadas como Control se procedió a realizar los ensayos de tratamiento térmico. De este modo se comparan la estabilidad físico-química y el desarrollo microbiológico de las muestras sin tratar (Control) y las tratadas térmicamente. Por último se realizó un análisis estadístico con Statgraphics empleando un ANOVA al 95 % de significación para todos los datos, y otros dos ANOVAS separando los datos por concentración. Además se realizó un análisis post-hoc HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey al 95 % de confianza para ver el efecto del tratamiento separando los datos por concentración y tiempo.

5.1. Caracterización inicial del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

El objetivo de este punto es determinar la temperatura y el tiempo de almacenamiento de la caseína micelar (CM) en el cual se produzca un desarrollo microbiológico cuantificable y/o cambios en la estabilidad físico-química. Se ensayaron dos temperaturas: 4 °C y 10 °C con una duración fija de 7 días. Para estos ensayos se midió el pH, el color y se realizó un análisis microbiológico de las muestras a tiempo 0 (t0) y 7 días (t7).

Los valores de pH de las caseínas micelares al 4 y al 8 % (CM-4 % y CM-8 %) no presentan apenas diferencias tras los 7 días de almacenamiento para ninguna de las temperaturas establecidas. Se observa que el pH de la CM-8 % es inferior al de la CM-4 % (Tablas 8 y 9).

En cuanto al color la CM-4 % pierde algo de luminosidad (L^*) a t7 para ambas temperaturas y tanto la componente a^* como la b^* adquieren valores más negativos. Un valor más negativo de a^* indica un aumento del color verde, en el caso de b^* indica un aumento del color azul. La diferencia total de color (ΔE^*) respecto a la muestra a t0 es superior en la muestra almacenada a 10 °C que en la de 4 °C (Tabla 8). Según (Mokrzycki y Tatol, 2011) si los valores de ΔE^* se encuentran entre 1 y 2 solo un observador experimentado puede notar la diferencia de color, por tanto un observador estándar no notaría la diferencia en ambos casos. La diferencia de color se nota claramente con valores de ΔE^* entre 3,5 y 5 mientras que valores superiores a 5 indican que el observador nota dos colores diferentes (Mokrzycki y Tatol, 2011).

Tabla 8. Valores de pH y color en la caseína micelar al 4 % (CM-4 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a dos temperaturas (T) de almacenamiento (4 °C y 10 °C)

Condiciones t-T		CM-4 %				
		pH	Color			
			L^*	a^*	b^*	ΔE^*
t0		7,12 ± 0,02	80,14 ± 0,47	-3,19 ± 0,04	-2,09 ± 0,20	-
t7	4 °C	7,21 ± 0,01	79,29 ± 0,35	-3,30 ± 0,03	-2,76 ± 0,18	1,09
	10 °C	7,15 ± 0,01	78,88 ± 0,27	-3,20 ± 0,05	-2,75 ± 0,08	1,42

Tras el almacenamiento a 4 °C la L^* de la CM-8 % aumenta mientras que a 10 °C disminuye un poco. La componente a^* aumenta tras el almacenamiento a 4 °C (aumento del color rojo) mientras que a 10 °C se mantiene prácticamente igual. En la componente b^* se observa un aumento a 4 °C (aumento del color

amarillo) y una disminución a 10 °C (aumento del color azul). La diferencia total de color (ΔE^*) tomando como referencia la muestra a t0 es superior en la muestra almacenada a 4 °C (Tabla 9). Esta diferencia de color es muy baja ya que según (Mokrzycki y Tatol, 2011) si los valores de ΔE^* se encuentran entre 0 y 1 el observador no nota la diferencia.

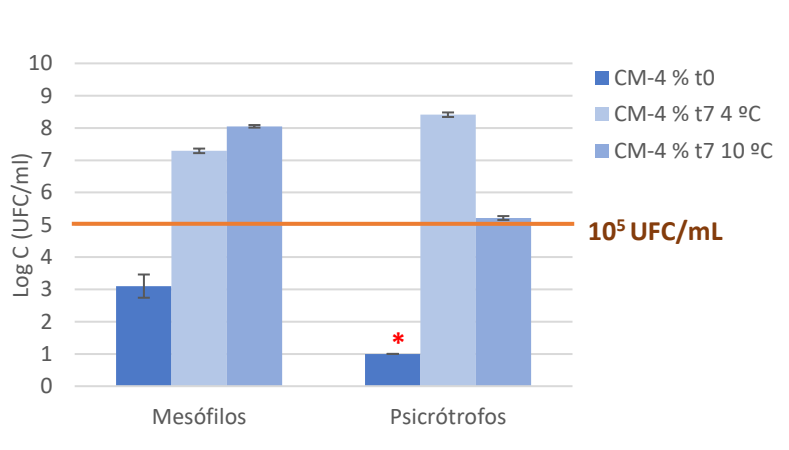
Tabla 9. Valores de pH en la caseína micelar al 8 % (CM-8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a dos temperaturas (T) de almacenamiento (4 °C y 10 °C)

CM-8 %						
Condiciones t-T	pH	Color				
		L*	a*	b*	ΔE^*	
t0	7,06 ± 0,00	81,38 ± 0,07	-2,99 ± 0,01	-0,24 ± 0,04	-	
t7	4 °C	7,05 ± 0,02	82,26 ± 0,02	-2,74 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,98
	10 °C	7,01 ± 0,05	80,95 ± 0,02	-3,01 ± 0,01	-0,49 ± 0,03	0,50

La CM-8 % tiene mayor L* que la CM-4 %, los valores de a* en la CM-4 % tienden más al verde (-a*) y los valores de b* al azul (-b*). En la CM-4 % se observa mayor diferencia total de color respecto a la muestra a t0 para ambas temperaturas de almacenamiento. Tras realizar un análisis estadístico se vio que el único factor que afecta a las variables estudiadas (pH y coordenadas de color) es la concentración de CM.

Se realizó un análisis microbiológico para mesófilos, psicrótrofos y bacterias lácticas a t0 y a t7 para las dos temperaturas de almacenamiento (Figuras 18 y 19). El recuento de bacterias lácticas fue inferior a 1 Log UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/ml en ambas concentraciones por lo que se decidió eliminarlas del análisis microbiológico en los tratamientos térmicos.

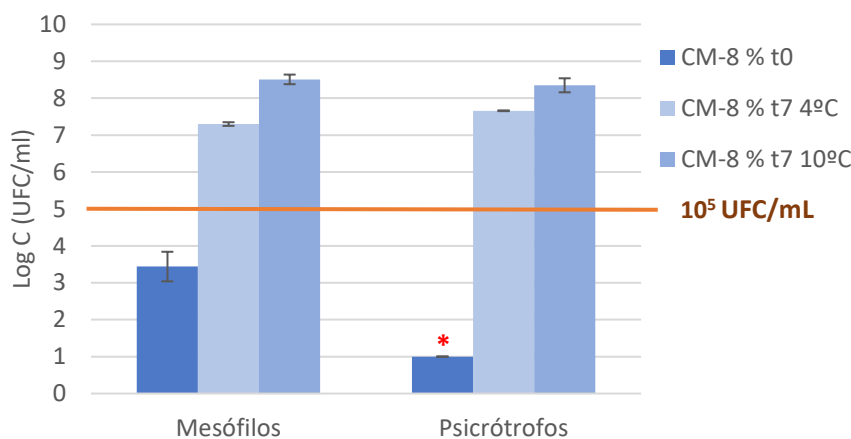
En la CM-4 % se observa un incremento considerable de la carga microbiana de mesófilos y de psicrótrofos tras el almacenamiento de 7 días. En el caso de mesófilos el crecimiento fue superior a 10 °C mientras que en psicrótrofos ocurrió lo contrario. Según el REGLAMENTO (CE) N° 1020/2008 “la leche de vaca tratada térmicamente utilizada para preparar productos lácteos tenga una concentración de gérmenes a 30 °C inferior a 100.000 colonias por ml”, es decir, la carga microbiana de la leche tratada térmicamente debe ser inferior a 10⁵ UFC/ml o bien 5 Log UFC/ml. Si se toma como referencia este valor para el límite de la carga microbiana de la CM, la carga microbiana de mesófilos y psicrótrofos a t7 supera en todos los casos a este límite.



* < 1 Log UFC/ml

Figura 18. Logaritmo de la carga microbiana (C) de mesófilos y psicrótrofos en la caseína micelar al 4 % (CM-4 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a dos temperaturas (T) del almacenamiento (4 °C y 10 °C).

El desarrollo microbiano en la CM-8 % es similar al de la CM-4 %, a t0 existe mayor desarrollo de mesófilos que de psicrótrofos en ambas concentraciones de CM. Al igual que la CM-4 % la carga microbiana de mesófilos y psicrótrofos a t7 supera el límite establecido para la leche en el REGLAMENTO (CE) N° 1020/2008. En este caso el crecimiento a 4 °C y a 10 °C ha sido homogéneo, siendo el de 10 °C algo superior.



* < 1 Log UFC/ml

Figura 19. Logaritmo de la carga microbiana (C) de mesófilos y psicrótrofos en la caseína micelar al 8 % (CM-8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a dos temperaturas (T) del almacenamiento (4 °C y 10 °C).

Tras esta caracterización inicial de la CM se decidió almacenar las muestras durante 7 días a 10 °C ya que en general el desarrollo microbiológico es mayor que a 4 °C. De este modo será más sencillo observar el efecto de los tratamientos térmicos en la estabilidad microbiológica de la CM.

