

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

***ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REOLOGICO
DE CASEINAS MICELARES RECONSTITUIDAS***

Presentado por:

Tatiana Flores González *(e)k*

aurkeztua

Dirigido por:

Teresa Fernández García *(e)k*

zuzendua

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

UNIBERTSITATE MASTERRA NEKAZARITZA INGENIERITZ

Febrero, 2019

Resumen

Las caseínas micelares son ingredientes de gran valor debido a sus propiedades nutricionales y tecnológicas (emulsificante, espumante, estabilizante). El estudio del comportamiento reológico de concentrados de caseínas en polvo es útil para su empleo en cálculos de ingeniería de procesos alimentarios en los que este ingrediente interviene (alimentos funcionales). En este trabajo se identifican dos tipos de comportamiento reológico según la concentración de disolución de caseína micelar reconstituida (CMR). Soluciones en régimen diluido (4%, 8% y 10%) presentan comportamiento newtoniano. La solución estudiada de mayor concentración (15%) presenta un comportamiento pseudoplástico. Por otro lado, la dilución de CMR al 12% marca un punto de inflexión en el comportamiento reológico de estas soluciones ya que, a bajas temperaturas (4°C y 10°C), es pseudoplástica; mientras que a mayores temperaturas (22,5°C, 33°C y 55°C) es newtoniana. El efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente de CMR se estudia con ecuaciones tipo Arrhenius, observando que los cambios en la viscosidad aparente están más influenciados por la variación de la temperatura a medida que se eleva la concentración de la solución. La repercusión de la temperatura y la concentración sobre CMR se modeliza matemáticamente y de forma conjunta mediante una única ecuación. Adicionalmente, se estudia el efecto de tratamientos de conservación sobre soluciones de CMR al 8%, de tal forma que los tratamientos de conservación no térmicos (altas presiones hidrostáticas a 450 y 600MPa) son los que más repercuten sobre la viscosidad relativa. Así mismo, se observa que con el tiempo de almacenamiento las muestras de CMR al 8%, que no han tenido tratamientos de conservación, experimentan un cambio de comportamiento reológico; mientras que las muestras que han sido pasteurizadas térmicamente (HTST o LTLT) o estabilizadas por altas presiones (300MPa, 450MPa o 600MPa durante 5 min) no se ven alteradas.

Palabras clave: *Caseína micelar reconstituida (CMR), viscosidad, comportamiento reológico, modelo de Arrhenius, pasteurización, altas presiones hidrostáticas.*

Abstract

Micellar caseins are valuable ingredients due to their nutritional and technological properties (emulsifying, foaming agent, stabilizer). The study of the rheological behavior of powdered casein concentrates is useful for its use in engineering calculations of food processes in which this ingredient is involved (functional foods). In this work, two types of rheological behavior are identified according to the dissolution's concentration of micellar casein concentrates (MCC). Solutions in a diluted regime (4%, 8% and 10%) present Newtonian behavior. The solution studied with the highest concentration (15%) shows shear-thinning behavior. On the other hand, the dilution of MCC at 12% marks a turning point in the rheological behavior of these solutions since, at low temperatures (4°C and 10°C), it is shear-thinning; while at higher temperatures (22.5°C, 33°C and 55°C) it is Newtonian. The effect of temperature on the apparent viscosity of MCC is studied with Arrhenius equations, observing that changes in apparent viscosity are more influenced by temperature variation as the concentration of the solution increases. The impact of temperature and concentration on MCC is mathematically modeled together using a single equation. In addition, the effect of conservation treatments on 8% MCC solutions is studied, so that non-thermal conservation treatments (high hydrostatic pressures at 450 and 600MPa) have the greatest impact on relative viscosity. Likewise, it is observed that with storage time the samples of MCC at 8%, which have not had conservation treatments, undergo a change in rheological behavior; while the samples that have been thermally pasteurized (HTST or LTLT) or stabilized by high pressures (300MPa, 450MPa or 600MPa during 5 min) are not altered.

Key words: *Micellar casein concentrate (MCC), viscosity, flow behavior, Arrhenius model, pasteurization, high hydrostatic pressure.*

Índice general

1. Antecedentes	9
2. Introducción.....	10
2.1 Proteínas de la leche y sus aplicaciones	10
2.2 Caseínas	11
a. Grupos de caseínas	12
b. Estructura micelar de las caseínas	13
2.3 Tratamientos de conservación	15
a. Tratamiento térmico: Pasteurización.....	15
b. Tratamiento no térmico: Altas presiones hidrostáticas	16
2.4 Propiedades reológicas de los alimentos.....	18
a. Fluidos newtonianos.....	18
b. Fluidos No-newtonianos	18
c. Viscosidad de soluciones	21
d. Viscosidad en función de la concentración	22
e. Viscosidad en función de la Temperatura	22
2.5 Reología de caseínas micelares	23
3. Objetivo	24
4. Plan experimental	24
5. Materiales y Métodos	25
5.1 Material.....	25
a. Prodiel®87B	25
b. Agua desionizada	25
c. CMR 8% tras tratamientos de conservación	25
5.1 Equipo de reología	25
5.2 Metodología y condiciones de ensayo	26
a. Reconstitución del concentrado de caseína micelar Prodiel® 87B.....	26
b. Determinación del extracto seco.....	26
c. Determinación del índice de solubilidad.....	27
c. Caracterización físico-química	27
d. Estabilidad Física	28
g. Estudio Reológico	28
5.3 Análisis de datos	29
6. Resultados y discusión	30
6.1 Reconstitución de la caseína micelar en solución acuosa.....	30

6.2	Estudio Reológico.....	33
a.	Evolución de la viscosidad con el tiempo.....	33
b.	Influencia de la temperatura, concentración y velocidad de deformación sobre la viscosidad relativa.....	33
c.	Comportamiento reológico y modelización	35
d.	Influencia de la concentración en el comportamiento reológico.	39
e.	Influencia de la temperatura en el comportamiento reológico	40
f.	Efecto combinado de temperatura y concentración sobre el comportamiento reológico. 42	
6.3	Influencia sobre la reología de tratamientos de conservación y tiempo de almacenamiento.	44
a.	Influencia de tratamientos de conservación sobre la viscosidad relativa.	44
b.	Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la viscosidad relativa.....	44
c.	Modelización del comportamiento reológico bajo la influencia de tratamientos de conservación y tiempo de almacenamiento.....	45
7.	Conclusiones.....	47
8.	Referencias	49

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes de la leche (Webb & Johnson, 1972)	10
Tabla 2. Propiedades generales de moléculas de caseína (Broyard & Gaucheron, 2015)	12
Tabla 3. Tratamientos de conservación y condiciones de ensayo para CMR 8%.	25
Tabla 4. Extracto seco [ES] e Índice de solubilidad [IS] según protocolos de preparación.	30
Tabla 5. Caracterización física y química de CMR según protocolo de preparación A.	31
Tabla 6. Caracterización física y química de CMR según protocolo de preparación B.	31
Tabla 7. Ajuste al modelo de Ostwale de Waele (n: índice de comportamiento; K: índice de consistencia).....	35
Tabla 8. Clasificación reológica de CMR según temperatura y concentración.	36
Tabla 9. Valores de viscosidad y viscosidad aparente [mPa.s] para caseínas micelares reconstituidas a distintas concentraciones.....	38
Tabla 10. Coeficientes a_1 y a_2 para el modelo de viscosidad aparente de CMR en función de la concentración.	39
Tabla 11. Valores de los parámetros de la ecuación tipo Arrhenius a diferentes concentraciones de CMR.	40
Tabla 12. Valores de los parámetros de la ecuación tipo Arrhenius según gradiente de velocidad para CMR al 15%.	41
Tabla 13. Ajuste al modelo de Ostwale de Waele (n: índice de comportamiento; K: índice de consistencia). Tiempo de almacenamiento 0 días. Diferentes superíndices representan diferencias significativas.....	45
Tabla 14. Ajuste al modelo de Ostwale de Waele (n: índice de comportamiento; K: índice de consistencia). Tiempo de almacenamiento 7 días. Diferentes superíndices representan diferencias significativas.....	46

Índice de Figuras

Figura 1. Modelo (sección transversal) de una micela de caseína (Walstra, 1999).	14
Figura 2. Modelo de doble unión para estructura de micela de caseína (Horne, 1998).	14
Figura 3. Evolución temperatura sistema de pasterización en paralelo (Abril & Casp Vanaclocha, 1999)	16
Figura 4. Esquema de funcionamiento HHP (Hiperbaric, 2018)	17
Figura 5. Definición gráfica de viscosidad (Orrego Alzate, 2003).	18
Figura 6. Relaciones entra la viscosidad aparente y la velocidad de deformación	19
Figura 7. Comportamientos tipo plásticos.	20
Figura 8. Reograma comportamiento tixotrópico.	20
Figura 9. Reograma comportamiento reopéctico.	20
Figura 10. Haake Rotovisco RV1	26
Figura 11. Condiciones método escalonado HHP.	28
Figura 12. Curvas comportamiento de Flujo.	28
Figura 13. TSI global. Protocolo de preparación A.	31
Figura 14. TSI global. Protocolo de preparación B.	32
Figura 15. Curva de flujo CMR 4% a 4°C.....	33
Figura 16. Evolución de la viscosidad relativa frente a la concentración de CMR según gradiente de velocidad. Valores medios y DS para para n=2.	34
Figura 17. Índice de comportamiento de flujo (n). Valores medios y DS para n=2. Diferentes superíndices indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% según método LSD de Fisher.....	36

Figura 18. Relación de viscosidad aparente según concentración.....	39
Figura 19. Ajuste del modelo para cálculo de viscosidad en función de la concentración.	39
Figura 20. Gráfica de Arrhenius para la variación de la viscosidad aparente a $300s^{-1}$ con la temperatura.	40
Figura 21. Ajuste del modelo para cálculo de viscosidad en función de la temperatura.	41
Figura 22. Gráfica de Arrhenius para la variación de la viscosidad aparente con la temperatura para CMR 15%.	41
Figura 23. Energía de activación según concentración de CMR.....	42
Figura 24. Ln del valor de la constante de Arrhenius según concentración de CMR.....	42
Figura 25. Evolución de la velocidad aparente según efecto combinado de concentración y temperatura.	43
Figura 26. Evolución de la viscosidad relativa de CMR 8% tras tratamientos de conservación.	44
Figura 27. Evolución de la viscosidad relativa de CMR8% según el tiempo de almacenamiento.	45
Figura 28. Evolución de la viscosidad relativa de CMR8% según el tiempo de almacenamiento.	45

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Viscosidad fluidos newtonianos	18
Ecuación 2. Ley de la potencia. Ecuación de Ostwale de-Waele.....	19
Ecuación 3. Viscosidad fluidos plásticos.	20
Ecuación 4. Determinación de esfuerzo sobre materiales viscoelásticos.	21
Ecuación 5. Viscosidad relativa	21
Ecuación 6. Viscosidad específica.....	22
Ecuación 7. Viscosidad específica.....	22
Ecuación 8. Viscosidad inherente.....	22
Ecuación 9. Viscosidad intrínseca.	22
Ecuación 10. Viscosidad según concentración.....	22
Ecuación 11. Ecuación de Arrhenius.	22
Ecuación 12. Extracto seco (ES)	26
Ecuación 13. Índice de solubilidad (IS).....	27
Ecuación 14. Acidez.....	27
Ecuación 15. Turbiscan Stability Index (TSI)	28
Ecuación 16. Ecuación efecto combinado concentración y temperatura para CMR.....	43

1. Antecedentes

El sector de la industria alimentaria se encuentra en constante desarrollo y para ello busca nuevos productos que cumplan las expectativas de un consumidor que, por su exigencia a la hora de escoger un producto, presta cada vez mayor atención a las cualidades nutricionales del alimento que va a consumir.

Este hecho se refuerza por medio del uso y disponibilidad de nuevas tecnologías. Este tipo de alimentos reciben el nombre de “alimentos funcionales” y tienen como fin principal producir efectos fisiológicos favorables para la salud. Esto se produce mediante el enriquecimiento del alimento con compuestos de actividad biológica conocida que no se encuentran de forma natural en el mismo, o en cantidades suficientes para proporcionar dicho efecto (Bañares Vilella, 2006). En este grupo de alimentos podemos encontrar aquellos que poseen una composición baja en grasa, rica en calcio, con omega 3 y rica en proteínas.

Así mismo, han aparecido en el mercado en las últimas décadas un gran número de productos lácteos en polvo de alto contenido proteico, que se intentan cada vez más introducir en productos existentes. No solo para aumentar el valor nutritivo de los mismos, sino también para elaborar productos con propiedades físicas determinadas como emulsiones más estables o productos espumosos (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema, & Boekel, 2001).

La leche de vaca, la cual ha despertado un gran interés por su alto contenido proteico, se define como secreción láctea, prácticamente libre de calostro, obtenida por el ordeño completo de una o más vacas sanas (Walstra et al., 2001), compuesta por aproximadamente un 3,5% de proteína, de las cuales el 80% se corresponden con caseínas. Las caseínas han sido objeto de numerosos estudios desde hace más de 50 años, los cuales se han centrado principalmente en torno a la modelización de su conformación micelar. La búsqueda de aplicaciones para este grupo de proteínas demanda el conocimiento del comportamiento reológico del mismo; tanto para la evaluación de la calidad del producto, como también para los cálculos de ingeniería y diseño de procesos en los que intervienen (Sahin & Sumnu, 2009).

Según el Informe de Consumo de Alimentación en España del 2017, el consumo de leche líquida sufrió un descenso del 0,3% en el último año y su precio de venta un 1,9% de media. Por otro lado, se puede observar que los derivados lácteos (batidos, yogurt, cuajadas, nata, etc.) tienen una tendencia ascendente, llegando a aumentar sus ventas en un 0,6% (Ministerio de Agricultura, 2017).

Desde el ámbito económico y social se ofrece a la industria láctea un mercado potencial para el desarrollo y salida de nuevos productos, supliendo así la tendencia a la baja del consumo de leches líquidas. A partir de esto, se puede observar también la importancia y gran potencial de la aplicación de proteínas lácteas en alimentos funcionales. Así mismo, posee un gran interés la caracterización de las propiedades de estos componentes (físicas, químicas, reológicas, etc.), cuyo fin único es el de encontrar la óptima adaptabilidad de los mismos a los distintos procesos tecnológicos, manteniendo aquellas propiedades que los dotan de gran interés en su forma más natural posible.

2. Introducción

2.1 Proteínas de la leche y sus aplicaciones

La leche está compuesta por los elementos descritos en la **Tabla 1**. Las propiedades de los productos lácteos dependen de las propiedades de las proteínas, además de las grasas, lactosa y las sales, que tiene un efecto significativo sobre las modificaciones que se producen sobre la leche.

Tabla 1. Componentes de la leche (Webb & Johnson, 1972)

Componente	g.L ⁻¹
Agua	875
Glúcidos	48
Materia grasa	36
Sustancias nitrogenadas	33
Minerales	9

Se puede considerar que la leche de vaca contiene aproximadamente 32 g.L⁻¹ de proteína, es decir, la proteína de la leche representa un 3,5% su peso. Inicialmente se consideraba que la leche contenía un solo tipo de proteína pero sobre 1880 el científico sueco, Olav Hammarsten, demostró que las proteínas podían ser fraccionadas en dos grupos bien definidos. Una acidificación de la leche a pH de 4,6 (pH isoelectrico) a aproximadamente 30°C, provoca la precipitación de un 80% del total de proteínas de leche de vaca, esta fracción se conoce como caseína isoelectrica (ácida). El resto de proteínas que no solubilizan bajo estas condiciones se conocen como proteínas del suero (Fox, Uniacke-Loewe, McSweeney, & O'Mahony, 2003). Ambos grupos de proteínas han sido reconocidos como fundamentales para el mantenimiento de la salud y el buen desarrollo de recién nacidos. La cantidad de proteínas que tiene la leche es una característica esencial de su valor comercial, tecnológico y biológico. El contenido de proteína de la leche de vaca puede variar según la cantidad de la población de la especie, entre razas e individuos (Pellegrino, Masotti, Cattaneo, Hogenboom, & de Noni, 2013).

Las proteínas del suero (*whey protein*) son típicas proteínas globulares. Presentan hidrofobicidad relativamente elevada y sus cadenas peptídicas están muy compactadas. Se solubilizan como consecuencia del calentamiento que produce su desnaturalización (Walstra et al., 2001). Las proteínas del suero son termolábiles, pueden desnaturalizarse completamente por calentamiento a 90°C durante 10 minutos (Fox et al., 2003).

Las más abundantes son la β -lactoglobulina, que representa el 50% de las proteínas solubles de la leche y posee una función biológica relacionada con la asimilación intestinal de la vitamina A, y la α -lactoalbumina (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

Hace aproximadamente 15 años, las proteínas del suero eran consideradas como desecho del proceso de producción del queso. Al principio se utilizaba como fertilizante pero debido a su alto contenido proteico se consideró peligroso para el medio ambiente. El desarrollo de nuevas tecnologías permitió su uso como ingrediente en alimentos funcionales, productos farmacéuticos entre otros (DAE, 2017). Entre los primeros productos desarrollados se encuentran los quesos de suero (*requesón*), mediante la aplicación de calor (>90°C) y en algunas ocasiones la adición de ácidos orgánicos (acético, cítrico) y/o sales (calcio). Entre ellos se encuentran el queso variedad *Ricotta* elaborado a partir del suero procedente de la preparación de queso *mozzarella* o *provolone* (Smithers, 2008). Por otro lado, el desarrollo de films comestibles a partir de aislados de proteínas de suero, con adición de aceites esenciales para reducir la actividad microbiana,

con un gran potencial de aplicación en películas alimentarias (Seydim & Sarikus, 2006). Así mismo, se estudia la aplicación de este tipo de proteínas a la prevención del cáncer, infecciones microbianas, enfermedades inducidas por el estrés entre otras.

Las caseínas son el objeto principal de estudio de este trabajo. Se dedica un apartado exclusivo para hablar detalladamente de sus características y propiedades. La industria utiliza tres tipos de caseínas que se diferencian por su forma de preparación. La “*caseína ácida*” obtenida por acidificación de la leche desnatada a pH 4,6 mediante el uso de un ácido común (clorhídrico, sulfhídrico, etc.), la “*caseína láctica*” preparada por acidificación de la leche desnatada con ayuda de fermentos lácticos, y por último la “*caseína del cuajo*” que precipita por acción del cuajo. Tecnológicamente los dos últimos grupos presentan limitaciones por lo que la caseína ácida es la más utilizada (Alias, 1985).

