

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“MICROPARTICULACIÓN DE
PROTEÍNAS A PARTIR DE
CONCENTRADOS PROTEICOS:WPC-60”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

ALEJANDRO COTO GARCÍA

JULIO, 2014





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Francisco A. Riera Rodríguez, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que D. **Alejandro Coto García** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción curso 2013-2014.

Oviedo, 14 de Julio de 2014

D. (Tutor) *Francisco Riera Rodríguez*

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega
Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Francisco A. Riera, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Oviedo, y tutor del presente proyecto, por su dirección, su ayuda y su estimable colaboración.

A Adrián Suárez, copartícipe principal de este proyecto por sus indicaciones, sus ideas y su gran disponibilidad diaria.

A Lidia, Paula y demás compañeros del laboratorio, por su comprensión, ayuda y alegría en los momentos difíciles.

A mis compañeros del Máster en Biotecnología Alimentaria, a mis amigos y mi familia por su gran apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A todos ellos, sinceramente Gracias.

ÍNDICE

1 RESUMEN	7
2 ABSTRACT	8
3 LISTA DE FIGURAS	9
4 LISTA DE TABLAS	14
5 INTRODUCCIÓN	17
5.1 EL SUERO LÁCTEO	17
5.1.1 Tipos de suero lácteo.....	17
5.1.2 Composición del suero lácteo	18
5.1.3 Aprovechamiento del suero lácteo	18
5.1.3.1 <i>Innovación reciente: la microparticulación proteica</i>	20
5.2 OBJETIVOS	21
6 CONSIDERACIONES TEÓRICAS	22
6.1 FRACCIÓN PROTEICA DEL SUERO LÁCTEO.....	22
6.2 APROVECHAMIENTO DEL SUERO LÁCTEO: WPCs E WPIs	29
6.2.1 Fabricación de WPC.....	29
6.2.2 Fabricación WPI.....	32
6.3 LA MICROPARTICULACIÓN	34
6.3.1 Tratamiento térmico	34
6.3.2 Tratamiento mecánico	36
6.3.2.1 <i>El homogenizador y sus características</i>	36
6.3.2.2 <i>El microfluidizador y sus características</i>	40
6.3.3 Aplicaciones de la microparticulación	41
6.3.4 Parámetros que influyen sobre la microparticulación proteica	44
6.3.5 Equipos comerciales para microparticulación.....	45
6.3.5.1 <i>IAPV LeanCreme</i>	45
6.3.5.2 <i>Tetra Pak: Tetra Therm Micropart</i>	47
6.3.6 Revisión bibliográfica sobre microparticulación proteica.....	50
6.4 REOLOGÍA	53
6.4.1 Conceptos básicos de reología	53
6.4.2 Tipo de fluidos según su comportamiento reológico	53
6.4.2.1 <i>Fluidos newtonianos</i>	54
6.4.2.2 <i>Fluidos no newtonianos</i>	55
6.4.3 Determinaciones reométricas	58

6.4.3.1 <i>Ensayos estacionarios: rampa de esfuerzo</i>	59
6.5 MASTERSIZER: DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS	61
6.5.1 Antecedentes. La Difracción de Láser	61
6.5.2 Refracción - Índices de Refracción	61
6.5.3 Teoría de Mie	62
6.5.4 Malvern Instruments	63
6.5.4.1 <i>Análisis del tamaño de partícula</i>	63
6.5.4.2 <i>Configuración Malvern: modelos ópticos</i>	64
6.5.4.3 <i>Interpretación de los resultados</i>	66
6.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	69
6.6.1 Introducción al diseño de experimentos	69
6.6.2 Diseño de Superficies de Respuesta.....	70
6.6.2.1 <i>Diseños Factoriales con Tres-Niveles</i>	71
6.6.2.2 <i>Diseño Box-Behnken</i>	71
6.6.2.3 <i>Ventajas e inconvenientes de la MRS</i>	72
7 MATERIAL Y MÉTODOS	73
7.1 ALIMENTACIÓN DE PARTIDA.....	73
7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	73
7.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	75
7.4 EQUIPOS Y ANALÍTICAS	76
7.4.1 Distribución de tamaños de partícula.	77
7.4.2 Medidas reológicas.....	77
7.4.3 Centrifugación y proteína agregada/microparticulada	79
8 RESULTADOS EXPERIMENTALES	82
8.1 ESTUDIO DE LA DISOLUCIÓN INICIAL.....	83
8.1.2 Resultados de la disolución inicial	83
8.2.1.1 <i>Tamaño de partícula</i>	84
8.2.2.2 <i>Viscosidad</i>	85
8.2.2.3 <i>Separación de proteína insolubilizada por centrifugación</i>	86
8.2 TRATAMIENTO TÉRMICO	87
8.2.1 Resultados del tratamiento térmico	87
8.2.1.1 <i>Tamaño de agregados</i>	88
8.2.1.2 <i>Viscosidad</i>	89
8.2.1.3 <i>Porcentaje de proteína agregada tras centrifugación</i>	91
8.2.2 Superficie de respuesta del tratamiento térmico.....	91
8.2.2.1 <i>Tamaño de los agregados</i>	92

8.2.2.2 <i>Viscosidad</i>	96
8.2.2.3 <i>Porcentaje de agregación tras centrifugación</i>	103
8.2.3 Comprobación de la superficie de respuesta del tratamiento térmico	108
8.3 TRATAMIENTO MECÁNICO INVARIABLE	110
8.3.1 Resultados del tratamiento mecánico	110
8.3.1.1 <i>Tamaño de partícula</i>	111
8.3.1.2 <i>Viscosidad</i>	112
8.3.1.3 <i>Porcentaje de proteína microparticulada</i>	113
8.3.2 Superficie de respuesta del tratamiento mecánico.....	113
8.3.2.1 <i>Tamaño de partícula</i>	114
8.3.2.2 <i>Viscosidad</i>	117
8.3.2.3 <i>Porcentaje de proteína microparticulada</i>	124
8.3.3 Comprobación de la superficie de respuesta del tratamiento mecánico.....	127
8.4 TRATAMIENTO MECÁNICO: EFECTO DE LA PRESIÓN Y EL NÚMERO DE PASES	129
8.4.3 Resultados del tratamiento mecánico variable	129
8.4.3.1 <i>Tamaño de partícula</i>	131
8.4.3.2 <i>Viscosidad</i>	132
8.4.3.3 <i>Porcentaje de proteína microparticulada</i>	132
8.4.4 Superficie de respuesta del tratamiento mecánico: efecto de la presión y el número de pases.	133
8.4.4.1 <i>Tamaño de partícula</i>	133
8.4.4.2 <i>Viscosidad</i>	135
8.4.4.3 <i>Porcentaje de proteína microparticulada</i>	137
8.4.5 Comprobación de la superficie de respuesta en el tratamiento mecánico: efecto de la presión y el número de pases.....	139
8.5 FUTURO: APLICACIÓN INDUSTRIAL DE SUERO MICROPARTICULADO EN YOGURT	140
9 CONCLUSIONES	142
10 SÍMBOLOS	144
11 BIBLIOGRAFÍA	146

1 RESUMEN

El suero lácteo es un subproducto líquido procedente de la elaboración de los quesos. Dada su alta carga orgánica, se considera uno de los contaminantes más severos que existen dentro del sector lácteo. Este hecho junto con su alto valor biológico y nutricional, debido a su alto contenido en proteínas ricas en aminoácidos esenciales, justifica la necesidad de su explotación.

Uno de los aprovechamientos del suero lácteo es la fabricación de WPCs (*Whey protein concentrates*), los cuales son aplicados a diferentes productos mejorando las propiedades nutricionales y funcionales de diversos tipos de alimentos y bebidas.

La gran demanda actual de productos bajos en grasa, ha hecho surgir la microparticulación proteica como una de las innovaciones recientes en el aprovechamiento del suero lácteo. La microparticulación proteica es un proceso que combina un tratamiento térmico y uno mecánico, generalmente de proteínas del suero lácteo, cuyo producto final son pequeñas partículas proteicas del suero lácteo con un tamaño comprendido entre 0,5 y 10 μm , similar al tamaño de los glóbulos grasos de la leche, con el fin de ser aplicado como sustituto de los mismos.

Basándose en estos antecedentes, se planteó estudiar el proceso de microparticulación proteica utilizando como materia prima un WPC-60. Para ello, se examinó el comportamiento de una serie de parámetros ligados al proceso de microparticulación (pH, concentración proteica de la alimentación, fuerza iónica, presión y número de pases en el homogenizador) con el fin de obtener sueros microparticulados con un amplio rango de tamaño de partícula, viscosidad y porcentaje de proteína microparticulada con el objetivo de ser destinados a diferentes productos lácteos como ingrediente sustitutivo de la grasa mejorando las propiedades sensoriales de estos productos bajos en grasa.

2 ABSTRACT

Whey is a liquid by-product from the manufacture of cheese. It is considered one of the most severe pollutant agent in the world given its high organic load. This fact along with its high biological and nutritional value, due to its high content of proteins rich in essential amino acids, justify its exploitation necessity the need for their use in order to reduce environmental pollution.

The whey is used in the production of WPCs (Whey protein concentrates) which are applied to different products by improving the nutritional and functional properties of several types of food and beverages.

Nowadays, the high demand for low fat products, has enabled the protein microparticulation to emerge as one of the latest innovations to exploit whey. Protein microparticulation is a process consisting of a heat treatment followed by a mechanical treatment, generally using whey proteins as feed, which produces small protein particles with a particle size between 0.5 and 10 μm , similar to the milk fat globules, in order to to apply them as fat replacer.

Based on this background, it is proposed to study the protein microparticulation process using as raw material a WPC-60. To this end, the effect of pH, feed protein concentration, ionic strength, pressure and number of passes in the homogenizer was investigated in order to obtain microparticulated proteins with a wide range of particle size, viscosity and percentage of microparticulated protein with the objective of to incorporating them to various dairy products as fat replacer with improving the organoleptic properties of low fat products.

3 LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama estructural de la β -lactoglobulina.....	23
Figura 2: Esquema del mecanismo de agregación de la β -Ig.....	24
Figura 3: Diagrama estructural de la α -lactoalbúmina.....	25
Figura 4: Diagrama estructural de una unidad básica de inmunoglobulina.....	26
Figura 5: Diagrama estructural de la BSA.....	27
Figura 6: Diagrama estructural de la lactoferrina.....	28
Figura 7: Mecanismo de separación de finos de caseína y grasa del suero.....	30
Figura 8: Diagrama del proceso de obtención del WPC.....	31
Figura 9: Proceso de fabricación de WPI a partir de lactosuero mediante tecnología de membranas.....	32
Figura 10: Etapas del proceso de microparticulación proteica.....	34
Figura 11: Diferencias en el tamaño de las proteínas nativas del suero respecto a las microparticulas y similitud del tamaño de las últimas con el de los glóbulos grasos....	34
Figura 12: Representación esquemática de la β -Ig en su forma globular nativa (A) y en su estado de desnaturalización (B).....	35
Figura 13: Esquema del proceso de desnaturalización de la β -Ig por acción del tratamiento térmico.....	36
Figura 14: Homogenizador de alta presión.....	37
Figura 15: Componentes principales de un homogenizador.....	37
Figura 16: Componentes de un cabezal de homogenización de simple etapa 1) Pistón, 2) Anillo de impacto, 3)Asiento, 4)Actuador hidráulico.....	38
Figura 17: Esquema del funcionamiento de un homogenizado de simple etapa.....	38
Figura 18: Componentes de un microfluidizador de alta presión.....	40
Figura 19: Esquema de diferentes geometrías de los microfluidizadores.....	41
Figura 20: Relación del tamaño de partícula y la sensación en la boca.....	43
Figura 21: Equipo APV LeanCreme.....	46
Figura 22: Intercambiador de calor de superficie rascada.....	46

Figura 23: Estructura del proceso APV LeanCreme.....	47
Figura 24: Equipo Tetra Therm Micropart.....	48
Figura 25: Estructura del proceso Tetra Therm Micropart.....	48
Figura 26: Clasificación de los fluidos en función de su comportamiento reológico....	54
Figura 27: Modelo de flujo entre dos láminas planas y paralelas.....	55
Figura 28: Comportamiento de los fluidos newtonianos y no newtonianos independientes del tiempo. En el eje de abscisas se representa la velocidad de corte y en el de ordenadas el esfuerzo cortante.....	56
Figura 29: Comportamiento de los fluidos tixotrópicos y reopéticos.....	57
Figura 30: Reómetro rotacional <i>MARS II (HAAKE)</i>	58
Figura 31: Curvas de flujo y de viscosidad de distintos tipos de fluidos: 1) Newtoniano, 2) Pseudoplástico, 3) Dilatante y 4) Plástico.....	60
Figura 32: Efectos que produce la aplicación de una fuente de luz sobre una partícula.....	62
Figura 33: Representación esquemática de la configuración óptica convencional de Fourier.....	65
Figura 34: Esquema de la configuración óptica de Fourier.....	66
Figura 35: Modelo de análisis Polidisperso.....	67
Figura 36: Representación de la media, mediana y moda en una distribución normal o gaussiana.....	69
Figura 37: Diseño de <i>Box-Behnken</i> con 3 factores.....	71
Figura 38: Equipo <i>Malvern Mastersizer S Long Bench</i>	77
Figura 39: Reómetro rotacional <i>MARS II DE HAAKE</i>	78
Figura 40: Centrífuga KUBOTA 6500.....	80
Figura 41: Resultado tras centrifugación de las muestras correspondientes a la disolución inicial (DI), tratamiento térmico (TT) y tratamiento mecánico (TM) de un determinado ensayo. En cada una de las muestras se diferencia el sobrenadante y el sedimento.....	80
Figura 42: En la imagen A se ilustran los sedimentos de proteína agregada y en la imagen B los sobrenadantes.....	81

Figura 43: Representación gráfica del porcentaje en volumen frente al diámetro de partícula (D) (μm) a diferente concentración proteica en la disolución inicial.....	84
Figura 44: Representación del comportamiento reológico de dos ensayos con distinta concentración proteica en la disolución inicial. En la gráfica A (3% p/p) el eje Y está comprendido entre 0-0,25 Pa y en la gráfica B (11% p/p) entre 0-0,45	85
Figura 45: Comparativa del diámetro de partícula D (μm) en la etapa de tratamiento térmico de dos ensayos distintos.....	89
Figura 46: Representación del comportamiento reológico de dos ensayos con distinta concentración de la disolución en el tratamiento térmico. En la gráfica A (pH 4, 7%, 0 mM CaCl_2) el eje Y está comprendido entre 2,5-4,5 Pa y en la gráfica B (pH 5,5, 3%, 90 mM CaCl_2) entre 0,5-4,5.....	90
Figura 47: Comparativa de los resultados del tamaño observados con los predichos.....	92
Figura 48: Superficie de respuesta del tamaño de partícula $D(v, 0,5)(\mu\text{m})$ en función de la concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento térmico.....	93
Figura 49: Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre el tamaño de partícula.....	94
Figura 50: Comparativa de los resultados de viscosidad observados con los predichos.....	97
Figura 51: Superficie de respuesta de la viscosidad (100 s^{-1}) (cP), en función de la concentración proteica de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento térmico.....	98
Figura 52: Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre la viscosidad.....	99
Figura 53: Comparativa de los resultados de "n" observados con los predichos en el tratamiento térmico.....	100
Figura 54: Superficie de respuesta de "n" en función de la concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento térmico.....	101
Figura 55: Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre "n" en el tratamiento térmico.....	102
Figura 56: Comparativa de los resultados del porcentaje de agregación tras centrifugación observados con los predichos.....	103

Figura 57: Superficie de respuesta del porcentaje de agregación tras centrifugación, en función de la concentración proteica de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl ₂) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento térmico.....	105
Figura 58: Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre el porcentaje de agregación tras centrifugación.....	105
Figura 59: Comparación de dos ensayos con distinto porcentaje de agregación tras centrifugación en el tratamiento térmico. Teniendo en cuenta el sedimento formado, el ensayo A presenta mayor agregación (pH 5,5, 3%, 0 mM CaCl ₂) que el ensayo B (pH 7, 3%, 45 mM CaCl ₂).....	107
Figura 60: Comparativa del diámetro de partícula D (μm) de dos ensayos diferentes en la etapa de tratamiento mecánico.....	111
Figura 61: Representación de la reología de dos ensayos: A (pH 4, concentración de proteína de la disolución 7%, fuerza iónica 0 mM CaCl ₂) y B (pH 5,5, concentración de proteína de la disolución 3% y fuerza iónica 90 mM CaCl ₂) en la etapa de tratamiento mecánico.....	112
Figura 62: Comparativa de los resultados del tamaño de partícula observados con los predichos.....	114
Figura 63: Superficie de respuesta del tamaño de partícula D (v, 0,5) (μm), en función de la concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl ₂) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase).....	115
Figura 64: Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre el tamaño de partícula.....	116
Figura 65: Comparativa de los resultados de viscosidad observados con los predichos en el tratamiento mecánico.....	117
Figura 66: Superficie de respuesta de la viscosidad (100 s ⁻¹) (cP), en función de la concentración de proteína en la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl ₂) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento mecánico.....	119
Figura 67: Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre la viscosidad en el tratamiento mecánico.....	119
Figura 68: Comparativa de los resultados de "n" observados con los predichos en el tratamiento mecánico.....	120
Figura 69: Superficie de respuesta de "n" en función de la concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl ₂) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento mecánico.....	122
Figura 70: Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre "n" en el tratamiento mecánico.....	123

Figura 71: Comparativa de los resultados del porcentaje de proteína microparticulada observados con los predichos.....	124
Figura 72: Superficie de respuesta del porcentaje de proteína microparticulada, en función de la de concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl ₂) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento mecánico.....	125
Figura 73: Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre el porcentaje de proteína microparticulada.....	126
Figura 74: Comparación de los agregados (A) y sobrenadantes (B) de un determinado ensayo obtenidos tras la centrifugación de la disolución inicial (DI), tratamiento térmico (TT) y tratamiento mecánico (TM).....	127
Figura 75: Comparativa del diámetro de partícula en la etapa de tratamiento mecánico de dos ensayos a diferente presión y número de pases.....	131
Figura 76: Representación de la reología de dos ensayos en la etapa de tratamiento mecánico a diferente presión y número de pases.....	132
Figura 77: Comparativa de los resultados del tamaño observados con los predichos.....	133
Figura 78: Superficie de respuesta del tamaño D(v, 0,5) (µm) en función de la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico.....	134
Figura 79: Representación del peso y la tendencia de la presión y el número de pases del tratamiento mecánico sobre el tamaño.....	134
Figura 80: Comparativa de los resultados de viscosidad observados con los predichos en el tratamiento mecánico.....	135
Figura 81: Superficie de respuesta de la viscosidad (100 s ⁻¹) (cP) en función de la presión y número de pases en el tratamiento mecánico.....	136
Figura 82: Representación del peso y la tendencia de la presión y el número de pases del tratamiento mecánico sobre la viscosidad.....	136
Figura 83: Comparativa de los resultados de agregación por centrifugación observados con los predichos en el tratamiento mecánico.....	137
Figura 84: Superficie de respuesta del porcentaje de proteína microparticulada por centrifugación en función de la presión y número de pases en el tratamiento mecánico.....	138
Figura 85: Representación del peso y la tendencia de la presión y el número de pases del tratamiento mecánico sobre el porcentaje de proteína microparticulada.....	138