5.2. Tratamientos térmicos del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

Para cuantificar la intensidad de los tratamientos se obtuvieron los valores de P (Tabla 10) mediante la ecuación 1 empleando los parámetros de termorresistencia de los microorganismos tomados con referencia en la pasteurización de la leche (*Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii*). Los valores de P tomando como referencia a *Mycobacterium tuberculosis* son inferiores a los obtenidos mediante los parámetros de *Coxiella burnetii* ya que el valor de P se obtiene mediante los parámetros de termorresistencia característicos de cada microorganismo. Se procuró que los valores fueran lo más similares posibles para obtener una letalidad equivalente en ambos tratamientos, para ello se realizaron unos pruebas previas ajustando las condiciones de los tratamientos. Las variaciones en estos valores dependen de muchos factores:

- Concentración de la CM: la CM- 8 % tarda generalmente más tiempo en calentarse por lo que el valor P suele ser mayor al de la CM-4 %.
- Temperatura alcanzada al final de la fase de calentamiento: los mayores valores de letalidad se alcanzan al finalizar esta fase en el tratamiento HTST, los valores de P en este tratamiento difieren de una repetición a otra ya que el incremento de temperatura aumenta considerablemente la letalidad alrededor de los 72 °C.
- Velocidad de calentamiento/enfriamiento.
- Sensibilidad de las sondas.

Tabla 10. Valores de P obtenidos en cada microorganismo de referencia mediante los dos ensayos de tratamiento térmico para la dispersión de CM a diferentes concentraciones.

	Valor P							
	HTST				LTLT			
	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 1		Repetición 2	
	MT	CB	MT	CB	MT	CB	MT	CB
CM-4 %	0,738	0,760	1,010	1,033	0,687	0,807	0,693	0,811
CM-8 %	0,957	0,986	0,789	0,817	0,716	0,844	0,688	0,806

MT: *Mycobacterium tuberculosis*, CB: *Coxiella burnetii*

En la Figura 20 se puede observar la evolución de la temperatura de la muestra durante el tratamiento de pasteurización HTST (*High Temperature-Short Time*), este tratamiento consta de una fase de calentamiento en la que la muestra alcanza aproximadamente 72 °C y una fase de enfriamiento hasta 12 °C. La temperatura del baño en el que se calentaron las muestras se fijó en 90 °C para que el calentamiento fuera más rápido, de otro modo los valores de P serían muy distintos a los del tratamiento LTLT (*Low Temperature-Long Time*).

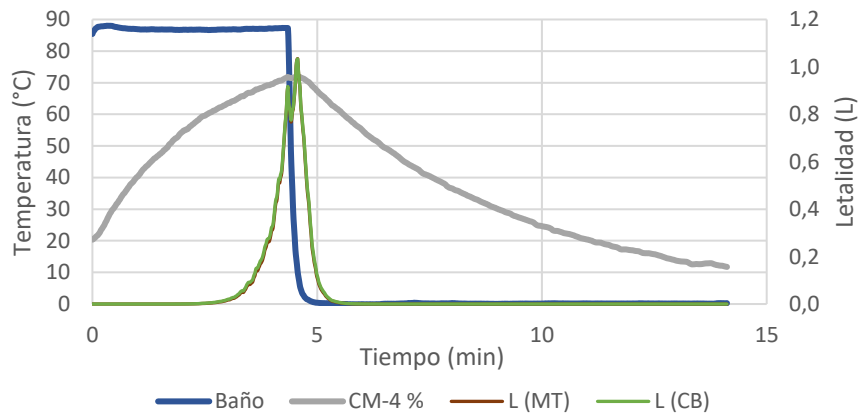


Figura 20. Curva de penetración de calor en el tratamiento HTST para la CM-4 %.

El tratamiento de pasteurización LTLT (Figura 21) tiene mayor duración que el tratamiento anterior ya que consta de una fase de mantenimiento de 30 minutos a 63 °C. La temperatura del baño empleado para calentar las muestras se mantuvo constante a 65 °C para garantizar que las muestras no bajaran de los 63 °C durante el mantenimiento, por este motivo las muestras alcanzan en esta fase valores de temperatura de entre 63 y 64 °C.

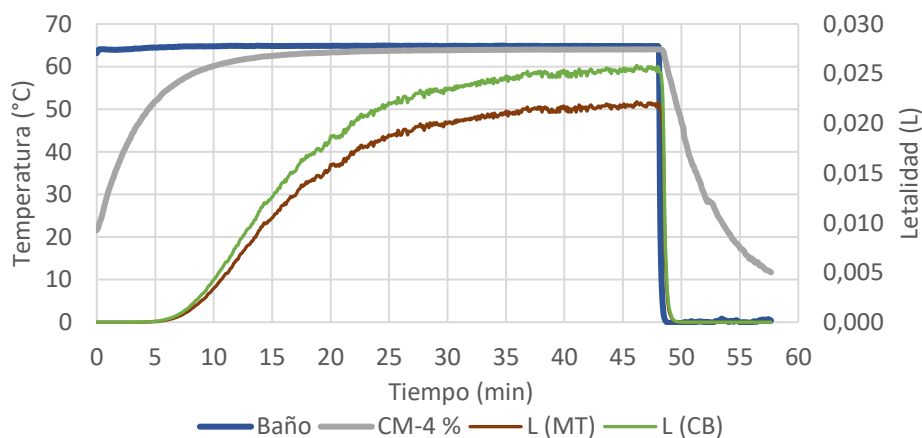


Figura 21. Curva de penetración de calor en el tratamiento LTLT para la CM-4 %.

Con estos dos tratamientos se pretende ver el efecto de la temperatura y del tiempo en la estabilidad físico-química de la CM. Por otro lado se comparará el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento microbiológico para determinar cuál de ellos es más efectivo.

En la Tabla 11 se indica el rango de temperaturas alcanzado en los tratamientos y el intervalo de duración de éstos.

Tabla 11. Condiciones de los dos ensayos de tratamiento térmico.

	Concentración (%)	Temperatura alcanzada (°C)	Tiempo de mantenimiento (min)	Duración del tratamiento (min)
HTST (High temperature-Short time)	4	71,80 - 72,23	0	14 – 16
	8	71,80 - 71,98	0	14 – 18
LTLT (Low temperature-Long time)	4	63,00 - 64,16	30	50 – 60
	8	63,00 - 64,16	30	53 - 65

5.2.1. Efecto de los tratamientos térmicos en la estabilidad físico-química del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

Para determinar si existen diferencias se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con todos los datos observándose diferencias significativas (p -valor $< 0,05$) de todos los parámetros (pH, L^* , a^* , b^* , acidez, TSI bajo, TSI medio, TSI alto, tamaño de partícula, polidispersión) en la mayoría de los factores (tratamiento, tiempo y concentración). Para observar mejor el efecto de los tratamientos en el pH se eliminó el factor concentración separando por un lado los datos de la CM al 4 % y al 8 %.

En el pH de la CM-4 % se observan diferencias significativas respecto al factor tratamiento y además existe interacción entre este factor y el tiempo, es decir el efecto del tiempo es diferente según el tratamiento. En el caso de la acidez solo hay diferencias significativas en el factor tiempo. En las coordenadas colorimétricas (L^* , a^* , b^*) así como en el tamaño de partícula existen diferencias significativas en ambos factores además de interacción (Tabla 12). Para los valores de TSI únicamente existen diferencias significativas con un p -valor de 0,007 en el factor tiempo mientras que en la polidispersión no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los factores.

Tabla 12. P -valores de los parámetros estudiados respecto a los factores tratamiento y tiempo obtenidos mediante un ANOVA de los datos de la CM-4 %.

CM-4 %						
	pH	Acidez	L^*	a^*	b^*	Tamaño de partícula
Tratamiento	0,000	0,211	0,000	0,000	0,000	0,000
Tiempo	0,157	0,038	0,000	0,001	0,000	0,000
Tratamiento*Tiempo	0,009	0,106	0,008	0,067	0,009	0,000

En la CM-8 % se observan diferencias significativas en el pH respecto a los factores tratamiento y tiempo aunque en este caso no hay interacción entre ellos. En cuanto a la acidez existen diferencias significativas respecto al tiempo pero no respecto al tratamiento y hay interacción entre ambos factores. En la L^* y en la b^* hay diferencias significativas respecto al tratamiento y el tiempo mientras que en la a^* solo

hay diferencias significativas con el tratamiento (Tabla 13). En los valores de TSI no hay efecto del tratamiento ni del tiempo.

Tabla 13. P-valores de los parámetros estudiados respecto a los factores tratamiento y tiempo obtenidos mediante un ANOVA de los datos de la CM-8 %.

CM-8 %					
	pH	Acidez	L*	a*	b*
Tratamiento	0,000	0,085	0,000	0,000	0,000
Tiempo	0,015	0,009	0,000	0,022	0,648
Tratamiento*Tiempo	0,271	0,003	0,678	0,536	0,924

Tras estos ANOVAS con dos factores se decidió separar los datos por tiempo (0 y 7 días) quedándose únicamente con un factor, el factor tratamiento. De este modo es más sencillo obtener las diferencias entre tratamientos mediante comparaciones múltiples con HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey.