Aunque la caseína ácida solo puede utilizarse en la elaboración de unos pocos alimentos, muchas de sus sales (caseinato de calcio y sodio) son más solubles y muy funcionales por lo que tienen un amplio rango de aplicación (Early & Oria Almudí, 2000). Al igual que las proteínas del suero, la aplicación de caseínas tanto en alimentos como productos no alimentarios es objeto de numerosos estudios. La propiedad anfipática de las caseínas la otorgan de una excelente propiedad emulsionante y en consecuencia el caseinato de calcio y sodio tienen extendidas aplicaciones como emulsificantes (Carr & Golding, 2016). Una de las mayores áreas de aplicación de caseínas es en la producción de licores en crema. Estudios revelan un cierto aumento de la viscosidad aparente de estas cremas a temperaturas de almacenamiento de 45°C, pero no se observa una relación directa con el uso de caseinatos (Lynch & Mulvihill, 1997). Sus propiedades antioxidantes también son objeto de estudio, la aplicación de 2% (w/w) de péptidos de caseinato cálcico en carne de res, con un contenido en lípidos del 15,8%, tiene un efecto inhibitor de la oxidación del 69,7% con respecto a carne no tratada (Sakanaka, Tachibana, Ishihara, & Juneja, 2005). En yogures, se busca mejorar la firmeza aunque se ha observado un descenso en los niveles de aroma debido a la fortificación del calcio (Saint-Eve, Juteau, Atlan, Martin, & Souchon, 2006).

Por otra parte, se encuentra la aplicación de este tipo de proteínas lácteas a productos no alimentarios. La manipulación de las propiedades funcionales de los sistemas de caseína mixtos puede tener un amplio rango de aplicaciones en plásticos, adhesivos y films. Uno de los usos más antiguos de las caseínas fue como pegamento aplicado por ejemplo a pigmentos de pintura. A principios del siglo XX, se producía un material flexible tipo plástico a partir de extraer la mezcla de caseína retenida en agua. Las caseínas también eran utilizadas como recubrimientos para el papel en el año 1893. No obstante, el desarrollo de alternativas sintéticas más baratas y un incremento en el valor de ingredientes lácteos en productos alimentarios, disminuye el uso de estos componentes para este tipo de productos (Carr & Golding, 2016).

2.2 Caseínas

La *American Dairy Science Association Committee on the Nomenclature, Classification, and Methodology of Milk Proteins* define a las caseínas como la proteína que precipita en la leche a pH de 4,6 a 30°C y que por lo tanto no es soluble a pH isoelectrico (Jeness et al., 1956). Las caseínas micelares son el vehículo de transporte del fosfato cálcico requerido para el crecimiento de los huesos de los neonatos, por lo que el desarrollo de caseínas micelares se remonta a más de 250 millones de años (C. . De Kruif, 2014; Holt & Carver, 2012).

Las caseínas difieren al de resto de proteínas de la leche. Son hidrofóbicas de carga muy elevada, con muchos residuos de prolina y pocos de cistina. En soluciones diluidas las cadenas están parcialmente desplegadas, dejando los grupos hidrofóbicos disponibles para establecer

fácilmente enlaces hidrofóbicos entre las moléculas. Se puede considerar que prácticamente no pueden ser desnaturalizadas porque casi no tienen estructura terciaria ni secundaria (Walstra et al., 2001).

a. Grupos de caseínas

En la leche existen varias caseínas diferentes cuya separación no fue posible hasta que se desarrolló la técnica de electroforesis. En principio se obtienen tres grupos (α , β , γ), pero posteriormente la caseína α se separó en una fracción sensible al Ca^{2+} y otra que no (κ). Finalmente, cuatro grupos pueden ser identificados tal y como se muestra en la **Tabla 2** según su sensibilidad al calcio. Los grupos α_{s1} -CN, α_{s2} -CN y β -CN son sensibles al calcio, mientras que la κ -CN no lo es (Huppertz, 2013). La proporción molar de estos compuestos es de 4:1:4:1,6. Las diferencias en la fosforilación y glicosilación, además de la proteólisis, originan una heterogeneidad todavía mayor (Walstra et al., 2001).

Tabla 2. Propiedades generales de moléculas de caseína (Broyard & Gaucheron, 2015)

	α_{s1} -caseína (α_{s1} -CN)	α_{s2} -caseína (α_{s2} -CN)	β -caseína (β -CN)	κ -caseína (κ -CN)
Peso molecular [kDa]	23	25	23	19
Concentración [g.L⁻¹]	10	2.6	9.3	3.3
Aminoácidos	199	207	209	169
Prolina	17	10	35	20
Cisteína	0	2	0	2
Ácido glutámico	24	25	18	13
Ácido aspártico	8	11	5	1
Fosfoserina	8	11	5	1
Residuos apolares [%]	36	40	33	33
Glicosilación	0	0	0	0-5
Carga a pH 6,6	-21	-15	-12	-3

- **α_{s1} - caseína**

Aproximadamente el 40% del total de caseína en leche de vaca es de tipo α_{s1} - CN. Presenta la carga más elevada y el mayor contenido en fosfatos. Esta proteína está compuesta de 199 aminoácidos, donde ocho de los dieciséis residuos de serina se encuentran fosforilados (Mercier, Grosclaude, & Ribadeau-Dumas, 1971). La proteína por referencia de esta familia es la α_{s1} - CN B-8P, cuya caracterización permite conocer que la masa molecular aproximada de estas proteínas es de aproximadamente 23 kDa, que puede incrementarse hasta 23,6 kDa como resultado de la fosforilación (Huppertz, 2013).

- **α_{s2} - caseína**

Este grupo de caseínas son bastantes sensibles al Ca^{2+} . Las variantes de esta proteína difieren en el número de ésteres de fosfato, que oscila entre 10 y 12 por molécula. La α_{s2} - CN contiene dos grupos deresiduos de cisteína (que forman puentes disulfuro –S-S–) y ningún grupo carbohidratado (Walstra et al., 2001). El 10% del total de caseínas en leche de vaca se corresponden a las de este grupo. La proteína de referencia de esta familia es la α_{s2} - CN A-11P (Huppertz, 2013).

- **β - caseína**

Este grupo abarca el 35% de la caseína de leche de vaca. La proteína de referencia para esta familia es la β - CN A²-5P, formada por 209 aminoácidos con una masa molecular de 23,6 kDa que puede incrementarse hasta los 24 kDa dependiendo de la fosforilación (Huppertz, 2013). La β caseína es la más hidrofóbica y contiene gran número de residuos de prolina. A temperaturas inferiores a 5°C no se produce la asociación de la β -caseína por lo que la molécula permanece desplegada. En la leche, parte de esta caseína se solubiliza a baja temperatura y en consecuencia la viscosidad de la leche aumenta (Walstra et al., 2001).

El producto de la degradación de la caseína β se categoriza como caseína γ . Se corresponde con los residuos más hidrofóbicos de la β -CN, por lo que es bastante soluble en etanol. La cantidad de este tipo de producto puede variar según la frescura de la leche y su temperatura de conservación (Walstra et al., 2001).

- **κ - caseína**

La estabilidad moléculas de caseína depende de la presencia de κ -CN en la superficie de la micela. Sirve como interfaz entre la parte interna (hidrofóbica) de la micela de caseína y el medio acuoso (Creamer, Plowman, Liddell, Smith, & Hill, 1998). Dentro de las caseínas, la κ -CN es la más pequeña en masa molecular (19kDa), con bajo nivel de fosforilación y baja sensibilidad al calcio. Además de la única que se encuentra en su forma glicosilada (Huppertz, 2013). Sólo contiene dos residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intermoleculares. Por esta razón la κ -CN se encuentra en la leche en forma de oligómeros que contienen de 5-11 monómeros (Walstra et al., 2001).

b. Estructura micelar de las caseínas

Las caseínas constituyen aproximadamente el 2,5% del total del peso de la leche, y las micelas ocupan el 10% del volumen. Las micelas pueden ser calentadas o enfriadas sin sufrir cambios significantes de agregación o destrucción es su estructura. Por otro lado, son fácilmente desestabilizadas si son tratadas con enzimas proteolíticas o por acidificación (Dalgleish & Corredig, 2012). El tamaño de la micela se encuentra en el rango de 20 a 600 nm de diámetro, con una media de 100 y 200 nm (Bloomfield & Mead, 1975). Las micelas son altamente hidratables, con aproximadamente 3,5 kilos de agua por cada kilo de proteína (Journink & De Kruif, 1993).

Estudios sobre la estructura micelar de caseínas ha sido propuesto desde hace más 50 años , siendo el modelo de la submicela (*submicelle model*) el más estudiado y base de modelos consecutivos (Slattery, 1976; Slattery & Evard, 1973a). Según el modelo de la submicela, las caseínas se agregan en primer lugar por interacciones hidrofóbicas entre subunidades de 15-20 moléculas cada una. El patrón seguido para estas interacciones depende de la variación en la κ -caseína contenida en la submicela. Las moléculas ricas en κ - caseínas se localizan en la cara exterior de la micela, mientras que las más pobres se encuentran en su interior (Schmidt, 1980; Slattery & Evard, 1973b).

El desarrollo de nuevos equipos como el microscopio eléctrico permitió confirmar que las micelas de caseína poseen una forma aproximadamente esférica, además de una estructura no homogénea en la cara exterior. Tras este nuevo descubrimiento, la teoría de la submicela no se considera suficientemente sólida para justificar la estructura de las caseínas (McMahon & McManus, 1998).

Intentando explicar este hecho, Holt propone la presencia de nano-clusters o nano-gránulos de CCP (fosfato cálcico coloidal). Según este modelo el carbono terminal de la κ - CN se extiende

hacia el exterior de la superficie micelar, formando así la capa pilosa observada en el exterior de esta estructura. La secuencia de aminoácidos fosforilada de la β -CN podría unirse a los gránulos de CCP, estabilizándolos y regulando su tamaño. Sin estas estructuras los nano-gránulos aumentarían de tamaño en exceso y precipitarían (Holt, 1992, 1998). El modelo de la micela de caseína propuesto por Holt se representa esquemáticamente en la **Figura 1** (Walstra, 1999). Según Walstra el modelo propuesto es útil para explicar la formación, estructura y propiedades de las caseínas aunque su estructura es de una mayor complejidad.

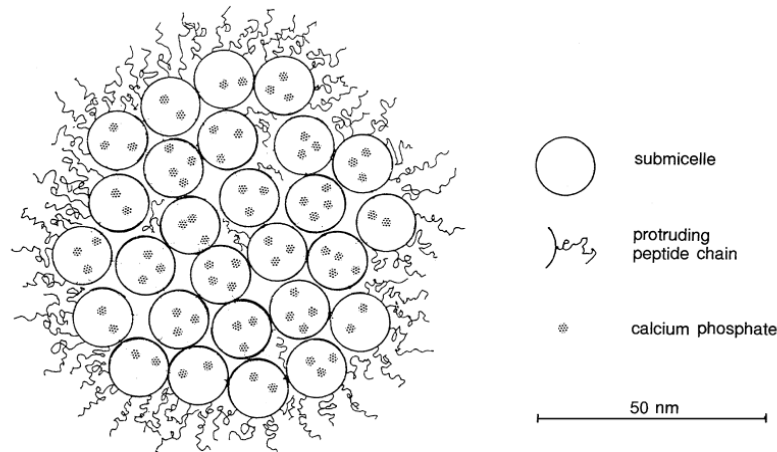


Figura 1. Modelo (sección transversal) de una micela de caseína (Walstra, 1999).

Otro de los autores que estudia el comportamiento y conformación entre moléculas de caseína es Horne. Según este autor la energía de interacción entre caseínas es un efecto combinado de la repulsión electrostática e interacciones hidrofóbicas producidas entre moléculas (Horne, 1983). Con estos supuestos Horne postula el modelo de doble unión (*dual bonding model*). Según este modelo representado en la **Figura 2**, la unión entre moléculas se produce entre regiones hidrofóbicas (representadas con barras rectangulares), y por la unión de regiones hidrofílicas que contienen grupos de fosfoserina con grupos de CCP. El crecimiento de estos polímeros es inhibido por la carga proteica residual cuya repulsión eleva la interacción de la energía libre. La κ -caseína actúa como terminante para ambos tipos de crecimiento, por lo que se encontrará de forma natural en la cara superficial de la micela.

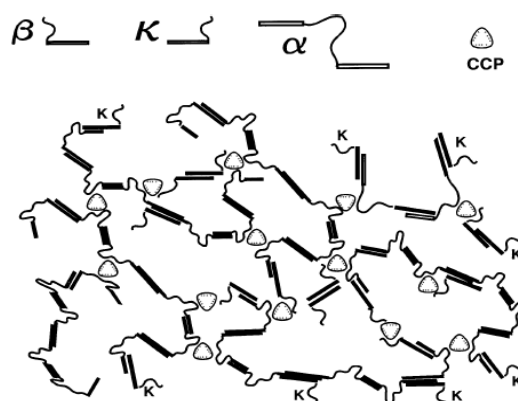


Figura 2. Modelo de doble unión para estructura de micela de caseína (Horne, 1998).

Observaciones más recientes de la micela de caseína bajo microscopio electrónico permiten observar agregados en el rango de 300-350 nm, cuya superficie está cubierta por estructuras cilíndricas o tubulares de 10-20 nm de diámetro. De este modo, se consolida la idea de que la micela es una estructura esférica pero cuya superficie sería más compleja que una simple capa pilosa (Dalglish, Spagnuolo, & Douglas Goff, 2004).

2.3 Tratamientos de conservación

El objetivo de los tratamientos de conservación es asegurar la calidad higiénica, microbiológica y sensorial del producto, dando como resultado un producto inocuo para el consumidor (Jeantet, Roignant, & Brulé, 2005).

Los métodos más tradicionales de conservación, mediante aplicación de calor, derivan en la pérdida de compuestos como aromas o sabores. Se busca con el desarrollo de nuevas tecnologías mantener las propiedades de los alimentos lo más parecidas al del producto fresco, por lo que se han desarrollado nuevas tecnologías como por ejemplo la aplicación de altas presiones. Como dos parámetros físico-químicos independientes, la presión y la temperatura inducen conjuntamente la desnaturalización de proteínas o cambios en su conformación, afectando a las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos (Yang & Powers, 2016).

En los siguientes apartados se busca describir la influencia específica de estos factores sobre la estructura y comportamiento de las caseínas.

a. Tratamiento térmico: Pasteurización

El proceso de fabricación de casi toda la leche y productos lácteos conlleva la aplicación de un tratamiento térmico. Los efectos del tratamiento térmico sobre estos productos dependen de la intensidad del calentamiento, es decir la combinación tiempo-temperatura. Una mala combinación de ambos factores puede derivar en pérdida de valor nutritivo, desarrollo de flavor a cocido o la inactivación de inhibidores del crecimiento microbiano (Walstra et al., 2001). Los tratamientos térmicos pueden ser de pasteurización o esterilización. Se centra el siguiente informe en el estudio de los procesos térmico de pasteurización.

• Descripción del proceso

El objetivo de la pasteurización es la destrucción de formas vegetativas, incluyendo ciertos patógenos como *Salmonella*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* o *Listeria*, así como de la reducción de la flora banal. Se pueden diferenciar dos sistemas de pasteurización según la combinación tiempo-temperatura empleada. Los tratamientos de baja pasteurización o LTLT (*low temperature-long time*) se realizan a temperaturas de 60-65°C durante 30 min. Por otro lado, los tratamientos de pasteurización alta o HTST (*high temperature-short time*) se realizan a temperaturas de 71-72°C durante aproximadamente 15-40 s (Jeantet et al., 2005).

El sistema de pasteurización determinará el equipo necesario para su aplicación. En procesos de baja pasteurización se pueden plantear sistemas por cargas o continuos, mientras que el sistema de pasteurización alta solo tiene sentido para productos líquidos en procesos continuos (Abril & Casp Vanaclocha, 1999).

Un tratamiento de pasteurización en discontinuo puede ser realizado por calentamiento del líquido en una cuba de agitación. Los sistemas de pasteurización en continuo son más complejos y se diferenciarán según el sistema de circulación empleado (flujo a contracorriente o en paralelo), o el equipo de transmisión de calor utilizado (intercambiadores de calor tubular o de placas).

Los procesos de pasteurización discontinuos y continuos se rigen por el mismo principio. El líquido se llevará a temperatura de tratamiento, por intercambio de calor, con un fluido más caliente. Se mantiene a temperatura de tratamiento durante el tiempo necesario y posteriormente se enfría a temperaturas óptimas para su conservación o uso en etapas posteriores (Jeantet et

al., 2005). Este principio se representa en la **Figura 3**, donde se observa la evolución de la temperatura en un sistema de pasteurización en paralelo del fluido calefactor y el de producto.

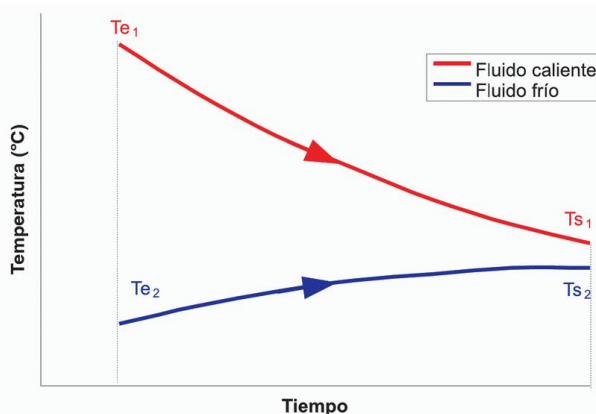


Figura 3. Evolución temperatura sistema de pasteurización en paralelo (Abril & Casp Vanaclocha, 1999)

- **Efectos del calor sobre caseínas micelares**

Las caseínas son más resistentes al calor que las proteínas del suero (Early & Oria Almuadí, 2000). Únicamente calentando a 120°C la caseína se va insolubilizando lentamente. La temperatura afecta especialmente a las interacciones hidrofóbicas que son más débiles a bajas temperaturas y más fuertes a temperaturas más altas (Walstra et al., 2001).

La inestabilidad de la leche por el calor no es causada simplemente por las micelas de caseína, sino por la desnaturalización de las proteínas del suero y sus interacciones con las micelas (Dalglish & Corredig, 2012). El efecto del calor sobre el tamaño de caseínas en presencia y ausencia de proteínas del suero ha sido analizado a 80°C de temperatura en intervalos de tiempo de 1,5 a 15 minutos. Como resultado, no se observan variaciones en el tamaño de caseínas en ausencia de proteínas del suero, pero sí en las mezclas de ambos (Tran Le, Saveyn, Hoa, & Van der Meeren, 2008). Este hecho explicaría como las micelas se modifican por la asociación de proteínas del suero con κ - caseína a temperaturas superiores a 70°C, donde las proteínas del suero se desnaturalizan y empiezan a agregarse (Dalglish & Corredig, 2012).