4 LISTA DE TABLAS

Tabla I: Composición aproximada del suero dulce y el suero ácido (%).....	18
Tabla II: Características principales de las proteínas del suero lácteo.....	28
Tabla III: Composición de WPCs líquidos con diferente concentración de proteína.....	31
Tabla IV: Ventajas que aporta el suero microparticulado proteico en diversos productos lácteos.....	42
Tabla V: Relación del tamaño de partícula y la sensación en la boca.....	43
Tabla VI: Tamaño de partículas de diferentes derivados lácteos.....	44
Tabla VII: Cuadro-resumen de diferentes estudios relacionados con la microparticulación proteica (parte 1). (/) Información se desconoce.....	50
Tabla VII: Cuadro-resumen de diferentes estudios relacionados con la microparticulación proteica (parte 2). (/) Información se desconoce.....	51
Tabla VII: Cuadro-resumen de diferentes estudios relacionados con la microparticulación proteica (parte 3). (/) Información se desconoce.....	52
Tabla VIII: Diseño de Box-Behnken con 3 factores.....	72
Tabla IX: Composición en % de WPC-60.....	73
Tabla X: Límites inferiores y superiores de cada uno de los parámetros experimentales en condiciones de tratamiento mecánico invariables.....	76
Tabla XI: Límites inferiores y superiores de los parámetros experimentales en la etapa en condiciones de tratamiento mecánico variables.....	76
Tabla XII: Resultados del tamaño $D(v, 0,5)$ (μm), viscosidad (100 s^{-1}) (cP) y porcentaje de proteína insolubilizada de las disoluciones iniciales a distinta concentración de alimentación.....	83
Tabla XIII: Comparativa del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad (100 s^{-1}) y porcentaje de proteína insolubilizada de dos ensayos a diferente concentración de alimentación.....	84
Tabla XIV: Valores que caracterizan el fluido de estudio al 3 y 7% de concentración de proteína de la disolución.....	86
Tabla XV: Resultados del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad (100 s^{-1}) y porcentaje de agregación proteica en el tratamiento térmico.....	87

Tabla XVI: Comparativa del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad a 100 s^{-1} y porcentaje de agregación proteica de dos ensayos que difieren en los factores de experimentación en la etapa de tratamiento térmico.....	88
Tabla XVII: Comparación de los parámetros que caracterizan la reología del fluido de cada uno de los ensayos de estudio.....	90
Tabla XVIII: Condiciones del ensayo tras la optimización con el máximo porcentaje de agregación.....	108
Tabla XIX: Condiciones del ensayo óptimo de interés para comprobar la superficie de respuesta.....	109
Tabla XX: Comparación de los resultados experimentales con la predicción de la superficie de respuesta a pH 6, 8% concentración de proteína de la disolución y fuerza iónica $31,26 \text{ mM CaCl}_2$ en el tratamiento térmico.....	109
Tabla XXI: Resultados del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad (100s^{-1}) y porcentaje de proteína microparticulada en la etapa de tratamiento mecánico.....	110
Tabla XXII: Comparativa del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad a 100 s^{-1} y porcentaje de agregación proteica por centrifugación de dos ensayos que difieren en los factores de experimentación en la etapa de tratamiento térmico.....	111
Tabla XXIII: Comparación de los parámetros que caracterizan la reología del fluido de cada uno de los ensayos de estudio en el tratamiento mecánico.....	112
Tabla XXIV: Resultados predichos por la superficie de respuesta en el tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase).....	128
Tabla XXV: Resultados predichos por la superficie de respuesta según las condiciones experimentales de interés en el tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase).....	128
Tabla XXVI: Comparación de los resultados experimentales con la predicción de la superficie de respuesta a pH 6, 8% concentración proteica de la disolución y fuerza iónica $31,26 \text{ mM CaCl}_2$ en el tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase).....	128
Tabla XXVII: Resultados de cada una de las variables de respuesta de estudio en el tratamiento térmico y en el tratamiento mecánico, en función de la presión y el número de pases, de las tres réplicas realizadas.....	130
Tabla XXVIII: Comparativa de los valores de cada una de las variables de respuesta analizadas de dos ensayos a diferente presión y número de pases en el tratamiento mecánico.....	131
Tabla XXIX: Comparación de los parámetros que caracterizan la reología del fluido de dos ensayos a diferente presión y número de pases en el tratamiento mecánico.....	132

Tabla XXX: Comparación de los resultados experimentales con la predicción de la superficie a 400 bar y 2 pases en el tratamiento mecánico.....139

5 INTRODUCCIÓN

5.1 EL SUERO LÁCTEO

El suero lácteo es el subproducto líquido que se obtiene de la elaboración de queso. Se trata de un producto residual que genera grandes problemas ambientales, sin embargo, este efluente desaprovechado constituye una importante fuente nutricional, ya que incluye en su composición un completo perfil de minerales, proteínas de alto valor biológico y una gran fuente de carbohidratos para la población. Principalmente destaca por ser una de las grandes reservas de proteínas alimentarias [1, 2].

5.1.1 Tipos de suero lácteo

El suero representa el 80-90% del volumen total de la leche para la fabricación de queso y contiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche original: proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales. Se pueden distinguir dos tipos de suero lácteo según cuál sea la metodología empleada en la coagulación de la leche [3]:

- **Suero dulce:** es resultado de la acción proteolítica de enzimas coagulantes sobre las micelas de caseína de la leche, las cuales catalizan la ruptura del enlace peptídico de la κ -caseína entre los aminoácidos fenilalanina en la posición 105 y metionina en la posición 106, provocando la precipitación de las caseínas para obtener el queso. Presenta un pH de 5,9-6,6 y es el suero más utilizado por la industria por tener una composición química más estable.
- **Suero ácido:** es resultado de la coagulación ácida o láctica de las micelas de caseína en su punto isoelectrico (pI) (pH 4,6), lo cual conlleva la desmineralización, desestabilización y precipitación de la caseína, dejando en solución solamente las proteínas séricas. El suero ácido es separado en la fabricación de quesos ácidos y en la fabricación de caseínas y tiene un pH de 4,3-4,6.

De estos dos tipos de suero, el dulce posee mejores aptitudes para el procesamiento y obtención de subproductos de mayor valor agregado. Este presenta aproximadamente 95% de lactosa, 25% de proteínas y 8% de la materia grasa que contiene la leche y es por eso que desde hace mucho tiempo se observó la posibilidad de reutilizarlo para distintos fines [3].

5.1.2 Composición del suero lácteo

El suero lácteo aunque tiene un contenido proteico bajo, presenta proteínas de alto valor biológico que no son deficientes en ningún aminoácido y que se conocen con el nombre de proteínas séricas. Presenta un bajo contenido graso y una gran cantidad de minerales entre los que destacan mayoritariamente el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. Contiene también vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico y cobalamina), ácido ascórbico y lactosa, la cuál es el componente mayoritario [4].

Tabla I. Composición aproximada del suero dulce y el suero ácido (%) [5].

<i>Componente</i>	<i>Suero dulce (%)</i>	<i>Suero ácido (%)</i>
<i>Sólidos totales</i>	6,4	6,5
<i>Agua</i>	93,6	93,5
<i>Grasa</i>	0,05-0,37	0,04-0,27
<i>Proteína sérica</i>	0,6-1	0,6-0,8
<i>NNP (Nitrógeno no proteico)</i>	0,18	0,18
<i>Lactosa</i>	4,6-5,2	4,4-4,6
<i>Minerales</i>	0,5	0,8
<i>Calcio</i>	0,043	0,12
<i>Fósforo</i>	0,040	0,065
<i>Sodio</i>	0,05	0,05
<i>Potasio</i>	0,16	0,16
<i>Cloro</i>	0,11	0,11
<i>Ácido láctico</i>	0,05	0,4

Como se observa en la tabla I, los macronutrientes permanecen casi en las mismas proporciones en ambos sueros. Las principales diferencias se observan al comparar las cantidades de calcio y ácido láctico, estando en mayor proporción en el suero ácido. La mayor cantidad de ácido láctico en el suero ácido es debido a la acidificación de la leche para la precipitación de la caseína y la presencia de flora láctica [5]. Por último, en el suero ácido el contenido en lactosa se ve reducido a causa de la fermentación láctica.

5.1.3 Aprovechamiento del suero lácteo

El problema ambiental más importante de la industria láctea lo representa la generación de aguas residuales, tanto por su volumen como por la carga contaminante asociada, fundamentalmente de carácter orgánico.

El suero lácteo es el subproducto más representativo de la industria láctea y dada su carga orgánica es uno de los contaminantes ambientales más severos que existen en este tipo de industrias ya que se desechan 9 litros de suero por cada kg de queso producido. Su alto valor biológico, nutritivo y funcional justifican en gran medida la necesidad de evaluar sus posibilidades de aprovechamiento con el fin de minimizar la contaminación ambiental y recuperar un subproducto como materia prima para generar productos de mayor valor añadido [1].

El mayor aprovechamiento del suero lácteo ha sido a nivel industrial con la fabricación de derivados del suero lácteo como el suero en polvo, suero en polvo desmineralizado, lactosa en polvo, suero en polvo deslactosado y suero reducido en lactosa (*Reduced Lactose Whey* – RLW), proteínas concentradas de suero (*Whey Protein Concentrates* – WPC) y los aislados proteicos de suero (*Whey Protein Isolates* – WPI) [3].

Debido a la funcionalidad tecnológica que poseen algunos de estos concentrados proteicos se utilizan como ingredientes en la formulación de nuevos productos en diversos sectores alimentarios y de bebidas y como reemplazo o alternativa a otros ingredientes tradicionales [3]. A continuación se describen diferentes aplicaciones de los derivados del suero lácteo [1, 5, 6]:

- Producción de piensos para consumo animal utilizando el suero en polvo como una de las materias primas de enriquecimiento nutricional.
- Elaboración de productos lácteos en la misma empresa, como el desarrollo de quesos basados en la coagulación de proteínas lactoséricas y en presencia de calcio. Estos quesos reciben el nombre de ricotta, ricottone y requesón.
- Producción de suero en polvo dulce y ácido para el aprovechamiento de su proteína en la elaboración de batidos proteicos destinados a deportistas con el fin de favorecer el metabolismo asociado a la hipertrofia muscular. Además se emplea en la elaboración de bebidas fermentadas y no fermentadas y bebidas de tipo refresco.
- Aislamiento de las proteínas de suero para utilización en alimentación infantil debido a sus características nutricionales.
- Obtención de cristales de lactosa a partir del suero lácteo a través de una serie de procesos, los cuales son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica para

el recubrimiento de medicamentos y a nivel dietético por su menor valor edulcorante, escasa higroscopicidad y menos solubilidad que el de la sacarosa.

- Empleo del suero lácteo en panificados (bases para pasteles, galletas, barras nutritivas), confitería (chocolates), productos cárnicos, pescados, pasta y cremas actuando como emulsificantes, estabilizantes y con capacidad de retención de agua.

5.1.3.1 Innovación reciente: la microparticulación proteica

Los glóbulos grasos lácteos interactúan con el resto de ingredientes para desarrollar la textura, la sensación en la boca y en general la lubricidad de los diferentes productos lácteos [7].

La gran demanda de productos bajos en grasa en la actualidad es una de las principales razones por las que se está estudiando la aplicación del lactosuero en derivados lácteos con el objetivo de mejorar la calidad de los productos lácteos bajos en grasas.

Una de las innovaciones recientes en los últimos años ha sido la microparticulación proteica, proceso que consta de una etapa de tratamiento térmico (desnaturalización de las proteínas y agregación de las mismas) y mecánico (homogenizador para microparticular los agregados de proteínas), generalmente de proteínas de lactosuero, cuyo producto final podría ser empleado como sustitutivo de la grasa mejorando la textura y el sabor (palatabilidad) de productos lácteos bajos en grasa (quesos, postres, yogurt, helado etc.).

5.2 OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto consistió en el estudio de las diferentes etapas del proceso de microparticulación utilizando como materia prima un WPC-60.

Para ello, durante el periodo de experimentación se variaron una serie de parámetros en el proceso de microparticulación (pH, concentración de proteína, fuerza iónica, presión y número de pases en el homogenizador) con el fin de obtener diferentes sueros microparticulados con un amplio rango de tamaño de partícula, viscosidad y porcentaje de proteína microparticulada, con el objetivo de ser empleados en diferentes productos lácteos como método sustitutivo de la grasa mejorando las propiedades sensoriales de aquellos que son bajos en grasa.

6 CONSIDERACIONES TEÓRICAS

6.1 FRACCIÓN PROTEICA DEL SUERO LÁCTEO

Las proteínas del suero lácteo se definen como aquellas que se mantienen en solución tras precipitar la caseína en el proceso de elaboración de los quesos. Las proteínas del lactosuero representan el 20% de las proteínas de la leche de vaca y reciben el nombre de seroproteínas [8]. Estas destacan por su alto valor biológico y calidad, es decir, una mayor capacidad de ofrecer nitrógeno al organismo, debido a su alta concentración de aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, valina y leucina) y aminoácidos esenciales respecto a otras fuentes de proteínas. Dentro de las proteínas séricas se pueden distinguir mayoritariamente cinco grupos:

- **β -Lactoglobulina (β -Lg)**

La β -Lactoglobulina es la proteína más abundante del lactosuero bovino, representando alrededor de la mitad de las proteínas presentes (50-55%) [5] y presentando una concentración en éste de 3 g/L [9]. Como es la proteína más abundante en el suero lácteo, se explicará con mayor detalle ya que se tomará como referencia en muchas de las explicaciones de los resultados de este proyecto.

Está formada por 162 aminoácidos, con una masa molecular de 18,4 kDa y tiene un punto isoeléctrico (valor de pH al cual la proteína tiene carga neta nula) situado en el rango de 4,6 a 5,2, dependiendo de la variante genética y las diversas impurezas que presente [10]. Existen variantes genéticas, siendo las más comunes las denominadas A y B, que difieren en dos aminoácidos. La variante A tiene una valina en la posición 118 y un aspártico en la posición 64, mientras que la variante B tiene alanina y glicina respectivamente.

Se trata de una proteína globular, es decir, sus cadenas polipeptídicas están plegadas estrechamente de tal forma que adopta una forma esférica o globular compacta dejando los grupos hidrofílicos hacia el exterior[10]. Su desnaturalización tiene lugar a una temperatura de 78 °C [11, 12].

Su función biológica específica es desconocida, aunque la teoría más aceptada de forma general es que actúa como medio de transporte de sustancias, capaz de interaccionar con distintas moléculas hidrofóbicas, especialmente el retinol y los ácidos

grasos. Esta propiedad, además de estar probablemente relacionada con su función biológica, hace que tenga buenas propiedades emulsionantes [8].

Como cualquier proteína, la β -Lg está constituida por una serie de estructuras: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La estructura primaria viene determinada por la secuencia de aminoácidos unidos entre sí por el enlace peptídico. Esta seroproteína presenta dos puentes disulfuro entre cuatro aminoácidos de cisteína lo que le proporciona estabilidad. Por otro lado, existe un quinto aminoácido de cisteína libre, con el grupo tiol (-SH) expuesto, responsable según estudios de la capacidad antioxidante que tiene la proteína y por tanto, la leche; además tiene una función importante en la estructura cuaternaria para que tenga lugar la agregación [10].

La estructura secundaria es la forma en la que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. De esta forma, la cadena polipeptídica es capaz de adoptar conformaciones de menor energía libre, y por tanto más estables. Esta proteína presenta dos estructuras secundarias bien diferenciadas, las llamadas hélice α y hoja plegada β antiparalela.

La estructura terciaria se caracteriza por el plegamiento espacial de la cadena polipeptídica y en cuyo interior se encuentra el punto de unión de ligandos (Figura 1).



Figura 1. Diagrama estructural de la β -lactoglobulina [13].

Por último, la estructura cuaternaria se debe a la asociación de diversas proteínas entre sí para formar diferentes agregados. La proteína puede formar distintos agregados en función de las condiciones en las que se encuentra [10].

La β -Lg en su estructura cuaternaria puede encontrarse como monómero, mantenida por dos puentes disulfuro (S-S). Además presenta un grupo tiol libre, correspondiente a la cisteína que ocupa el lugar 121 de la secuencia de aminoácidos, el cual es muy importante en la asociación con otras moléculas, concretamente en la formación de dímeros a través de la formación de un tercer puente disulfuro entre las cisteínas libres de los dos monómeros [14]. En la leche de los rumiantes la proteína se encuentra en forma de dímeros lo que confiere propiedades de unión a diferentes moléculas hidrofóbicas, mientras que en el resto de las especies se encuentra en forma de monómeros [15]. La figura 2 representa de forma esquemática la formación inicial de los primeros agregados de β -Lg.

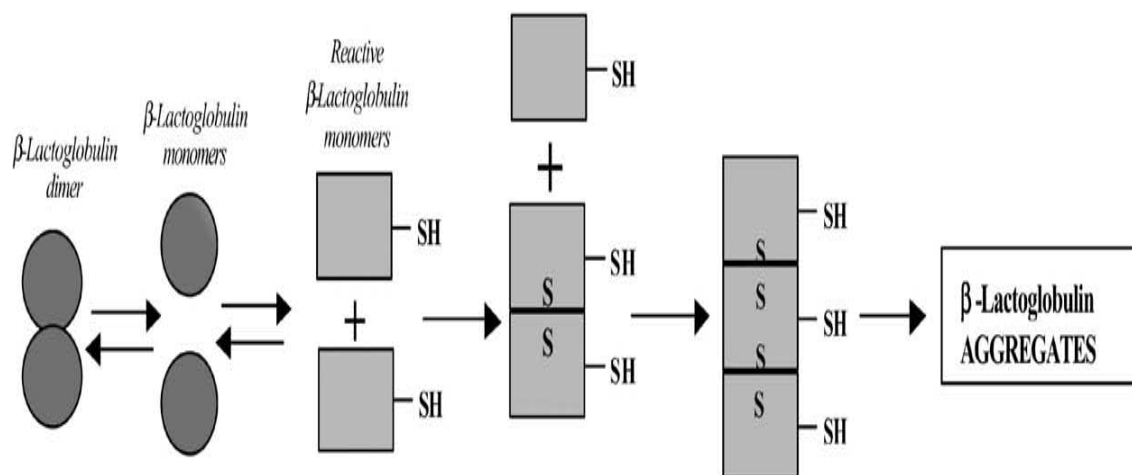


Figura 2. Esquema del mecanismo de agregación de la β -Lg [16].

La formación del trímero tiene lugar por fuerzas débiles de tipo electroestáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, el tetramero por asociación de dos dímeros a través de fuerzas débiles, el pentámero por la unión de un monómero a un tetramero y por último, se encuentra el octámero, formado por 4 dímeros enlazados, siendo el mayor agregado posible dentro de la estructura cuaternaria [10].

α -Lactoalbúmina (α -La)

La α -lactoalbúmina es la segunda proteína más abundante del suero lácteo bovino (20-25%) [5], con una concentración de 0,7 g/L, y es la más abundante en la leche humana [9].

Se trata de una proteína formada por solo una cadena polipeptídica de 123 aminoácidos y con un peso molecular de 14,2 kDa [13].

Su estructura terciaria, muy compacta, es globular y está mantenida por cuatro puentes disulfuro, con una zona de hélice α y otra de hojas plegadas β (Figura 3) [13]. Es una proteína ácida con un punto isoelectrico en el rango 4,5-4,8 [17] y presenta una temperatura de desnaturalización de 62°C [11, 12].

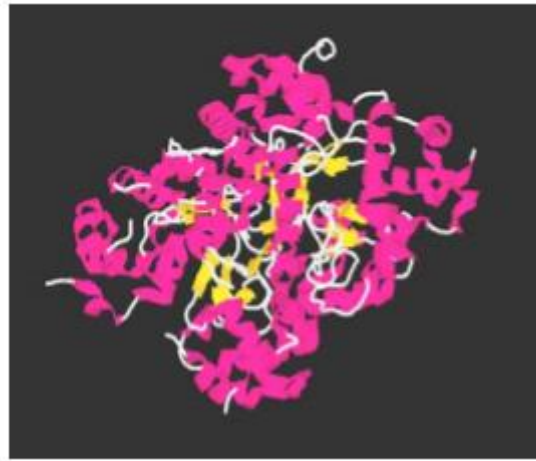


Figura 3. Diagrama estructural de la α -lactoalbúmina [13].

Su principal función es la de participar en la biosíntesis de la lactosa al formar parte junto con el enzima galactosiltransferasa del enzima lactosa sintetasa [15].

La α -La tiene un ión calcio unido, que es imprescindible en el mantenimiento de su estructura y de su actividad como reguladora de la galactosiltransferasa. La eliminación del calcio genera una estructura llamada "*moltenglobule*" que es un estado intermedio de desnaturalización, en el que la proteína mantiene su estructura secundaria, pero con una estructura terciaria poco definida [8].