En la Tabla 14 se presentan los valores de pH obtenidos en el Control y en los tratamientos a t0 y a t7 para las dos concentraciones de CM. Se aprecia que la CM-8 % tiene un pH algo inferior al de la CM-4 %, tanto a t0 como a t7, la diferencia entre ambas concentraciones es significativa por lo que se deduce que la concentración de CM influye en el pH.

Los valores de pH obtenidos son similares a los de (Beliciu et al., 2012), en este estudio se prepararon concentrados de CM diluyéndolos en agua purificada por osmosis inversa obteniendo 4 concentraciones distintas (5, 7.5, 8 y 10 %). El pH del concentrado de CM al 5 % fue de $7,17 \pm 0,06$ mientras que el del 8 % fue $7,11 \pm 0,08$. Se determinó estadísticamente que el pH varía significativamente con el contenido de caseína. En este caso el pH de la CM-8 % es significativamente inferior al de la CM-4 %, por tanto se concluye también que el pH disminuye conforme aumenta la concentración de CM.

En la CM-4 % las muestras tratadas térmicamente presentan un pH significativamente más elevado que la muestra Control a nivel estadístico, tanto a t0 como a t7. En el caso de la CM-8 % a t0 el pH de la muestra con tratamiento HTST no es significativamente diferente al Control, en cambio el pH de la muestra con tratamiento LTLT sí lo es. Tras 7 días de almacenamiento el pH de la CM-8% del tratamiento LTLT es significativamente diferente al del Control.

Tabla 14. Valores de pH de la caseína micelar (CM) con dos concentraciones distintas (4 y 8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) almacenadas a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados

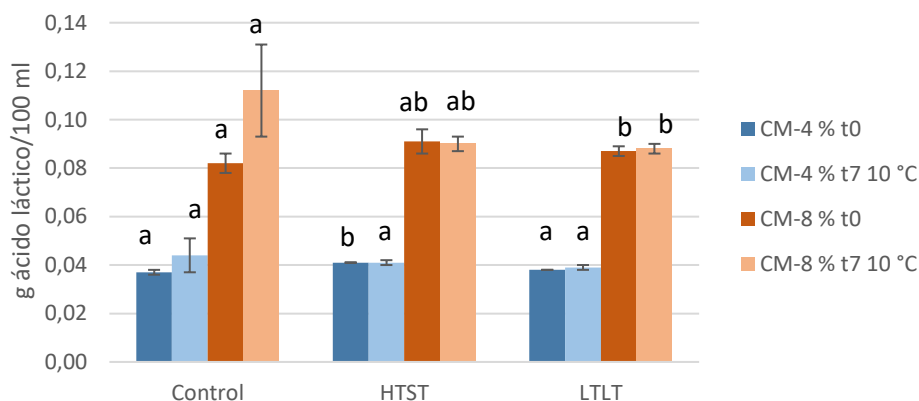
	Control	HTST	LTLT
CM-4 % t0	$7,12 \pm 0,02^a$	$7,21 \pm 0,02^b$	$7,19 \pm 0,01^b$
CM-4 % t7 10 °C	$7,15 \pm 0,01^a$	$7,20 \pm 0,01^b$	$7,22 \pm 0,01^b$
CM-8 % t0	$7,06 \pm 0,00^a$	$7,07 \pm 0,01^a$	$7,10 \pm 0,02^b$
CM-8 % t7 10 °C	$7,01 \pm 0,05^a$	$7,04 \pm 0,06^{ab}$	$7,09 \pm 0,01^b$

Letras diferentes en la misma fila significan grupos homogéneos diferentes según el análisis post-hoc HSD Tukey al 95 % de confianza.

En la Figura 22 se observan los valores de acidez expresada en gramos de ácido láctico/ 100 ml de la dispersión de CM al 4 y al 8 % a t0 y t7. Estos valores están por debajo de 0,048 g ácido láctico/100 ml

de dispersión de CM-4% y 0,137 g ácido láctico/100 ml en la dispersión de CM-8 %. La concentración de lactosa en el aislado de proteína de leche Prodiel 87B es de un 2 % (Tabla 7) por este motivo la acidez de las muestras es baja.

En cuanto a la acidez se observa un incremento transcurridos 7 días a 10 °C en las muestras Control para las dos concentraciones de CM. En cambio no se observan prácticamente diferencias con el tiempo en los valores de acidez de las muestras tratadas térmicamente. La acidez de la CM-8 % es en todos los casos superior a la del 4 %, podría decirse la CM-8 % presenta el doble de acidez que la CM-4 %



Letras diferentes en barras de mismo color significan grupos homogéneos diferentes según el análisis post-hoc HSD Tukey al 95 % de confianza.

Figura 22. Acidez expresada en g de ácido láctico/100 ml de la caseína micelar (CM) con dos concentraciones distintas (4 y 8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) almacenadas a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados.

Ambos tratamientos influyen significativamente en la luminosidad (L^*) de la CM-4 % a t0, este parámetro aumenta tras el tratamiento HTST y LTLT. Este resultado concuerda con la revisión realizada por (Considine et al., 2007) en la que se afirma que el color se vuelve más blanco tras el tratamiento térmico. Los tratamientos también influyen en la componente a^* siendo esta componente significativamente diferente en ambos tratamientos en los que es menos negativa (aumento del color rojo) respecto al Control. Lo mismo sucede con la componente b^* , en este caso indica un aumento del color amarillo. La diferencia total de color (ΔE^*) es muy similar en ambos tratamientos siendo algo más elevada la del tratamiento HTST (Tabla 15).

Tras 7 días de almacenamiento a 10 °C el valor de L^* disminuye significativamente en el Control y en los tratamientos (Tablas 12 y 15). La componente a^* así como la componente b^* aumentan significativamente con el tiempo (Tabla 12 y 15), lo que indica un aumento del color rojo y amarillo respectivamente. En la componente a^* no hay diferencias significativas entre tratamientos en cambio en la L^* y en la b^* si existen diferencias, la L^* es superior en el tratamiento LTLT mientras que la b^* disminuye (aumento del color amarillo). El tratamiento LTLT tiene la mayor diferencia total de color (ΔE^*), en cambio el tratamiento HTST presenta una ΔE^* menor que el Control a t7. Valores de ΔE^* entre 1 y 2 indican que solo un observador experimentado puede notar la diferencia según (Mokrzycki y Tatol, 2011).

En general las coordenadas de color del tratamiento LTLT, tanto a t0 como a t7, son más diferentes al Control que las del tratamiento HTSTS. Por tanto un periodo de calentamiento de mayor duración influye un poco en color de la dispersión de CM.

Tabla 15. *Coordenadas de color (L^* , a^* , b^*) de la caseína micelar al 4 % (CM-4 %) a tiempo 0 (t_0) y transcurridos 7 días (t_7) almacenadas a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados.*

		Control	HTST	LTLT
CM-4 % t_0	L^*	80,14 ± 0,47 ^a	81,20 ± 0,11 ^b	80,99 ± 0,16 ^b
	a^*	-3,19 ± 0,04 ^a	-2,95 ± 0,04 ^b	-2,82 ± 0,02 ^c
	b^*	-2,09 ± 0,20 ^a	-1,69 ± 0,24 ^b	-1,53 ± 0,02 ^b
	ΔE^*	-	1,16	1,08
CM-4 % t_7 10 °C	L^*	78,88 ± 0,27 ^a	79,73 ± 0,31 ^b	80,26 ± 0,15 ^c
	a^*	-3,20 ± 0,05 ^a	-3,03 ± 0,1 ^b	-2,94 ± 0,01 ^b
	b^*	-2,75 ± 0,08 ^a	-2,12 ± 0,30 ^b	-1,70 ± 0,01 ^c
	ΔE^*	1,42	1,07	1,75

Letras diferentes para una misma componente al mismo tiempo significan grupos homogéneos diferentes según el análisis post-hoc HSD Tukey al 95 % de confianza.

La CM-8 % a t_0 tiene mayor valor de L^* en ambos tratamientos respecto al valor obtenido en el Control, en el tratamiento LTLT este valor es significativamente mayor al del tratamiento HTST. La componente a^* es menos negativa con el tratamiento (aumento del color rojo), aunque no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos. La componente b^* se vuelve positiva con el tratamiento (aumento del color amarillo) pero también sin diferencias entre ambos tratamientos. La diferencia total de color (ΔE^*) es mayor en el caso del tratamiento LTLT.

Después de almacenar la muestra durante 7 días a 10 °C existen diferencias en la luminosidad (L^*) y la componente a^* (Tabla 13), pero no en la componente b^* . La L^* disminuye siendo diferente en cada caso (Control, HTST, LTLT), en la a^* y la b^* no existen diferencias significativas entre tratamientos pero si con el Control, en ambas componentes el valor aumenta con el tratamiento (aumento del color rojo en el caso de a^* y amarillo en el caso de b^*). Los tratamientos térmicos tienen mayor diferencia total de color (ΔE^*) que el Control a tiempo 7 siendo la del tratamiento LTLT mayor que la del HTST. Según (Mokrzycki y Tatol, 2011) si los valores de ΔE^* se encuentran entre 2 y 3,5 un observador inexperto puede notar la diferencia, por tanto se podrían apreciar diferencias de color entre el Control a t_0 y el tratamiento LTLT a t_0 y a t_7 .