- b. Tratamiento no térmico: Altas presiones hidrostáticas**

El bienestar y estilo de vida saludable de los consumidores actuales da lugar a la industria alimentaria a considerar introducir alternativas a las tecnologías para preservar las cualidades organolépticas y nutricionales en los alimentos, buscando utilizar en estas una mínima cantidad de conservantes (Martínez Monteagudo & Balasubramaniam, 2016). Entre las tecnologías más modernas en industria alimentaria, las más importantes son las implicadas en tratamientos no-térmicos de productos. Los tratamientos a alta presiones (100-1000 MPa) son los más prometedores para el tratamiento y preservación de alimentos a temperatura ambiente (Cheftel, 1992). Las primeras investigaciones sobre el efecto de esta tecnología en la conservación de leche y otros productos datan del año 1899 (Hite, 1899) y no es hasta mediados de los noventa cuando estos productos se introducen en mercados como Japón o Estados Unidos (Martínez Monteagudo & Balasubramaniam, 2016)

- **Descripción del proceso**

Como se puede observar en el esquema de la **Figura 4**, en primer lugar está el acondicionamiento de producto en envases herméticos para introducirlos en la cámara de presión. Cuando el alimento envasado se encuentra en la cámara de presión se llena el recinto con el medio transmisor de presión. En muchos de los equipos el medio utilizado es agua con pequeñas cantidades de aceite soluble para conseguir efectos de lubricación y anticorrosión. La

base de las altas presiones es comprimir el agua alrededor de los alimentos (Abril & Casp Vanaclocha, 1999).



Figura 4. Esquema de funcionamiento HHP (Hiperbaric, 2018)

Presiones entre 300 y 600 MPa han demostrado tener un efecto significativo sobre la inactivación de microorganismos, incluyendo los patógenos más infecciosos transmitidos por alimentos (Trujillo, Capellas, Saldo, Gervilla, & Guamis, 2002), sin afectar al *flavor* o sabor de los mismos. Dado que la presión es uniforme en todo el producto, su conservación también es uniforme y ninguna parte del mismo escapa de dicha conservación (Abril & Casp Vanaclocha, 1999).

Durante el tratamiento a altas presiones, la compresión del producto produce un incremento en la temperatura del alimento tratado (3°C/100 MPa para agua y alimentos con alto contenido de humedad; 8-9°C/100 MPa para alimentos a base de lípidos). Tras la descompresión, la temperatura del producto vuelve a ser cercana a la que tenía inicialmente. El rápido incremento de la temperatura en el producto durante la compresión y el posterior enfriamiento es la singular ventaja que la tecnología de altas presiones presenta para procesos de pasterización y esterilización de alimentos (Martínez Monteagudo & Balasubramaniam, 2016).

- **Efecto de las altas presiones en caseínas micelares**

El efecto de altas presiones sobre caseínas micelares ha sido objeto de numerosos estudios. El análisis de las propiedades físico-químicas de leche tratada, a más de 150 MPa, revela un decrecimiento en el diámetro de caseínas micelares, un incremento en la hidratación de caseínas micelares y una ligera solubilización en el fósforo y calcio micelar, además de una solubilización parcial del α_1 y α_2 fueron observados (Regnault, Dumay, & Cheftel, 2016)

Se ha demostrado, en leche cruda, que tratamientos de 250 MPa incrementan el tamaño de las micelas de caseína en aproximadamente un 20%, mientras que a mayores presiones (300-800 MPa) se observa un decrecimiento en el tamaño del 50% con respecto a la leche no tratada (Huppertz, Fox, & Kelly, 2004). Leche tratada a 400 MPa revela que los diámetros de las micelas se reducen con respecto a leches no tratadas, del rango de 154 a 215 nm medidos en la leche testigo, los diámetros disminuyen a 38 (25°C), 58 (40°C), 87 (50°C) y 135 (60°C) nm en leche tras tratamiento. Estos cambios son probablemente el resultado de la desnaturalización de las proteínas del suero y la desintegración de moléculas de caseína. La degradación de las caseínas precedería a la desnaturalización de las proteínas del suero ya que un tamaño mínimo de caseínas es necesario para que se produzcan estas interacciones (Garía-Risco, Olano, Ramos, & López-Fandiño, 2000).

Se puede concluir que el efecto de las altas presiones sobre las micelas de caseína estará relacionado con fenómenos de agregación y desagregación según el tratamiento aplicado. Regnault y otros (2004) observaron este efecto mediante aplicación de presiones de 150 a 250 MPa a 20°C. En el rango de 100-150 MPa se observó un incremento en el volumen hidrodinámico

de la media de la población de micelas estudiadas provocada por una asociación de las micelas estudiadas. Tratamientos a 200 MPa conduce a un fenómeno de disociación, mientras que a 250 MPa el fenómeno de agregación vence al de disociación. A mayores presiones, el tamaño pequeño de micelas es predominante (Regnault, Thiebaud, Dumay, & Cheftel, 2004).

Merel-Rausch y otros estudian además el efecto que la velocidad de descompresión tiene sobre estas estructuras, concluyendo que a 600 y 200 MPa.min⁻¹ el tamaño de las caseínas es más pequeño con respecto al producto crudo (Merel-Rausch, Kulozik, & Hinrichs, 2007).

2.4 Propiedades reológicas de los alimentos

Las propiedades reológicas se definen como propiedades mecánicas que dan como resultado la deformación y el flujo del material en presencia de esfuerzos. Estas propiedades se estudian dentro de la reología. Esta ciencia estudia la deformación de los materiales incluyendo el flujo de los mismos (M Anandha Rao, 2007b). Con carácter general los cuerpos deformables presentan dos comportamientos extremos que son el elástico y el viscoso, entre ellos existe una gama muy amplia dentro de la cual se encuentran gran cantidad de alimentos. Es por ello que su caracterización reológica adquiere gran relevancia (Ibarz & Barbosa Cánovas, 2005). Los datos obtenidos de estos estudios son aplicados no solo en la evaluación de la calidad de producto, sino también en cálculos ingenieriles y en el diseño de procesos (Sahin & Sumnu, 2009).

a. Fluidos newtonianos

La viscosidad es la resistencia de un fluido a fluir. En la **Figura 5** se representa un fluido entre dos placas paralelas. Si se empuja la placa superior hacia la derecha con una fuerza F , como resultado se produce una velocidad u sobre la placa hacia la derecha. Por otro lado, la placa inferior no se moverá a la misma velocidad si no a otra menor.

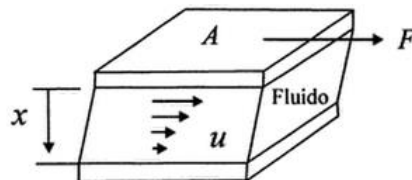


Figura 5. Definición gráfica de viscosidad (Orrego Alzate, 2003).

Definiendo esfuerzo cortante (σ) como la relación entre F/A , la viscosidad se define mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\sigma}{du/dx} \quad \text{Eq. 1}$$

Donde,

- μ : Viscosidad [Pa.s]
- σ : Esfuerzo cortante [Pa]
- du/dx : Gradiente de velocidad [s⁻¹]

Los Fluidos Newtonianos son aquellos que cumplen la **Ecuación 1**. En este tipo de fluidos la pendiente del esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación, que es la viscosidad (μ), es constante e independiente de la velocidad de deformación. Para este grupo de fluidos la viscosidad dependerá de la naturaleza del fluido y de la temperatura. La viscosidad disminuirá a medida que aumente la temperatura (Sahin & Sumnu, 2009).

b. Fluidos No-newtonianos

Estos fluidos se caracterizan porque el valor de la constante que se ha definido como viscosidad varía con el gradiente de velocidad, con el tiempo de aplicación del esfuerzo o con ambos

simultáneamente. Para este grupo de fluidos no puede utilizarse el concepto de viscosidad bajo la definición de Ley de Newton, por lo que aparece el concepto de viscosidad aparente (η_a), cuyo valor es la tangente a la curva esfuerzo-deformación en el punto considerado.

Las desviaciones que los fluidos no newtonianos presentan con respecto a la Ley de Newton son de diversa naturaleza, por lo que se puede clasificar a los fluidos no-newtonianos en tres grupos principales.

- **Fluidos independientes del tiempo**

Este tipo de fluidos presentan un comportamiento caracterizado por la existencia de una función $\sigma = f(\dot{\gamma})$. Dentro de este grupo se encuentran los fluidos pseudoplásticos (*shear thinning*) y dilatantes (*shear thickening*). En estos fluidos la viscosidad aparente tiende a hacerse lineal para altos valores, es decir, alcanza un valor constante a partir de un valor límite de velocidad de deformación (η_{g^∞}) tal y como se muestra en la **Figura 6**.

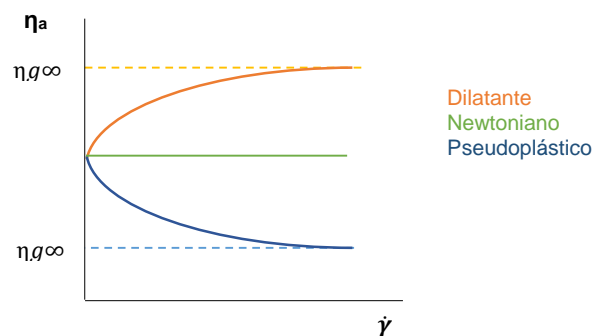


Figura 6. Relaciones entre la viscosidad aparente y la velocidad de deformación para fluidos independientes del tiempo.

Los fluidos pseudoplásticos y dilatantes pueden ser definidos por una ecuación general conocida como Ley de la potencia o ecuación de Ostwale de-Waele (**Ecuación 2**), en la que el parámetro K representa el índice de consistencia del fluido y n el comportamiento del flujo, es decir, la desviación respecto al fluido newtoniano. En efecto, valores de n igual a 1 están asociados a fluidos de comportamiento newtoniano.

$$\sigma = K * \dot{\gamma}^n \quad \text{Eq. 2}$$

Donde,

- σ : Fuerza de cizalladura [Pa]
- K: Coeficiente de cizalladura [Pa.sⁿ]
- $\dot{\gamma}$: Gradiente de cizalladura [s⁻¹]
- n: Índice de comportamiento de flujo [adimensional]

Para fluidos pseudoplásticos n está comprendido entre 0 y 1. En los fluidos pseudoplásticos la viscosidad aparente disminuye con el aumento del esfuerzo cortante. En general se puede decir que este comportamiento es característico de suspensiones de moléculas asimétricas y de disoluciones de polímeros. Como ejemplos de fluidos pseudoplásticos se encuentran la pasta de papel, la mayonesa, algunos zumos de frutas, las compotas y mermeladas.

Para los fluidos dilatantes, n varía entre 1 e infinito. La viscosidad aparente aumenta con el aumento del esfuerzo cortante. El comportamiento dilatante es característico de suspensiones con alto contenido en sólidos, pastas de almidón y de la goma arábica.

El comportamiento plástico representa otro grupo dentro de los fluidos independientes del tiempo. Su característica fundamental es el hecho de presentar un valor de tensión (σ_0)

denominado *esfuerzo de deformación umbral*, que debe ser superado para que el fluido empiece a fluir.

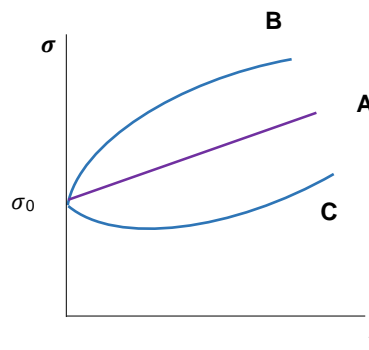


Figura 7. Comportamientos tipo plásticos.

El grupo de fluidos representados en la **Figura 7** se caracterizan por la siguiente ecuación:

$$\sigma = \sigma_0 + K * \dot{\gamma}^n \quad \text{Eq. 3}$$

Donde,

σ : Fuerza de cizalladura [Pa]

σ_0 : Fuerza de cizalladura umbral [Pa]

K: Coeficiente de cizalladura [Pa.sⁿ]

$\dot{\gamma}$: Gradiente de cizalladura [s⁻¹]

n: Índice de comportamiento de flujo [adimensional]

El comportamiento tipo (A) se conoce como plástico de Bingham. Se caracteriza porque al alcanzar el valor umbral de esfuerzo, el flujo presenta proporcionalidad entre σ y $\dot{\gamma}$ como en los fluidos newtonianos y cumple la **Ecuación 3** para valores de n igual a 1. Valores de n comprendidos entre 1 e infinito representan el caso (C), y entre 0 y 1 para el caso (B).

- **Fluidos dependientes del tiempo**

La viscosidad aparente en algunos fluidos depende no solo de la velocidad de deformación si no también, y de forma simultánea, del tiempo que se mantiene la deformación. Son los denominados fluidos dependientes del tiempo entre los que se encuentran dos tipos fundamentales de comportamiento: tixotrópico y reopéctico. Presentan la característica común de modificación progresiva de su estructura por aplicación de un esfuerzo, entendiendo dicha modificación en el sentido de destrucción- regeneración. Este tipo de modificación es dinámico, es decir, ocurre en ambos sentidos aunque uno de ellos puede ser predominante.

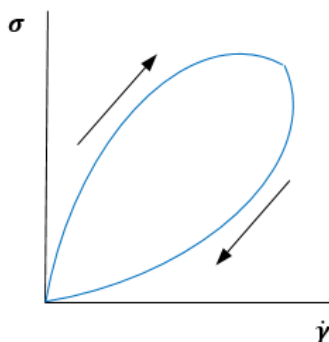


Figura 8. Reograma comportamiento tixotrópico.

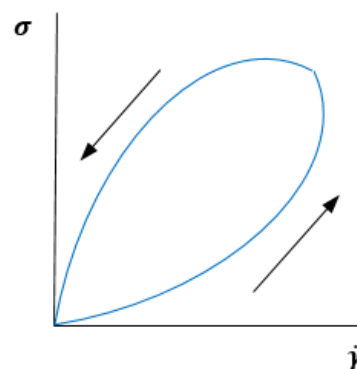


Figura 9. Reograma comportamiento reopéctico.

En el comportamiento tixotrópico (**Figura 8**) prevalece la velocidad de destrucción sobre la regeneración con el aumento del gradiente de velocidad y del tiempo, por lo que la viscosidad aparente disminuye con estos. La tixotropía es un fenómeno reversible, es decir, una vez dejado en reposo, la estructura del material se reconstituye gradualmente.

Por el contrario el comportamiento reopéctico (**Figura 9**) muestra un incremento de la viscosidad aparente con respecto al tiempo de aplicación del esfuerzo y el aumento del gradiente. La estructura temporal de estos materiales se reorganiza con la deformación, presentando mayor resistencia a medida que aumenta y volviendo a desorganizarse cuando se deja en reposo.

- **Fluidos viscoelásticos**

Se caracterizan por poseer simultáneamente propiedades elásticas (sólidos) y viscosas (fluidos). La velocidad de deformación no solo es función del esfuerzo y del tiempo aplicado, sino también de una función que relaciona a ambos.

Para la determinación de las propiedades viscoelásticas de alimentos puede utilizarse el experimento de reología dinámica también conocido como SAOS (*small amplitude oscillatory shear*). Según este experimento, la muestra se somete a una pequeña deformación o deformación oscilante sinusoidal, generándose así dos tipos de componentes en este esfuerzo. Un componente será de tipo elástico y otro de tipo viscoso. El componente elástico se encuentra en línea con el esfuerzo y desfasado 90° del componente viscoso (M Anandha Rao, 2007a). Esta relación se resume en la siguiente ecuación:

$$\sigma_0 = G' \gamma_0 \sin(\omega t) + G'' \gamma_0 \cos(\omega t) \quad \text{Eq. 4}$$

Donde,

- σ_0 : Fuerza de aplicado
- G' : Elasticidad o módulo de almacenamiento
- G'' : Viscosidad o módulo de pérdida
- γ_0 : Amplitud de la fuerza
- ω : Frecuencia angular
- t: tiempo

c. Viscosidad de soluciones

En el caso de soluciones, emulsiones o suspensiones, la viscosidad a menudo se mide en términos comparativos, es decir, se compara la viscosidad de la solución o emulsión con la del disolvente puro. Se puede medir la viscosidad de los disolventes puros y de las suspensiones y a partir de los datos resultantes se pueden aplicar las siguientes ecuaciones (Ibarz & Barbosa Cánovas, 2005):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_s}{\eta_d} = 1 + k X_d^v \quad \text{Eq. 5}$$

Donde,

- η_{rel} : Viscosidad relativa
- η_s : Viscosidad de la solución
- η_d : Viscosidad del disolvente
- X_d^v : Fracción volumétrica ocupada por la fase dispersa
- k : constante

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad \text{Eq. 6}$$

Donde,

η_{sp} : Viscosidad específica

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \text{Eq. 7}$$

Donde,

η_{red} : Viscosidad reducida

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{C} \quad \text{Eq. 8}$$

Donde,

η_{inh} : Viscosidad inherente

C: Concentración másica de la solución [g/100 ml]

$$\eta_{int} = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \text{Eq. 9}$$

Donde,

η_{int} : Viscosidad intrínseca

C: Concentración másica de la solución [g/100 ml]

d. Viscosidad en función de la concentración

La influencia de la concentración sobre la viscosidad se puede describir como una relación exponencial (Beliciu & Moraru, 2011; Institute of Food Technologists., H.J., & A.A., 1984).

$$\eta_a = a_1 * e^{a_2 C} \quad \text{Eq. 10}$$

Donde,

η_a : Viscosidad aparente [Pa.s]

a_1 y a_2 : constantes

C: Concentración másica de la solución [g/100 ml]

e. Viscosidad en función de la Temperatura

De acuerdo con la teoría de Eyring, existen vacíos en el líquido. Las moléculas se mueven continuamente en estos vacíos, permitiendo el flujo, pero requiriendo cierta energía para el mismo. Esta energía de activación está más fácilmente disponible a temperaturas más elevadas y el fluido fluye fácilmente (Sahin & Sumnu, 2009). El efecto de la temperatura sobre la viscosidad se puede describir mediante una ecuación tipo Arrhenius.

$$\mu = \mu_{\infty} \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Eq. 11}$$

Donde,

μ : Viscosidad

μ_{∞} : Constante [Pa.s]

E_a : Energía de activación [J/mol]

R: Constante de gases [8.314,34 J/kg mol K]

T: Temperatura absoluta [K]

2.5 Reología de caseínas micelares

En la mayoría de condiciones la leche se comporta como un fluido newtoniano, con una viscosidad media aproximada de 2 mPa.s, valor que puede variar en función de la proporción en la que se encuentren sus distintos componentes (Walstra et al., 2001). Productos derivados de la leche, como por ejemplo leche concentrada o nata no siguen el mismo comportamiento (Alias, 1985), por lo que el estudio de la reología de productos derivados de la leche adquiere gran relevancia debido a los numerosos procesos tecnológicos en los que intervienen.

La gran voluminosidad de las micelas de caseína hacen que estas contribuyan significativamente al valor de viscosidad alcanzado por la leche (Walstra et al., 2001). Es por ello que diferentes publicaciones estudian el grado de influencia de este componente en el comportamiento reológico de productos lácteos como por ejemplo licores en crema (Lynch & Mulvihill, 1997), leche desnatada en polvo (Karlsson, Ipsen, Schrader, & Ardö, 2005) , o yogurt (Keogh & O'Kennedy, 1998; Mottar, Bassier, Joniau, & Baert, 1989). En los años 20, Loeb estudió la viscosidad de soluciones de polvo caseína en agua con pequeñas cantidades de ácido clorhídrico, buscando en su comportamiento la justificación de los cambios de viscosidad en soluciones de gelatina en polvo (Loeb, 1921). En 1927 Sutermeister establece que en soluciones de caseína de 0 a 100 g/litro, la viscosidad aumenta hasta 25 veces más con respecto a la del agua (Sutermeister, 1927).