Desde el punto de vista nutricional, la α -lactabúmina es importante debido a su alto contenido en triptófano, siendo el precursor de la serotonina cuya función es actuar como neurotransmisor regulando el apetito. La α -La también dispone de cisteína y

aminoácidos de cadena ramificada, importantes para el desarrollo del tejido muscular [18].

- **Inmunoglobulinas (IGs)**

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas cuya función es la de unirse a un antígeno. Representan el 10-15 % de las proteínas del suero lácteo [5], con una concentración de 0,6 g/L [9]. Presentan un peso molecular medio de 150 kDa y su punto isoeléctrico se encuentra en el rango 5,5-8,3 [13, 17]. Presenta una temperatura de desnaturalización de 72°C [11, 12].

La estructura básica, con forma de **Y**, está constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas (Figura 4). Las cadenas ligeras están formadas por 200 aminoácidos, mientras que las pesadas por 400 aminoácidos. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un puente disulfuro, mientras que las dos cadenas pesadas, que están glicosiladas, se unen entre sí mediante dos puentes disulfuro [8, 13].

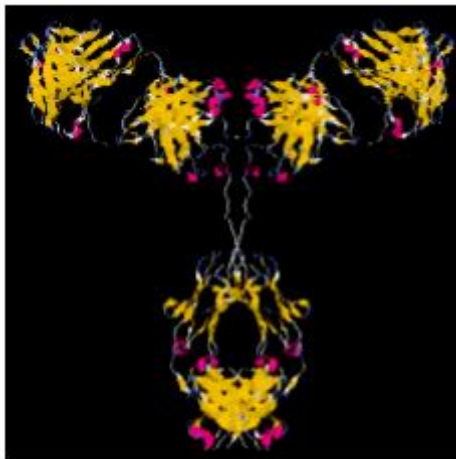


Figura 4. Diagrama estructural de una unidad básica de inmunoglobulina [13].

Se conocen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgA, IgG, IgD e IgE. Siendo IgG la más abundante y representando el 70 % de las inmunoglobulinas séricas. Las inmunoglobulinas suponen una acción pasiva frente a infecciones microbianas [13].

- **Albúmina de suero bovino (BSA)**

La albúmina de suero bovino (BSA) es una seroproteína que representa el 5-10% del total [5] y se encuentran en una concentración de 0,5 g/L [9]. Es una proteína relativamente grande, con una cadena formada por 583 aminoácidos, un peso molecular

de 69 kDa y presentado un punto isoeléctrico comprendido entre 4,7 y 4,9 [13, 17]. Además presenta una temperatura de desnaturalización de 64°C [11, 12].

Su estructura tridimensional (Figura 5) se compone de tres dominios, cada uno de ellos formados por 10 segmentos helicoidales. Su estructura secundaria, en su forma nativa es principalmente α -helicoidal y contiene 17 puentes disulfuro. Además, en función del pH, la BSA presenta diferentes estados de isomerización [13].



Figura 5. Diagrama estructural de la BSA [13].

La propiedad más importante de la BSA es su capacidad de unión a ligandos, entre los cuales destacan los ácidos grasos de cadena larga, insolubles en el plasma, que son transportados gracias a dicha seroproteína [13].

- **Lactoferrina**

La lactoferrina es otra de las proteínas presentes en el suero lácteo que se encuentra en bajas proporciones (1-2%) [5] y con una concentración de 0,10 g/L[13]. Presenta una cadena polipeptídica de 689 aminoácidos, con un peso de 77 kDa y un punto isoeléctrico a pH 9 [13, 17].

La lactoferrina está constituida por dos lóbulos (lóbulo N y C) (Figura 6) correspondientes a las mitades de las moléculas que contienen el N- terminal y el C-terminal, respectivamente. Estos lóbulos se dividen en dos dominios (N1, N2, C1 y C2) unidos mediante una hélice de tres vueltas [13].



Figura 6. Diagrama estructural de la lactoferrina [13].

La lactoferrina es una proteína fijadora de hierro y ejerce funciones como la absorción de hierro, actividad antimicrobiana y regulación del metabolismo del hierro [13].

Tabla II. Características principales de las proteínas del suero lácteo.

<i>Proteínas séricas</i>	<i>Concentración (g/l)</i>	<i>% sobre proteína total</i>	<i>PM (kDa)</i>	<i>pI</i>	<i>Temperatura desnaturalización °C</i>
<i>β-Lactoglobulina</i>	3,0	50-55	18,4	4,8-5,1	78
<i>α-Lactoalbúmina</i>	0,7	25-30	14,2	4,5-4,8	62
<i>Inmunoglobulinas</i>	0,6	10-15	150	5,5-8,3	72
<i>BSA</i>	0,5	5-10	69	4,7-4,9	64
<i>Lactoferrina</i>	0,10	1-2	77	8,5-9	-

A partir de la información descrita, en la tabla II se resumen las características diferenciales de las principales seroproteínas, teniendo en cuenta la proporción en que se encuentran respecto al total, la concentración (g/L), el peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y la temperatura de desnaturalización en aquellas proteínas donde se conoce.

6.2 APROVECHAMIENTO DEL SUERO LÁCTEO: WPCs E WPIs

Las proteínas del suero lácteo son muy utilizadas en la industria alimentaria debido a su amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales. Entre estas últimas destacan la solubilidad, viscosidad, capacidad de retención de agua y sus cualidades como agentes gelificantes, emulsificantes y espumantes [13].

Una de las formas de aprovechar estas propiedades es utilizando técnicas de ultrafiltración, a partir de las cuales se obtiene el denominado concentrado de proteínas del suero lácteo (*Whey protein concentrates*-WPCs) y los aislados de proteína del lactosuero (*Whey protein isolates*-WPIs). Mediante ultrafiltración se consiguen WPCs de baja concentración proteica, sin embargo para WPCs de mayor concentración de proteína e WPIs es además necesario aplicar otro tipo de procesos entre los que destaca la diafiltración. La diferencia entre ambos concentrados es que el WPC contiene hasta un máximo de 80% de proteína, mientras que el WPI llega a contener hasta un 90% [13].

Según el Código de Estados Unidos de Regulaciones Federales, el WPC se define como la sustancia obtenida por la eliminación de suficiente constituyente no proteico a partir de lactosuero para que el producto seco final contenga no menos del 25% de proteína. La mayoría de los WPC en el mercado contienen 34-35% aunque pueden alcanzar valores de hasta o aproximadamente un 80% de proteína [19].

Ambos se emplean como ingredientes en la formulación de nuevos productos en diversos sectores alimentarios y de bebidas y como reemplazo o alternativa a otros ingredientes tradicionales.

6.2.1 Fabricación de WPC

Los WPCs se pueden fabricar con distinta concentración proteica mediante procesos de ultrafiltración y posterior secado por atomización. El suero a procesar debe ser preacondicionado antes de ingresar a la planta purificadora concentradora, de tal manera que se hayan separado los finos de caseína y la grasa (Figura 7). Además se debe asegurar la inactivación de los microorganismos y enzimas que provienen de la fabricación de queso mediante un proceso de pasteurización [3].



Figura 7. Mecanismo de separación de finos de caseína y grasa del suero [5].

Previamente al proceso de ultrafiltración es preferible realizar una etapa adicional de pretratamiento que consiste en la microfiltración del suero ya pasteurizado y clarificado. Esta se realiza con el fin de eliminar al máximo las sustancias grasas presentes en forma de microagregaciones con el fin de no perjudicar el proceso posterior de ultrafiltración [3].

El siguiente procedimiento a seguir para la obtención del WPC es el de ultrafiltración. La ultrafiltración es un proceso de membranas semipermeables capaces de retener las proteínas por su alto peso molecular, mientras que las sales y lactosa debido a su bajo peso molecular se eliminan junto con el agua que atraviesa la membrana. En cambio, si se trabaja en diafiltración, es decir, una variante de la ultrafiltración en la cual se adiciona agua para facilitar el permeado de algunos componentes a través de la membrana, principalmente lactosa y minerales, se consiguen concentrados mayores de hasta un 80 % de proteína [13]. La figura 8, muestra los pasos a seguir en el proceso de fabricación de WPC y la influencia de la ultrafiltración y diafiltración para obtener WPCs con diferente concentración de proteína.

Tras la ultrafiltración, el concentrado es sometido a un proceso de secado por atomización (secado *Spray*) en los que la temperatura del aire a la entrada es de 175°C-190°C [13]. De esta forma se obtiene como producto final WPC en polvo, aunque también puede comercializarse en forma líquida. En la figura 8 se representa un diagrama de fabricación de WPC.

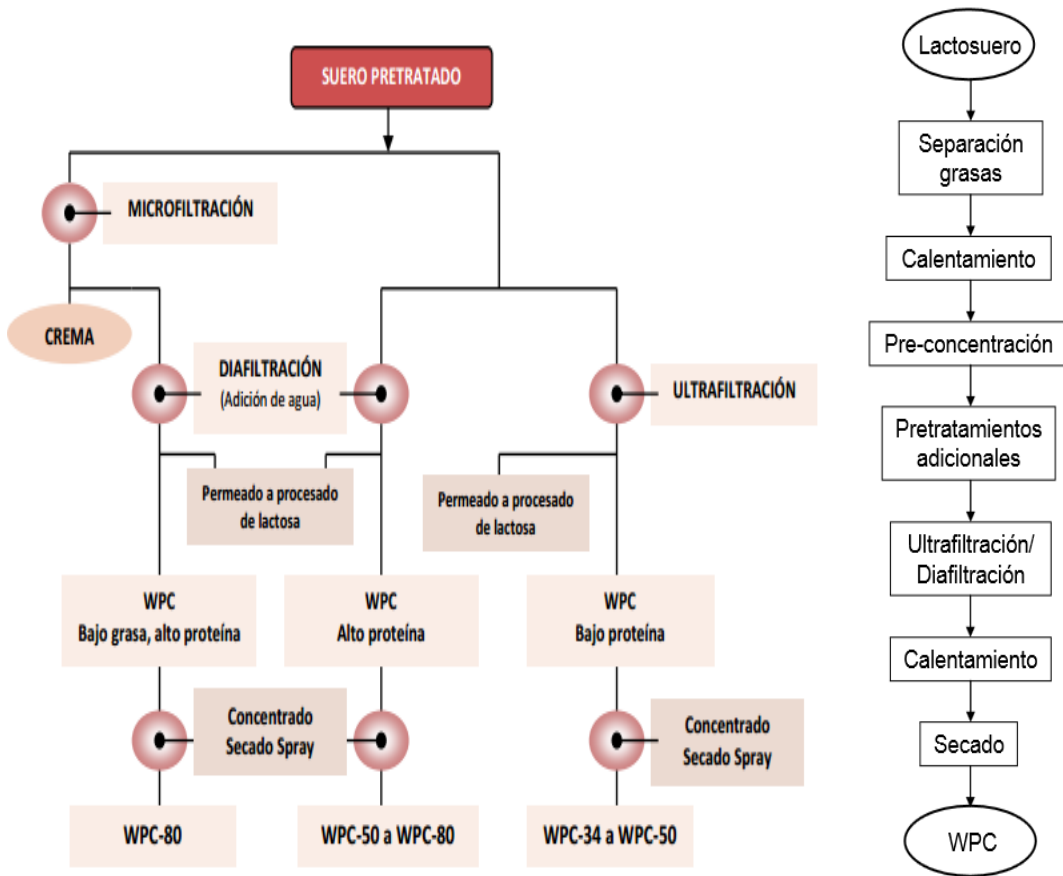


Figura 8. Diagrama del proceso de obtención del WPC [3, 13].

En la tabla III, se muestran las diferencias existentes en la composición de WPCs con diferente concentración de proteína.

Tabla III. Composición de WPCs líquidos con diferente concentración de proteína [20].

Componentes	Suero lácteo	WPC 35%	WPC 50%	WPC 60%	WPC 70%	WPC 80%
Grasas	0,05	0,3	0,6	1	1,9	2,20
Proteína	0,80	3,5	7,25	11,75	22	23-25
NNP	0,20	0,25	0,28	0,28	0,30	0,40
Lactosa	0,50	5,1	5,2	5,3	4,6	1,5
Cenizas	6,10	0,7	0,85	1	1,50	1,30

Teniendo en cuenta la tabla III, cabe destacar que un aumento en la concentración de proteína del WPC incrementa el contenido en grasas y proteínas. En cambio, la lactosa disminuye cuanto mayor es el concentrado de proteína debido al proceso de diafiltración, el cual diluye más el permeado facilitando una mayor eliminación del contenido en lactosa y otros componentes.

De todos los concentrados de proteína que son fabricados, se empleó en el desarrollo de este proyecto un WPC-60 en polvo.

6.2.2 Fabricación WPI

Los aislados de proteína de suero (WPIs) se pueden obtener, principalmente, por dos métodos: tecnología de membranas o por intercambio iónico.

La microfiltración y la ultrafiltración son tecnologías de membranas necesarias para obtener WPIs. Las membranas de microfiltración se diseñan para retener partículas en suspensión en el rango de micras, como es el caso de grasas presentes en el lactosuero concentrado. Por otra parte, las membranas de ultrafiltración se utilizan para retener los constituyentes del lactosuero en el rango molecular, como es el caso de las proteínas, separándolas de lactosa y otras impurezas presentes en el suero lácteo. Esta técnica produce WPIs que difieren de los obtenidos por intercambio iónico en que no hay modificación química de las proteínas y que la fracción de glicomacropéptidos es retenida junto con las demás. Si no hay ajuste de pH y el proceso se lleva a cabo a temperaturas intermedias, el producto final está casi completamente exento de proteínas desnaturalizadas [13]. En la figura 9 se representa un proceso de producción de WPI a partir de lactosuero mediante la tecnología de membranas.

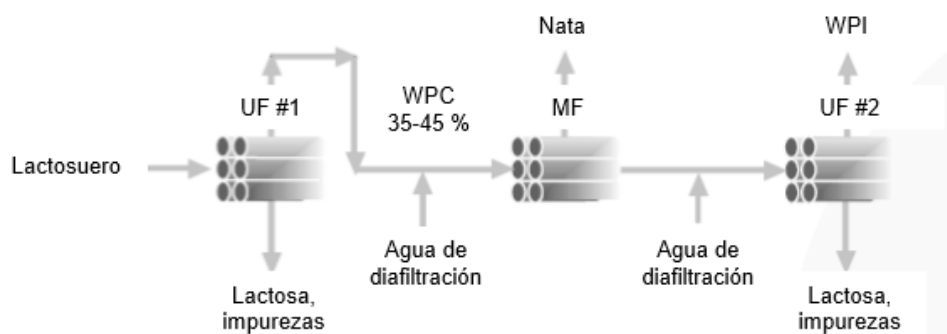


Figura 9. Proceso de fabricación de WPI a partir de lactosuero mediante tecnología de membranas [13].

El lactosuero clarificado y pasterizado se concentra de 5 a 6 veces mediante una primera etapa de ultrafiltración, obteniéndose un concentrado de proteínas con un contenido entre el 35 y el 45 %. Este WPC contiene pequeñas cantidades de grasa natural, la cual se reduce utilizando un proceso de microfiltración en modo de diafiltración continua. El filtrado de este proceso es un WPC 35-45 desgrasado y corresponde a la alimentación de una segunda etapa de ultrafiltración, en la que se trabaja también en diafiltración continua, cuyo retenido final es un aislado de proteínas de suero (WPI) con una concentración superior al 90 % de proteína [3, 13].

Durante el proceso de intercambio iónico, el lactosuero líquido se hace pasar a través de resinas especiales, que se unen mediante enlaces químicos a las proteínas, quedando así separadas de la corriente del suero lácteo. Esta unión de proteínas-resina es reversible dependiendo del valor del pH. De este modo, mediante el ajuste del pH se consigue sustraer dichas proteínas que posteriormente son concentradas mediante ultrafiltración. Generalmente, los intercambiadores iónicos comerciales son capaces de separar todas las fracciones proteicas mayoritarias del lactosuero, a excepción de la fracción de glicomacropéptidos [13]. El proceso de intercambio iónico modifica químicamente a las proteínas ya que el calcio es reemplazado por el sodio en las etapas de unión y desunión. Esto provoca una desnaturalización de las proteínas dando lugar a WPIs con propiedades más gelificantes y espumantes [13].

Tanto en el intercambio iónico como en la tecnología de membranas, el WPI obtenido es un producto líquido que es secado posteriormente por atomización para obtener un WPI en polvo.

Los WPI se usan principalmente en suplementación nutricional y bebidas deportivas y medicinales. Se emplean como proteínas de alimentos funcionales en formulaciones de alimentos, por sus propiedades de hidratación, gelificación, emulsificación, y formación de espumas. Por otro lado, la aplicación de nano-arcillas en películas de WPI produce un efecto antimicrobiano, extendiendo la vida útil de los alimentos cuando se emplean envases con estas características [19]. Por último, la corriente de concentrado de la etapa de microfiltración resulta ser una importante fuente de recursos con aplicaciones en industrias cosméticas y farmacéuticas debido al alto contenido de fosfolípidos que posee [3].

6.3 LA MICROPARTICULACIÓN

La microparticulación se define como el proceso en el cual un concentrado de proteínas, generalmente de proteínas de suero lácteo, se somete a un tratamiento térmico (desnaturalización de las proteínas y agregación de las mismas) y mecánico (microparticulación de los agregados proteicos a través de un homogenizador) (Figura 10) para la formación de partículas de tamaño (0,1-10 μm) similar al de los glóbulos grasos de la leche (Figura 11), lo que facilita su inclusión en matrices proteicas, comportándose así, como un sustituto potencial de los glóbulos grasos, pudiendo ser incorporados en diversos productos lácteos bajos en grasa [21].

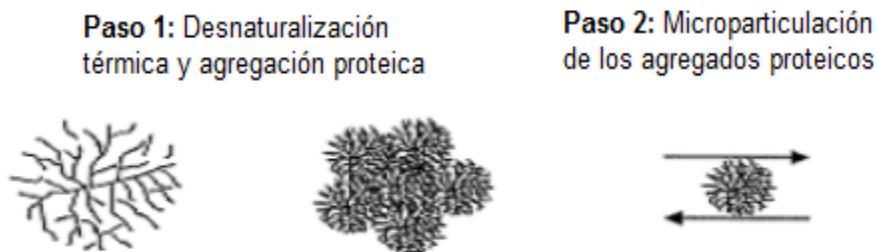


Figura 10. Etapas del proceso de microparticulación proteica [22].

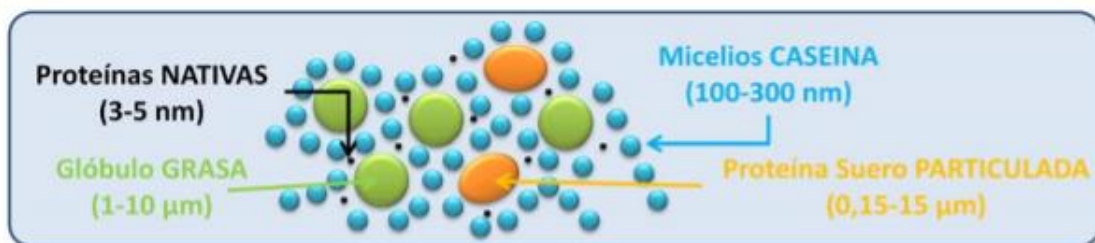


Figura 11. Diferencias en el tamaño de las proteínas nativas del suero respecto a las micropartículas y similitud del tamaño de las últimas con el de los glóbulos grasos [23].

Actualmente, la proteína microparticulada, elaborada a partir de WPCs e WPIs se utiliza en multitud de aplicaciones.

6.3.1 Tratamiento térmico

La primera etapa del proceso de microparticulación es el tratamiento térmico. La aplicación de tratamientos térmicos a proteínas del lactosuero o concentrados proteicos, produce una alteración de su tamaño y forma y conduce a la exposición de sus zonas hidrofóbicas, y consecuentemente a la formación de una red de agregados [24].