Tabla 16. *Coordenadas de color (L^* , a^* , b^*) de la caseína micelar al 8 % (CM-8 %) a tiempo 0 (t_0) y transcurridos 7 días (t_7) almacenadas a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados*

		Control	HTST	LTLT
CM-8 % t_0	L^*	81,38 ± 0,07 ^a	83,05 ± 0,28 ^b	83,40 ± 0,07 ^c
	a^*	-2,99 ± 0,01 ^a	-2,56 ± 0,14 ^b	-2,38 ± 0,01 ^b
	b^*	-0,24 ± 0,04 ^a	0,74 ± 0,38 ^b	1,11 ± 0,05 ^b
	ΔE^*	-	1,98	2,50
CM-8 % t_7 10 °C	L^*	80,95 ± 0,02 ^a	82,41 ± 0,46 ^b	82,83 ± 0,12 ^c
	a^*	-3,01 ± 0,01 ^a	-2,67 ± 0,11 ^b	-2,57 ± 0,01 ^b
	b^*	-0,49 ± 0,03 ^a	0,65 ± 0,24 ^b	0,90 ± 0,02 ^b
	ΔE^*	0,50	1,88	2,38

Letras diferentes para una misma componente al mismo tiempo significan grupos homogéneos diferentes según el análisis post-hoc HSD Tukey al 95 % de confianza.

En resumen los tratamientos térmicos aumentan la luminosidad de la CM y ésta disminuye tras el almacenamiento durante 7 días a 10 °C. Según la estadística esta disminución es significativa aunque se observa que tampoco hay gran variación. Para ambas concentraciones los valores de a^* y b^* aumentan con el tratamiento de forma significativa, en el caso de la a^* los valores siguen siendo negativos. En la b^* hay diferencias entre concentraciones, en la CM-4 % los valores de b^* siguen siendo negativos sin embargo en la CM-8 % pasan a ser positivos. El tratamiento LTLT afecta más al color que el HTST, sin embargo no se aprecian grandes diferencias entre ambos. Como se menciona en la introducción si las micelas se rompen el color blanco de la leche desaparece (Fox, 2008), en este caso las dispersiones de CM siguen manteniendo su coloración blanca lo cual es un indicativo de su estabilidad.

Las dispersiones de CM pueden experimentar distintos fenómenos de desestabilización (sedimentación, floculación, cremado...) por distintas causas (viscosidad, tamaño de partícula, fuerza de atracción...). Para determinar la estabilidad física de las dispersiones se obtuvo el Turbiscan Stability Index (TSI) en la parte alta, media y baja de la muestra como se indica en el apartado material y métodos. Los valores de este parámetro se obtuvieron tras 1 hora y tras 1 hora y 55 minutos, al finalizar el análisis.

Tabla 17. Turbiscan Stability Index (TSI) de la parte baja, media y alta de la muestra para el Control y los dos tratamientos (HTST y LTLT).

	TSI Baja		TSI Media		TSI Alta	
	Control		Control		Control	
	CM-4 %	CM-8 %	CM-4 %	CM-8 %	CM-4 %	CM-8 %
t0 1 h	0,65 ± 0,35	0,50 ± 0,00	0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,00	0,30 ± 0,14	0,40 ± 0,00
t0 1h 55 min	0,70 ± 0,42	0,55 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,00	0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,00
t7 10 °C 1 h	1,95 ± 0,64	3,00 ± 2,40	0,90 ± 0,28	3,20 ± 2,83	0,90 ± 0,14	2,55 ± 2,62
t7 10 °C 1 h 55 min	2,2 ± 0,71	4,20 ± 3,11	1,00 ± 0,42	5,00 ± 4,67	0,95 ± 0,21	3,35 ± 3,75
	HTST		HTST		HTST	
	CM-4 %	CM-8 %	CM-4 %	CM-8 %	CM-4 %	CM-8 %
t0 1 h	0,90 ± 0,14	1,25 ± 0,21	0,25 ± 0,07	0,45 ± 0,21	0,20 ± 0,00	0,40 ± 0,14
t0 1h 55 min	1,10 ± 0,28	1,35 ± 0,21	0,25 ± 0,07	0,45 ± 0,21	0,20 ± 0,00	0,40 ± 0,14
t7 10 °C 1 h	1,05 ± 0,35	1,40 ± 0,42	0,75 ± 0,07	0,95 ± 0,21	0,65 ± 0,07	0,85 ± 0,07
t7 10 °C 1 h 55 min	1,15 ± 0,35	1,55 ± 0,49	0,85 ± 0,07	1,05 ± 0,21	0,75 ± 0,07	1,00 ± 0,14
	LTLT		LTLT		LTLT	
	CM-4 %	CM-8 %	CM-4 %	CM-8 %	CM-4 %	CM-8 %
t0 1 h	0,35 ± 0,21	0,70 ± 0,14	0,30 ± 0,14	0,55 ± 0,21	0,30 ± 0,14	0,55 ± 0,21
t0 1h 55 min	0,40 ± 0,14	0,80 ± 0,14	0,25 ± 0,07	0,55 ± 0,21	0,30 ± 0,14	0,40 ± 0,21
t7 10 °C 1 h	0,55 ± 0,35	0,80 ± 0,14	0,50 ± 0,42	0,75 ± 0,07	0,50 ± 0,42	0,70 ± 0,14
t7 10 °C 1 h 55 min	1,15 ± 0,35	0,90 ± 0,00	0,60 ± 0,42	0,90 ± 0,14	0,60 ± 0,42	0,80 ± 0,14

Los valores de TSI obtenidos en los tratamientos no varían significativamente respecto a los valores del Control por lo que la muestra es estable físicamente. Tras los 7 días de almacenamiento el TSI aumenta en todos los casos, este aumento es mayor en el Control que en los tratamientos. Mediante el análisis estadístico se determinó que el tiempo influye en el valor del TSI con un p-valor de 0,07 en la CM-4 % mientras que en la CM-8 % no hay efecto del tratamiento ni del tiempo.

En el tratamiento LTLT se observan en general menores valores de TSI que en el tratamiento HTST aunque estadísticamente no existan diferencias significativas entre ambos.

Las gráficas obtenidas mediante Turbiscan representan el el incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) en % (eje y) frente a la altura de la muestra en mm (eje x).

En las muestras Control a t7 de la CM-4 % se observan fenómenos de sedimentación (Figura 23) mientras que en la CM-8 % se aprecian fenómenos de coalescencia/floculación (Figura 24) mientras que en ambos casos a tiempo 0 las muestras son más estables presentando menores valores de TSI (Tabla 17).

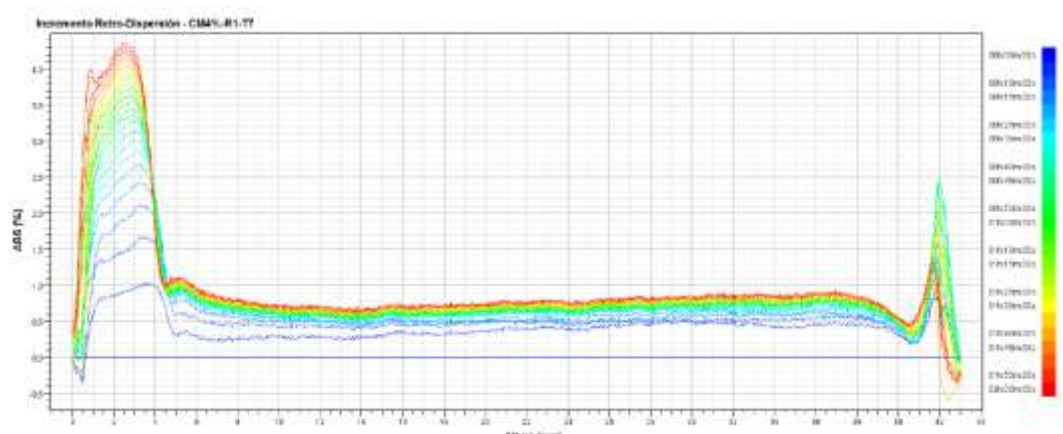


Figura 23. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-4 % a t7 para el Control.

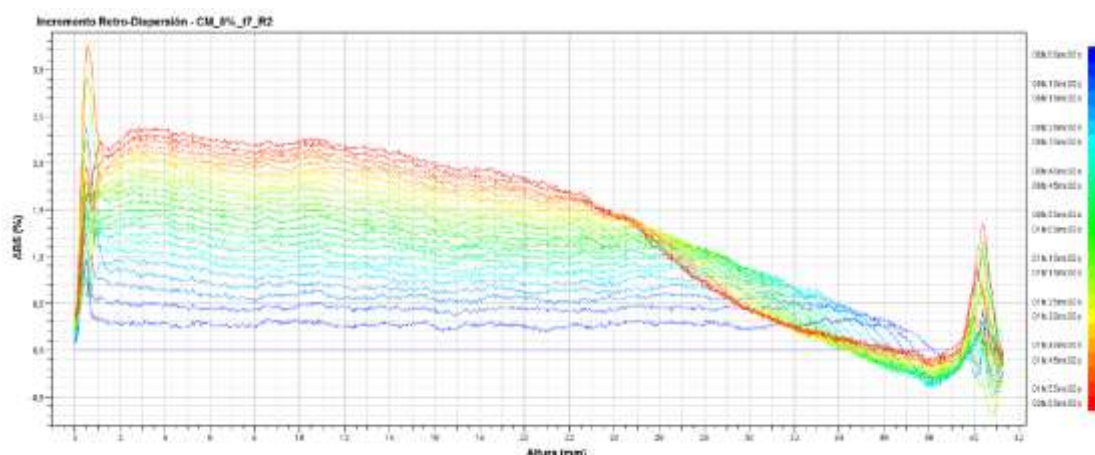


Figura 24. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-8 % a t7 para el Control.