Estudios recientes (Beliciu & Moraru, 2011; Loria, Aragón, Torregiani, Pilosof, & Farías, 2018) definen su comportamiento como de tipo newtoniano e identifican además los factores que mayor grado de influencia tienen sobre la viscosidad de estas soluciones: concentración, temperatura y pH (Walstra et al., 2001).

El conocimiento de la respuesta de las moléculas de caseína a los distintos factores descritos en el apartado anterior, permite un gran avance en el diseño de instalaciones en los que se busca utilizar este producto. Rao destaca la importancia de este conocimiento, fundamental en la elección de bombas o diámetros de tubería que intervienen en sistemas continuos de procesos, así como la aplicación de los resultados de variación de viscosidad en el planteamiento de modelos termodinámicos (M Anandha Rao, 1999), característicos de cada material y/o solución. Además el estudio reológico de polvos reconstituidos de caseína sin interacción de otros componentes, como sales o proteínas del suero, es un campo poco explorado y con amplio potencial de estudio por el potencial de sus aplicaciones.

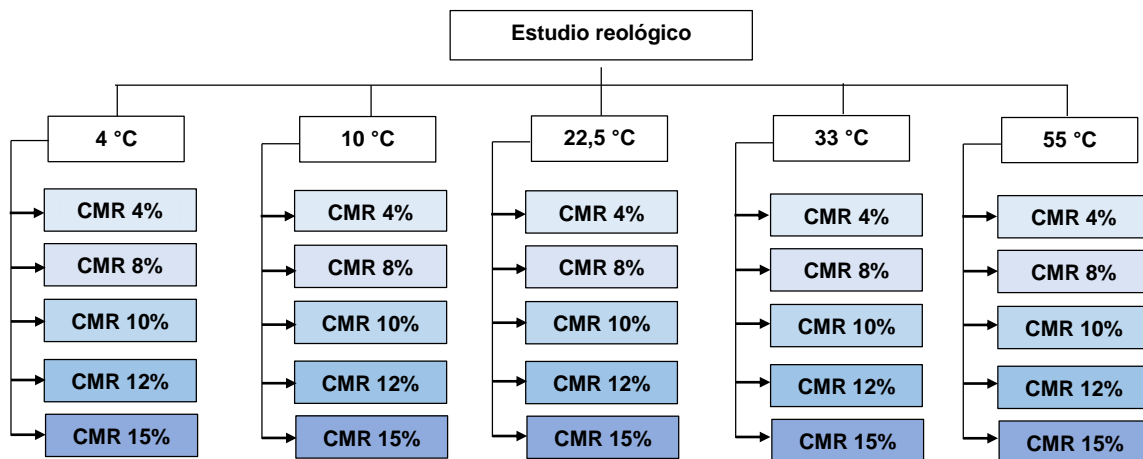
3. Objetivo

El presente trabajo buscar caracterizar el comportamiento reológico de caseínas micelares en polvo reconstituidas bajo los efectos de:

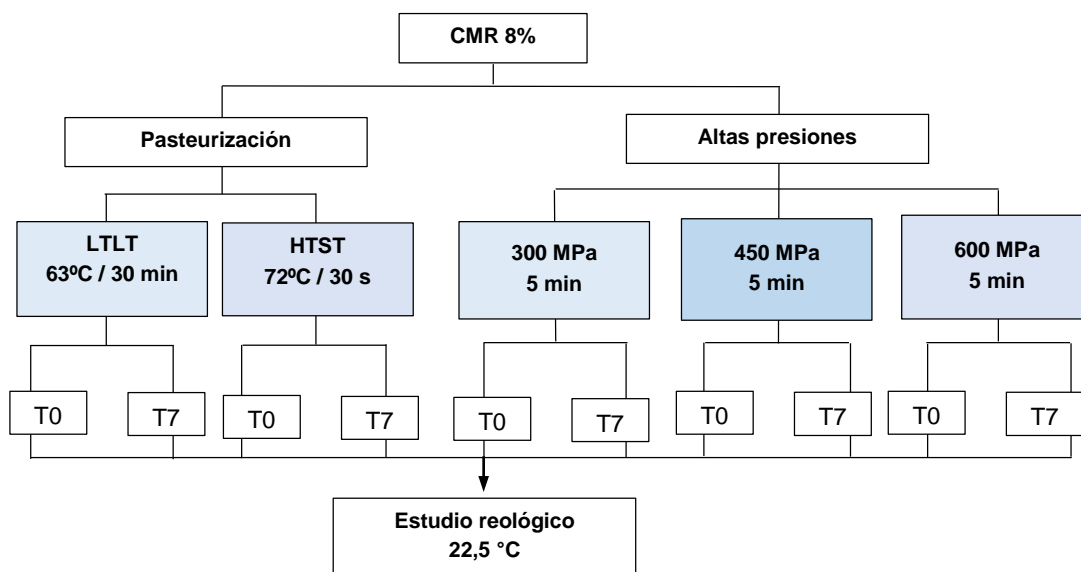
- Concentración y temperatura.
- Tratamientos de conservación térmicos y no térmicos en soluciones de caseínas micelares reconstituidas (CMR) al 8 % w/w, así como del tiempo de almacenamiento.

4. Plan experimental

En el estudio de CMR se analiza la influencia que tienen diferentes concentraciones y temperaturas sobre su comportamiento reológico. Para cada condición de ensayo se realizaron dos preparaciones de cada concentración de CMR (replicas). Sobre cada replica a distinta concentración, se realizaron dos medidas de viscosidad (repeticiones) a diferentes temperaturas.



Adicionalmente se determina el efecto de tratamientos de conservación térmicos (pasteurización convencional) y no térmicos (altas presiones), y tiempo de almacenamiento sobre el comportamiento reológico de caseínas en polvo reconstituidas.



5. Materiales y Métodos

Para la realización de este trabajo han sido requeridos los diferentes materiales y equipos descritos dentro de las distintas metodologías de ensayo.

5.1 Material

a. Prodiel®87B

Se trata de un aislado de proteína de leche secado mediante un proceso de atomización. Contiene más del 83% de proteína, menos del 1,5% de grasa, menos del 2% de carbohidratos, 2% de lactosa y un 8,5 % de cenizas, con un contenido de materia seca del 97 %. Del total de proteínas, un 92% se corresponden a caseínas micelares.

b. Agua desionizada

Agua libre de cationes (sodio, calcio, hierro, cobre) y aniones (carbonato, fluoruro, cloruro y otros) con conductividad eléctrica de 0,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C.

c. CMR 8% tras tratamientos de conservación

Los tratamientos de conservación térmicos y no térmicos de CMR 8% han sido realizados dentro del proyecto *Opticasein Apply*. Las muestras han sido cedidas posteriormente para el estudio de su comportamiento reológico dentro del alcance de este informe.

Las caseínas micelares reconstituidas utilizadas han sido sometidas a los siguientes procesos de conservación, bajo las condiciones descritas en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Tratamientos de conservación y condiciones de ensayo para CMR 8%.

Tratamiento	Condiciones de ensayo
Pasteurización LTLT	63°C / 30 minutos
Pasteurización HTST	72°C / 30 segundos
Altas presiones hidrostáticas (HHP)	300 MPa / 5 minutos 450 MPa / 5 minutos 600 MPa / 5 minutos

Parte de las muestras serán almacenadas en cámara a 10°C durante 7 días para su posterior evaluación del comportamiento reológico.

5.1 Equipo de reología

El siguiente estudio se centra en la caracterización reológica de concentrado líquido de caseínas micelares. El equipo empleado es el Haake Rotovisco RV1 (**Figura 10**). Se trata de un viscosímetro rotacional de cilindros coaxiales al que se acopla un sistema sensor DIN Z34 de titanio y un calefactor/refrigerador de agua termostatzado (Haake DC30-K15). De esta manera es posible realizar los ensayos a distintas temperaturas (entre 4 y 55°C).

El equipo opera gracias al software informático Rheowind Job Manager. Se trabaja mediante un método de ensayo escalonado de gradiente de velocidad. Se aplican 5 velocidades de cizalladura ($\dot{\gamma} = 100, 200, 300, 400$ y 500 s^{-1}) con un tiempo de mantenimiento de 1 minuto. El equipo mide el esfuerzo de cizalladura generado para cada velocidad ($\sigma = f[\dot{\gamma}]$). A partir de los datos obtenidos, para cada par de datos σ - $\dot{\gamma}$, el programa determina la viscosidad o viscosidad aparente correspondiente (η). A través del software se buscará el modelo que mejor se ajuste a los resultados obtenidos.



Figura 10. Haake Rotovisco RV1

5.2 Metodología y condiciones de ensayo

a. Reconstitución del concentrado de caseína micelar Prodiel® 87B

Las soluciones se preparan a partir de caseína micelar Prodiel®87B disuelta en agua desionizada. Se trabaja con disoluciones a concentraciones del 4, 8, 10, 12 y 15% (w/w) en volúmenes de 150ml. Para la reconstitución de caseína micelar en polvo se ensayan dos protocolos. Para los ensayos de ambos protocolos se realizarán 2 repeticiones de cada concentración de CMR, para cada condición de ensayo descrito en el plan experimental.

- **Protocolo de preparación A**

Los componentes de la disolución se mezclan sobre una placa magnética con ayuda de un agitador magnético en el interior del vaso de precipitados. Se utiliza el agitador magnético *Multistirrer* a nivel 4 (500-600 rpm), durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se sonifica con el ultrasonidos (*Hielscher UP400S*) acoplado al sonotrodo tipo H7, durante 30 minutos con una amplitud del 20%. Estudios previos demuestran el efecto positivo del ultrasonidos en la reconstitución de concentrados de caseína en polvo (Zhang et al., 2018).

- **Protocolo de preparación B**

Se llevan a cabo los mismos pasos descritos en el Protocolo de preparación A. Adicionalmente, tras el tiempo de sonicación la mezcla se lleva nuevamente a agitación en placa magnética durante 30 minutos a nivel 4.

b. Determinación del extracto seco

Se toman 20 ml de solución de CMR. Se deja en estufa a 105°C durante 24 horas. La muestra se pesa previamente al secado y tras el tiempo de estufa. Se realizan dos repeticiones por cada concentración de CMR.

$$ES = \frac{m_{ds-c}}{m_{as-c}} * 100$$

Eq. 12

Donde,

ES: Extracto seco [g]
c: cápsula metálica [g]
m_{as}: muestra + cápsula metálica antes del secado [g]
m_{ds}: muestra + cápsula metálica después del secado [g]

c. Determinación del índice de solubilidad

La CMR se centrifuga a 500 xg durante 10 minutos. Se toman 20 ml de la parte líquida de la muestra tras la centrifugación y se deja en estufa a 105°C durante 24 horas. La muestra se pesa previamente al secado y tras el tiempo de estufa. Mediante la **Ecuación 12** se determina el extracto seco de las muestras. Se realizan dos repeticiones por cada concentración de CMR.

El índice de solubilidad se determina como la relación entre el extracto seco de la muestra y la concentración de CMR inicial, teniendo en cuenta que la caseína utilizada tiene un 97% de materia seca.

$$IS = \frac{ES}{P_{CMR} \cdot MS_{PR}} \quad \text{Eq. 13}$$

Donde,

IS: Índice de solubilidad
ES: Extracto seco tras centrifugación [g]
P_{CMR}: Peso inicial de la CMR [g]
MS_{PR}: Materia seca Prodiel®87B en tanto por uno [0,97]

c. Caracterización físico-química

- **pH**

El pH se determinó con el pH-metro Crison, previamente calibrado. La medida del pH se llevó a cabo directamente en cada muestra por triplicado, a 20 ± 2°C y en agitación.

- **Color**

El color se medirá utilizando el criterio cromático del espacio CIE L*a*b. Se medirá con ayuda del Colorímetro CM-2500 D Konica Minolta. Las condiciones de medida fueron: iluminante D65, visor observador 10° y el componente especular incluido (SCI). Todo ello sobre 20 ml. Las medidas se realizarán por triplicado sobre la misma muestra.

- **Acidez**

La acidez se medirá con ayuda del Titrador automático Hanna H1901 y se utiliza el análisis de la leche como referencia, utilizando como valorante hidróxido sódico (NaOH) 0,1N.

La acidez se calcula teniendo en cuenta el peso molecular del ácido láctico, principal ácido de la leche, según la siguiente fórmula. Las medidas se realizarán por duplicado en cada muestra.

$$Acidez = \frac{V \times N \times m_{al}}{V_m} \times 100 \quad \text{Eq. 14}$$

Donde,

Acidez: g/100 ml de ácido láctico
V: volumen de NaOH utilizado [ml]
N: normalidad del NaOH [0,1N]
V_m: volumen de muestra valorada [ml]
m_{al}: Peso molecular del ácido láctico [0,09 kg/mol]

d. Estabilidad Física

La estabilidad de las soluciones de los concentrados líquidos de caseínas micelares serán medidos con ayuda del equipo Turbiscan LAB™, que opera gracias al software informático TurbiSoft Lab. La muestra es escaneada con una fuente de luz de infrarrojo cercano ($\lambda = 880$ nm). Las medidas de los perfiles de transmisión y de absorbancia son obtenidos en toda la altura del recipiente. Las medidas se realizarán sobre 20 ml de muestra durante 8 horas, con un intervalo de toma de datos de 10 minutos. Los resultados se expresarán a través del TSI global, para una sección de 0 a 39,5 mm. Se realizará un ensayo por cada concentración de CMR estudiada.

$$TSI = \frac{\sum_h |scan_i(h) - scan_{i-1}(h)|}{H} \quad \text{Eq. 15}$$

g. Estudio Reológico

Los ensayos se llevarán a cabo en el Haake Rotovisco RV1 y con el calefactor/refrigerador de agua termostatzado (Haake DC30-K15) para ajustar la temperatura de consigna correspondiente (4, 10, 22,5, 33 y 55 °C). La viscosidad es medida a 100, 200, 300, 400 y 500s⁻¹, durante 60 segundos y se vuelve a descender. (**Figura 11**).

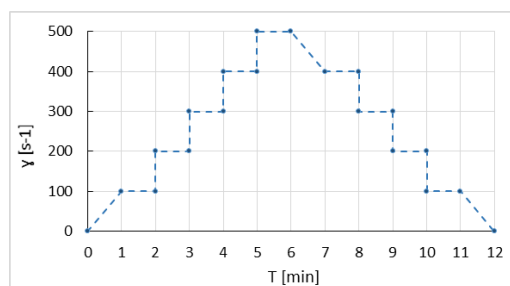


Figura 11. Condiciones método escalonado HHP.

Las medidas se realizarán dos veces sobre cada muestra preparada para cada condición descrita en el plan experimental de este informe (*Apartado 4*). Tras observar el ajuste de los modelos reológicos disponibles en el software (Newton, Bingham, Herschel-Bulkley, Ley de la potencia, Carson y otros), se decide estudiar el comportamiento del flujo reológico mediante la aplicación de la Ley de la potencia, también conocido como modelo de Ostwald- de Waele (**Ecución 2**).

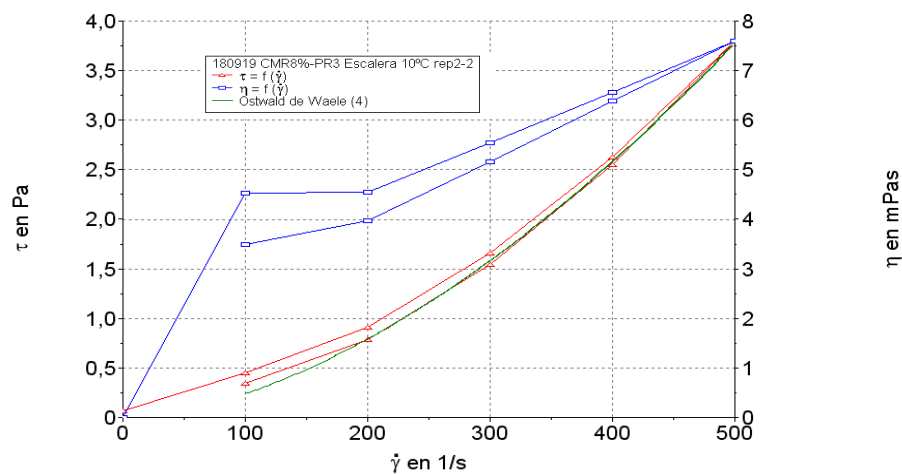


Figura 12. Curvas comportamiento de Flujo.

Adicionalmente se estudiará el comportamiento del solvente (agua desionizada) según las condiciones de ensayo propuestas.

5.3 Análisis de datos

El análisis estadístico de datos se llevará a cabo utilizando el como herramienta el software Statgraphics® Centurion XVI desarrollado por Statpoint Technologies Inc. Los datos se analizarán mediante ANOVA de un factor y multifactorial para comprobar la influencia y existencia de diferencias significativas en el comportamiento reológico de CMR según gradiente de velocidad, concentración y temperatura. Estas diferencias se analizarán mediante *Intervalos LSD de Fisher (Least Significant Difference)* con diferencias estadísticamente significativas al 95% (INC, 2010).

La comprobación de la bondad de ajustes, de los valores calculados a partir modelos matemáticos propuestos sobre los medidos experimentalmente, se analizarán mediante un Test de hipótesis (*prueba-t*), con un nivel de confianza del 95%.

6. Resultados y discusión

6.1 Reconstitución de la caseína micelar en solución acuosa

Los polvos de caseína fueron reconstituidos según dos protocolos de preparación (A y B). En ambos, las soluciones de agua desionizada y caseína se someten a 60 minutos de agitación seguidos de 30 minutos de ultrasonidos. En el caso del protocolo B se añaden 30 minutos más de agitación tras la sonicación.

El uso de polvos lácteos está limitado algunas veces por su baja capacidad de rehidratación en medios acuosos (Crowley, Kelly, Schuck, Jeantet, & O'Mahony, 2016). Para comprobar la capacidad de rehidratación de los polvos de caseína utilizados, según cada protocolo de preparación, se determinarán dos índices. El primero es el extracto seco que nos permite conocer cuanta cantidad del polvo proteico empleado se encuentra disperso en la solución. El segundo indicador, el índice de solubilidad, nos permitirá conocer que cantidad del polvo utilizado inicialmente se ha rehidratado por completo, correspondiéndose este porcentaje con la cantidad de materia en la que se produce la desaparición completa de estructuras granulares (Crowley et al., 2016). Los resultados obtenidos para ambos protocolos pueden encontrarse en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Extracto seco [ES] e Índice de solubilidad [IS] según protocolos de preparación.