La desnaturalización de la β -Lg por acción del tratamiento térmico se produce en una serie de pasos que se describen a continuación [25]:

- A temperaturas comprendidas entre 40-55°C se producen cambios reversibles en la estructura de la proteína.
- Cuando la β -Lg alcanza temperaturas próximas a 60°C, la estructura de la proteína se despliega parcialmente en un estado de "glóbulo fundido". Este proceso se acelera aproximadamente a 90°C, pero la proteína puede entrar en un estado reversible volviendo a su forma nativa si la temperatura disminuye por debajo de 60°C.
- La agregación tiene lugar finalmente a temperaturas cercanas a 90°C, favoreciendo la exposición de los grupos tiol de la β -Lg, lo que conduce a que la proteína sea inestable y se asocie con más proteínas. Por tanto, los agregados formados son totalmente irreversibles.

En la figura 12, se muestra un modelo esquemático de la β -Lg con su grupo tiol en su forma globular nativa (A) y su estado de desnaturalización (B) por acción del tratamiento térmico.

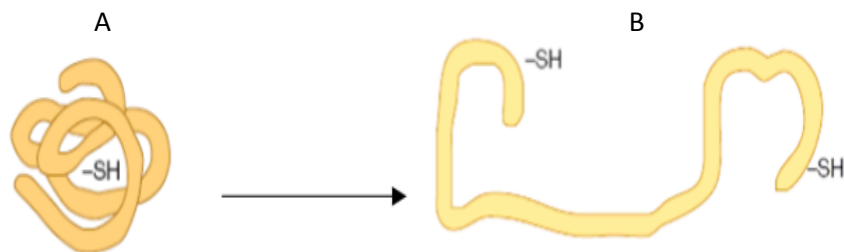


Figura 12. Representación esquemática de la β -Lg en su forma globular nativa (A) y en su estado de desnaturalización (B) [25].

El proceso de desnaturalización de la β -Lg, se ilustra en la figura 13, donde se muestra esquemáticamente la forma nativa de la proteína del suero (1), la etapa de estado reversible de la misma durante el tratamiento térmico (2) y los agregados finales irreversibles (3).

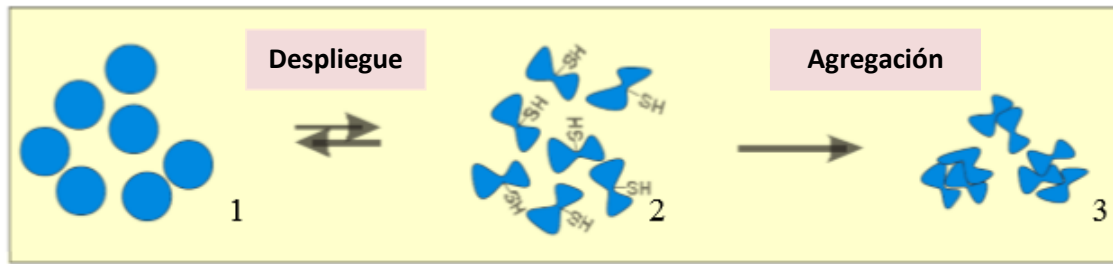


Figura 13. Esquema del proceso de desnaturalización de la β -Lg por acción del tratamiento térmico [25].

6.3.2 Tratamiento mecánico

La siguiente etapa del proceso de microparticulación proteica es el tratamiento mecánico, donde la acción de fuerzas de corte por parte del homogenizador produce una rotura de los enlaces entre y dentro de la red formada en la etapa térmica, evitando la formación de una matriz gelificada y generando pequeños agregados de proteínas séricas [24].

6.3.2.1 El homogenizador y sus características

La homogenización es un proceso industrial utilizado generalmente como medio de estabilización de la emulsión de grasa frente a la separación espontánea que se produce por la acción de la gravedad [2].

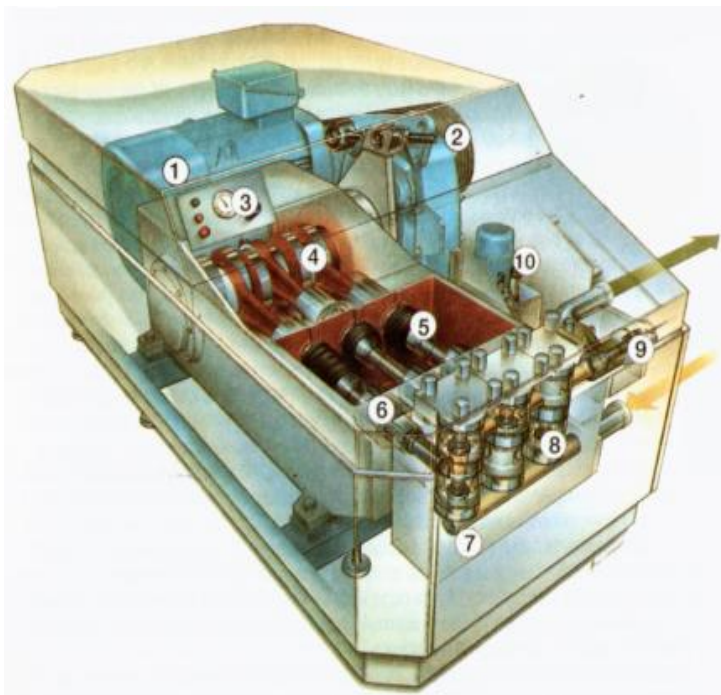
Un homogeneizador es un equipo a escala de laboratorio o industrial, empleado mayoritariamente en las industrias lácteas con el fin de provocar la disrupción de los glóbulos de grasa en otros muchos más pequeños. La desintegración de los glóbulos de grasos originales se consigue por varios factores tales como la turbulencia y la cavitación, reduciendo los glóbulos de grasa hasta aproximadamente un diámetro de $1\mu\text{m}$ [2].

En el homogenizador, el producto de alimentación entra al bloque de bombeo y es presurizado por medio del pistón de la bomba. La presión que se consigue viene determinada por la contrapresión dada entre el émbolo y el asiento en el dispositivo de homogenización. La bomba de pistón es accionada por un motor eléctrico de gran potencia a través de una transmisión cigüeñal y biela que convierte el movimiento de rotación del motor en el movimiento alternativo de los pistones de la bomba. Los pistones se mueven en el interior de los cilindros en un bloque de alta presión. En la

figura 15 se muestra una representación de los diferentes componentes de un homogenizador [2].



Figura 14. Homogenizador de alta presión [26].



- 1) Motor de accionamiento
- 2) Transmisión de correas
- 3) Indicación de presión
- 4) Cigüeñal
- 5) Pistón
- 6) Cartucho de sellado del pistón
- 7) Cuerpo de bombeo de acero inoxidable
- 8) Válvulas
- 9) Dispositivo de homogenización
- 10) Sistema hidráulico de ajuste de la presión

Figura 15. Componentes principales de un homogenizador [2].

El homogenizador puede estar equipado con uno o dos dispositivos de homogenización conectados en serie, recibiendo el nombre de homogenización en

simple y doble etapa, respectivamente. En este proyecto se explicará el funcionamiento del homogenizador de simple etapa (Figura 16).

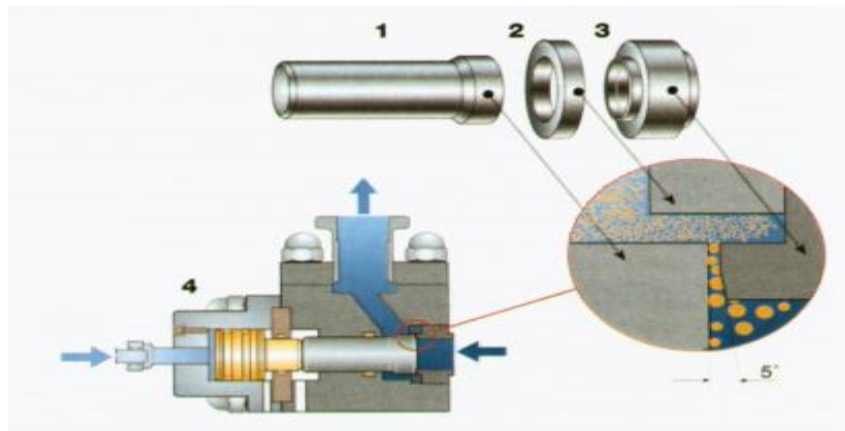


Figura 16. Componentes de un cabezal de homogenización de simple etapa
1) Pistón, 2) Anillo de impacto, 3) Asiento, 4) Actuador hidráulico[2].

La figura 17 representa de manera sencilla el funcionamiento de un homogenizado de simple etapa.

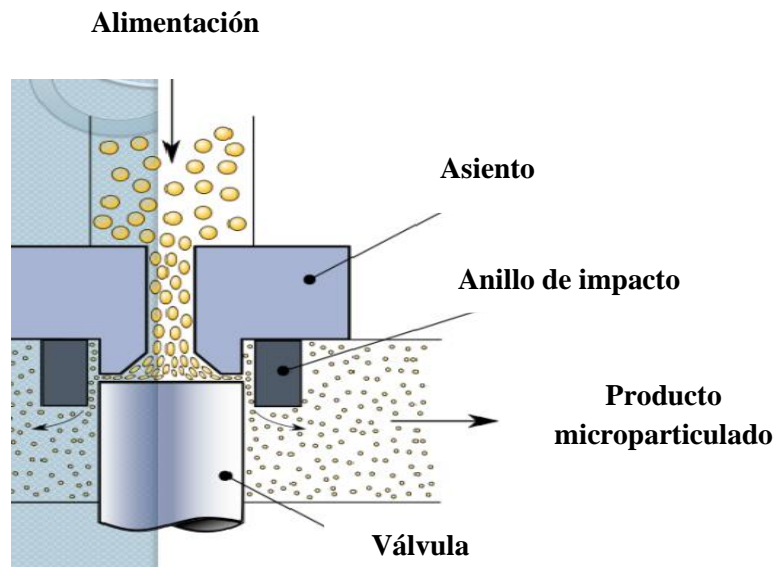


Figura 17. Esquema del funcionamiento de un homogenizado de simple etapa.

En el homogenizador de simple etapa la presión de homogenización se mantiene constante automáticamente. Además la presión de aceite sobre el pistón hidráulico y la presión de homogenización sobre el émbolo se encuentran equilibradas

Las diferentes partes del cabezal de homogenización son de gran precisión. El anillo de impacto está unido al asiento de tal manera que la superficie interior es

perpendicular a la salida del orificio. El asiento presenta un ángulo de 5° para conseguir que el producto se acelere de manera controlada, reduciéndose así el rápido desgaste y agrietado que de otra manera ocurriría [2].

El producto entra a una alta presión en el espacio existente entre el asiento y el émbolo. La amplitud del orificio es aproximadamente 0,1 mm a 100 veces el tamaño de los glóbulos de grasa de la leche homogenizada. La velocidad del líquido es normalmente de 100-400 m/s en el orificio anular estrecho, y la homogenización tiene lugar en 10-15 microsegundos. Durante este tiempo toda la energía de presión liberada por la bomba de pistón se convierte en energía cinética. Parte de esta energía se desprende en forma de calor (cada 40 bar de caída de presión sobre el cabezal provoca un aumento de temperatura de 1°C). Menos de un 1% de la energía es empleada por la homogenización, aunque hay que decir que la homogenización a alta presión es el método disponible más eficiente [2].

El empleo de homogenizadores en la industria láctea supone una serie de ventajas [2, 9]:

- Glóbulos de grasa más pequeños, sin formación de nata en la superficie.
- Color más blanco y atractivo de la leche.
- Ligero aumento del "cuerpo de la leche".
- Estabilización de la materia grasa.

Por otro lado, la homogenización presenta también una serie de inconvenientes:

- La leche homogenizada no puede ser desnatada eficientemente.
- Aumenta la sensibilidad a la luz del sol y fluorescente por lo que puede aparecer un sabor metálico.
- Baja estabilidad térmica, especialmente en el caso de la homogeneización en simple etapa, con contenidos altos de grasa y otros factores que contribuyen a la separación de la nata.
- La leche no será adecuada para la producción de quesos duros y semiduros debido a que la cuajada será demasiado blanda y difícil de escurrir.
- Cierta daño metálico del glóbulo graso

- Los glóbulos grasos presentan una menor protección de membrana. La reducción del glóbulo graso disminuye la membrana que protege a los triglicéridos frente a la oxidación.

6.3.2.2 El microfluidizador y sus características

Además de los homogenizadores existen otros equipos que desempeñan funciones similares denominados microfluidizadores (Figura 18). En estos equipos, se fuerzan corrientes de flujo a grandes presiones (algunos equipos más de 270 MPa) a través de un sistema de micro-canales dispuestos en una serie de geometrías. La fuerza de arrastre ejercida por los fluidos al moverse en el sistema y el contacto entre partículas causa la rotura de las gotas. El principio fundamental de estos equipos se basa en los esfuerzos cortantes que se presentan cuando las corrientes de fluido se ponen en contacto a altas velocidades [27].

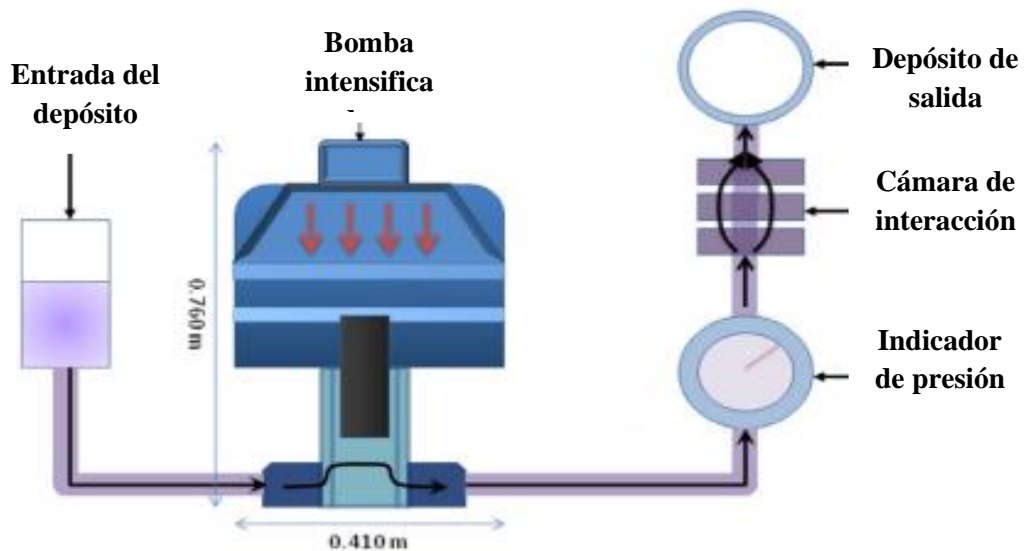


Figura 18. Componentes de un microfluidizador de alta presión [28].

La figura 19 presenta las diferentes geometrías de dispositivos de microcanales. La presión y la relación entre los radios de los conductos para diferentes fluidos sometidos al procesamiento son factores fundamentales para obtener nanoemulsiones con distribuciones de tamaño homogéneo.

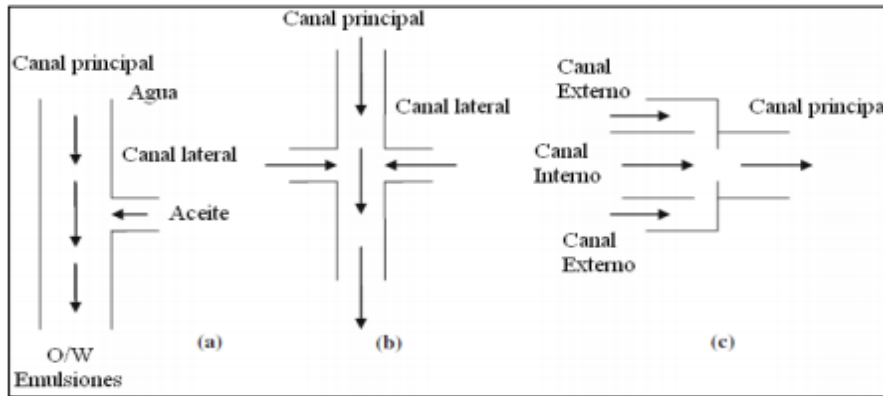


Figura 19. Esquema de diferentes geometrías de los microfluidizadores [27].

Existen diferencias entre los microfluidizadores y los homogenizadores. Principalmente, los homogenizadores necesitan un mayor volumen de muestra y actúan a presiones más bajas, además tienen como inconveniente la formación de partículas de tamaño variable en el producto final. Por otro lado, los microfluidizadores pueden generar partículas más pequeñas y consistentes debido a las altas presiones que se alcanzan en las cámaras microfluidizadoras. A su vez, tienen la capacidad vez de formar micropartículas con un tamaño y forma más uniformes [29].

En la industria láctea es más común el uso de homogenizadores que de microfluidizadores, posiblemente debido a que se emplean grandes volúmenes en el proceso de elaboración de diferentes productos.

6.3.3 Aplicaciones de la microparticulación

La microparticulación permite obtener agregados proteicos que tengan un tamaño de partícula entre 0,5 y 10 μm , similar al tamaño de los glóbulos grasos (1-10 μm), facilitando su inclusión en matrices proteicas, comportándose como un sustituto de los glóbulos grasos de diversos productos lácteos (quesos, yogures, helados, postres, etc.).

Actualmente, la microparticulación de WPCs tiene diversas aplicaciones [23]:

- Aporta nuevas propiedades tecnológicas o funcionales (capacidad espumante, emulsionante, gelificante) y organolépticas, conservando su valor nutritivo. Por tanto, puede ser un ingrediente muy útil en la formulación de productos lácteos.

- El empleo del producto microparticulado como método sustitutivo de los glóbulos grasos de productos lácteos para reducir el contenido graso de los mismos y además mejorar las características sensoriales de alimentos bajos en grasa.

El empleo de suero microparticulado en productos lácteos, además de ser más saludable al reducir el contenido graso, supone una serie de ventajas de gran interés. En la tabla IV se describen los beneficios más destacables del empleo de suero microparticulado proteico en derivados lácteos.

Tabla IV. Ventajas que aporta el suero microparticulado proteico en diversos productos lácteos [22].

Producto lácteo	Ventajas del microparticulado
Queso	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora la percepción de sabor y la sensación de cremosidad. • Mayor elasticidad y textura grasa. • Aumento del rendimiento (6-10 %).
Yogurt	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora cremosidad y sensación en la boca. • Disminuye la grumosidad. • Productos más saludables al aumentar el contenido en aminoácidos.
Helado	<ul style="list-style-type: none"> • Producto saludable; bajo en grasa y rico en aminoácidos esenciales. • Se necesitan menos estabilizadores. • Se derrite con menos facilidad.
Batidos proteicos	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora el color blanco de leches bajas en grasa. • Mejor sensación en la boca. • Alarga la vida útil del producto.

La aplicación de suero proteico microparticulado también se realiza en otro tipo de productos alimenticios como aderezos, salsas (mayonesas), chocolates, productos de panadería y confitería, carnes, nutracéuticos y productos en polvo[22].

Según el tamaño de partícula del suero microparticulado, se obtendrán diferentes sensaciones en la boca como se observa en la tabla V.

Tabla V. Relación del tamaño de partícula y la sensación en la boca [30].

Tamaño de partícula (μm)	Sensación en la boca
<0,1	Acuosa
0,1-3	Cremosa
>5	Calcárea
>10	Arenosa

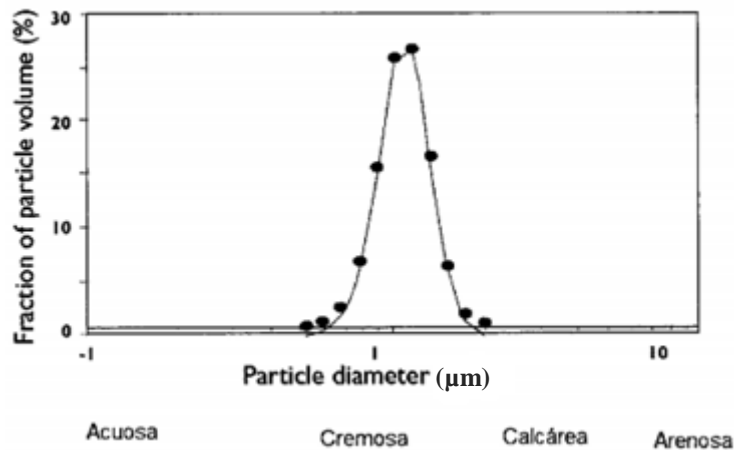


Figura 20. Relación del tamaño de partícula y la sensación en la boca [30].