En el tratamiento HTST el TSI en la parte media y alta aumenta un poco tras los 7 días mientras que el TSI en la parte baja es similar al de t0 en el caso de la CM-4 %. Como se observa en la Figura 25, en la parte baja de la muestra hay un poco de sedimentación por este motivo el valor de TSI es más alto en esta zona. En la CM-8 % ocurre algo similar, los valores de TSI en la parte baja son parecidos a t0 y t7 mientras que en la parte media y alta el TSI aumenta con el tiempo (Tabla 17). En la Figura 26 que corresponde a la CM-8 % a t7 también se observa sedimentación, en este caso el valor del TSI es algo superior al de la CM-4 % en la parte baja de la muestra.

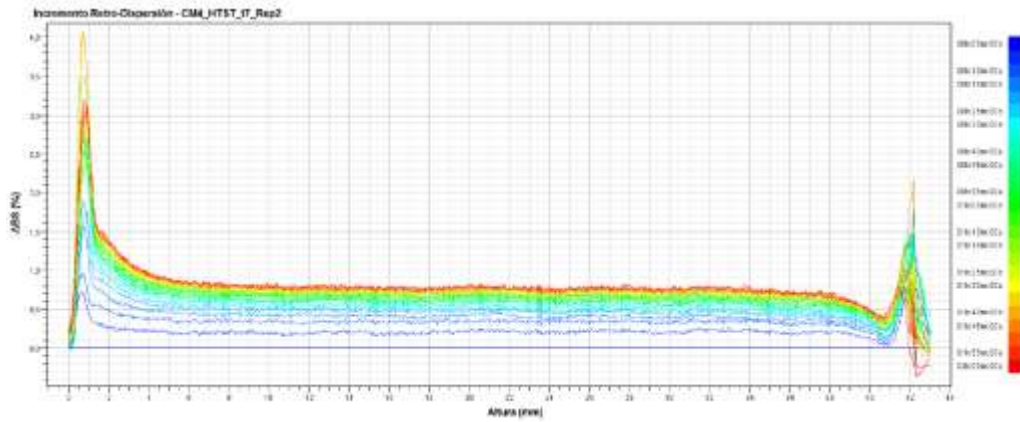


Figura 25. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-4 % a t7 para el tratamiento HTST.

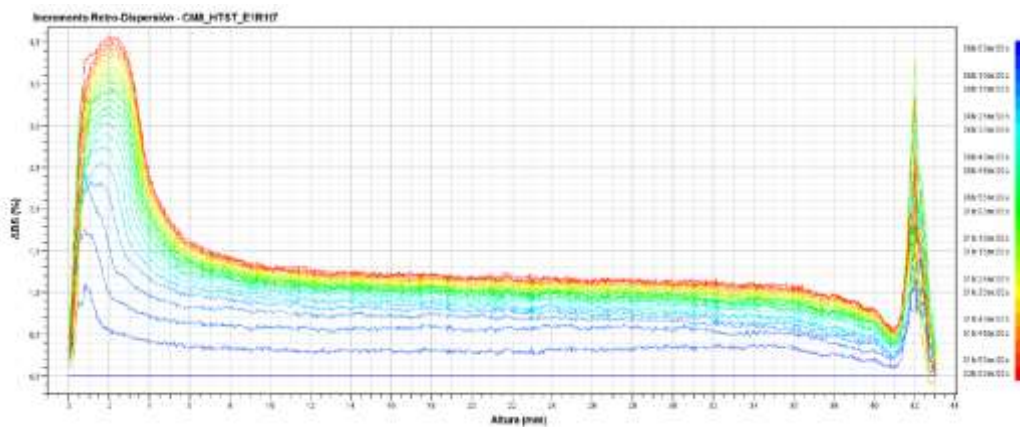


Figura 26. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-8 % a t7 para el tratamiento HTST.

En el tratamiento LTLT los valores de TSI son similares en la parte alta, media y baja de la muestra. En la CM-4 % se observa un incremento del valor de TSI a tiempo 7 en una de las repeticiones mientras que en la otra repetición se mantiene igual (Tabla 17). La muestra CM-4 % a t7 presenta algo de sedimentación (Figura 27). En la CM-8 % los valores de TSI apenas aumentan con el tiempo en la parte baja, en el TSI de las partes media y alta se observan diferencias entre una repetición y otra. En un caso aumenta con el tiempo y en la otra repetición se mantiene igual (Tabla 17). A diferencia de los casos anteriores en la CM-8 % a t7 no se observa sedimentación (Figura 28).

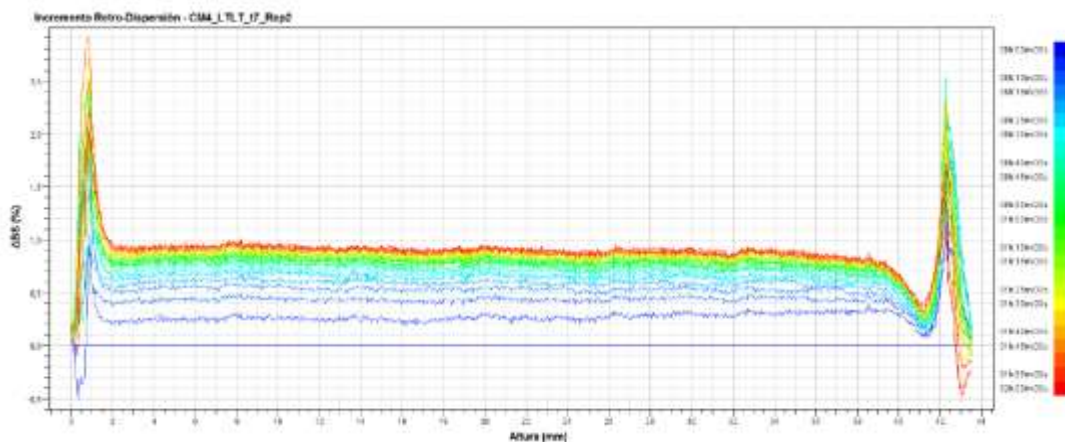


Figura 27. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-4 % a t7 para el tratamiento LTLT.

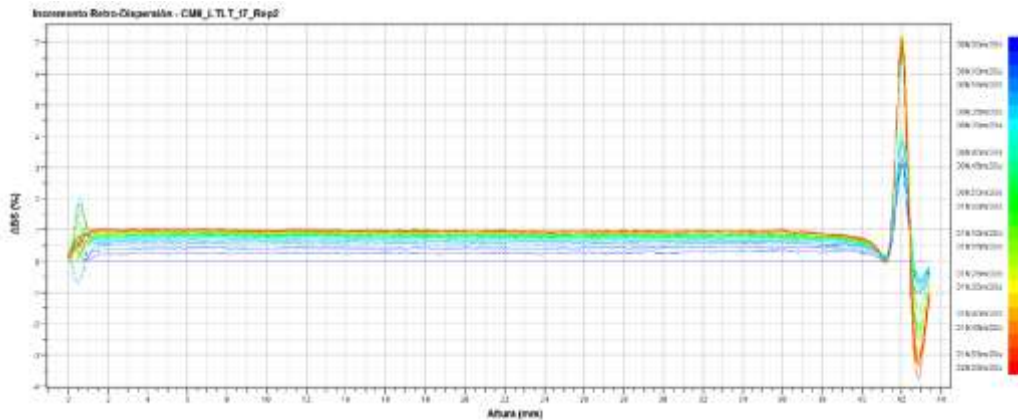
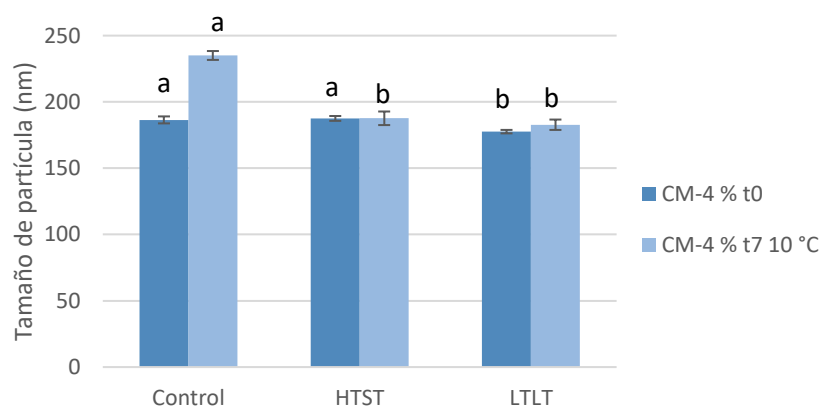


Figura 28. Incremento de la retrodispersión de la muestra (ΔBS) de la CM-8 % a t7 para el tratamiento LTLT.

En la Figura 29 aparecen los tamaños de partícula (nm) de la CM-4 % a t0 y a t7, en el Control se observa un incremento del tamaño de partícula (de $186,42 \pm 2,64$ a $235,02 \pm 3,35$) lo que indica que ha habido una agregación. En cambio, la CM tratada térmicamente es estable en el tiempo ya que apenas hay diferencias aunque estadísticamente las diferencias sean significativas (Tabla 13). En las muestras sometidas al tratamiento LTLT el tamaño de partícula disminuye un poco respecto al del Control. Según (Badui Dergal, 2006) cuanto más pequeñas son las micelas mayor es el área de dispersión de la luz y como consecuencia la leche se ve más blanca, en la CM-4 % t7 las partículas son más pequeñas en los tratamientos que en el Control lo que explicaría que la componente L^* sea algo mayor (Tabla 15).