	Protocolo A			Protocolo B		
	ES (%)	% Producto disperso*	IS [%]*	ES (%)	% Producto disperso*	IS [%]*
CMR 4%	3,80 ± 0,11	98 ± 2	93 ± 1	3,60 ± 0,01	93 ± 0	93 ± 1
CMR 8%	7,15 ± 0,05	92 ± 1	90 ± 1	7,17 ± 0,01	92 ± 0	91 ± 1
CMR 10%	9,05 ± 0,10	93 ± 1	87 ± 2	9,43 ± 0,01	97 ± 1	93 ± 0
CMR 12%	10,77 ± 0,10	93 ± 0	79 ± 6	11,11 ± 0,12	95 ± 1	86 ± 0
CMR 15%	14,20 ± 0,10	98 ± 0	80 ± 4	14,13 ± 0,03	97 ± 1	83 ± 0

*El porcentaje de producto disperso en la solución se corrige con el extracto seco de Prodiel® 87B, correspondiente a un 97% del peso total del polvo proteico utilizado.

Se observa que conforme aumenta la concentración de CMR, el protocolo B permite que las partículas del polvo proteico tengan una mayor tasa de dispersión y disolución en el medio acuoso.

Estudios sobre el efecto de ultrasonidos en la solubilidad de caseínas micelares atribuyen esta mejora a un cambio en la estructura globular de la caseína. Regiones hidrofílicas quedan expuestas al agua, permitiendo una mejora en las interacciones agua-proteína (Zhang et al., 2018). La agitación tras la aplicación de ultrasonidos permite una mejora en el establecimiento de estas interacciones. Sin embargo, a partir de concentraciones de CMR al 12% la solubilidad del producto es inferior al 90% y por lo tanto el producto no acaba de solubilizarse completamente. Considerando las soluciones de caseína de naturaleza coloidal (C. De Kruijff, 1999), un aspecto importante de estos sistemas es su elevada relación superficie-volumen y la gran área de contacto de la fase dispersa con la continua (Lewis, 1949). Se puede considerar que para el polvo utilizado, a concentraciones superiores al 10% se está llegando al límite de interacciones agua-soluto disponibles, es decir, al límite de saturación de estas soluciones.

También se ha comprobado las principales características físico-químicas (pH, acidez y color) de las soluciones a concentraciones del 4 al 15%, preparadas según protocolos A (**Tabla 5**) y B (**Tabla 6**).

Tabla 5. Caracterización física y química de CMR según protocolo de preparación A.

	pH	Acidez [g _{a.} /100 ml]	Color		
			L*	a*	b*
CMR 4%	7,12 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	80,14 ± 0,47 ^a	-3,19 ± 0,04 ^a	-2,09 ± 0,20 ^a
CMR 8%	7,06 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,04 ^a	81,38 ± 0,09 ^a	-2,99 ± 0,01 ^a	-0,24 ± 0,04 ^a
CMR 10%	7,05 ± 0,01	0,11 ± 0,00	82,78 ± 0,09	-2,63 ± 0,02	1,51 ± 0,09
CMR 12%	6,99 ± 0,01	0,15 ± 0,01	83,79 ± 0,02	-2,87 ± 0,00	1,48 ± 0,01
CMR 15%	6,94 ± 0,01	0,17 ± 0,01	82,12 ± 0,04	-2,55 ± 0,01	1,88 ± 0,02

^a Datos cedidos por el proyecto Opticasein Apply.

Tabla 6. Caracterización física y química de CMR según protocolo de preparación B.

	pH	Acidez [g ^a /100 ml]	Color		
			L*	a*	b*
CMR 4%	7,10 ± 0,03	0,04 ± 0,02	80,20 ± 0,03	-2,95 ± 0,02	-1,50 ± 0,03
CMR 8%	7,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	81,25 ± 0,02	-2,75 ± 0,03	-0,14 ± 0,01
CMR 10%	7,04 ± 0,04	0,06 ± 0,00	82,66 ± 0,04	-2,64 ± 0,02	1,35 ± 0,01
CMR 12%	6,93 ± 0,01	0,11 ± 0,02	82,62 ± 0,02	-2,61 ± 0,01	1,72 ± 0,02
CMR 15%	6,92 ± 0,06	0,14 ± 0,03	81,81 ± 0,01	-2,59 ± 0,02	2,12 ± 0,04

^agramos de ácido láctico.

El análisis estadístico ANOVA permite observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en el pH, la acidez y el color de las muestras preparadas bajo las condiciones de los protocolos A y B, con un nivel de confianza del 95% según el método *LSD de Fisher*.

Por otro lado, se puede observar cambios conforme la concentración de caseína micelar aumenta. En el caso del pH una ligera tendencia a disminuir a medida que aumenta la concentración, acercándose al pH de la caseína micelar (6,7). En cuanto al color, las muestras más concentradas presentan una mayor luminosidad (L*) y tienen hacia tonalidades amarillas (b⁺), mientras que las soluciones más diluidas tienen a coloraciones azules (b⁻).

La estabilidad de las muestras ha sido determinado mediante el Turbiscan Stability Index (TSI) global, en un tiempo de 8 horas, para una altura de 0-39,5 mm del recipiente de medida del aparato. Los resultados obtenidos para el protocolo de preparación A se representan en la **Figura 13**, y los correspondientes al protocolo de preparación B en la **Figura 14**.

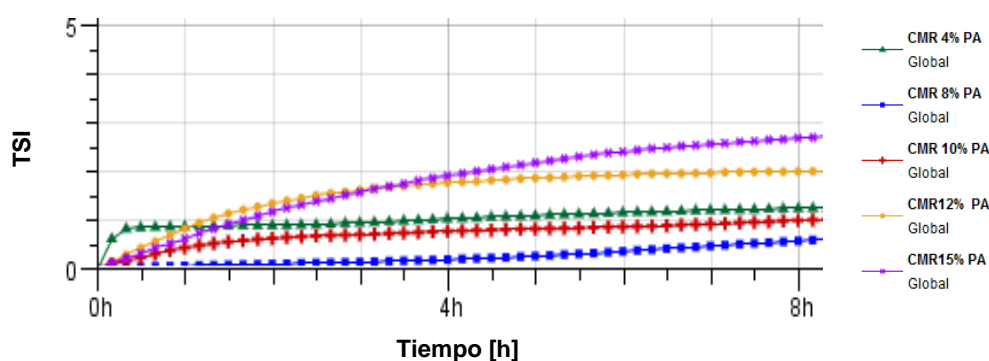


Figura 13. TSI global. Protocolo de preparación A.

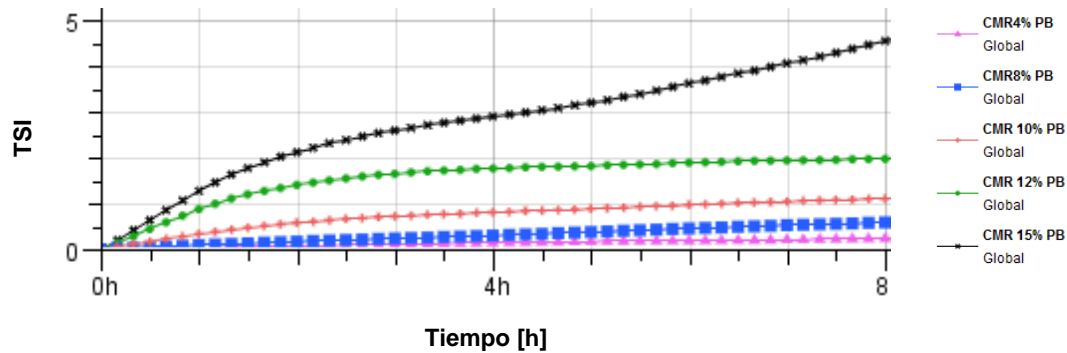


Figura 14. TSI global. Protocolo de preparación B.

En ambas gráficas se puede observar como la estabilidad de las muestras a 25°C disminuye con el tiempo. En el caso del Protocolo A (Figura 13), las muestras se mantienen más estables en todo el periodo registrado, llegando a un máximo de TSI 3 para la solución más concentrada (CMR 15%). En el caso del protocolo B (Figura 14) se alcanza hasta un TSI 5 para la misma solución y periodo de tiempo. El resto de concentraciones se mantienen más estables tanto para el protocolo A como para el B.

Adicionalmente, el análisis de la retro-dispersión (ΔBS) a través de la herramienta TrubisSoft®, a lo largo de la altura del envase, a las 16 horas de análisis permite identificar, en las soluciones más concentradas (12 y 15%), fenómenos incipientes de floculación o coalescencia.

Los fenómenos de floculación y/o coalescencia son dependientes del balance entre las interacciones de las fuerzas de Van der Waals y la repulsión electrostática entre partículas (Wong, 2018). De Kruif estudia la interacción de micelas de caseína centrándose en el comportamiento de la capa pilosa de κ -caseína bajo interacción con la adición de sales y otros componentes. En primer lugar observa que una pérdida en la solvencia provoca un colapso de la capa pilosa, quedando zonas pequeñas entre grupos de micelas donde las fuerzas de repulsión disminuyen y las micelas se comportan como esferas adhesivas. En consecuencia, las interacciones de Van der Waals inducen la floculación. (C. De Kruif, 1999). Se puede observar según los resultados de este trabajo, que el aumento de la concentración de caseínas en polvo, en soluciones reconstituidas, favorece la desestabilización en el tiempo de las mismas.

Por todo lo observado anteriormente, el protocolo de preparación elegido para la reconstitución de caseínas micelares en polvo es el B. Se observa que bajo las condiciones de preparación de este protocolo el producto se hidrata mejor y a pesar de que la inestabilidad física de las muestras del protocolo B es ligeramente superior, las reconstituciones siguen siendo estables durante las primeras 8 horas, tiempo que excede al transcurrido desde la preparación de la muestra y la realización de los ensayos reológicos.

6.2 Estudio Reológico

a. Evolución de la viscosidad con el tiempo

La influencia del tiempo sobre las curvas de flujo reológico entre los valores estudiados de fuerza de cizalladura se analizan mediante un ANOVA de un factor para comprobar la existencia de diferencias entre las curvas de ascenso y descenso. Para todas las curvas de flujo obtenidas a diferentes concentraciones (4-15%) y temperaturas (4-55°C) se observa que no existen diferencias significativas entre las fuerzas de cizalladura aplicadas durante el ascenso y descenso, para el mismo nivel de gradiente de velocidad (s^{-1}), con un nivel de confianza del 95,0% según el método *LSD de Fisher*. Por lo tanto, las soluciones de CMR, en términos reológicos, son fluidos independientes del tiempo tal y como se muestra en la **Figura 15** para CMR4% a 4°C.

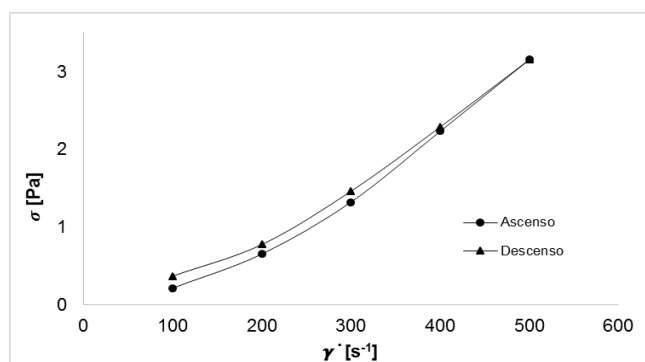


Figura 15. Curva de flujo CMR 4% a 4°C.

b. Influencia de la temperatura, concentración y velocidad de deformación sobre la viscosidad relativa.

En las **Figuras 16a a 16e** se muestran las curvas de flujo para caseínas micelares reconstituidas a temperaturas de 4 a 55°C según velocidad de deformación (100 a 500 s^{-1}), con respecto a la viscosidad relativa (mPa.s) en función de la concentración de CMR (4 al 15%).

Se observa que la viscosidad relativa está influenciada por la temperatura (p -valor $<0,000$, nivel de significación 95%) de manera que disminuye a medida que se incrementa la temperatura. Se puede observar como 4°C la viscosidad relativa alcanza valores de hasta 420 mPa.s (**Figura 16a**), mientras que a 55°C disminuye hasta los 20 mPa.s (**Figura 16e**). Estos resultados están de acuerdo a los observados por (Belicium & Moraru, 2011; Panouillé, Benyahia, Durand, & Nicolai, 2005) y que puede ser explicado ya que a baja temperatura la voluminosidad de las micelas aumenta notablemente y parte de la β -caseína se disocia de las micelas, provocando en consecuencia aumentos en la viscosidad (Walstra et al., 2001). Otro de los factores que tiene una influencia estadísticamente significativa sobre la viscosidad relativa es la concentración, con un nivel de significación del 95% según el método *LSD de Fisher*. A partir de concentraciones superiores al 10% el aumento de la viscosidad relativa con la concentración es más notorio, siendo la CMR al 15% la que presenta los valores máximos de viscosidad relativa a las distintas temperaturas de ensayo.

Para valores de CMR inferiores al 12% a una misma temperatura, las variaciones de la viscosidad relativa en función del gradiente de velocidad no presentan tantas diferencias como las observadas por la influencia de la temperatura y la concentración. Solo se observa una variación estadísticamente significativa al 95% para el factor velocidad de deformación sobre la viscosidad relativa para la concentración del 15% y para CMR 12% a 4 y 10°C.

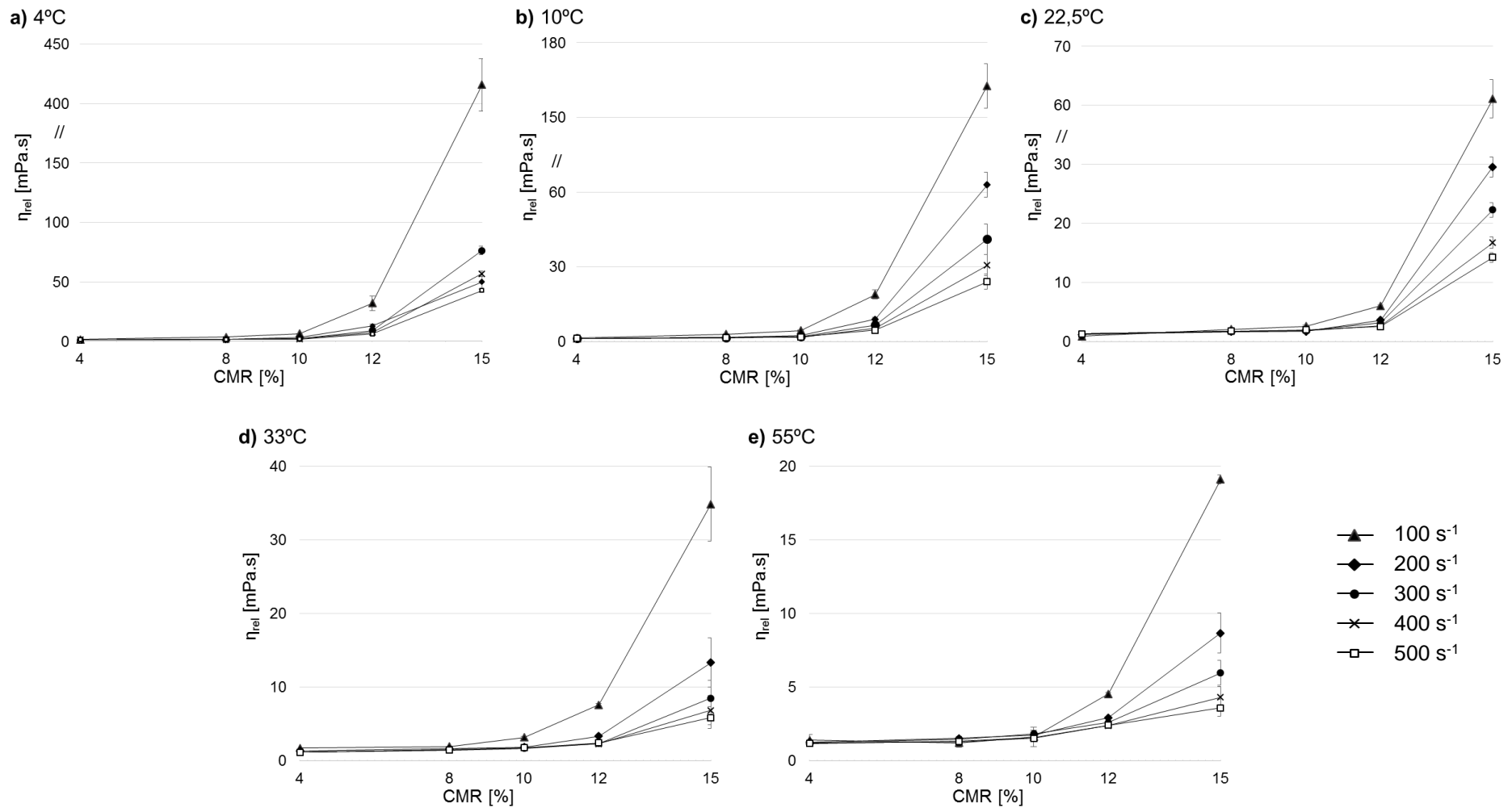


Figura 16. Evolución de la viscosidad relativa frente a la concentración de CMR según gradiente de velocidad. Valores medios y DS para para n=2.

c. Comportamiento reológico y modelización

Las curvas que se obtienen de la representación gráfica del esfuerzo de cizalla frente a la velocidad de deformación se ajustaron al modelo reológico de Ostwale- de Waele a las distintas concentraciones y temperaturas. Estos valores permiten definir el comportamiento de las reconstituciones de caseínas micelares estudiadas y la bondad del ajuste de este modelo.

Tabla 7. Ajuste al modelo de Ostwale de Waele (n: índice de comportamiento; K: índice de consistencia).