La figura 20, muestra esquemáticamente la relación existente entre el tamaño de partícula y la sensación en la boca. Sin embargo, a medida que las partículas tienen un tamaño inferior o superior al tamaño medio, las texturas se vuelven más desagradables al paladar [30].

Dependiendo de las condiciones del proceso de microparticulación proteica se obtendrán diferentes tamaños de partícula. En la tabla VI, se muestra el tamaño de los glóbulos grasos en diferentes productos lácteos.

Tabla VI. Tamaño de partícula de diferentes derivados lácteos [22].

Productos lácteos	Tamaño (μm)
Yogurt	1-2
Helado	1-2
Queso	5

En función del tipo de producto lácteo el tamaño de los glóbulos grasos varía. Por tanto, para aplicar suero microparticulado a estos productos hay que determinar cuáles son las condiciones y parámetros que hay que modificar en el proceso de microparticulación para obtener un tamaño de partícula concreto con el fin de aplicarlo como sustituto de la grasa.

En el caso de los quesos, se ha comprobado que las partículas con un tamaño menor de 0,5 micras no pueden permanecer en el mismo, mientras que aquellas que son mayores de 10 micras perturban la coagulación del queso [25].

6.3.4 Parámetros que influyen sobre la microparticulación proteica

Los factores que influyen principalmente en la estructura y el tamaño de las partículas formadas durante el proceso de microparticulación proteica son [25]:

- **Composición del producto; WPC** (concentración de proteína, lactosa y CaCl_2)
 - La lactosa induce un efecto protector alrededor de la β -Lg frente a la desnaturalización térmica.
 - Un aumento en la concentración de proteína aumenta la tasa de desnaturalización de la proteína. Sin embargo, la presencia de alto contenido de lactosa en la composición del producto puede obstaculizar el proceso de desnaturalización y viceversa. Es decir, cuanto mayor es la relación proteína-lactosa más favorable es la desnaturalización proteica, en cambio cuanto menor es dicha relación más dificultad supone la desnaturalización térmica.
 - El contenido de sales de CaCl_2 en el concentrado de proteína tiene mucha importancia en la microparticulación. Cuando el contenido de lactosa es bajo (1,5%), el calcio tiene un efecto estimulante sobre la desnaturalización debido a su capacidad de formar puentes iónicos entre

las proteínas y compensar sus cargas negativas. En cambio, cuando los niveles de lactosa son altos, disminuye el efecto del calcio en la formación de agregados proteicos.

- **pH:** Cuanto más ácido tiende a ser el pH menor es el efecto de la lactosa sobre la β -Lg, de tal forma que se favorece su desnaturalización.
- **Temperatura:** El incremento de la temperatura favorece la desnaturalización de las proteínas y con ello la agregación aumentando el tamaño de partícula.
- **Trabajo mecánico:** Las fuerzas de cizallamiento pueden favorecer la desnaturalización de proteínas debido a la alteración de su estructura y la inactivación de enzimas. Además, un aumento en la fuerza de cizalla estimula la tasa de corte de las proteínas disminuyendo el tamaño de partícula y facilitando la aglutinación de las mismas a través de una mayor colisión en la solución. A su vez, un mayor número de pases en el homogenizador tiende a reducir cada vez más el tamaño de los agregados [29].

La variación de cada uno de los parámetros mencionados en el proceso de microparticulación genera sueros microparticulados con diferentes características (tamaño de partícula, reología y agregación proteica).

En este proyecto se va a estudiar la microparticulación proteica utilizando como materia prima un WPC-60, de tal forma que posteriormente se analizará el efecto de los diferentes parámetros que intervienen en el proceso de microparticulación sobre las variables de respuesta mencionadas.

6.3.5 Equipos comerciales para microparticulación

Existen diversos equipos comerciales productores de suero microparticulado entre los que destacan: APV Leancreme y Tetra paK Micropart.

6.3.5.1 APV LeanCreme

El sistema APV LeanCream ha sido diseñado para la microparticulación de la proteína de suero. Este sistema puede procesar WPCs con distintos contenidos proteicos (WPC-28, WPC-35, WPC-60, WPC-80) provenientes de varias fuentes de suero tales como suero dulce, suero láctico ácido, suero caseínico, WPC reconstituido, concentrado, WPCs altos en sólidos y WPCs mezclados con nata [31].

Cambiando los parámetros del proceso LeanCreme y los tipos de alimentación es posible personalizar los productos LeanCreme a una amplia gama de aplicaciones como quesos, bebidas, postres e ingredientes en polvo [31].



Figura 21. Equipo APV LeanCreme [31].

El sistema APV Leancreme presenta en su equipo un intercambiador de calor de superficie rascada (Figura 22) que resulta clave para el proceso. Este tipo de intercambiador de calor se emplea para la transferencia de calor en fluidos altamente viscosos y particulados. Estos dispositivos están equipados con una serie de elementos rascadores (cuchillas) en el interior de cada tubo. El movimiento recíproco de los rascadores mezcla el fluido y limpia la superficie de intercambio, favoreciendo una transferencia térmica elevada ya que se evitan las paradas por limpieza [32].



Figura 22. Intercambiador de calor de superficie rascada [32].

El APV, a diferencia de otros sistemas, es un proceso en una etapa, donde la formación de agregados en el tratamiento térmico y el corte de los mismos en el tratamiento mecánico son realizados mediante un intercambiador de calor de superficie

rascada, el cual no necesita un tratamiento térmico tan duro en comparación con otros de objetivos similares. Este sistema supone una ventaja al generar una estructura más flexible en el microparticulado final, haciéndolo fácilmente adaptable cuando se incorpora a la matriz del queso [25]. En la figura 23, se muestra esquemáticamente el proceso APV Leancreme.

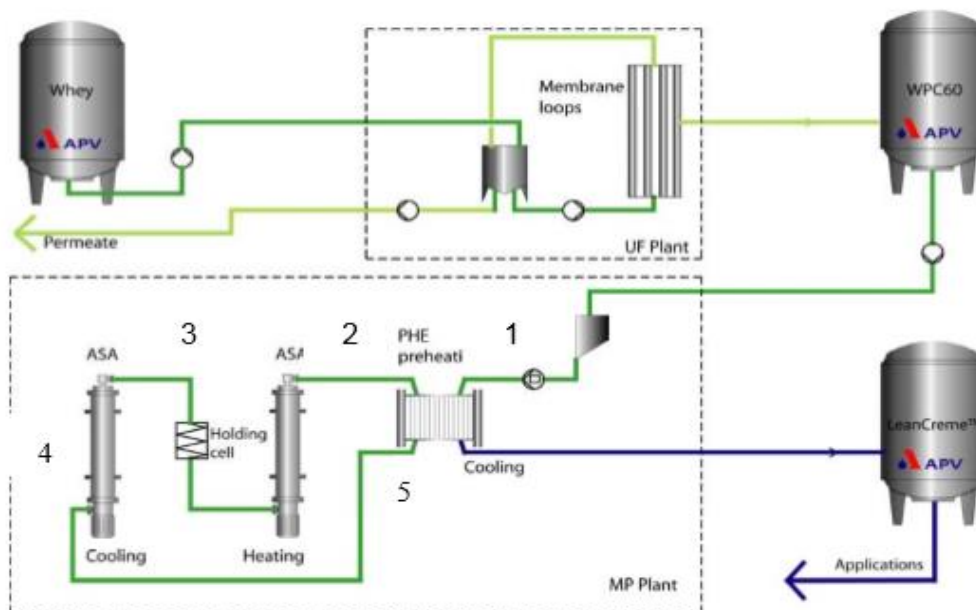


Figura 23.Estructura del proceso APV Leancreme [25].

Dicho proceso se divide en 5 etapas:

- 1) Precalentamiento.
- 2) Tratamiento mecánico por cizallamiento.
- 3) Desnaturalización y agregación.
- 4) Refrigeración y tratamiento mecánico por cizallamiento.
- 5) Enfriamiento final.

6.3.5.2 Tetra Pak: Tetra Therm Micropart

Tetra Therm Micropart es otro equipo comercial empleado en la microparticulación de proteica. Emplean como fuente de proteína WPC con un 5-10% de proteína total en la disolución de alimentación [33].

Tetra Therm Micropart presenta una serie de ventajas específicas respecto a otros sistemas: produce una alta inactivación térmica de los bacteriófagos, se trata de un proceso bien ajustado y definido y presenta una alta tasa de recuperación de calor (80-85%) [33].



Figura 24. Equipo Tetra Them Micropart.

A diferencia del AVP Leancreme y otros equipos comerciales de microparticulación, este sistema carece del proceso de intercambio de calor de superficie rascada, debido a los grandes gastos de operación y mantenimiento que supone. En la figura 25, se muestra esquemáticamente el proceso Tetra Therm Micropart.

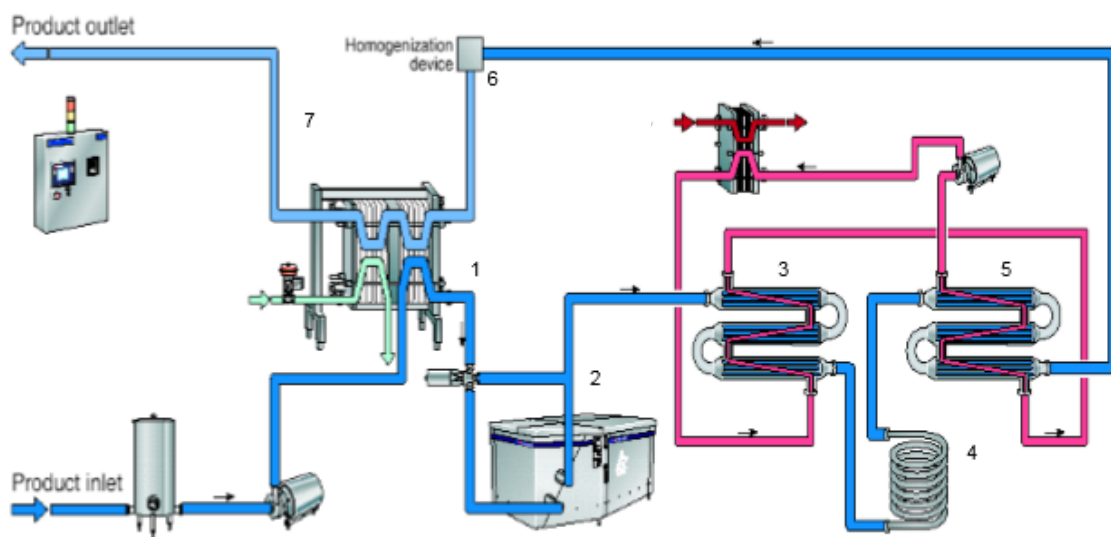


Figura 25. Estructura del proceso Tetra Therm Micropart [25].

Atendiendo a la figura 25, dicho proceso se divide en 8 etapas [25]:

- 1) Precalentamiento.
- 2) Bomba homogenizadora.
- 3) Humedecimiento.
- 4) Desnaturalización y agregación de proteínas.
- 5) Enfriamiento.
- 6) Tratamiento mecánico mediante equipo de homogenización.
- 7) Enfriamiento final.

El producto de alimentación se bombea desde el tanque de equilibrio a través un intercambiador de calor de placas *Tetra Plex* donde se calienta por encima de 60 °C. Después de precalentar el producto, este se bombea a alta presión por un equipo *Tetra Alex*, a través de un intercambiador de calor tubular *Tetra Spiraflo* en el que se lleva a cabo el calentamiento final [33].

El producto calentado se mantiene durante varios minutos con el fin de completar la desnaturalización de proteínas e inactivar microorganismos y los bacteriófagos como sea posible. La velocidad de calentamiento, la temperatura máxima y el tiempo de retención pueden variar para dar diferentes propiedades al producto final microparticulado[33].

El enfriamiento del producto después del tratamiento térmico se lleva a cabo en el intercambiador de calor tubular *Tetra Spiraflo*. Después de preenfriar, el producto pasa a un dispositivo de homogenización. El enfriamiento final se lleva a cabo en el intercambiador de calor *Tetra Plex* [33].

El efecto mecánico que provoca Tetra Pak con la homogenización es suficiente flexible para poder orientar el tamaño de partícula, al mismo tiempo, el proceso es más fiable y económico que aquellos equipos construidos con intercambiadores de calor de superficie rascada [25].

6.3.6 Revisión bibliográfica sobre microparticulación proteica

En este apartado se describe de forma esquemática una revisión bibliográfica de lo publicado hasta la fecha sobre microparticulación proteica.

Tabla VII. Cuadro-resumen de diferentes estudios relacionados con la microparticulación proteica (parte 1). (/) Información que se desconoce.

Fuente proteica	Condiciones iniciales	Tratamiento Térmico	Equipo	Parámetros medidos	Tamaño de partícula y características del microparticulado	Aplicabilidad (producto final)	Referencia
Retenido de proteínas de suero (WP)	Dispersiones de WP 7% (wt/wt) pH 3 (ácido cítrico o láctico)	20 min a 90°C	Microfluidizador (5 pases, 140 MPa)	Proteína Análisis térmico Tamaño de partícula Solubilidad Estabilidad térmica Emulsión Proteína adsorbida Reología	Pulverizado seco Tamaño de partícula < 1 μm Aumento estabilidad coloidal Mayor solubilidad Mayor viscosidad	/	Dissanayake et al., 2012
Proteína de suero aislada (WPI-93,4 %)	WPI-93,4 (2 a 12% p/p), pH (3 a 8)	5 - 30 min/65-90°C	/	Reología Turbidez Análisis térmico Proteína Agregación Gelificación en frío	Alta viscosidad La acción de la cizalla impide la gelificación	Ingredientes fríos gelatinosos para su aplicación en gran variedad de productos.	Bryant and Mclements, 2008
Soluciones de concentrados de proteínas séricas (WPC)	Soluciones de WPC 5% (p/p) pH 3,5, 4,8, 5,8 (ácido láctico o NaOH)	10 min a 90 °C en reactor agitado (posterior enfriamiento en baño de hielo)	Microfluidizador (3 pases, 150 MPa)	Sedimentación Solidificación Proteína Humedad	Menor tamaño de partícula Menor sedimentación Mayor solubilidad	/	(Iordache&Jelen, 2003)
Solución de WPI	Solución de WPI 40% (p/p) pH original (~6,8)	50 min a 90 °C en un mezclador de corte con un posterior enfriamiento y un secado	Molino ultracentrífugo (15000 r.p.m.).	% de agregación Viscosidad Tamaño de partícula Reactividad de los agregados	95% de agregación Mayor tamaño a mayor concentración de proteína (diámetro medio ~ 70 μm)	/	Purwanti et al., 2011

Tabla VII. Cuadro-resumen de diferentes estudios relacionados con la microparticulación proteica (parte 2). (/) Información que se desconoce.

Fuente proteica	Condiciones iniciales	Tratamiento Térmico	Equipo	Parámetros medidos	Tamaño de partícula y características del microparticulado	Aplicabilidad (producto final)	Referencia
Suero concentrado de proteína (WPC-33)	WPC-33 (0, 1,5, 3, 4,5 % p/p)	Varios tratamientos térmicos: 2 min 40°C 15 min 90°C 2 min 40°C	/	Textura Reología Análisis térmico Proteína	/	Postres lácteos	Vidigal et al., 2005
Retenido de proteínas séricas (WP)	Dispersiones de WP 10, 17,5 y 25 % (p/p) pH 4, 5 y 6 (HCl)	5, 10, 15 o 20 s a 140 °C en baño de aceite	/	Turbidez Solubilidad de las dispersiones de WP Proteína Análisis térmico	/	/	Dissanayake et al., 2013 a
Leche en polvo	Disolución 10% (p/p) pH 4,7	2 min a 95 °C	Homogenizador convencional (en dos etapas: 20 y 5 MPa) o microfluidizador (150 MPa)	Tamaño de partícula Textura Retención de agua Microestructura	Microfluidizador: aumento de la sinéresis, reducción firmeza, cohesividad y viscosidad. Menor tamaño de partícula Homogenizador: efectos menos fuertes que el microfluidizador	Yogurt	Ciron et al., 2010
Suero concentrado de proteína (WPC-80)	WPC-80 (25% peso/peso), pH 6,5	60 min 85°C	Homogenizador 27000 rpm (durante 2,4,6 min)	Tamaño de partícula Reología Agregación	Tamaño de partícula a los 4 min: disminuye de 330 nm a 188 nm. Menor tamaño de partícula Reducción de la viscosidad	Aplicaciones en productos de la industria láctea	Onwulata et al., 2008

Tabla VII. Cuadro-resumen de diferentes estudios relacionados con la microparticulación proteica (parte 3). (/) Información que se desconoce.

Fuente proteica	Condiciones iniciales	Tratamiento Térmico	Equipo	Parámetros medidos	Tamaño de partícula y características del microparticulado	Aplicabilidad (producto final)	Referencia
Concentrados de mazada y lactosuero	Mezclas al 25, 50 75 y 100% de proteína pH 4,6 (HCl)	25 min a 90 °C con agitación a 168 rpm (posterior enfriamiento hasta 30 °C en baño de hielo)	Emulsificador (65,5 MPa)	Proteína % de agregación Capacidad de retención de agua Tamaño de particular Área de la superficie Reología	Tamaño de partícula <μm Mayor agregación Aumento viscosidad	/	Saffon et al., 2011
Proteína de suero aislada (WPI-97,9)	WPI-97,9 (25% p/p)	/	Homogenizador (6 pases, 150 bar)	Tamaño de partícula Agregación Emulsificación Contenido de proteína	Tamaño de partícula 2,7 μm, con un 20% (peso/peso) de proteína.	Ingrediente alimentario o a veces como encapsulante	Saglam et al., 2011
Proteína de suero (WP) retenida	pH 6 y 3 (ácido cítrico y ácido láctico)	30 s 140°C	/	Análisis térmico Agregación Turbidez Análisis electroforéticos	/	/	Dissanayake et al., 2013 b
Proteína de suero aislada(WPI)	WPI (5% p/v) , 10 mM CaCl ₂	30 min 80°C	/	Tamaño de partícula Estructura de proteína	/	/	Marangoni et al., 2000
Retenido de proteínas de suero (WP)	Disoluciones de WP 10% (p/p) pH 7 (NaOH)	20 min a 90°C	Microfluidizador (1 o 5 pases, 140 MPa)	Distribución del tamaño de partícula Exclusión de tamaño Proteína Análisis térmico Propiedades funcionales Solubilidad Estabilidad térmica Emulsión Formación de espumas	Tamaño de partícula: 10 μm Mayor solubilidad Aumento de la estabilidad térmica Mayor emulsión Aumento formación de espumas Mayor estabilidad espumas	/	(Dissanayake&Vasiljevic, 2009)

6.4 REOLOGÍA

6.4.1 Conceptos básicos de reología

La reología se define como el estudio de los fenómenos de deformación y flujo de los materiales bajo la acción de fuerzas mecánicas. Deformación y flujo son las respuestas dinámicas características de sólidos y fluidos, entendiéndose por deformación el cambio de forma o volumen experimentado por un cuerpo bajo la acción de un sistema de fuerzas; y por flujo, una deformación continua en el tiempo [34].

La aplicación de fuerzas externas de intensidad suficiente puede provocar una deformación de la materia, realizándose un trabajo que se acumula como energía interna de deformación. Para sólidos ideales estas transformaciones son reversibles y cuando las fuerzas externas dejan de actuar, el sistema recupera instantáneamente la forma y dimensiones originales, mientras que la energía acumulada retorna en forma de trabajo; hablándose de un comportamiento elástico. Si por el contrario el trabajo realizado se disipa completamente en forma de calor, el estado de deformación permanece y se habla de un comportamiento viscoso, lo cual ocurre con los líquidos ideales [34, 35].

Sin embargo la mayoría de los cuerpos reales no se comportan como sólidos o líquidos ideales, ya que incluso los sólidos reales también se pueden deformar parcialmente de forma irreversible; y bajo la influencia de fuerzas de magnitud suficiente se deforman, fluyen. La mayoría de los materiales muestran un comportamiento reológico que los clasifica en una región entre los líquidos y los sólidos, los cuales presentan comportamientos viscoso y elástico, denominados “viscoelásticos” [35].