En el estudio llevado a cabo por (Anema y Klostermeyer, 1996) el diámetro promedio (nm) de las micelas de caseína en la leche desnatada fue de $199,5 \pm 0,6$. Este valor es un poco más alto al obtenido en este trabajo para el Control a t0. Tras un tratamiento térmico de $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 6 minutos a pH 7,1 el diámetro promedio aumento hasta $202,1 \pm 1,6$ por lo que el tamaño de las micelas no sufrió grandes cambios al igual que ocurre en este caso con tratamientos térmicos de menor intensidad. Se vio también que una disminución del pH hasta 6,6 o un aumento del mantenimiento de la temperatura hasta 25 minutos afecta al tamaño de partícula aumentando considerablemente el diámetro. En otro estudio realizado por (Sauer y Moraru, 2012) en el que se determina la estabilidad térmica de concentrados de CM con temperaturas comprendidas entre $110\text{ }^\circ\text{C}$ y $150\text{ }^\circ\text{C}$ también se aprecia este efecto. Los tratamientos térmicos provocaron un incremento considerable del tamaño de partícula a pH 6,9 mientras que a pH 7,1 y 7,3 la variación fue mucho menor. En este trabajo la CM-4 % tiene un valor de pH alrededor de 7,20 que parece favorecer la estabilidad.



Letras diferentes para un mismo tiempo significan grupos homogéneos diferentes según el análisis post-hoc HSD Tukey al 95 % de confianza.

Figura 29. Tamaño de partícula (nm) de la CM-4 % a tiempo 0 y tiempo 7 para el Control y los dos tratamientos.

La polidispersión (Figura 30) mide la variabilidad entre partículas, en el Control se aprecia un incremento de la polidispersión con el tiempo superior al aumento que se observa en las muestras tratadas térmicamente. En cualquier caso, no existen diferencias significativas respecto al tiempo en este parámetro, tampoco respecto al tratamiento.

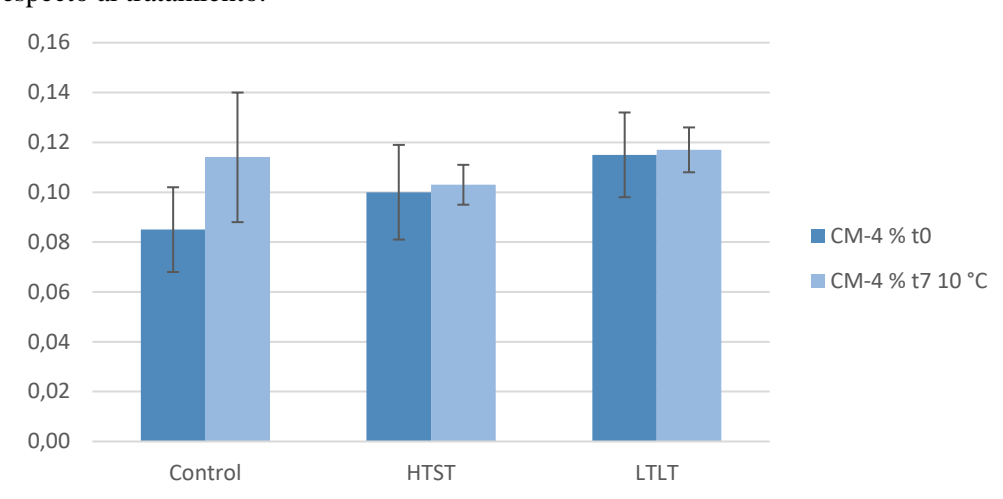


Figura 30. *Polidispersión de la CM-4 % a tiempo 0 y 7 para el Control y los dos tratamientos.*

El potencial ζ mide la diferencia de potencial de la partícula en un medio líquido específico, este valor sirve para comprender y predecir las interacciones entre partículas en suspensión. No se observan grandes diferencias de potencial ζ entre el Control y los tratamientos, el tiempo tampoco parece influir (Tabla 18).

En el estudio realizado por (Belicieu et al., 2012) se empleó el potencial ζ como medida de la carga eléctrica de las micelas de caseína y como un indicador relativo de la estabilidad coloidal de los concentrados de CM. Los valores de potencial ζ que obtuvieron estaban entre -20 y -30 mV (concentraciones CM de 5, 7.5, 8 y 10 %) y determinaron que los tratamientos de esterilización afectaron significativamente a este parámetro mientras que el contenido en caseína no influyó. Tras la esterilización los valores absolutos del potencial ζ disminuyeron lo que indica una disminución de la estabilidad electrostática de la CM. En este caso todos los valores son inferiores a -20 mV y no se observa disminución del potencial ζ con los tratamientos de pasteurización.

Tabla 18. *Potencial ζ de la CM-4 % a tiempo 0 y tiempo 7 para el Control y los dos tratamientos.*

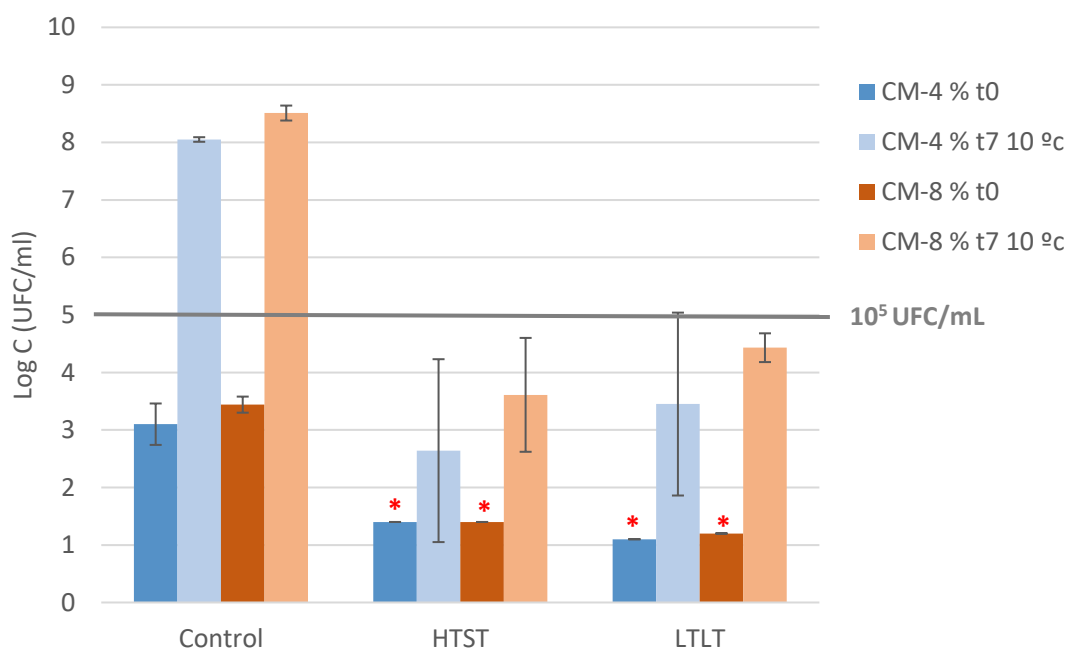
	Potencial ζ (mV)		
	Control	HTST	LTLT
t0	-17,85 ± 1,19	-17,55 ± 1,41	-17,52 ± 1,31
t7 10 °C	-17,10 ± 1,14	-17,40 ± 1,23	-18,3 ± 1,62

5.2.2. Efecto de los tratamientos térmicos en la estabilidad microbiológica del aislado de proteína de leche (Caseína micelar)

Para determinar la estabilidad microbiológica de las dispersiones de caseína micelar se realizó un recuento de los microorganismos mesófilos y psicrótrofos a t0 y a t7.

Los resultados obtenidos del recuento de microorganismos mesófilos se muestran en la Figura 31, la carga microbiana (C) se expresa como logaritmo (Log) de las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Se observa que a tiempo 0 la carga microbiana en las muestras tratadas térmicamente es menor que la carga de las muestras Control para las dos concentraciones (4 y 8 %). A t7 la carga microbiana de las muestras Control aumenta considerablemente entre 8 y 9 Log UFC/ml, en cambio la carga microbiana de las muestras tratadas térmicamente disminuye respecto a la Control entre 3 y 5 reducciones decimales.

Según el REGLAMENTO (CE) N° 1020/2008 la carga microbiana de la leche tratada térmicamente debe ser inferior a 10^5 UFC/ml o bien 5 Log UFC/ml. Los resultados obtenidos en las muestras tratadas térmicamente se encuentran por debajo de este valor tras los 7 días de almacenamiento, aunque en una de las repeticiones de la CM-4 % se obtuvo un resultado de $4,90 \pm 0,10$.



* Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior del valor que aparece en el gráfico.

Figura 31. Logaritmo de la carga microbiana (C) de mésofilos en la caseína micelar (CM) con dos concentraciones distintas (4 y 8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados.

Los resultados no fueron muy homogéneos entre una repetición y otra por este motivo las barras de error que aparecen en la Figura 31 son grandes, a excepción de la CM-8 % a tiempo 7.