T [°C]	CMR [%]	n [adimensional]	K [Pa.s ⁿ]	Chi ²	R ²
4	0	1,64 ± 0,13	1,05E-04 ± 7,16E-05	0,01	0,99
	4	1,69 ± 0,04	8,98E-05 ± 2,50E-05	0,01	0,99
	8	1,57 ± 0,03	2,30E-04 ± 4,53E-05	0,06	0,99
	10	1,09 ± 0,07	5,63E-03 ± 2,45E-03	0,41	0,99
	12	0,71 ± 0,24	0,10 ± 0,03	0,03	0,99
	15	0,45 ± 0,01	6,64 ± 0,64	0,07	1,00
10	0	1,63 ± 0,14	1,17E-04 ± 9,18E-05	0,01	0,99
	4	1,60 ± 0,06	1,60E-04 ± 7,27E-05	0,01	0,99
	8	1,61 ± 0,08	1,93E-04 ± 9,04E-05	0,03	0,99
	10	1,34 ± 0,11	1,29E-03 ± 1,02E-03	0,10	0,99
	12	0,88 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,10	0,98
	15	0,57 ± 0,03	1,74 ± 0,51	0,18	0,99
22,5	0	1,49 ± 0,03	1,91E-04 ± 3,44E-05	0,58	0,95
	4	1,41 ± 0,09	4,76E-04 ± 3,48E-04	0,21	0,98
	8	1,58 ± 0,17	1,84E-03 ± 3,38E-03	0,02	0,99
	10	1,58 ± 0,07	2,17E-04 ± 7,85E-05	0,01	0,99
	12	1,06 ± 0,06	0,01 ± 3,01E-03	0,01	0,99
	15	0,67 ± 0,01	0,01 ± 3,01E-03	0,18	0,99
33	0	1,62 ± 0,03	5,03E-05 ± 5,51E-05	0,01	0,99
	4	1,51 ± 0,10	2,00E-04 ± 9,54E-05	0,01	0,99
	8	1,55 ± 0,04	1,85E-04 ± 5,54E-05	0,01	0,99
	10	1,57 ± 0,07	1,98E-04 ± 7,32E-05	0,01	0,99
	12	1,36 ± 0,09	1,05E-03 ± 5,68E-04	0,09	0,99
	15	0,72 ± 0,10	0,22 ± 0,20	0,32	0,99
55	0	1,70 ± 0,00	2,50E-05 ± 2,50E-05	0,47	0,93
	4	1,64 ± 0,07	7,14E-05 ± 3,21E-05	0,01	0,99
	8	1,54 ± 0,09	1,50E-04 ± 6,54E-05	0,01	0,99
	10	1,52 ± 0,19	3,67E-04 ± 5,11E-04	0,02	0,99
	12	1,52 ± 0,14	3,96E-04 ± 3,43E-04	0,11	0,99
	15	0,70 ± 0,06	0,09 ± 0,05	0,01	0,99

Se puede observar que el índice de consistencia (K) aumenta a medida que aumenta la concentración.

Se realizan distintas ANOVAS para cada una de las temperaturas estudiadas (4, 10, 22,5, 33, 55 °C) para observar si existen diferencias estadísticas entre los índices de comportamiento de flujo (n) respecto al factor de concentración (0%-solvente, 4, 8, 10, 12, 15%).

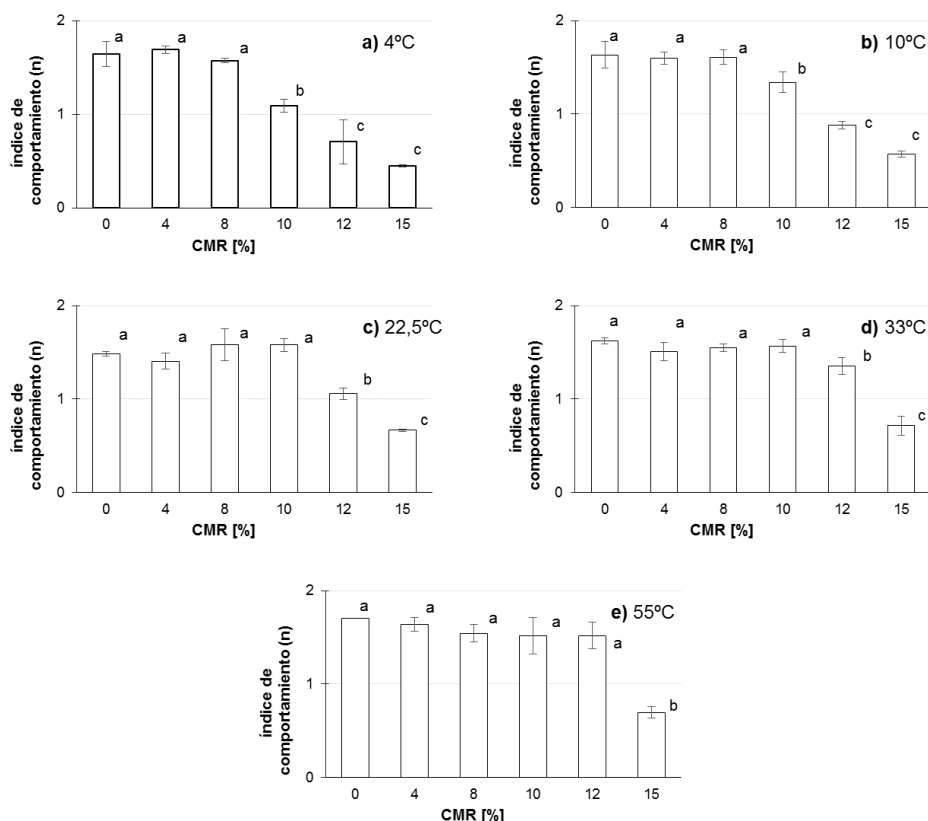


Figura 17. Índice de comportamiento de flujo (n). Valores medios y DS para n=2. Diferentes superíndices indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% según método LSD de Fisher.

A medida que se incrementa la temperatura disminuyen las diferencias significativas entre los índices de comportamiento con respecto a la del solvente (CMR 0%), siendo la CMR 15% el único que sigue presentando diferencias significativas a 55°C. En contra se encuentran las concentraciones más diluidas (4 y 8%), que no presentan diferencias significativas con el agua en los índices de comportamiento a lo largo de todo el rango de temperaturas estudiado.

Siendo el comportamiento reológico del solvente (agua) de tipo newtoniano, se clasifican los comportamientos reológicos de los distintos CMR a distintas temperaturas en función de las diferencias significativas encontradas con el solvente. Esta clasificación se recoge en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Clasificación reológica de CMR según temperatura y concentración.

	4°C	10°C	22,5°C	33°C	55°C
CMR 0 %	Newtoniano				
CMR 4 %					
CMR 8 %					
CMR 10 %	Transición				
CMR 12 %			Transición		
CMR 15 %			Pseudoplástico		

Se diferencian tres tipos de comportamiento reológico para CMR en función de la concentración del soluto y la temperatura a la que se encuentre la disolución. Como se puede observar en dicha tabla, las disoluciones más bajas de CMR presentan un comportamiento prácticamente newtoniano en todo el rango de temperaturas estudiadas. La CMR al 15% presenta un comportamiento pseudoplástico a distintas temperaturas, caracterizado de esta manera debido a las diferencias significativas que presenta con el comportamiento reológico del solvente así como el bajo valor de su índice de comportamiento ($n < 1$).

A diferencia de los casos anteriores, las CMR a 10 y 12% presentan un cambio de comportamiento en dependencia de la temperatura. A bajas temperaturas la CMR a 12% presenta comportamiento pseudoplástico, a medida que la temperatura aumenta su comportamiento es una fase de transición entre el comportamiento newtoniano y pseudoplástico, la misma que caracteriza a la CMR al 10% a bajas temperaturas.

Teniendo en cuenta la clasificación anterior y que la concentración y la temperatura tienen efectos más significativos que el gradiente de velocidad sobre la viscosidad, se asigna un único valor de viscosidad para la CMR de comportamiento prácticamente newtoniano y estados de transición. En el caso de CMR al 12% a bajas temperaturas y CMR al 15%, debido a las diferencias significativas observadas con el comportamiento reológico del agua, su bajo índice de comportamiento y comportamiento pseudoplástico se asigna un valor de viscosidad aparente para cada uno de los valores de gradiente de velocidad estudiados (100, 200, 300, 400, 500 s⁻¹). Todos los valores antes descritos se recogen en la **Tabla 9** de este documento.

Beliciu y Moraru (2011) atribuyen la presencia de estos comportamientos al régimen de solución de estos sistemas. En soluciones de caseínas micelares líquidas (LCCM) con concentraciones menores al 5% (w/w), que definen como régimen diluido, se presenta un comportamiento claramente newtoniano. Sin embargo en concentraciones superiores al 7,5% (w/w), considerado como régimen concentrado, el comportamiento de soluciones de caseína pasa a ser pseudoplástico a medida que la concentración aumenta (Beliciu & Moraru, 2011).

Si tenemos en cuenta los índices de solubilidad de las CMR estudiadas en este informe, para concentraciones <10% (w/w) con índices de solubilidad superiores al 90%, el comportamiento es prácticamente newtoniano en todas las temperaturas estudiadas, lo cual definiría el régimen diluido para la caseína en polvo utilizada. Por el contrario, el régimen concentrado se encontraría para soluciones superiores al 12% (w/w), en el que se observa claramente una coexistencia de distintos comportamientos de flujo según la temperatura. El índice de solubilidad para este régimen no supera el 87%, por lo que se estaría llegando al límite de saturación permitido para la elaboración de soluciones reconstituidas de caseínas micelares en polvo.

Otros autores estudian el comportamiento reológico de soluciones de caseínas micelares obtenidas por filtración de membrana, con una mezcla de proteínas del suero (Sauer, Doehner, & Moraru, 2012). Al igual que las disoluciones de caseína obtenidas a partir de polvos rehidratados, este estudio observa dos tipos de comportamiento reológico. A 20°C el comportamiento tipo newtoniano se presenta en soluciones con concentraciones del 2,5 al 5% (w/vol), mientras que el pseudoplástico se presenta en concentraciones del 7,5 al 12% de concentración. El resultado obtenido en este trabajo es más comparable al estudiado en soluciones acuosas de caseinomacropéptidos (Loria et al., 2018), donde a 25°C y un 15% de concentración se observa un comportamiento pseudoplástico, mientras que soluciones de menor concentración presentan comportamiento newtoniano.

En el caso de soluciones de leches enteras en polvo se observa que para concentraciones en sólidos solubles superiores al 22,8% (w/w), se presenta un comportamiento de flujo pseudoplástico (Vélez-Ruiz & Barbosa-Cánovas, 2000). Este cambio en el comportamiento en régimen concentrado de las soluciones estaría influenciado por la solubilidad y el incremento de gradiente de velocidad. La solubilidad de estos componentes decrece a altas concentraciones lo que favorece la interacción entre partículas. El incremento del gradiente de velocidad induce una dispersión asimétrica de las moléculas, que se alinean dentro del plano del gradiente de velocidad y en consecuencia disminuye la resistencia a la fricción (Vélez-Ruiz & Barbosa-Cánovas, 2000). Se explicaría así la tendencia de las CMR a concentraciones del 15% a ejercer una mayor resistencia al gradiente de velocidad de 100 s⁻¹, disminuyendo este esfuerzo a medida que el gradiente de velocidad aumenta hasta llegar a los 500 s⁻¹.

Tabla 9. Valores de viscosidad y viscosidad aparente [mPa.s] para caseínas micelares reconstituidas a distintas concentraciones.

	$\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]	CMR 4%	CMR 8%	CMR 10%	CMR 12%	CMR 15%
4°C	100				40,1 ± 7,7	522,7 ± 27,6
	200				36,5 ± 5,2	356,2 ± 17,8
	300	4,4 ± 0,0	5,7 ± 0,2	8,8 ± 0,1	33,8 ± 4,6	284,4 ± 12,9
	400				32,2 ± 4,0	242,9 ± 9,6
	500				30,6 ± 3,5	214,9 ± 7,8
10°C	100				27,3 ± 2,6	236,0 ± 43,5
	200				25,3 ± 2,3	177,3 ± 28,4
	300	4,5 ± 0,2	5,5 ± 0,3	7,1 ± 0,4	24,1 ± 2,2	149,3 ± 22,1
	400				23,4 ± 2,0	131,6 ± 18,2
	500				22,6 ± 1,7	118,9 ± 15,4
22,5°C	100					91,8 ± 4,8
	200					75,0 ± 4,3
	300	3,7 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,4 ± 0,2	9,3 ± 0,4	66,0 ± 3,8
	400					59,5 ± 3,3
	500					54,5 ± 3,0
33°C	100					46,3 ± 22,2
	200					37,8 ± 15,8
	300	3,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1	4,8 ± 0,2	6,7 ± 0,3	33,4 ± 12,5
	400					30,4 ± 10,4
	500					28,0 ± 8,9
55°C	100					20,1 ± 5,1
	200					16,5 ± 3,7
	300	2,6 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,8 ± 0,2	5,4 ± 0,1	14,5 ± 2,9
	400					13,2 ± 2,3
	500					12,3 ± 2,0

d. Influencia de la concentración en el comportamiento reológico.

La influencia de la concentración sobre la viscosidad se puede describir como una relación exponencial. Para evaluar el efecto de la concentración sobre la viscosidad aparente se utilizaron los valores de viscosidad o viscosidad aparente a 300 s^{-1} .

$$\eta_{a(300\text{s}^{-1})} = a_1 * e^{a_2 C}$$

Las constantes a_1 y a_2 son determinadas con las ecuaciones de ajuste de los datos según líneas de tendencia exponenciales (**Figura 18**). Los valores para las constantes descritas a diferentes temperaturas se encuentran en la **Tabla 10**.

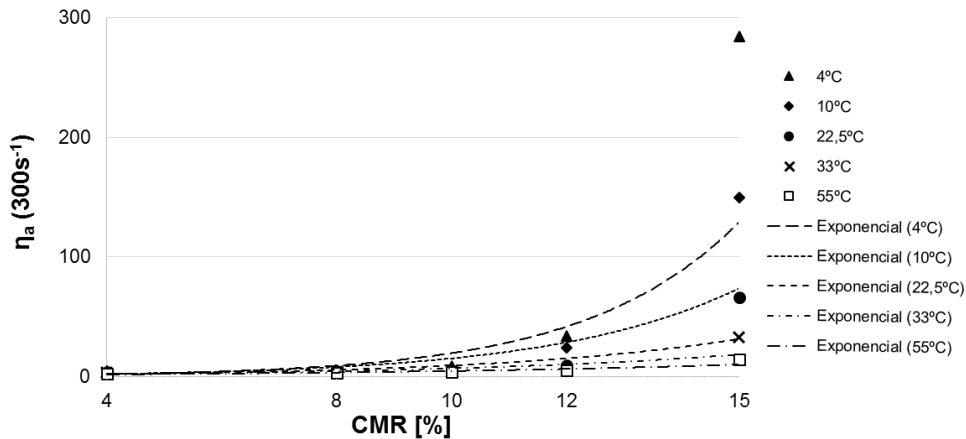


Figura 18. Relación de viscosidad aparente según concentración.

Tabla 10. Coeficientes a_1 y a_2 para el modelo de viscosidad aparente de CMR en función de la concentración.

	4 °C	10 °C	22,5 °C	33 °C	55 °C
a₁	4,67E-04	6,69E-04	8,54E-04	1,03E-03	1,09E-03
a₂	0,37	0,31	0,24	0,19	0,15
R²	0,82	0,80	0,74	0,75	0,83

Como se puede observar, la constante a_2 que está relacionada con el efecto de la concentración sobre la viscosidad aparente disminuye con la temperatura, por tanto la concentración tiene un efecto mayor sobre la viscosidad aparente, efecto más marcado a temperaturas más bajas. El rango de valores obtenidos para estas constantes se encuentra dentro del obtenido para soluciones de caseínas micelares en proteínas del suero (Sauer et al., 2012).

Para verificar la bondad del ajuste del modelo, se calculan las viscosidades aparentes a diferentes temperaturas con los coeficientes obtenidos en la tabla anterior, para diferentes concentraciones de CMR (**Figura 19**). El análisis estadístico demuestra con un 95% de nivel de confianza, según prueba-t, que no hay diferencias significativas entre las medias de las dos muestras de datos.

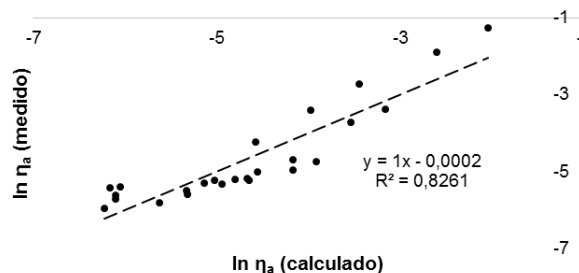


Figura 19. Ajuste del modelo para cálculo de viscosidad en función de la concentración.

e. Influencia de la temperatura en el comportamiento reológico

La influencia de la temperatura sobre la viscosidad o viscosidad aparente se estudia mediante una ecuación tipo Arrhenius.

$$\ln \mu = \ln \mu_{\infty} * \frac{E_a}{RT}$$

La representación gráfica de $(\ln \mu)$ frente a $(1/T)$ se muestra en el **Figura 20**, para las diferentes concentraciones de CMR estudiadas. Los valores de viscosidad o viscosidad aparente son los correspondientes a velocidades de 300 s^{-1} . Para cada una de las rectas se encuentra la ecuación asociada al modelo. A partir de esta ecuación es posible conocer la energía de activación (E_a) de cada concentración.

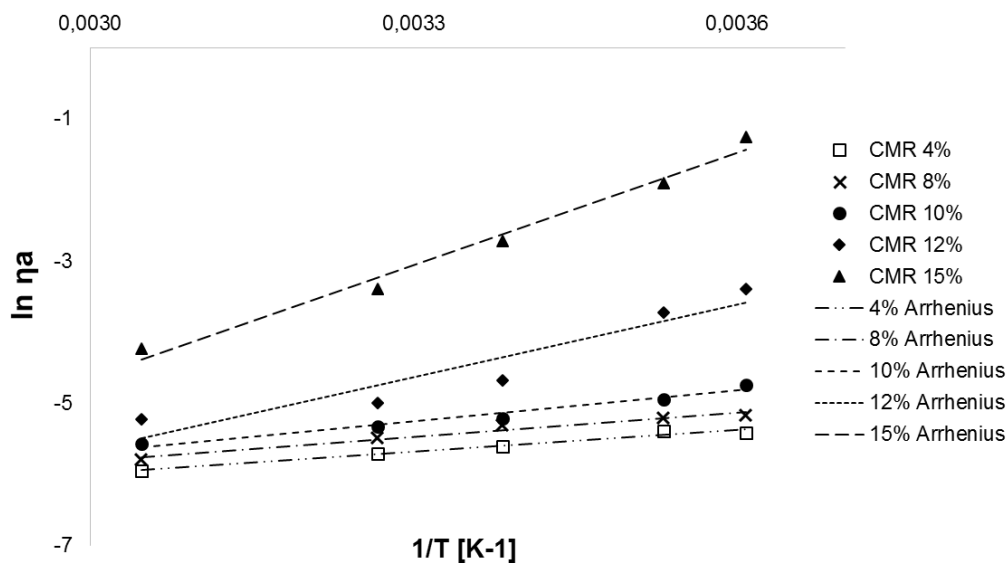


Figura 20. Gráfica de Arrhenius para la variación de la viscosidad aparente a 300 s^{-1} con la temperatura.

Tabla 11. Valores de los parámetros de la ecuación tipo Arrhenius a diferentes concentraciones de CMR.

	CMR 4%	CMR 8%	CMR 10%	CMR 12%	CMR 15%
Ea [kJ/mol]	8,44	9,39	12,03	28,34	43,70
Ln (μ_{∞}) [Pa.s]	-9,03	-9,20	-10,03	-15,88	-20,40
R²	0,98	0,96	0,97	0,89	0,98

En la **Tabla 11**, se puede apreciar como la E_a decrece a medida que la temperatura aumenta, por lo contrario, incrementos en la concentración producen un incremento de la E_a . De este modo podemos observar como esta energía de activación está más disponible a temperaturas más elevadas y por tanto el fluido fluye más fácilmente (Sahin & Sumnu, 2009).