6.4.2 Tipo de fluidos según su comportamiento reológico

La clasificación general de los fluidos según su comportamiento reológico puede establecerse tal y como se muestra en la figura 26. De modo general, la mayoría de los autores, coinciden al hacer una primera división entre fluidos newtonianos y fluidos no newtonianos, según su comportamiento reológico siga o no la ley de Newton de la viscosidad [36].

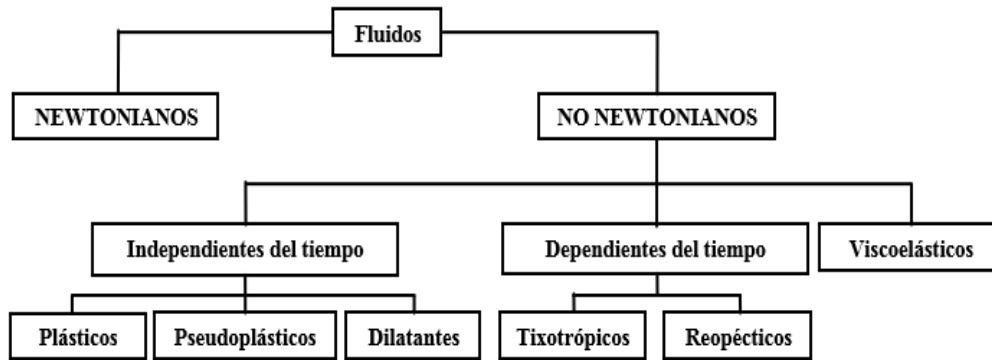


Figura 26. Clasificación de los fluidos en función de su comportamiento reológico [36].

6.4.2.1 Fluidos newtonianos

Los fluidos newtonianos son aquellos cuya viscosidad permanece constante en el tiempo para cualquier valor de la velocidad de deformación, siendo únicamente dependiente de la presión, temperatura y naturaleza físico-química del fluido [34, 35].

Para entender el concepto de viscosidad se debe suponer un sistema de placas planas y paralelas, separadas entre sí por una mínima distancia, entre las cuales reposa el fluido en cuestión. En un tiempo cero, la placa superior se empieza a mover con una velocidad constante, transmitiendo cantidad de movimiento al fluido. Con el tiempo este adquiere un perfil de velocidades en el estado estacionario, estado en el cual la fuerza aplicada a la placa superior es constante [34, 35] (Figura 27).

La fuerza por unidad de superficie (F/A) que se ejerce sobre la placa se encuentra directamente relacionada con la deformación originada en el líquido, así como con su viscosidad dinámica; que es una medida del rozamiento interno de las capas del fluido [35].

La viscosidad se obtiene dividiendo el esfuerzo cortante ($\tau=F/A$) entre la velocidad de deformación (Ley de Newton de la Viscosidad):

$$\eta = F/A \, d\gamma/dt = \tau\dot{\gamma}$$

Donde η es la viscosidad aparente; τ el esfuerzo cortante e $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación.

La viscosidad tiene dimensiones de $ML^{-1}t^{-1}$, y las unidades empleadas son el Pa·s y el cP (centipoise).

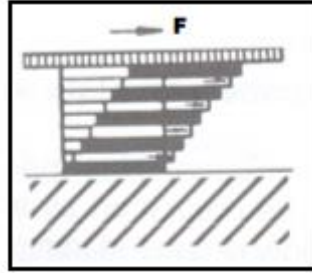


Figura 27. Modelo de flujo entre dos láminas planas y paralelas [37].

6.4.2.2 Fluidos no newtonianos

Los fluidos no newtonianos son aquellos que no cumplen la ley de Newton de la viscosidad, por lo tanto, la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación deja de ser lineal. Estos fluidos se caracterizan porque su viscosidad no permanece constante cuando la temperatura y la composición permanecen invariables, sino que depende del esfuerzo cortante y, a veces, del tiempo de aplicación del esfuerzo y de la historia previa del producto. Así los fluidos no newtonianos pueden clasificarse en fluidos independientes del tiempo o fluidos dependientes del tiempo [34, 36].

✓ Fluidos independientes del tiempo

Los fluidos independientes del tiempo se clasifican en tres grupos: pseudoplásticos, dilatantes y plásticos, y se caracterizan por que la viscosidad aparente sólo depende de la temperatura, de la composición del fluido y del esfuerzo cortante aplicado, pero nunca del tiempo de aplicación de éste último [34, 36].

a) Fluidos pseudoplásticos

La principal característica de los fluidos pseudoplásticos es que su viscosidad aparente decrece cuando aumenta el esfuerzo cortante. El comportamiento pseudoplástico es posiblemente el más frecuente en los fluidos alimentarios. En general, se comportan de esta forma la mayoría de productos lácteos y algunas salsas [36].

b) Fluidos dilatantes

Los fluidos dilatantes se caracterizan porque al aumentar el esfuerzo cortante se incrementa su viscosidad aparente. Algunos alimentos que presenten este tipo de comportamiento son las disoluciones de almidón [36].

c) Fluidos plásticos

En los fluidos plásticos la viscosidad aparente decrece cuando aumenta el esfuerzo cortante, pero a diferencia de los pseudoplásticos, los fluidos plásticos se caracterizan porque no fluyen hasta que son sometidos a un esfuerzo cortante límite determinado, denominado esfuerzo umbral o límite de fluencia. El chocolate, la mostaza o el ketchup se consideran alimentos típicamente plásticos [36].

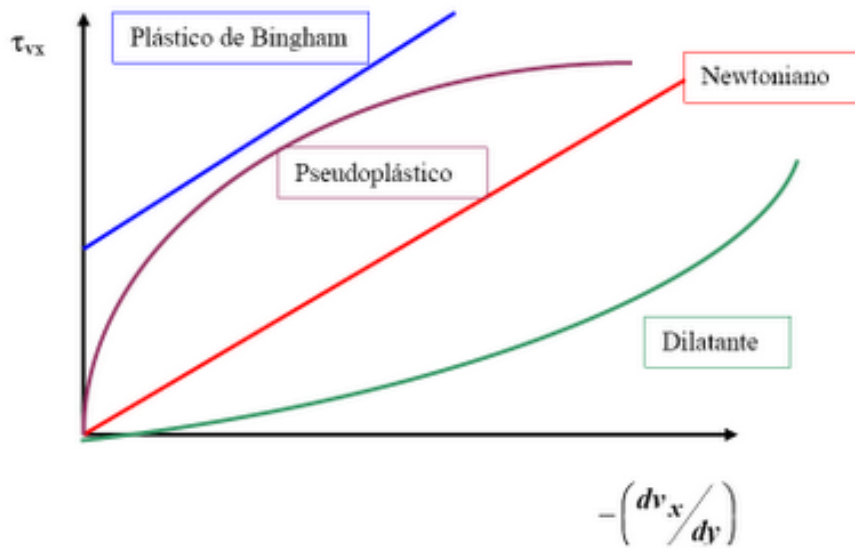


Figura 28. Comportamiento de los fluidos newtonianos y no newtonianos independientes del tiempo. En el eje de abscisas se representa la velocidad de corte y en el de ordenadas el esfuerzo cortante [38].

✓ Fluidos dependientes del tiempo

Son aquellos fluidos en los que la viscosidad aparente depende, además del esfuerzo cortante, del tiempo de actuación de dicho esfuerzo. Los fluidos no newtonianos con propiedades dependientes del tiempo se subdividen en tixotrópicos y reopéticos [34, 36].

a) Fluidos tixotrópicos

Se consideran fluidos tixotrópicos todos aquellos que al aplicarles un esfuerzo cortante constante, muestran una disminución de la viscosidad aparente con el tiempo. El comportamiento tixotrópico ha sido descrito en varios alimentos, tales como la mayonesa, el ketchup, la mostaza y los helados.

b) Fluidos reopécticos

Los fluidos reopécticos tienen un comportamiento contrario a los tixotrópicos, es decir, la viscosidad aparente aumenta con el tiempo durante el que la muestra es sometida a un determinado esfuerzo cortante. Aunque se ha observado un comportamiento reopéctico en algunos alimentos tales como ciertas dispersiones de lecitina de soja, la reopexia es una propiedad muy poco frecuente en el campo de la alimentación.

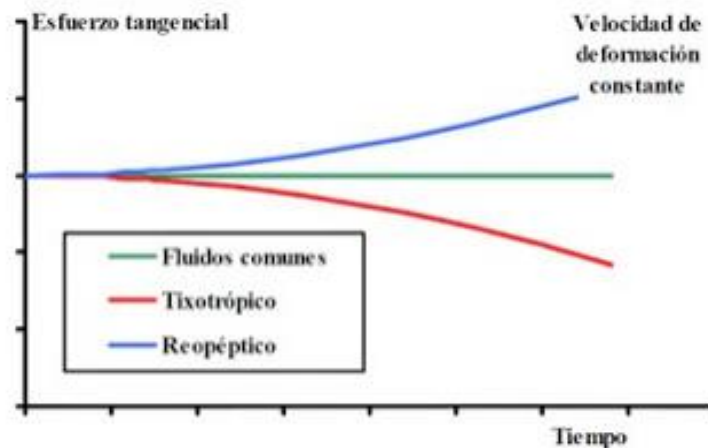


Figura 29. Comportamiento de los fluidos tixotrópicos y reopécticos [39].

✓ Fluidos Viscoelásticos

Son fluidos de comportamiento muy complejo, con características intermedias entre los sólidos (Ley de Hooke) y los líquidos (Ley de Newton). De modo que bajo la acción de fuerzas tangenciales no sólo fluyen, sino que además tienden a recuperar su forma inicial cuando el esfuerzo desaparece [35]; ya que parte del trabajo se disipa en forma de calor (componente viscosa) y parte se almacena en forma de energía interna (componente elástica) [34].

Dada esta definición, en la realidad se consideran sólidos o líquidos, a aquellos fluidos que destacan más el componente elástico o viscoso en sus características, según sea el caso.

Para describir el comportamiento de estos fluidos se puede acudir al uso de diversos modelos matemáticos tales como el modelo de Maxwell, Kelvin-Voight o Burgers.

Cabe destacar que en este grupo de fluidos, el esfuerzo umbral o crítico es el requerido para que un sólido elástico comience a fluir.

6.4.3 Determinaciones reométricas

Para realizar determinaciones reométricas que permitan conocer parámetros como la viscosidad, se debe someter las muestras a una deformación que puede tener su origen en esfuerzos por cizalla, extensión o compresión; lo que origina distintas técnicas de medida y equipos para realizarlas [34].

Para las sustancias complejas se utilizan reómetros rotacionales (Figura 30), que pueden realizar medidas reproducibles a partir de esfuerzos generados por desplazamientos rotacionales muy limitados y precisos [34].



Figura 30. Reómetro rotacional *MARS II (HAAKE)* [34].

Desde el punto de vista del sistema de trabajo, los reómetros rotacionales pueden hacerlo en [34, 35]:

- Modo CR, o modo de velocidad controlada, donde se asigna una velocidad de deformación y se mide el esfuerzo (par) originado.
- Modo CS, o modo de esfuerzo controlado, donde se mide la velocidad de deformación a un esfuerzo de deformación (par deformador) dado.
- Modo CD, o modo de deformación controlada.

A la hora de realizar un ensayo reológico es necesario tener en cuenta ciertos aspectos [34]:

- La muestra tiene que ser homogénea para que reaccione de modo uniforme. Debe evitarse la formación de burbujas y en caso de que las muestras sean suspensiones o dispersiones, sus componentes deben estar distribuidos homogéneamente.
- El esfuerzo aplicado debe ser transmitido desde el plato móvil hacia el interior de la muestra. En caso de que la adherencia entre la muestra y el plato móvil sea insuficiente el plato se deslizará sobre la muestra, pudiendo originar resultados erróneos. Estos fenómenos de deslizamiento ("*slippage*") son frecuentes a la hora de medir grasas y aceites.

Los dispositivos para producir el esfuerzo sobre la muestra se llaman sensores y pueden ser [34, 35]:

- Cilindros concéntricos: consta de un cilindro externo y otro interno en el que la sustancia se coloca en el espacio libre que dejan. Son utilizados para medir sustancias de baja viscosidad.
- Cono-Placa: son utilizados para materiales de viscosidad media, fáciles de limpiar y que no tengan partículas en suspensión.
- Placa-Placa: esta geometría es adecuada para realizar ensayos oscilatorios y para sustancias poco homogéneas (con partículas en suspensión). Una variación en los sensores de placa-placa, son las placas serradas utilizadas para evitar fenómenos de deslizamiento ("*slippage*").

6.4.3.1 Ensayos estacionarios: rampa de esfuerzo

A partir de las herramientas expuestas, se pueden realizar ensayos estacionarios de rampa de esfuerzo. Este consiste en incrementar el esfuerzo y medir la velocidad de deformación originada; de esta forma se pueden generar dos tipos de curvas [34, 35]: "*Curva de Flujo*" y "*Curva de Viscosidad*".

✓ Curva de Flujo

Es la representación gráfica de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) frente al esfuerzo de deformación (τ), cuya relación determina el modo de fluir de un líquido. Trabajando

en modo CR, la curva de flujo se obtiene al hacer una rampa de deformación, que implica medir la variación del esfuerzo originado, cuando se varía la velocidad de deformación en un intervalo dado. Si se trabaja en modo CS se emplea una rampa de esfuerzo midiendo la variación de la velocidad de deformación originada.

✓ *Curva de Viscosidad*

Otro modo de estudiar el comportamiento de un fluido basándose en la realización de rampas de esfuerzo es mediante la representación de la viscosidad (η) frente a la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$), se obtiene así la denominada “Curva de Viscosidad”, que al igual que la curva de flujo también sirve para determinar el comportamiento reológico de un fluido.

En la figura 31, se muestran las curvas de flujo y las curvas de viscosidad de fluidos newtonianos y no newtonianos independientes del tiempo.

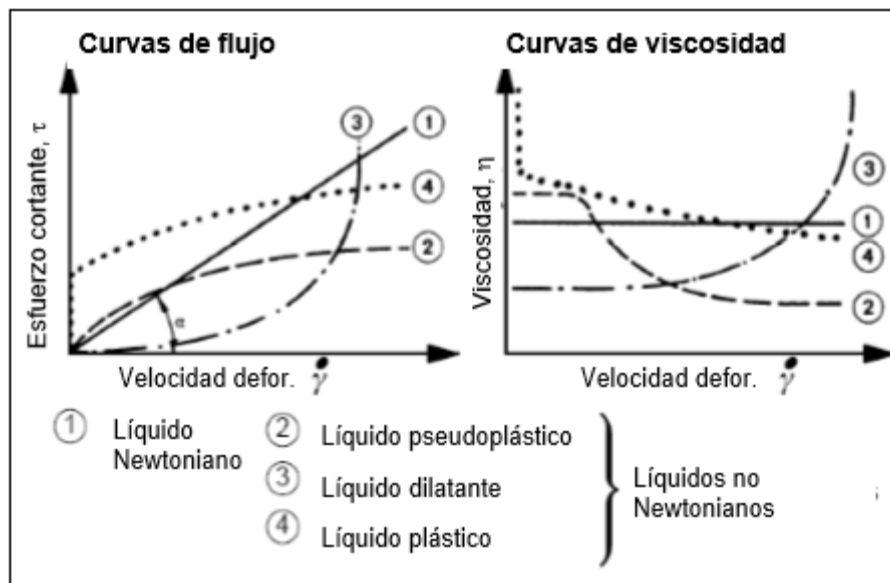


Figura 31. Curvas de flujo y de viscosidad de distintos tipos de fluidos: 1) Newtoniano, 2) Pseudoplástico, 3) Dilatante y 4) Plástico [37].

6.5 MASTERSIZER: DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULAS

6.5.1 Antecedentes. La Difracción de Láser

Uno de los métodos más utilizados para la determinación del tamaño de las partículas en muchas aplicaciones es el de Difracción de Láser, también conocida como Difracción de Fraunhofer. Las principales razones por las que esta técnica se ha implementado notablemente han sido su facilidad para ser aplicada a muchos tipos de sistemas particulados, su rapidez y su automatización [40, 41].

La Difracción de Láser es una técnica basada en el siguiente fenómeno: las partículas dispersan luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente del tamaño de partícula [40].

Este fenómeno conocido como "aproximación de Fraunhofer" fue la base de los primeros modelos ópticos empleados para la medida del tamaño de partícula. En esta aplicación, además de considerar la esfericidad de las partículas se asumían otros dos puntos importantes [40]:

- Todas las partículas son mucho más grandes que la longitud de onda de la luz empleada y sólo es considerada la dispersión de luz producida por el contorno de la partícula.
- Solo es considerada la dispersión de luz en la dirección prácticamente frontal, es decir, a ángulos muy pequeños.

La aproximación de Fraunhofer no considera ningún conocimiento de las propiedades ópticas del material. Esta aproximación es válida para grandes partículas o para partículas más pequeñas que son opacas o tienen un alto índice de refracción respecto al medio en el que están suspendidas.

6.5.2 Refracción - Índices de Refracción

La refracción se define como el cambio de dirección y de velocidad que experimentan los rayos luminosos cuando inciden oblicuamente sobre la superficie de separación de dos medios [40].

El índice de refracción de una sustancia es el cociente entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de esa misma luz en su propio medio.

Por tanto, cuando un haz de luz láser incide sobre un conjunto de partículas se producen cuatro efectos importantes (Figura 32) [40]:

- Difracción sobre el contorno de una partícula (Difracción por Fraunhofer).
- Reflexión sobre la superficie de la partícula, tanto hacia fuera como hacia dentro.
- Refracción del medio a la partícula y de la partícula al medio.
- Absorción de luz por parte de la partícula.

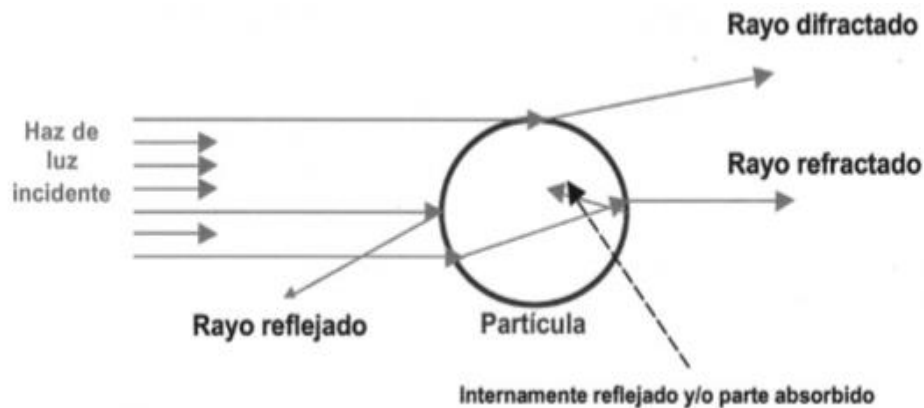


Figura 32. Efectos que produce la aplicación de una fuente de luz sobre una partícula [40].

6.5.3 Teoría de Mie

Para aquellas partículas cuyo diámetro no es muy superior a la longitud de onda de la luz utilizada, se emplea la teoría de Mie para evaluar las mediciones. Esta teoría, es la solución completa de las ecuaciones de Maxwell para la dispersión de ondas electromagnéticas en partículas esféricas [42].

Además permite evaluar también las distribuciones de intensidad características de las partículas muy pequeñas. Por tanto, los avances tecnológicos han permitido la implementación de la teoría de Mie en los equipos de Difracción de Láser. La teoría de Mie asume las siguientes consideraciones [40]:

- La partícula es una esfera uniforme homogéneamente óptica cuyos índices de refracción real e imaginario (absorción) son conocidos.
- La partícula esférica es iluminada por una onda plana de extensión infinita y de longitud de onda conocida.

- Los índices de refracción real e imaginario del medio que la rodea también son conocidos.

En definitiva, la determinación del tamaño de partícula según la teoría de Mie incluye las influencias de la difracción, refracción (o absorción), reflexión y efectos de polarización de la luz usada.