En el tratamiento HTST a t7 la muestra CM-4 % presenta mucha desviación ya que en una repetición la carga microbiana era inferior a $1,20 \pm 0,35$ mientras que en la otra fue de $4,08 \pm 0,06$ (Figura 32 A). En el caso de la muestra CM-8 % a tiempo 7 la desviación es similar ya que una repetición dio como resultado una carga microbiana de $2,70 \pm 0,13$ mientras que en otra repetición la carga fue algo mayor con un resultado de $4,51 \pm 0,01$ (Figura 32 B) Estas diferencias pueden deberse a una contaminación durante la manipulación de la muestra.

Un estudio llevado a cabo por (Ranieri et al., 2009) determino la efectividad del tratamiento HTST en el crecimiento microbiológico de leche con un 2 % de grasa. Se realizó la pasteurización con diferentes temperaturas (72.9, 77.2, 79.9, y 85.2 °C) y un tiempo de mantenimiento de 25 segundos, las muestras se almacenaron a 6 °C durante 21 días. Los resultados de este estudio que más se acercan a los establecidos en este trabajo son los obtenidos a la temperatura de 72,9 °C a los 7 y 14 días. El recuento de aerobios en este caso fue inferior a 3 Log UFC/ml (7 días) y menos de 6 Log UFC/ml (14 días) si se tienen en cuenta las barras de error. En este trabajo, el recuento de aerobios mesófilos a los 7 días de almacenamiento a 10 °C en el tratamiento HTST dieron como resultado valores inferiores a 5 Log UFC/ml en ambas concentraciones. Este resultado sería intermedio a los obtenidos mediante ese estudio, lo cual tiene sentido ya que la temperatura de almacenamiento en este trabajo es más elevada por tanto a t7 la carga microbiana es superior. Los intervalos de error en este estudio fueron aproximadamente de entre 1 y 2 Log UFC/ml, algo inferiores a los obtenidos en la CM-4 % t7.

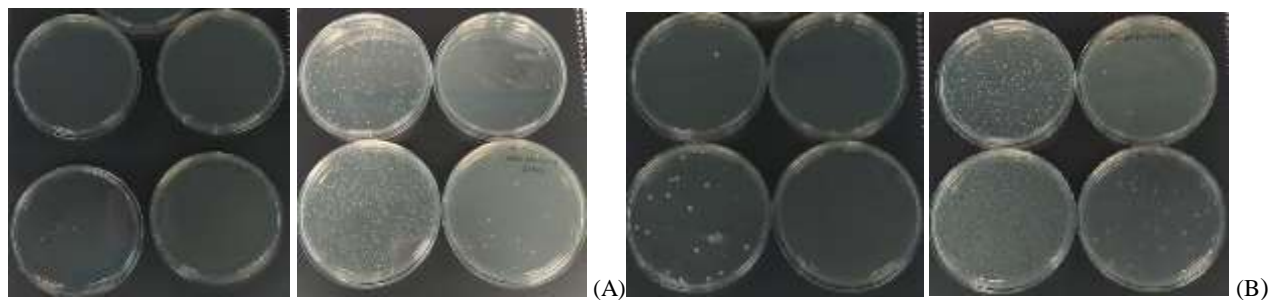


Figura 32. Placas de Petri con 4 diluciones consecutivas para el recuento de microorganismos mesófilos a tiempo 7 del tratamiento HTST en la muestra CM-4 % (A) y CM-8 % (B)

En el caso la CM-4 % a t7 en el tratamiento LTLT, en una repetición el recuento fue inferior a 2 mientras que en otra repetición el recuento fue de $4,90 \pm 0,10$ (Figura 33 A). En el caso de la CM-8 % del tratamiento LTLT a tiempo 7 los resultados obtenidos en ambas repeticiones fueron bastante similares, $4,61 \pm 0,05$ y $4,26 \pm 0,25$ (Figura 33 B).

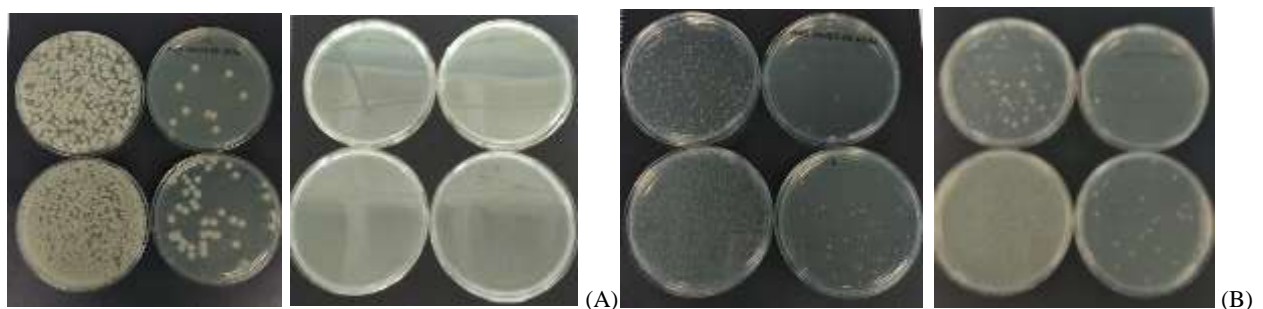


Figura 33. Placas de Petri con 4 diluciones consecutivas para el recuento de microorganismos mesófilos a tiempo 7 del tratamiento LTLT en la muestra CM-4 % (A) y CM-8 % (B).

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en el recuento de psicrótrofos a t0 y a t7 para el Control y los dos tratamientos. A t0 no hay apenas desarrollo microbiológico, tanto en las muestras Control como en las muestras tratadas térmicamente. En cambio a t7 las muestras Control presentan un crecimiento de psicrótrofos considerable, siendo la carga microbiana de la CM-8 % superior a la CM-4 %. Además se supera el límite microbiológico indicado en el REGLAMENTO (CE) N° 1020/2008.

En las muestras tratadas térmicamente, tanto para el tratamiento HTST como para el LTLT, la carga microbiana a t7 se mantiene estable y es similar a la del t0. Por tanto no hay apenas desarrollo microbiológico tras los 7 días de almacenamiento, tanto para ambas concentraciones como para los dos tratamientos.

Tabla 14. Logaritmo de la carga microbiana (C) de psicrótrofos en la caseína micelar (CM) con dos concentraciones distintas (4 y 8 %) a tiempo 0 (t0) y transcurridos 7 días (t7) a 10 °C en el Control (sin tratamiento) y en los dos ensayos realizados.

	Control		Ensayo 1 (HTST)		Ensayo 2 (LTLT)	
	CM-4 %	CM-8 %	CM-4 %	CM-8 %	CM-4 %	CM-8 %
t0	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00
t7 10 °C	5,21 ± 0,06	8,35 ± 0,19	< 1,00	< 1,00	< 1,00	< 1,00

En la Figura 34 se puede observar el efecto de los tratamientos en el crecimiento de psicrótrofos tras los 7 días de almacenamiento en la CM-8 %, en el Control se observa un excesivo desarrollo con $8,35 \pm 0,19$ Log UFC/ml mientras que tras los tratamientos apenas hay desarrollo.

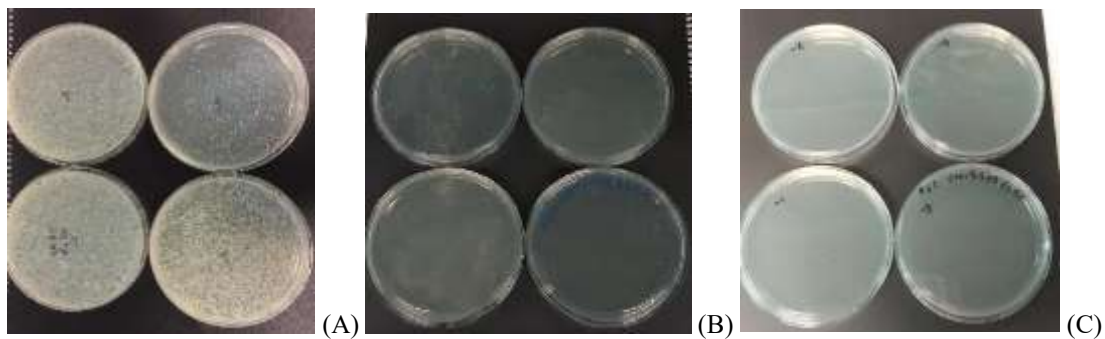


Figura 34. Placas de Petri con 4 diluciones consecutivas para el recuento de psicrótrofos de la CM-8 % a tiempo 7 del Control (A), del tratamiento HTST (B) y del tratamiento LTLT (C).

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que los dos tratamientos térmicos de pasteurización (HTST y LTLT) permiten alargar la vida útil de dispersiones de caseína micelar con una concentración del 4 y el 8 % hasta 7 días a 10 °C.