Se comprueba la bondad del ajuste de los modelos de viscosidad aparente en función de la temperatura, según ecuación tipo Arrhenius, para distintas concentraciones enfrentando los valores de las viscosidades aparentes calculadas frente a las medidas en los distintos ensayos de este trabajo. El ajuste de la recta de los datos representados en el **Figura 21** permite observar la cercanía entre los valores medidos y los calculados. Así mismo, el análisis estadístico demuestra con un 95% de nivel de confianza según prueba-t, que no hay diferencias significativas entre las medias de las dos muestras de datos.

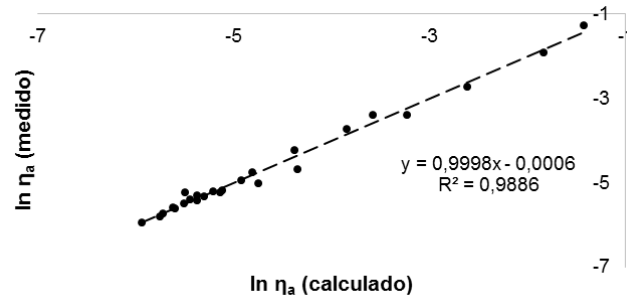


Figura 21. Ajuste del modelo para cálculo de viscosidad en función de la temperatura.

Para aquellos fluidos cuya viscosidad tiene dependencia del gradiente de velocidad, es posible conocer, mediante el mismo ajuste, la variación de la energía de activación. Se analiza este parámetro para la CMR al 15% (Figura 22).

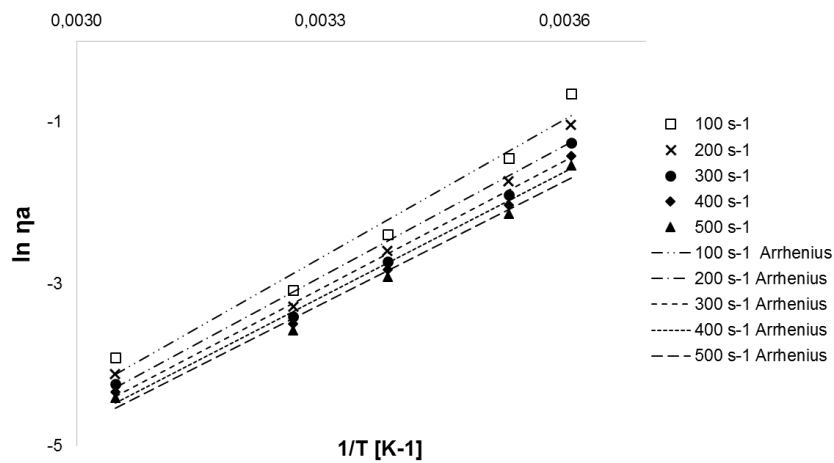


Figura 22. Gráfica de Arrhenius para la variación de la viscosidad aparente con la temperatura para CMR 15%.

Tabla 12. Valores de los parámetros de la ecuación tipo Arrhenius según gradiente de velocidad para CMR al 15%.

	100 s ⁻¹	200 s ⁻¹	300 s ⁻¹	400 s ⁻¹	500 s ⁻¹
Ea [kJ/mol]	47,48	45,01	43,70	42,83	42,14
Ln (μ [∞]) [Pa.s]	-21,52	-20,78	-20,40	-20,16	-19,98
R ²	0,97	0,98	0,98	0,99	0,99

Se puede observar como la energía de activación disminuye a medida que se incrementa el gradiente de velocidad. A diferencia de la concentración, la variación del gradiente de velocidad no produce grandes cambios sobre la energía de activación.

f. Efecto combinado de temperatura y concentración sobre el comportamiento reológico.

El efecto combinado de la concentración y la temperatura sobre la viscosidad resulta una herramienta útil en la predicción del comportamiento de CMR a concentraciones y temperaturas fuera del alcance de los ensayos de este informe. Se sigue el modelo de Arrhenius en función de la concentración seguido por otros autores dentro de estudios de este tipo (Sauer et al., 2012).

En primer lugar se estudia la dependencia de la energía de activación (E_a) con la concentración. Diversos autores encuentran en la relación de ambos parámetros una dependencia lineal (A.A. & Rao, 1984; Loria et al., 2018; Marcelo & Rizvi, 2008; M.A Rao, Bourne, & Cooley, 1981), caso contrario al encontrado en las caseínas en polvo reconstituidas utilizadas. La **Figura 23** muestra como la energía de activación a distintas concentraciones de CMR sigue una relación no lineal.

Se vuelve a apreciar nuevamente la influencia del régimen diluido y concentrado de las caseínas en polvo utilizadas para este estudio. En rangos de CMR del 10% al 15% la energía de activación tiene una diferencia de 31,68 kJ/mol, mientras que en régimen diluido (4-10%) el incremento es de 3,59 kJ/mol. Las CMR a concentraciones superiores al 10% son más sensibles a los cambios de temperatura. El rango de E_a para proteínas del suero también ha sido estudiado. En concentraciones de proteínas del suero del 8 al 15% (w/w) disueltas en aislados de proteína del suero líquida, la E_a se encuentra en rangos de 16 a 20 kJ/mol (Marcelo & Rizvi, 2008). Se observa que a bajas concentraciones, las proteínas del suero son más sensibles que las CMR cuyo rango de E_a del 8-15% es de 9 a 49 kJ/mol.

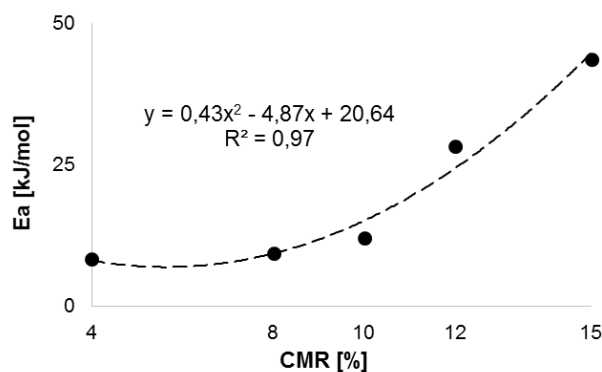


Figura 23. Energía de activación según concentración de CMR.

Por último, se relaciona la variación de la constante de Arrhenius con la concentración. Al igual que con la E_a los mismos estudios citados anteriormente encuentran una dependencia lineal de ambos parámetros. El ajuste de los resultados obtenidos encuentra en una relación no lineal la óptima relación de ambos parámetros (**Figura 24**).

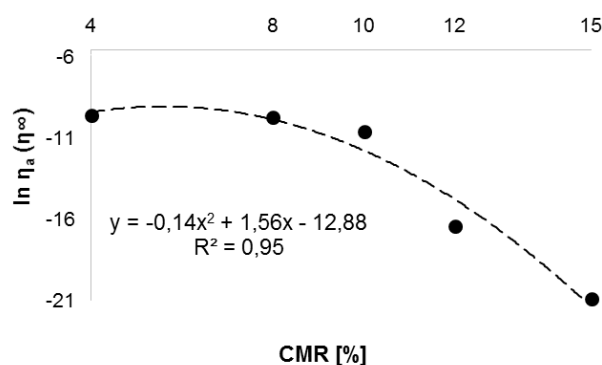


Figura 24. Ln del valor de la constante de Arrhenius según concentración de CMR

Para los resultados obtenidos en este trabajo, se puede describir la viscosidad aparente de caseínas micelares reconstituidas a diferentes concentraciones y temperaturas mediante la siguiente ecuación, para viscosidades medidas a 300 s⁻¹.

$$\ln(\eta_a) = [-0,14C^2 + 1,56C - 12,88] + \left[\frac{0,43C^2 - 4,87C + 20,64}{RT} \right] \quad \text{Eq. 16}$$

Donde,

- η_a : Viscosidad aparente [Pa.s]
- R: Constante de gases [8,314x10⁻³ kJ/mol K]
- T: Temperatura [K]
- C: Concentración de caseína micelar en polvo (w/w) [%]

La viscosidad aparente de CMR está más influenciada por la concentración que por la temperatura, tal y como se observa en la **Figura 25**. El ajuste permite observar que el modelo matemático descrito en la **Ecuación 16** permite una predicción favorable de la viscosidad o viscosidad aparente a 300 s⁻¹ de caseínas micelares reconstituidas en concentraciones del 4 al 15% y temperaturas de 4 a 55°C. Así mismo, el análisis estadístico demuestra que no existen diferencias significativas entre las media de los valores calculados (**Figura 25a**) y medidos (**Figura 25b**), con un nivel de confianza del 95% según el *test de comparación de hipótesis*.

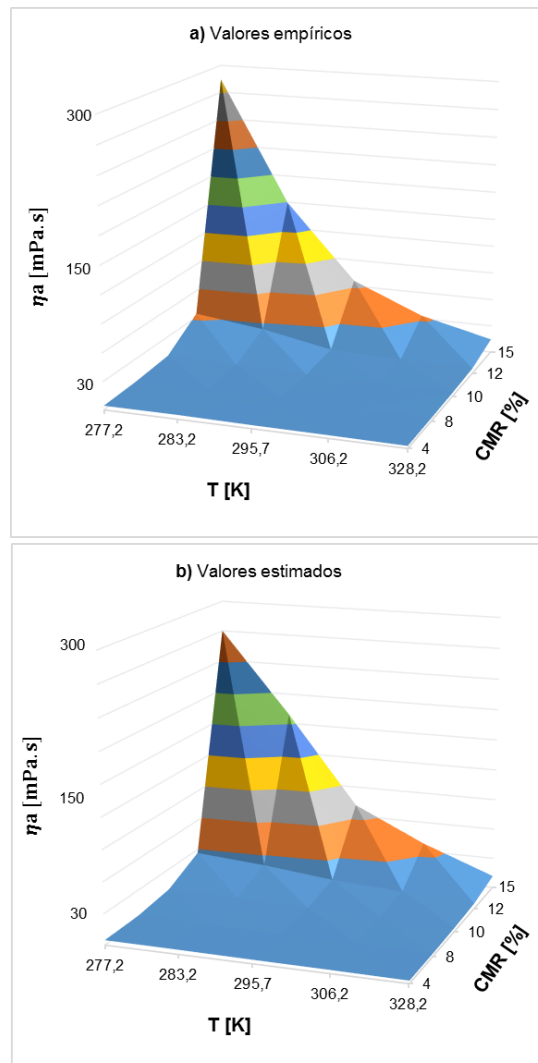


Figura 25. Evolución de la velocidad aparente según efecto combinado de concentración y temperatura.

6.3 Influencia sobre la reología de tratamientos de conservación y tiempo de almacenamiento.

En el siguiente apartado se estudia el comportamiento reológico de caseínas micelares reconstituidas con un 8% (w/w), tras ser sometidas tratamientos térmicos (pasteurización) y no térmicos (altas presiones hidrostáticas-HHP) de conservación. Además se observará la influencia del tiempo de almacenamiento sobre las características reológicas de dicha solución. Los ensayos reológicos se llevarán a cabo a 22,5°C de temperatura.

a. Influencia de tratamientos de conservación sobre la viscosidad relativa.

Los tratamientos de pasteurización aplicados a CMR al 8% son de tipo LTLT (63°C-30 minutos) y HTST (72°C-30 segundos). En el caso de altas presiones hidrostáticas, se trabaja con presiones de tratamiento de 300, 450 y 600 MPa. La evolución de la viscosidad relativa tras la aplicación de los tratamientos térmicos se puede observar en la **Figura 26a**. Así mismo, la influencia de tratamietos no térmicos de conservación se encuentran en la **Figura 26b**.

El análisis estadístico ANOVA, permite observar como son los tratamientos a altas presiones hidrostáticas los que tienen un mayor grado de influencia sobre la viscosidad relativa de CMR 8%, con un nivel de confianza del 95 % (p -valor=0,002). La prueba de múltiples rangos demuestra que son los tratamientos a altas presiones hidrostáticas de 450 y 600 MPa los que presentan diferencias significativas sobre la viscosidad relativa de la solución control a tiempo 0 (Control T0) y del resto de tratamientos estudiados. A 450 MPa, la viscosidad relativa disminuye con respecto al control, mientras que a 600 MPa se produce un aumento de este parámetro.

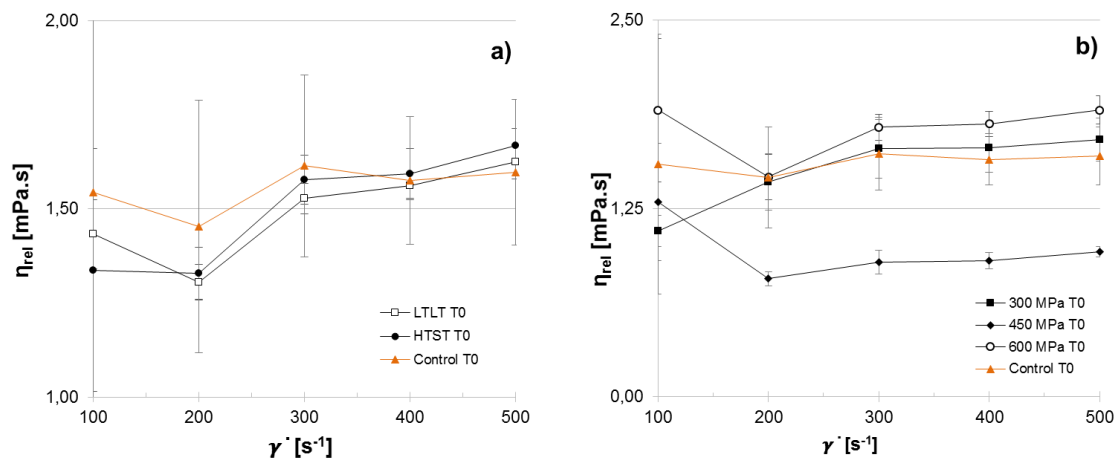


Figura 26. Evolución de la viscosidad relativa de CMR 8% tras tratamientos de conservación.

b. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la viscosidad relativa.

La muestra testigo, así como tras tratamientos de pasteurización y HHP, fueron almacenadas en cámara a 10°C durante 7 días.

En la **Figura 27** se representa la evolución de la viscosidad relativa para la muestra control a tiempo cero y tras siete días de almacenamiento. Se puede observar como tras siete días de almacenamiento la viscosidad relativa aumenta notablemente. Así mismo, se observa el efecto del gradiente de velocidad, a medida que esta aumenta los valores de viscosidad relativa decrecen. El análisis estadístico ANOVA permite comprobar como el tiempo de almacenamiento influye significativamente sobre la viscosidad relativa de la muestra control.

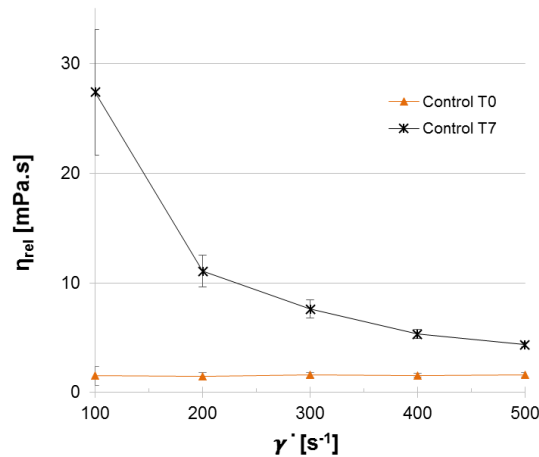


Figura 27. Evolución de la viscosidad relativa de CMR8% según el tiempo de almacenamiento.

La evolución de la viscosidad relativa tras la aplicación de tratamientos de conservación, térmicos y no térmicos, y 7 días de almacenamiento se representan en la **Figura 28 a y b** respectivamente. A diferencia la muestra control tras siete días de almacenamiento (Control T7), el cambio de la viscosidad relativa tras tratamientos es menos apreciable, hecho que corrobora el análisis estadístico, en el que no se encontraron diferencias significativas de los tratamientos con respecto a la muestra control a tiempo 0.

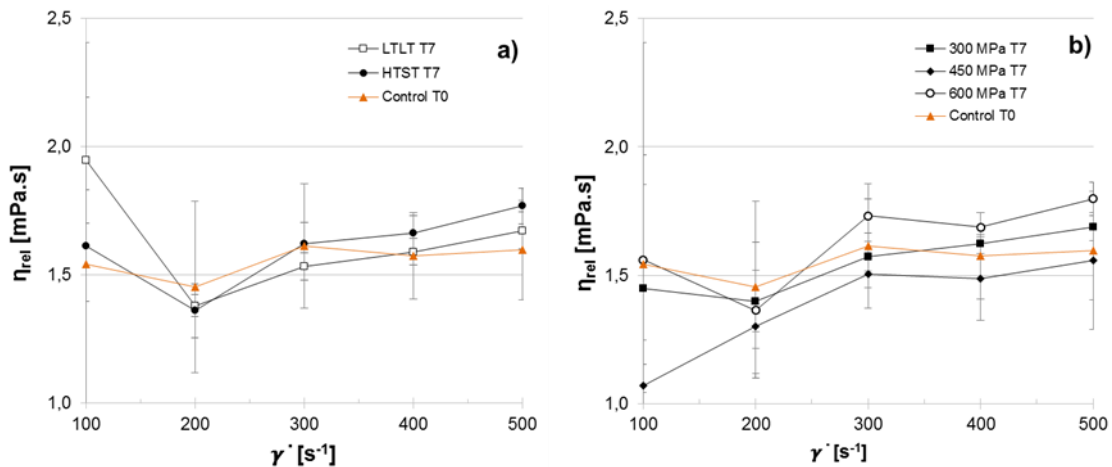


Figura 28. Evolución de la viscosidad relativa de CMR8% según el tiempo de almacenamiento.

c. Modelización del comportamiento reológico bajo la influencia de tratamientos de conservación y tiempo de almacenamiento

Las curvas de flujo (esfuerzo de cizalladura frente a gradiente de velocidad) fueron ajustadas mediante el modelo de Ostwale- de Waele.

Tabla 13. Ajuste al modelo de Ostwale de Waele (n: índice de comportamiento; K: índice de consistencia). Tiempo de almacenamiento 0 días. Diferentes superíndices representan diferencias significativas.

Tratamiento	n [adimensional]	K [Pa.s ⁿ]	Chi ²	R ²
Control	1,53 ^a ± 0,13	2,73E-04 ± 1,50E-04	0,01	0,99
LTLT	1,65 ^{a,b} ± 0,01	1,14E-04 ± 3,18E-06	0,00	0,99
HTST	1,65 ^{a,b} ± 0,04	1,14E-04 ± 3,02E-05	0,01	0,99
300 MPa	1,63 ^{a,b} ± 0,05	1,37E-04 ± 5,31E-05	0,01	0,99
450 MPa	1,65 ^{a,b} ± 0,05	1,33E-04 ± 4,18E-05	0,01	0,99
600 MPa	1,67 ^b ± 0,12	1,39E-03 ± 3,49E-03	0,01	0,99

Tabla 14. Ajuste al modelo de Ostwale de Waele (n: índice de comportamiento; K: índice de consistencia). Tiempo de almacenamiento 7 días. Diferentes superíndices representan diferencias significativas.