Según la Internacional estándar ISO13320-1: "si el tamaño de partícula es superior a 50 μm , la aproximación de Fraunhofer da buenos resultados. La teoría de Mie también puede ser usada y además es preferida para casos en donde el índice de refracción de las partículas está cercano al del medio. Para partículas inferiores a 50 μm la teoría de Mie ofrece la mejor solución general".

6.5.4 Malvern Instruments

En las partículas de gran tamaño, además de poder aplicarse la teoría de Fraunhofer, es recomendable usar una presentación óptica general "Default" obtenida por *Malvern* como medida de la mayoría de los índices de refracción y absorción que han sido calculados en la naturaleza [42].

Aquellas partículas a medir que proceden de mezclas de varios productos y forman una muestra homogénea química y física, o bien proceden de síntesis química, como ocurre en emulsiones químicas y alimentarias, las propiedades ópticas del material a medir se desconocen. Como solución, la respuesta de *Malvern Instruments* permite variar las condiciones ópticas de las partículas hasta conseguir un punto en el que concuerden dichas propiedades ópticas con las medidas realizadas [42].

6.5.4.1 Análisis del tamaño de partícula

Para comprender el significado de los resultados obtenidos por un equipo de Difracción Mastersizer de *Malvern Instruments*, hay que tener en cuenta tres conceptos[42]:

- a) **La distribución de tamaño fundamental de las partículas está basada en volumen.** La dispersión del láser determina el volumen de las partículas. Esto significa que, con ayuda de la dispersión del láser, el resultado de una medición permite saber qué porcentaje del volumen total de la muestra tiene partículas de

un tamaño determinado o partículas situadas dentro de un intervalo de tamaños. Por ejemplo, si en la categoría de tamaño entre 5,63-6,32 aparece el resultado de 9%, esto significa que el 9% de las partículas en volumen, presentan un tamaño comprendido entre 5,63 y 6,32 micras.

- b) **El resultado es expresado en términos de volumen de esferas equivalentes.** Es decir, para cualquier forma de partícula, la tecnología de Difracción de Láser considera en el cálculo de su tamaño, una esfera de igual volumen que la partícula.
- c) **La distribución de tamaño viene de una distribución fundamental.** La distribución finalmente analizada está expresada en un conjunto de clases de tamaño que están optimizados para concordar con la geometría del detector y la configuración óptica considerada, proporcionando así la mejor resolución. Así, los parámetros derivados se calculan a partir de la distribución fundamental haciendo uso de la suma de las contribuciones de cada banda de tamaños. Para la realización de este cálculo, se toma el diámetro representativo correspondiente a cada banda, que se considera la media geométrica de los límites de cada banda de tamaño.

6.5.4.2 Configuración Malvern: modelos ópticos

Malvern Instruments incluye dos tipos de sistemas ópticos en los diferentes modelos que dispone[42]:

a) Convencional de Fourier

La fuente de luz procede de un tubo láser de "Hene", que produce un haz de luz monocromática (igual longitud de onda) y colimada (paralela) de un máximo de 18 mm de diámetro de sección.

Las partículas son introducidas al haz del láser del equipo en vía seca, húmeda o en forma de spray. La luz dispersada por las partículas, se dirige hacia una lente focalizadora denominada "lente de rango". Esta lente opera como una transformada de Fourier de forma que genera un campo de difracción de luz dispersada hacia un plano focal donde están situados un conjunto de detectores patentados angulares que reciben las diferentes intensidades de luz en función del ángulo de recepción y por tanto del

tamaño de las partículas. En la figura 33, se muestra un esquema del modelo de configuración óptica Convencional de Fourier.

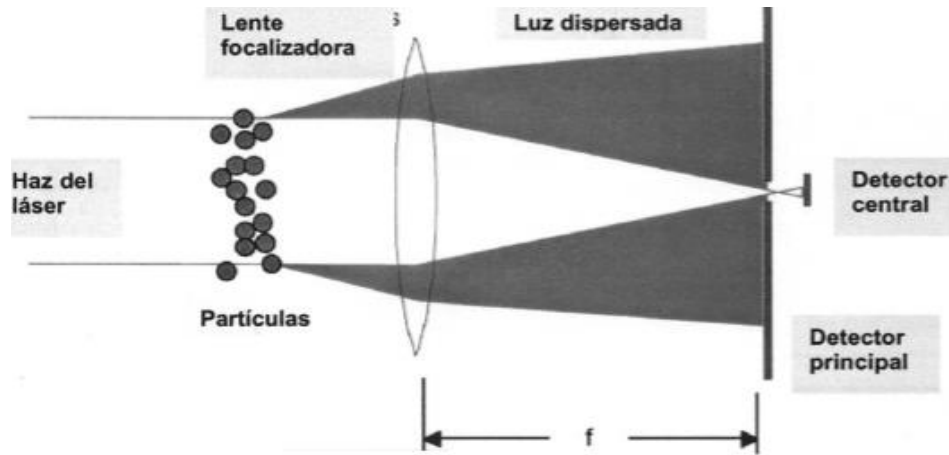


Figura 33. Representación esquemática de la configuración óptica convencional de Fourier.

Se puede observar que hay una cierta limitación en el ángulo que el equipo puede captar y por ello en éste tipo de configuraciones el tamaño de partícula más pequeño está limitado más o menos del orden de entre 0,3 y 0,5 μm , ya que el máximo ángulo de difracción recogido es del orden de unos 10 a 14°.

b) Inversa de Fourier

En la configuración óptica Inversa de Fourier el orden de los componentes es alterado, en cambio, la medida se realiza de la misma forma. La necesidad de esta configuración es, permitir la medida de dispersión de luz a ángulos mucho más grandes que con el método convencional.

En este caso, la lente focalizadora está situada antes de la célula de medida por donde pasan las partículas y el láser es focalizado en un punto central del plano del detector. Por tanto, a partir de las partículas se produce el campo de difracción a todos los ángulos. Las partículas más gruesas dirigirán principalmente su patrón de difracción al detector principal, captando ángulos de hasta 10° aproximadamente. Las partículas finas lo dirigirán al conjunto de detectores laterales que cubren un ángulo de difracción de entre 10 y 60 °, incluso reflexiones de luz producidas por partículas ultrafinas, serán recogidas por dos detectores extras situados a 120° y 135°. En la figura 34, se muestra un esquema del modelo de configuración óptica Inversa de Fourier.

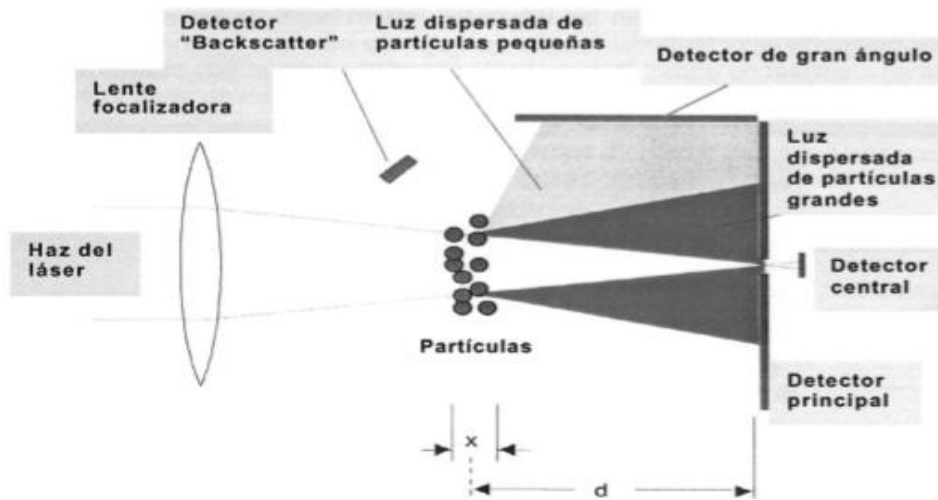


Figura 34. Esquema de la configuración óptica Inversa de Fourier.

Esta es una de las razones por las que equipos como Mastersizer Microplus, Mastersizer S o el nuevo Mastersizer 2000, pueden llegar a medir partículas submicrónicas. Por ejemplo, el equipo Mastersizer 2000 emplea la técnica de Difracción de Rayo Láser con un amplio rango de medición, desde 0,02 a 2000 μm [43].

Los equipos Mastersizer de Malvern Instruments permiten caracterizar el tamaño de partícula de emulsiones, suspensiones y polvos en industrias de recubrimientos, pinturas, farmacéuticas, cerámicas, alimenticias y tiene un amplio uso en sistemas coloidales.

6.5.4.3 Interpretación de los resultados

A continuación, se explicarán cada uno de los parámetros que aparecen en un informe de resultados para el control de calidad del tamaño de partícula de un producto[40].

- **Presentación óptica**

La presentación óptica indica los datos de los índices de refracción que se han usado tanto para la partícula como para el dispersante y la absorción de luz de láser de la partícula.

- **Obscuración**

La obscuración permite a establecer la concentración de la muestra cuando es añadida al dispersante. En realidad es una medida de la cantidad de luz de láser que se pierde (dispersada o absorbida) debido a la introducción de la muestra dentro del haz de láser del analizador. El margen más adecuado de medida se encuentra entre el 10% y el 30%, aunque depende del tipo de muestra a analizar. Existen partículas que provocan un aumento de la obscuración muy rápido y otras que lo hacen lentamente. Esto es debido fundamentalmente al grado de absorción y dispersión de luz que se produce cuando el láser choca contra las partículas.

- **Modelo de análisis**

Todos los equipos proporcionan varios modelos de análisis del resultado global de la distribución, aunque el mayoritario es el denominado modelo Polidisperso, también llamado de propósito general, en todo tipo de aplicaciones industriales o de investigación (Figura 35).

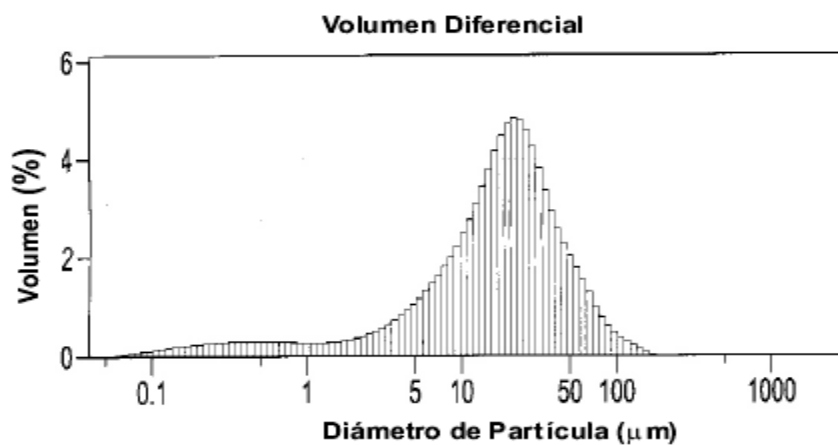


Figura 35. Modelo de análisis Polidisperso.

- **Residual**

El Residual es una indicación de hasta que punto los datos calculados concuerdan o se ajustan con los datos reales medidos. Un buen residual correspondería a un valor por debajo del 1%. Por encima del 1% se debe a dos cosas: primero, que la presentación óptica escogida (índices de refracción de la muestra y dispersante y la absorción de la muestra) no es la adecuada y segundo que el sistema se encuentre sucio,

modificando las propiedades de dispersión de la muestra y alterando los resultados finales generando picos extraños.

- **Concentración**

Corresponde a la concentración en volumen de la dispersión de medida en la célula de medida. El cálculo de esta concentración está determinada por la Ley de Beer-Lambert, donde se incluye el parámetro de "Eficiencia de extinción" que depende de la propiedad óptica de la partícula.

- **D[4, 3]**

Representa el diámetro medio de la distribución en volumen y es considerado uno de los parámetros de calidad más importantes.

- **Percentiles**

Los percentiles son unos valores establecidos en % que indican lo que hay por debajo o por encima de un cierto tamaño. Los más destacados son:

- **D(v, 0,1)** o D(0,1): es el tamaño en micras por debajo del cual queda el 10% de la distribución. Denominado también Percentil 10.
- **D(v, 0,5)** o D(0,5): es el tamaño en micras por debajo del cual queda el 50% de la distribución y por tanto también por encima. Es conocido también como Percentil 50 o diámetro volumétrico mediano (mediana).
- **D(v, 0,9)** o D(0,9): es el tamaño en micras por debajo del cual queda el 90% de la distribución. Se denomina también Percentil 90.

- **Área superficial específica**

Se define como el área total de las partículas respecto al peso total de las mismas; su unidad es m^2/g .

- **Moda**

Corresponde el valor de tamaño más común de la distribución de partículas, y coincide con el pico más alto de la distribución.

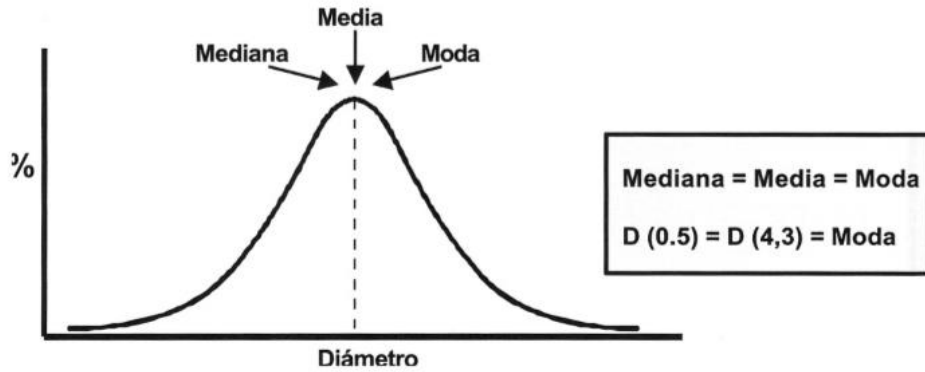


Figura 36. Representación de la media, mediana y moda en una distribución normal o gaussiana [40].

Si se desea un informe del tamaño de partícula más común en la muestra, se puede elegir entre los siguientes parámetros: media, mediana, moda. En la figura 36 la distribución del tamaño de partícula es simétrica y los tres valores coinciden exactamente, sin embargo si la distribución es asimétrica, como en la mayoría de las muestras que se analizan, los parámetros de medida no son equivalentes.

6.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

6.6.1 Introducción al diseño de experimentos

Los experimentos se llevan a cabo con el objetivo de conseguir información acerca de un proceso o sistema particular. En todo proceso existen una variable de respuesta o dependiente, una variable de entrada o manipulada, y una serie de factores controlables y no controlables. El objetivo de la experimentación es determinar qué variables son las que más afectan a la variable de respuesta, y cómo ajustar los factores controlables para mantener la variable de respuesta dentro de los límites deseados, a la vez que se minimiza el efecto de los factores no controlables [44].

La experimentación se puede llevar a cabo de varias opciones [44]:

- Prueba y error: se selecciona arbitrariamente una combinación diferente de los factores, cada vez que se realiza un experimento. Este planteamiento tiende a ofrecer información de baja utilidad.
- Experimentar con un factor a la vez: considerando solo un factor constante para determinar su efecto en ese experimento. Este planteamiento es extremadamente

ineficiente y puede llevar a conclusiones incorrectas en caso de que cualquiera de los factores interactúe.

- Usar un diseño de experimentos estadístico: permite establecer una serie de experimentos que generen la mayor información acerca de los factores y su interacción entre ellos en el menor número de experimentos como sea posible.

El diseño de experimentos se utiliza ampliamente tanto en la etapa de desarrollo de procesos y productos como en la etapa de fabricación. Algunas aplicaciones típicas son:

- Caracterización de un proceso.
- Optimización de un proceso.
- Diseño de un producto.

Entre los diferentes de diseños experimentales estadísticos (categórico de un solo factor, de cribado, de superficie de respuesta, etc.), se explicará solamente el de superficie de respuesta al ser el empleado en la realización de este proyecto.

6.6.2 Diseño de Superficies de Respuesta

La Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta. Puesto que “óptimo” implica a menudo un mínimo o máximo, los diseños para optimización implican por lo menos tres niveles por cada factor para poder estimar la curvatura [45].

En este proyecto, con la superficie de respuesta se busca obtener una combinación de tratamientos, los cuales varían en una serie de parámetros experimentales (pH, concentración de proteína, fuerza iónica, presión y número de pases en el homogenizador), que permitan obtener diferentes tamaños de partícula o una determinada viscosidad y encontrar el tratamiento óptimo en cuanto agregación. Es decir, establecer las condiciones del tratamiento que permita obtener un

microparticulado con la mayor agregación posible, con su tamaño y viscosidad correspondientes.

Entre los diseños de superficie de respuesta se encuentran:

- *Diseño Factorial a tres-niveles*
- *Diseño Box-Behnken*

6.6.2.1 Diseños Factoriales con Tres-Niveles

El diseño central compuesto implica cinco niveles de cada factor experimental ($-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$). Diseños más simples pueden realizarse usando solamente tres niveles por cada factor, un nivel bajo (-1), nivel central (0), y un nivel alto (+1). Los diseños factoriales a tres niveles generan corridas en cada combinación de estos tres niveles. Por ello, a menos que el número de corridas no sea una preocupación, el diseño factorial a 3 niveles usualmente no es la mejor opción. Por ejemplo, con 3 factores experimentales, se obtienen $3^3 = 27$ corridas [44].

6.6.2.2 Diseño Box-Behnken

Los diseños de *Box-Behnken* parten siempre de tres niveles en cada variable. Su algoritmo de generación de experimentos consiste en plantear diseños factoriales completos a dos niveles (tomando el nivel alto y el bajo) entre parejas de variables, manteniendo el resto de variables en su nivel intermedio. Además se realizan tres réplicas del punto central (con todas las variables en nivel intermedio) [46]. En la figura 37 se muestra un esquema de la generación de experimentos en un diseño de *Box-Behnken* con 3 variables.

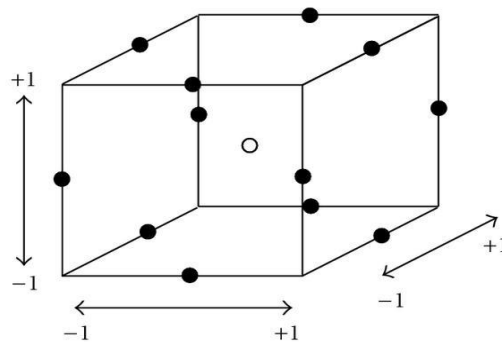


Figura 37. Diseño de *Box-Behnken* con 3 factores

Por ejemplo, un diseño *Box-Behnken* con 3 factores (con puntos al centro omitidos) se muestra en la tabla VIII:

Tabla VIII. Diseño de Box-Behnken con 3 factores [44].

Corrida	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1

Cada conjunto de 4 corridas consecutivas es un diseño experimental con 2 niveles implicando seleccionar un par de factores. Además, de 3-5 puntos al centro en (0, 0, 0) pueden agregarse al diseño. El diseño es considerablemente más pequeño que un factorial a tres niveles [44].

6.6.2.3 Ventajas e inconvenientes de la MRS

La Metodología de Superficie de Respuesta presenta una serie de ventajas en comparación con los clásicos métodos experimentales [47]:

- Ofrece una gran cantidad de información a partir de un número pequeño de experimentos, en cambio la metodología clásica necesita un gran número de experimentos para explicar el comportamiento de un sistema.
- Permite observar el efecto de la interacción de los parámetros independientes en la respuesta.

Sin embargo, el principal inconveniente del diseño de superficie de respuesta radica en la dificultad de encajar polinomios de 2° orden [47].

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 ALIMENTACIÓN DE PARTIDA

La materia prima que se empleó en el proceso de microparticulación fue un WPC-60 en polvo procedente del suero lácteo generado durante la fabricación de queso, suministrado por *WHEYCO (Alemania)*, cuya composición y características figuran en la tabla IX.

Tabla IX. Composición en % del WPC-60.

<i>Componentes</i>	<i>WPC-60</i>
<i>Proteína</i>	59,37
<i>Lactosa</i>	26,78
<i>Grasa</i>	5,05
<i>NPN</i>	1,41
<i>Cenizas</i>	5,05
<i>Extracto seco</i>	97,66

7.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental consistió en el ajuste de las variables pH, concentración proteica de la alimentación, fuerza iónica, presión y número de pases en el homogenizador con el objetivo de estudiar el efecto de estas variables sobre las características finales del microparticulado, cuyo proceso productivo se basó en la combinación de un tratamiento térmico y un tratamiento mecánico. Para ello se partió de un WPC-60 con el fin de obtener un producto final con un tamaño de partícula, viscosidad y porcentaje de proteína microparticulada adecuados para ser incorporado a productos bajos en grasa.