Las muestras son estables físico-químicamente tras ambos tratamientos (HTST y LTLT) y la estabilidad se mantiene tras los 7 días de almacenamiento a 10 °C:

- El pH la CM-4 % es significativamente superior al Control en las muestras tratadas térmicamente, en el caso de la CM-8 % el pH también aumenta sin embargo no hay grandes variaciones. Tras los 7 días de almacenamiento no hay apenas variaciones de pH en el Control ni en los tratamientos térmicos (HTST y LTLT). El pH disminuye significativamente al aumentar la concentración de caseína.
- La acidez aumenta tras el tratamiento pero, a diferencia del Control, se mantiene estable a t7. Este parámetro es mayor conforme aumenta la concentración de caseína micelar.
- La diferencia total de color (ΔE^*) en la CM-4 % tras los tratamientos térmicos, tanto a t0 como a t7, tiene valores comprendidos entre 1 y 2 por lo que un observador estándar no notaría la diferencia entre las muestras tratadas térmicamente y la Control. En la CM-8 % tras el tratamiento LTLT, tanto a t0 como a t7, los valores de ΔE^* son superiores a 2 por tanto se podrían apreciar diferencias de color entre el Control y el tratamiento LTLT.
- Los valores de TSI del Control y los tratamientos térmicos (HTST y LTLT) no muestran diferencias significativas, por lo que la dispersión de caseína micelar es estable.
- El tamaño de partícula de la muestra Control de caseína micelar aumenta desde t0 a t7. Sin embargo, tras los tratamientos térmicos (HTST y LTLT) el tamaño de partícula es equivalente a t0 y t7.

Las muestras son estables microbiológicamente tras los 7 días de almacenamiento a 10 °C:

- Los tratamientos térmicos de pasteurización (HTST y LTLT) reducen la carga microbiana de mesófilos por debajo de 10^5 UFC/ml a los 7 días de almacenamiento. La variación entre las repeticiones de los tratamientos no permitió determinar con certeza cuál de los dos tratamientos fue más efectivo.
- Los dos tratamientos térmicos disminuyen considerablemente el crecimiento de psicrótrofos para las condiciones de almacenamiento establecidas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, S., Beausire, R. L. W., Patel, S., & Patel, H. (2015). Innovative uses of milk protein concentrates in product development. *Journal of Food Science*, *80 Suppl 1*, A23-29. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12807>
- Anema, S. G. (2008). Chapter 8 - The whey proteins in milk: thermal denaturation, physical interactions and effects on the functional properties of milk. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 239-281). San Diego: Academic Press. Recuperado a partir de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123740397000088>
- Anema y Klostermeyer. (1996). ζ -Potentials of casein micelles from reconstituted skim milk heated at 120 °C. *International Dairy Journal*, *6(7)*, 673-687. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00070-4](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00070-4)
- Badui Dergal. (2006). *Química de los alimentos* (Cuarta). México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Beliciu et al. (2012). The effect of commercial sterilization regimens on micellar casein concentrates. *Journal of Dairy Science*, *95(10)*, 5510-5526. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4875>
- Bogahawaththa et al. (2018). Comparison between thermal pasteurization and high pressure processing of bovine skim milk in relation to denaturation and immunogenicity of native milk proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *47*, 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.016>
- Broyard et al. (2015). Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Science & Technology*, *95(6)*, 831-862. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y>
- Casp y Abril. (2003). *Procesos de conservación de alimentos* (Segunda Edición). Mundi-Prensa.
- Cerf y Condron. (2006). Coxiella burnetii and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology and Infection*, *134(5)*, 946-951. <https://doi.org/10.1017/S0950268806005978>
- Considine et al. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *8(1)*, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.08.003>
- Dalgleish y Corredig. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*, 449-467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- De Kruif et al. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, *171-172*, 36-52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>
- Edwards et al. (2008). Chapter 6 - Structure and stability of whey proteins. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 163-203). San Diego: Academic Press. Recuperado a partir de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123740397000064>
- Ferrandini et al. (2008). Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de Veterinaria de Murcia*, *22(0)*, 5-18.

- Fox, P. F. (2008). Chapter 1 - Milk: an overview. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 1-54). San Diego: Academic Press. Recuperado a partir de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123740397000015>
- Fox y Brodkorb. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18(7), 677-684. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.002>
- Gazi y Huppertz. (2015). Influence of protein content and storage conditions on the solubility of caseins and whey proteins in milk protein concentrates. *International Dairy Journal*, 46, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.009>
- Gonzalez-Jordan et al. (2015). The effect of pH on the structure and phosphate mobility of casein micelles in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 51, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.024>
- Guevara-Garay et al. (2014). Kappa caseína de la leche: aspectos bioquímicos, moleculares, productivos y nutricionales. *Revista Médica de Risaralda*, 20(1), 11.
- Hernández-Rojas et al. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla.*, 13-22.
- Holt, C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6127-6146. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6831>
- Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2), 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>
- Horne, D. S. (2008). Chapter 5 - Casein micelle structure and stability. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 133-162). San Diego: Academic Press. Recuperado a partir de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123740397000052>
- Huppertz et al. (2018). 3 - The caseins: Structure, stability, and functionality. En *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (pp. 49-92). Woodhead Publishing. Recuperado a partir de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081007228000048>
- Mokrzycki y Tatol. (2011). Color difference ΔE : a survey. *Machine Graphics and Vision*, Vol. 20, No. 4, 383-411.
- Moughan, P. J. (2008). Chapter 17 - Milk proteins: a cornucopia for developing functional foods. En A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins* (pp. 483-499). San Diego: Academic Press. Recuperado a partir de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123740397000179>
- Pereda, J. (2009). *Utilización de la ultra alta presión por homogenización como alternativa al tratamiento de pasteurización para la obtención de leche en consumo*. Universitat Autònoma de Barcelona,. Recuperado a partir de <https://ddd.uab.cat/record/36550>
- Pereira. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(6), 619-627. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
- Post et al. (2012). Effect of temperature and pH on the solubility of caseins: environmental influences on the dissociation of $\alpha(S)$ - and β -casein. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1603-1616. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4641>

- Quispe Guachalla. (2010). *Estudio de la calidad de leche en los centros de acopio del municipio de Pucarani*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Raikos et al. (2010). Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.014>
- Ranieri et al. (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4823-4832. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2144>
- Ryan, G., Nongonierma, A. B., O'Regan, J., & FitzGerald, R. J. (2018). Functional properties of bovine milk protein isolate and associated enzymatic hydrolysates. *International Dairy Journal*, 81, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.013>
- Sahin et al. (2006). *Propiedades físicas de los alimentos*. ACRIBIA, S.A.
- Sauer y Moraru. (2012). Heat stability of micellar casein concentrates as affected by temperature and pH - Journal of Dairy Science. *Journal of dairy science*, 95(11), 6339-6350. Recuperado a partir de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(12\)00658-3/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00658-3/abstract)
- Sikand et al. (2011). Solubility of commercial milk protein concentrates and milk protein isolates. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 6194-6202. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4477>
- Smiddy et al. (2007). Microbial shelf-life of high-pressure-homogenised milk. *International Dairy Journal*, 17(1), 29-32. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.003>
- Turbiscan® LAB. (2014). UserGuide LAB 2_1, Various physical destabilization and detection with the Turbiscan.
- Uluko et al. (2016). Functional Characteristics of Milk Protein Concentrates and Their Modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1193-1208. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.758625>

8. ANEXO: Ficha técnica del aislado de proteína de leche PRODIET87 B

PRODIET87 B

Ref. MPI87BDS09

TECHNICAL
DATA SHEET

- Description** PRODIET87 B is a milk protein isolate (MPI) in spray-dried powder that contains more than 87% protein on dry matter.
PRODIET87 B is riched in micellar caseins: 92% as compared to 80% in original milk.
- Applications** PRODIET87 B is perfectly adapted to functional foods (bars, beverages...).
PRODIET87 B also offers good heat stability.
- Benefits** PRODIET87 B is rich in high nutritional quality proteins and riched in micellar caseins which have a positive effect on satiety.
PRODIET87 B is thus particularly adapted to the market of sports, dietetic and clinical nutrition.

Technical specifications

Physical-Sensorial	Typical Value	Guaranteed Value	Method of Analysis
Form	Free flowing powder		Internal method
Color	Creamy white		Internal method
Taste and odor	Milky		Internal method
Scorched particles	A	B	ADMI
Bulk density			ISO 8967

Chemical

	Typical Value	Guaranteed Value	Method of Analysis
Total moisture	5.0 %	≤ 6.0 %	IDF 26
Total protein	83.0 %		ISO 8968
Protein on dry matter	87.5 %	≥ 87.0 %	ISO 8968
Total fat	1.5 %	≤ 2.5 %	ISO 1736
Total carbohydrate	2.0 %		by difference
(of which) Sugars	2.0 %		by difference
Lactose	2 %		by difference
Total ash	8.5 %	≤ 9.0 %	V04-208

Microbiological

	Typical Value	Guaranteed Value	Method of Analysis
Total Plate Count	5 000 CFU / g	< 10 000 CFU / g	ISO 4833
Yeasts - Moulds	< 10 CFU / g	< 30 CFU / g	ISO 6611
Enterobacteriaceae	Negative / g	Negative / g	ISO 8523
Coliform organisms	Negative / g	Negative / g	ISO 4831
E. coli	Negative / g	Negative / g	ISO 7251
Salmonella	Negative / 50 g	Negative / 50 g	ISO 6579
Staphylococcus coag. +	Negative / g	Negative / g	ISO 6888

Nutritional

Energy per 100g	354 kcal - 1501 kJ
-----------------	--------------------

Packaging and storage

Packaging:
20kg bag

Best before date:
18 months when stored in a cool and dry place.

Quality assurance

Additives: Free
Allergens: Milk and products thereof
BSE: Free
Contaminants: Comply with EC regulation
GMO: Free

Regulation

Customs code (EC): 35.04.00.10.00
Suggested labelling: Milk protein isolate (MPI)

Mar. 18, 2016

In the absence of an agreed specification, this technical data sheet would be held valid for delivery.