Tratamiento	n [adimensional]		K [Pa.s ⁿ]		Chi ²	R ²
Control T0	1,53 ^a	± 0,13	2,73E-04	± 1,50E-04	0,01	0,99
Control T7	0,39 ^b	± 0,08	6,00E-01	± 3,22E-01	0,02	0,99
LTLT	1,63 ^{a,c}	± 0,06	1,31E-04	± 4,42E-05	0,01	0,99
HTST	1,69 ^c	± 0,05	3,22E-04	± 4,49E-04	0,00	0,99
300 MPa	1,64 ^{a,c}	± 0,04	3,14E-04	± 3,56E-04	0,01	0,99
450 MPa	1,62 ^{a,c}	± 0,17	1,49E-04	± 1,18E-04	0,01	0,99
600 MPa	1,66 ^{a,c}	± 0,15	2,33E-04	± 1,29E-04	0,02	0,99

Se realiza un análisis tipo ANOVA para cada tiempo de almacenamiento estudiado, para observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices de comportamiento de la muestra control con el resto de grupos estudiados, diferentes superíndices (**Tabla 13** y **14**) señalan dichas diferencias.

Se puede observar como entre los ensayos realizados el mismo día de la aplicación de los tratamientos (**Tabla 13**), solo existen diferencias significativas entre el índice de comportamiento de la muestra control y la muestra tras aplicación de altas presiones hidrostáticas a 600MPa, pero con índices de comportamiento sin diferencias significativas con el resto de grupos estudiados.

En el caso de las muestras tras siete días de almacenamiento a 10°C (**Tabla 14**), se observa como en el caso de la muestra Control T7 se produce un descenso significativo de su índice de comportamiento, presentando según la prueba de múltiples rangos diferencias significativas con el resto de grupos.

El comportamiento reológico de CMR al 8% sin tiempo de almacenamiento ha sido estudiado en apartados anteriores de este informe y clasificado como de tipo newtoniano. El análisis tipo ANOVA así como la prueba de múltiples rangos permiten observar como es la muestra Control T7 la única que presenta un cambio en su comportamiento, pasando a ser de tipo pseudoplástico debido a su bajo índice de comportamiento ($n < 1$).

La influencia del tiempo de almacenamiento sobre productos lácteos como leche concentrada fue estudiada por Vélez y otros (1998), quienes encontraron una influencia significativa de este parámetro sobre el índice de comportamiento de leches reconstituidas tras una semana de almacenamiento a 4°C, pasando de un comportamiento newtoniano a pseudoplástico (Vélez-Ruiz & Barbosa-Cánovas, 1998)

7. Conclusiones

El estudio de características físico-químicas y reológicas de caseínas micelares reconstituidas ha permitido concluir los siguientes puntos.

- Tras la evaluación de dos protocolos de preparación para la reconstitución de caseínas micelares en polvo (Prodiel87B®), el protocolo de preparación B aunque con índices de inestabilidad mayores, pero despreciables frente al tiempo de estudio empleado, permite obtener soluciones más diluidas y homogéneas comprobado a través del índice de solubilidad.
- Se observa la influencia de la temperatura y la concentración sobre la viscosidad relativa de soluciones de caseína micelar en polvo. A medida que aumenta la temperatura la viscosidad relativa disminuye. Por lo contrario, aumentos en la concentración de la solución tienden a un aumento de su viscosidad relativa, efecto más notorio en concentraciones superiores al 10% (w/w). La influencia de la concentración sobre la viscosidad relativa es más marcada que la producida por la temperatura o el gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$).
- El ajuste de las curvas de flujo mediante el modelo de Ostwald de Waele permiten clasificar el comportamiento reológico de CMR según concentración y temperatura. Soluciones más diluidas (4%, 8% y 10%) presentan un comportamiento claramente newtoniano. La solución de caseína micelar al 12% presenta un punto de inflexión con respecto al comportamiento reológico de estas soluciones. A bajas temperaturas (4°C y 10°C) el comportamiento es de tipo pseudoplástico, mientras que a temperaturas de 22,5°C a 55°C el comportamiento es newtoniano. La solución de mayor concentración (15%) presenta comportamiento pseudoplástico a todas las temperaturas analizadas.
- El efecto de la concentración sobre la viscosidad o viscosidad aparente se puede modelizar mediante ecuaciones de tipo exponencial.
- El efecto de la temperatura sobre CMR se modeliza mediante ecuaciones tipo Arrhenius. Se identifican para las concentraciones de 4%, 8%, 10%, 12% y 15% los valores correspondientes de energía de activación (8.44 kJ/mol, 9.39 kJ/mol, 12.03 kJ/mol, 28.34 kJ/mol y 43.70 kJ/mol). Los cambios en la viscosidad aparente se ven más influidos por la variación de la temperatura a medida que se eleva la concentración de estas soluciones.
- Se ha determinado un modelo matemático que permite describir en una única ecuación la viscosidad aparente de caseínas micelares reconstituidas en función del rango de concentraciones y temperaturas estudiado.
- El estudio del efecto de tratamientos térmicos (parteurización LTLT y HTST) y no térmicos (altas presiones hidrostáticas a 300MPa, 450MPa y 600MPa) de conservación, en caseínas micelares reconstituidas al 8% (w/w), permite observar que son los tratamientos a 450 y 600 MPa los que mayor repercusión tienen sobre la viscosidad relativa. Los tratamientos de conservación no influyen en el comportamiento reológico de la solución.
- El tiempo de almacenamiento (siete días a 10°C) en caseínas micelares reconstituidas al 8% (w/w), sin ser sometidas a tratamientos de conservación, induce un cambio en su comportamiento reológico que evoluciona de newtoniano a pseudoplástico.

8. Referencias

- A.A., V., & Rao, M. . (1984). Flow Properties of Low-Pulp Concentrated Orange Juice: Serum Viscosity and Effect of Pulp Content. *Journal of Food Science*, 49(3), 876–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13232.x>
- Abril, J., & Casp Vanaclocha, A. (1999). *Procesos de conservación de alimentos*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Alias, C. (1985). *Ciencia de la leche. Principios de la técnica lechera* (4th ed.). Barcelona-España: Editorial Reverté S.A.
- Beliciu, C. M., & Moraru, C. I. (2011). The effect of protein concentration and heat treatment temperature on micellar casein–soy protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1448–1460. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2011.01.011>
- Bloomfield, V. A., & Mead, R. J. (1975). Structure and Stability of Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, 58(4), 592–601. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(75\)84615-7](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(75)84615-7)
- Broyard, C., & Gaucheron, F. (2015). Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Science & Technology*, 95, 831–862.
- Carr, A., & Golding, M. (2016). Functional Milk Proteins Production and Utilization: Casein-Based Ingredients BT - Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects. In P. L. H. McSweeney & J. A. O'Mahony (Eds.) (pp. 35–66). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_2
- Cheftel, C. . (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents : an overview. *Hip Pressure Biotechnology*, 195–209. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10012001435/en/>
- Creamer, L. K., Plowman, J. E., Liddell, M. J., Smith, M. H., & Hill, J. P. (1998). Micelle Stability: κ -Casein Structure and Function. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 3004–3012. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(98\)75864-3](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(98)75864-3)
- Crowley, S. V, Kelly, A. L., Schuck, P., Jeantet, R., & O'Mahony, J. A. (2016). Rehydration and Solubility Characteristics of High-Protein Dairy Powders BT. In P. L. H. McSweeney & J. A. O'Mahony (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects* (pp. 99–131). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_4
- DAE, E. D. A. (2017). *Economic Report 2016/2017*. Retrieved from http://eda.euromilk.org/fileadmin/user_upload/Public_Documents/Facts_and_Figures/EDA_EWPA_Economic_Report_2016.pdf
- Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 449–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., & Douglas Goff, H. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14(12), 1025–1031. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2004.04.008>
- De Kruif, C. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9(3), 183–188. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00058-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00058-8)
- De Kruif, C. . (2014). The structure of casein micelles: a review of small angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*, 47, 1479–1489.
- Early, R., & Oria Almudí, R. M. (2000). *Tecnología de los productos lácteos / edición a cargo de Ralph Early; traducción de Rosa M Oria Almudí*. Zaragoza-España: Editorial Acribia. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat03043a&AN=bupn.00139157&site=eds-live>
- Fox, P. F., Uniacke-Loewe, T., McSweeney, P. L. ., & O'Mahony, J. . (2003). *Dairy chemistry and Biochemistry* (3rd ed.). New York: Springer US. Retrieved from

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-319-14892-2.pdf>

- Garía-Risco, M. R., Olano, A., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2000). Micelar Changes Induced by High Pressure. Influence in the Proteolytic Activity and Organoleptic Properties of Milk. *Journal of Dairy Science*, 83(10), 2184–2189. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75101-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75101-0)
- Hiperbaric. (2018). ¿Que es la alta presión? Retrieved December 26, 2018, from <https://www.hiperbaric.com/es/alta-presion>
- Hite, B. H. (1899). *The effect of pressure in the preservation of milk*. Virginia: West Virginia University. Agricultural Experiment Station.
- Holt, C. (1992). Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. *Advances in Protein Chemistry*, 43, 63–151. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60554-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60554-9)
- Holt, C. (1998). Casein Micelle Substructure and Calcium Phosphate Interactions Studied by Sephacryl Column Chromatography. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2994–3003. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75863-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75863-1)
- Holt, C., & Carver, J. . (2012). Darwinian transformation of a “scarcely nutritious fluid” into milk. *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 1256–1263.
- Horne, D. S. (1983). Calcium-induced precipitation of α 1-casein: effect of modification of lysine residues. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5(5), 296–300. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(83\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0141-8130(83)90045-4)
- Horne, D. S. (1998). Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171–177. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00040-5)
- Huppertz, T. (2013). Chemistry of the casein. In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (pp. 135–160).
- Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2004). High pressure treatment of bovine milk: Effects on casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research*, 71(1), 97–106. <https://doi.org/10.1017/S002202990300640X>
- Ibarz, A., & Barbosa Cánovas, G. (2005). *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Madrid-España: Mundi-Prensa Libros S.A.
- INC, S. T. (2010). Statgraphics Centurion. USA: StatPoint Technologies, Inc.
- Institute of Food Technologists., R., H.J., C., & A.A., V. (1984). *Food technology. Food Technology*. Institute of Food Technologists. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19850048225>
- Jeanet, R., Roignant, M., & Brulé, G. (2005). *Ingeniería de los procesos aplicada a la industria láctea*. Zaragoza-España: ACRIBIA S.A.
- Jenness, R., Larson, B. ., McMeekin, T. ., Swanson, A. ., Whitnah, C. ., & Whitney, R. . (1956). Nomenclature of the proteins of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 39, 536–541.
- Jeurnink, T. J. M., & De Kruif, K. G. (1993). Changes in milk on heating: viscosity measurements. *Journal of Dairy Research*, 60(2), 139–150. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0022029900027461>
- Karlsson, A. O., Ipsen, R., Schrader, K., & Ardö, Y. (2005). Relationship Between Physical Properties of Casein Micelles and Rheology of Skim Milk Concentrate. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3784–3797. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73064-2](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73064-2)
- Keogh, M. K., & O’Kennedy, B. T. (1998). Rheology of Stirred Yogurt as Affected by Added Milk Fat, Protein and Hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 63(1), 108–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15687.x>

- Lewis, M. J. (1949). *Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado*. Zaragoza-España: ACRIBIA S.A.
- Loeb, J. (1921). DONNAN EQUILIBRIUM AND THE PHYSICAL PROPERTIES OF PROTEINS. *The Journal of General Physiology*, 4(1), 73 LP-95. <https://doi.org/10.1085/jgp.4.1.73>
- Loria, K. G., Aragón, J. C., Torregiani, S. M., Pilosof, A. M. R., & Farías, M. E. (2018). Flow properties of caseinomacropptide aqueous solutions: Effect of particle size distribution, concentration, pH and temperature. *LWT*, 93, 243–248. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.03.050>
- Lynch, A. G., & Mulvihill, D. M. (1997). Effect of sodium caseinate on the stability of cream liqueurs. *International Journal of Dairy Technology*, 50(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01727.x>
- Marcelo, P. A., & Rizvi, S. S. H. (2008). Physicochemical properties of liquid virgin whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 18(3), 236–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.011>
- Martínez Monteagudo, S., & Balasubramaniam, V. . (2016). Chapter 1: Fundamentals and applications of High-Pressure processing technology. In V. . Balasubramaniam, G. Barbosa-Cánovas, & H. Lelieveld (Eds.), *High Pressure Procesising of Food Principles* (Primera ed, pp. 3–17). New York: Springer New York.
- McMahon, D. J., & McManus, W. R. (1998). Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2985–2993.
- Mercier, J.-C., Grosclaude, F., & Ribadeau-Dumas, B. (1971). Structure primaire de la caséine asl-bovine. *European Journal of Biochemistry*, 23(1), 41–51. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1971.tb01590.x>
- Merel-Rausch, E., Kulozik, U., & Hinrichs, J. (2007). Influence of pressure release rate and protein concentration on the formation of pressure-induced casein structures. *Journal of Dairy Research*, 74(3), 283–289. <https://doi.org/10.1017/S002202990700252X>
- Ministerio de Agricultura. (2017). *Informe de consumo de alimentación de España*. Retrieved from https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeannualdeconsumoalimentario2017_tcm30-456186.pdf
- Mottar, J., Bassier, A., Joniau, M., & Baert, J. (1989). Effect of Heat-Induced Association of Whey Proteins and Casein Micelles on Yogurt Texture. *Journal of Dairy Science*, 72(9), 2247–2256. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79355-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79355-3)
- Orrego Alzate, C. (2003). *Procesamiento de alimentos* (Primera). Manizalez, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Sede Manzanales.
- Panouillé, M., Benyahia, L., Durand, D., & Nicolai, T. (2005). Dynamic mechanical properties of suspensions of micellar casein particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 287(2), 468–475. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.02.007>
- Pellegrino, L., Masotti, F., Cattaneo, S., Hogenboom, J. A., & de Noni, I. (2013). Nutritional Quality of Milk Proteins. In P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (pp. 515–538). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_16
- Rao, M. ., Bourne, M. C., & Cooley, H. . (1981). FLOW PROPERTIES OF TOMATO CONCENTRATES. *Journal of Texture Studies*, 12(4), 521–538. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1981.tb00265.x>
- Rao, M. A. (1999). Chapter 8: Application of Rheology to fluid food handling and processing. In *Rheology of fluid ans semisolid foods. Principles and applications*. (pp. 385–421). Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Rao, M. A. (2007a). Flow and Functional Models for Rheological Properties of Fluid Foods BT - Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications. In M. A. Rao (Ed.) (pp.

- 27–58). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70930-7_2
- Rao, M. A. (2007b). Introduction: Food Rheology and Structure BT - Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications. In M. A. Rao (Ed.) (pp. 1–26). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70930-7_1
- Regnault, S., Dumay, E., & Cheftel, J. (2016). Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 degrees C or 20 degrees C: effects on the distribution of minerals and proteins between colloidal and soluble phases. *Journal of Dairy Research*, 73, 91–100.
- Regnault, S., Thiebaud, M., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (2004). Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: effects on casein micelle size distribution. *International Dairy Journal*, 14(1), 55–68. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00144-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00144-4)
- Romero del Castillo Shelly, R., & Mestres Lagarriga, J. (2004). *Productos lácteos: Tecnología*. Ediciones UPC. Retrieved from <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.3/36810>
- Sahin, S., & Sumnu, S. G. (2009). *Propiedades físicas de los alimentos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Saint-Eve, A., Juteau, A., Atlan, S., Martin, N., & Souchon, I. (2006). Complex Viscosity Induced by Protein Composition Variation Influences the Aroma Release of Flavored Stirred Yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3997–4004. <https://doi.org/10.1021/jf0600206>
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., & Juneja, L. R. (2005). Antioxidant Properties of Casein Calcium Peptides and Their Effects on Lipid Oxidation in Beef Homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 464–468. <https://doi.org/10.1021/jf0487699>
- Sauer, A., Doehner, I., & Moraru, C. I. (2012). Steady shear rheological properties of micellar casein concentrates obtained by membrane filtration as a function of shear rate, concentration, and temperature. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5569–5579. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-5501>
- Schmidt, D. . (1980). Colloidal aspects of casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34(1), 42–64. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19800460315>
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639–644. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2006.01.013>
- Slattery, C. W. (1976). Model calculations of casein micelle size distributions. *Biophysical Chemistry*, 6(1), 59–64. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(76\)80061-0](https://doi.org/10.1016/0301-4622(76)80061-0)
- Slattery, C. W., & Evard, R. (1973a). A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 317(2), 529–538. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90246-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90246-8)
- Slattery, C. W., & Evard, R. (1973b). A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 317(2), 529–538. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90246-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90246-8)
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold.” *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>
- Sutermeister, E. (1927). *Casein and its industrial applications*. New York: American Chemical Society. Monograph Series.
- Tran Le, T., Saveyn, P., Hoa, H. D., & Van der Meeren, P. (2008). Determination of heat-induced effects on the particle size distribution of casein micelles by dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis. *International Dairy Journal*, 18(12), 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2008.06.006>
- Trujillo, A. J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R., & Guamis, B. (2002). Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovative Food Science and*

Emerging Technologies, 3, 295–307.

- Vélez-Ruiz, J. F., & Barbosa-Cánovas, G. V. (1998). Rheological properties of concentrated milk as a function of concentration, temperature and storage time. *Journal of Food Engineering*, 35(2), 177–190. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00019-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00019-3)
- Vélez-Ruiz, J. F., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2000). FLOW AND STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF CONCENTRATED MILK. *Journal of Texture Studies*, 31(3), 315–333. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2000.tb00293.x>
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3–6), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X)
- Walstra, P., Geurts, T. ., Noomen, A., Jellema, A., & Boekel, M. A. J. . (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza-España: ACRIBIA S.A.
- Webb, B., & Johnson, A. (1972). *Fundamentals of dairy chemistry*. AVI.
- Wong, D. W. S. (2018). *Mechanism and theory in food chemistry / Dominic W. S. Wong*.
- Yang, J., & Powers, J. R. (2016). Chapter 18: Effects of High pressure on Food Proteins. In V. . Balasubramaniam, G. Barbosa-Cánovas, & H. Lelieveld (Eds.), *High Pressure Processing of Food Principles* (Primera ed, pp. 353–389). New York: Springer New York.
- Zhang, R., Pang, X., Lu, J., Liu, L., Zhang, S., & Lv, J. (2018). Effect of high intensity ultrasound pretreatment on functional and structural properties of micellar casein concentrates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 47(April), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.04.011>