El tratamiento térmico seleccionado fue de 80°C durante 50 minutos, en cambio en otros estudios paralelos llevados a cabo se trabajó con un WPC-35 a 90°C durante 25 minutos [65]. Como la lactosa tiene un efecto protector frente a la desnaturalización térmica de la β -Lg (78°C) [48] y la relación proteína-lactosa es mayor en el WPC-60 que en el WPC-35, se consideró disminuir la temperatura y compensarla aumentando el tiempo del tratamiento térmico.

Para la aplicación del tratamiento térmico se empleó una placa calefactora/agitadora *RCT basic* (IKA, Alemania) con un sistema de control de temperatura *ETS-D5* (IKA, Alemania). Para la agitación de las disoluciones se empleó un imán. En el tratamiento mecánico se utilizó un homogenizador simple *Panda* (NIRO-SOAVI, Italia).

El protocolo experimental seguido en los ensayos realizados consistió en disolver el WPC-60 en agua mediante agitación a 500 rpm durante 45 minutos para favorecer la hidratación de las proteínas, añadiendo azida de sodio (NaN_3) 0,1% p/p como bactericida para conservación de las muestras. Transcurrido dicho tiempo se tomaban las muestras correspondientes a la disolución inicial (DI) para llevar a cabo las analíticas pertinentes. Posteriormente, se ajustaba la fuerza iónica añadiendo la cantidad de CaCl_2 necesaria en cada caso (0, 45, 90 mM CaCl_2). Tras 10 minutos de espera, para favorecer la disolución de las sales añadidas, se ajustaba el pH correspondiente (pH 4, 5,5 y 7) con una disolución de sosa cáustica (NaOH) 1M o de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) al 38% p/p según correspondiera. Una vez ajustado, se calentaba la disolución a 80°C (~30 minutos se tardaba en alcanzar la temperatura), manteniéndola a dicha temperatura con una agitación a 700 rpm durante 50 minutos. Transcurrido ese tiempo, se tomaban las muestras correspondientes al tratamiento térmico (TT). Finalmente, se pasó la muestra por el homogenizador y se aplicó el tratamiento mecánico ajustando la presión y el número de pases correspondientes en cada caso, para analizar finalmente las muestras del tratamiento mecánico (TM).

Para la elección de la sustancia empleada para ajustar el pH ácido se realizaron pruebas previas con diferentes ácidos para comprobar cuál de ellos permitía reducir el pH utilizando menos volumen: ácido láctico y ácido cítrico. El primero no se consideró adecuado por ser un producto marrón que pardeaba el producto final por lo que se empleó ácido cítrico en una concentración del 38% p/p. No obstante, la sustancia más común para ajustar pHs ácidos es el HCl pero no se pudo utilizar al estar el producto final destinado al campo alimentario. Para ajustar a pHs básicos se empleó NaOH por ser una de las sustancias más habituales y apta en el sector alimentario.

La toma de muestra se llevó a cabo con micropipetas, recogiendo volúmenes de aproximadamente 13 mL en tubos de plástico graduados. Los criterios para la elección de los tiempos de toma de muestra fijados en base a la necesidad de comprobar que en

todos los ensayos se partió de muestras homogéneas, el interés en el estudio del grado de desnaturalización de las proteínas en el tratamiento térmico y, finalmente, la necesidad de conocer las características del microparticulado final obtenido en cada caso tras el tratamiento mecánico.

7.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El diseño experimental que se empleó en el desarrollo del proyecto fue un diseño de tipo estadístico, el cual permitió establecer una serie de experimentos con el objetivo de generar la mayor información posible acerca de la influencia de una serie de factores sobre las variables de estudio.

Los diferentes tratamientos realizados durante la experimentación en el proceso de microparticulación proteica a partir de WPC-60, se determinaron a partir de la metodología de superficie de respuesta (MSR) por medio del programa estadístico *Statgraphics (Centurion XV version) statistical analysis and data visualization software (Statpoint Technologies Inc, USA)*.

En la primera parte experimental del proyecto de microparticulación se estudió un tratamiento térmico y uno mecánico bajo condiciones invariables de este último (300 bar y 1 pase en el homogenizador). En el diseño de superficie de respuesta se seleccionaron 3 factores experimentales (pH, concentración de proteína en la alimentación y fuerza iónica) y 3 variables de respuesta: el tamaño de partícula, representado por el $D(v,0,5)$, la viscosidad a 100 s^{-1} y el porcentaje de proteína agregada en el tratamiento térmico y microparticulada en el tratamiento mecánico.

Dentro de la metodología de superficie de respuesta se eligió el diseño de *Box-Behnken*, para construir y analizar la planificación experimental, el cual permite seleccionar un límite inferior y un límite superior de cada parámetro experimental (Tabla X) y además realiza 3 réplicas del punto central, estableciéndose los factores experimentales a nivel intermedio.

Tabla X. Límites inferiores y superiores de cada uno de los parámetros experimentales en condiciones de tratamiento mecánico invariables.

<i>Factores experimentales</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
<i>pH</i>	4	7
<i>Concentración de alimentación (%)</i>	3	11
<i>Fuerza iónica (mM CaCl₂)</i>	0	90

Dicho diseño permitió establecer 15 experimentos a valores variables de los factores experimentales, generando diferencias en el producto final del tratamiento térmico y mecánico del proceso de microparticulación.

En la segunda parte del proyecto, se estudió el efecto de la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico (homogenización) sobre las variables de respuesta previamente comentadas.

En este caso, se ha escogido el *diseño factorial a tres niveles*, seleccionando un nivel inferior, medio y superior de cada variable experimental (Tabla XI), donde el valor del nivel intermedio viene dado por el promedio de los límites extremos, generándose corridas en cada uno de estos tres niveles.

Tabla XI. Límites inferiores y superiores de los parámetros experimentales en la etapa en condiciones de tratamiento mecánico variables.

<i>Factores experimentales</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
<i>Presión (bar)</i>	300	700
<i>Nº de pases</i>	1	5

Con el *diseño factorial de tres niveles* se establecieron 9 tratamientos mecánicos diferentes, los cuales variaron en la presión y el número de pases, generando diferencias en cada una de las variables de estudio del producto microparticulado final.

7.4 EQUIPOS Y ANALÍTICAS

La caracterización de las diferentes muestras recogidas durante la etapa experimental del proceso de microparticulación se llevó a cabo mediante la realización de analíticas de cada una de las variables de respuesta a estudiar (tamaño de partícula, viscosidad y porcentaje de proteína agregada y microparticulada).

7.4.1 Distribución de tamaños de partícula.

La distribución de tamaños de partícula de las diferentes muestras de WPC-60 tratadas térmicamente y mecánicamente se determinó mediante difracción de luz láser con el equipo *Malvern Mastersizer S Long Bench* (*Malvern Instruments Ltd.*) (*Reino Unido*) mostrado en la figura 38.

Se ha utilizado como alimentador una unidad de dispersión de pequeño volumen, cuya velocidad se ajustó a 1600 rpm y, sobre la celda de flujo, se instaló la lente 300RF, a la que corresponde un intervalo de medida comprendido entre 0,05 y 880 μm . Los valores obtenidos estaban basados en volumen, por lo que el resultado que se presenta para cada intervalo de tamaños de partícula corresponde al volumen ocupado por las partículas de ese tamaño, dividido entre el volumen total de partículas en la muestra. Para expresar el tamaño medio de la distribución, se utilizó el $D(v, 0,5)$, que representa el tamaño de partícula por debajo del cual está el 50% de la muestra.



Figura 38. Equipo *Malvern Mastersizer S Long Bench*.

7.4.2 Medidas reológicas

Para la determinación de las propiedades reológicas de las diferentes muestras estudiadas se empleó un reómetro rotacional *HAAKE MARS* (*Modular Advanced Rheometer System*) II con un sistema *Peltier* para el control de la temperatura (Figura 39).



Figura 39. Reómetro rotacional *MARS II DE HAAKE*.

El sistema de rotación de los reómetros es de tipo *Searle*. La placa superior (rotor), gira un número de revoluciones constante o variable según convenga, mientras que la placa de abajo (vaso de medición), permanece en reposo. La placa superior al girar hace que la sustancia que se encuentra entre las dos placas empiece a fluir. La resistencia del líquido a ser cizallado es proporcional al momento de giro dependiente de la viscosidad, es decir, la resistencia de la muestra a ser cizallada permite al rotor solamente girar a una velocidad (velocidad de cizalla) que es inversamente proporcional a la velocidad de la muestra. Entre el motor y el eje de la placa superior está colocado un elemento de medición que registra ese momento de giro (resorte de acero que se torsiona). La torsión que sufre el resorte es una medida directa de la viscosidad del producto sometido a cizalla [34].

Las condiciones reométricas comunes a todos los ensayos fueron las siguientes:

- Ranura entre platos de 1mm.
- Temperatura de ensayo de 25°C.
- El sensor empleado fue un sensor placa-placa serrado de 35 mm de diámetro, PP35.
- Curva de flujo de 0,1 a 100 s⁻¹ tras 300 segundos en estabilización a 25°C.
- El sistema de trabajo del reómetro fue en modo CR, donde la velocidad de deformación se encuentra fijada.

Para estudiar el comportamiento reológico de las diferentes muestras se empleó el modelo *Newtoniano* y el modelo de *Ostwald de Waele*.

El modelo de *Ostwald de Waele*, definido por la ecuación $\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$, donde τ es el esfuerzo cortante, k el coeficiente de consistencia, $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación y n el índice de comportamiento del fluido, se utilizó para determinar la naturaleza de los fluidos, newtonianos ($n=1$) o pseudoplásticos ($n<1$), siendo estos últimos generalmente los más comunes en el proyecto considerado.

Para determinar si un fluido se ajusta adecuadamente al modelo reológico se tiene en cuenta un parámetro de ajuste (r^2) que si es superior al 90% se puede decir que el fluido se ajusta correctamente al modelo correspondiente. En algunos casos puede suceder que las muestras tratadas mecánicamente presenten un buen ajuste tanto al modelo de *Ostwald de Waele* como al *Newtoniano*.

El parámetro reológico seleccionado para caracterizar las muestras en la explicación de los resultados fue la viscosidad a 100 s^{-1} .

Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado, ya que se trató de muestras que en algunos casos presentaron cierta grumosidad debido a la existencia de grandes agregados, lo cual hace que sean poco homogéneas y uniformes y por tanto, se generen errores en la medición. El cálculo de los distintos parámetros reológicos se realizó empleando el software *Rheowin 3 Data Manager de HAAKE*.

7.4.3 Centrifugación y proteína agregada/microparticulada

La determinación de porcentaje de agregación proteica se realizó en base al volumen de sedimento generado tras una operación de centrifugación. Cada una de las muestras se centrifugaron (*High speed refrigerated centrifuge model 6500, KUBOTA, Japan*) (Figura 40) a 15000 rpm y a 20°C durante 20 minutos; obteniéndose un sedimento (proteína agregada o microparticulada) y un sobrenadante (Figura 45).



Figura 40. Centrífuga *KUBOTA 6500*.



Figura 41. Resultado tras centrifugación de las muestras correspondientes a la disolución inicial (DI), tratamiento térmico (TT) y tratamiento mecánico (TM) de un determinado ensayo. En cada una de las muestras se diferencia el sobrenadante y el sedimento.

Posteriormente, se anotaron los volúmenes de cada muestra tras la centrifugación y después el del sobrenadante cuando este se separó del sedimento y fue recogido en otro tubo de muestra (Figura 42).

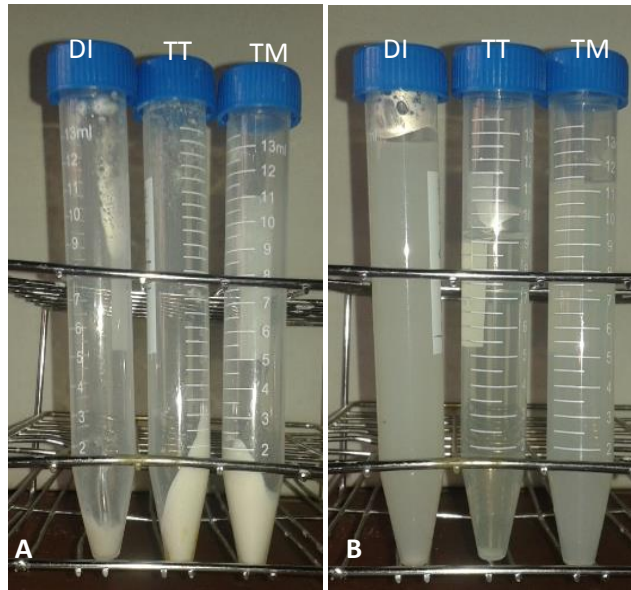


Figura 42. En la imagen A se ilustran los sedimentos de proteína agregada y en la imagen B los sobrenadantes.

La determinación del porcentaje de agregación proteica tuvo lugar mediante una ecuación matemática que incluye ambos volúmenes:

$$\% \text{ Centrifugación} = [(V_i - V_s) / V_i] \cdot 100$$

donde V_i es el volumen inicial (volumen tras la centrifugación) y V_s es el volumen del sobrenadante.

8 RESULTADOS EXPERIMENTALES

A lo largo de este apartado se comentarán y discutirán los resultados obtenidos en la parte experimental del proyecto.

Durante la experimentación del proceso de microparticulación del WPC-60 se han distinguido dos fases principalmente: el tratamiento térmico, que depende de los factores experimentales (pH, concentración de alimentación del WPC-60 y fuerza iónica) correspondientes a cada ensayo y el tratamiento mecánico, determinado por las variables experimentales mencionadas y la presión y el número de pases en el homogenizador.

En función de las características de cada ensayo, se obtendrán diferentes resultados en cada una de las variables de respuesta de estudio (tamaño de partícula, viscosidad y porcentaje de agregación y de proteína microparticulada), tanto para el tratamiento térmico como para el tratamiento mecánico.

8.1 ESTUDIO DE LA DISOLUCIÓN INICIAL

Inicialmente, se preparó una disolución en agua al 3%, 7% y 11% p/p de proteína de WPC-60 dependiendo del tipo de ensayo, siendo posteriormente sometida a un proceso de agitación con el objetivo de favorecer la hidratación de las proteínas. Por tanto, la disolución inicial es una etapa de hidratación de las proteínas. Finalmente, se determinaron las características de esta disolución inicial por medida directa de las variables de respuesta previamente especificadas.

8.1.2 Resultados de la disolución inicial

En la tabla XII se muestran los diferentes resultados que se obtuvieron de tamaño, viscosidad y proteína insolubilizada variando las concentraciones proteicas de alimentación de WPC-60 en cada uno de los ensayos que se realizaron.

Tabla XII. Resultados del tamaño $D(v, 0,5)$ (μm), viscosidad (100s^{-1}) (cP) y porcentaje de proteína insolubilizada de las disoluciones iniciales a distinta concentración de alimentación.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración alimentación (% p/p)</i>	<i>D(v, 0,5) (μm)</i>	<i>η 100 s⁻¹ (cP)</i>	<i>Proteína insolubilizada (%)</i>
1	7	0,44	2,57	2,44
2	7	0,42	2,41	2,4
3	7	0,43	2,93	2,38
4	3	0,43	1,95	2,4
5	11	0,43	4,10	2,36
6	7	0,46	2,73	2,36
7	3	0,45	2,03	1,58
8	3	0,43	1,97	3,2
9	7	0,55	2,84	4,65
10	3	0,59	1,54	0,79
11	11	0,42	3,92	4,76
12	11	0,43	3,92	1,59
13	7	0,42	2,81	1,57
14	7	0,42	2,43	1,59
15	11	0,42	3,98	2,36

Según los resultados de la tabla XII, en la disolución inicial no se observan grandes diferencias en cada una de las variables de respuesta. Sin embargo, existe una tendencia a aumentar la viscosidad y el porcentaje de proteína insolubilizada cuando se incrementa la concentración proteica de la disolución. Por último, el tamaño se

mantiene constante a diferentes concentraciones, salvo en dos ensayos (9 y 10) donde se observan ligeras diferencias respecto al resto, probablemente debidas a pequeños errores en la determinación de la medida.

A continuación, se expondrán las gráficas de dos ensayos correspondientes a la disolución inicial con diferente concentración de alimentación, con la finalidad de comparar las diferencias existentes en cada variable de respuesta (tamaño, viscosidad y % de proteína insolubilizada).

Los ensayos seleccionados son comparados en la tabla XIII:

Tabla XIII. Comparativa del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad a 100 s^{-1} y porcentaje de proteína insolubilizada de dos ensayos a diferente concentración de alimentación.

<i>Ensayo</i>	<i>Concentración de alimentación (% p/p)</i>	<i>$D(v, 0,5)$ (μm)</i>	<i>η a 100 s^{-1} (cP)</i>	<i>Proteína insolubilizada (%)</i>
4	3%	0,43	1,95	2,40
11	11%	0,42	3,92	4,76

8.2.1.1 Tamaño de partícula

En la figura 43, se muestra la comparativa del tamaño de partícula de dos ensayos a diferente concentración de proteína de la disolución inicial.

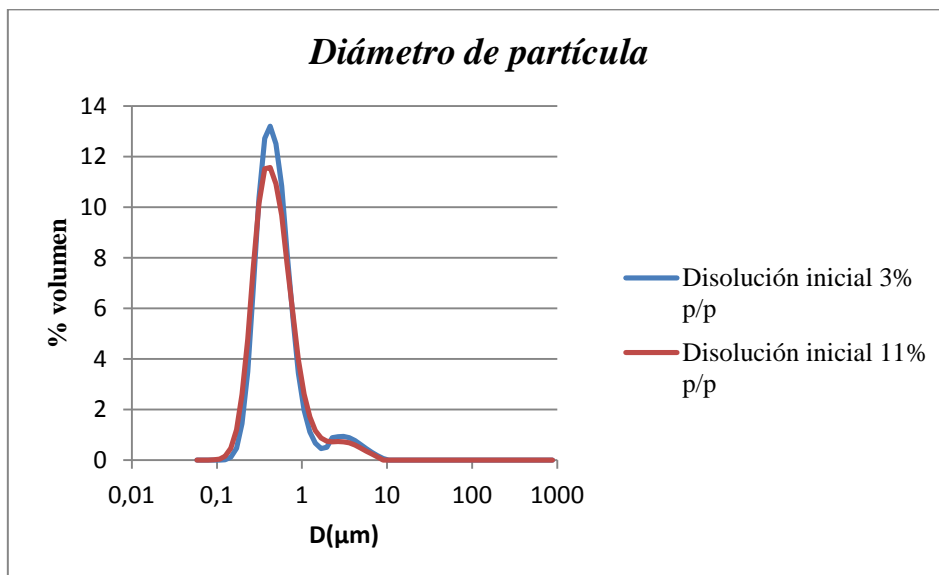


Figura 43. Representación gráfica del porcentaje en volumen frente al diámetro de partícula (D) (μm) a diferente concentración proteica en la disolución inicial.

En el eje de ordenadas se representa el $D(\mu\text{m})$ y en el de abscisas el porcentaje en volumen, es decir, el volumen de partículas que presentan un determinado tamaño con respecto al volumen total de todas las partículas.

Observando la gráfica 43, no se aprecian diferencias en el tamaño de partícula a diferente concentración proteica de la disolución, ya que ambos ensayos presentan un pico con un tamaño de partícula muy similar. Por tanto, en un principio parece ser que en la disolución inicial el tamaño no varía con la concentración de alimentación.

8.2.2.2 Viscosidad

La siguiente variable que se analizó fue la viscosidad, un parámetro reológico. En la figura 44 se muestran dos gráficas correspondientes a la reología de las réplicas de cada uno de los dos ensayos anteriormente seleccionados. En el eje Y se representa el esfuerzo cortante (Pa), en el eje X la velocidad de deformación (s^{-1}) y en el eje Y2 (eje Y secundario) la viscosidad (cP).

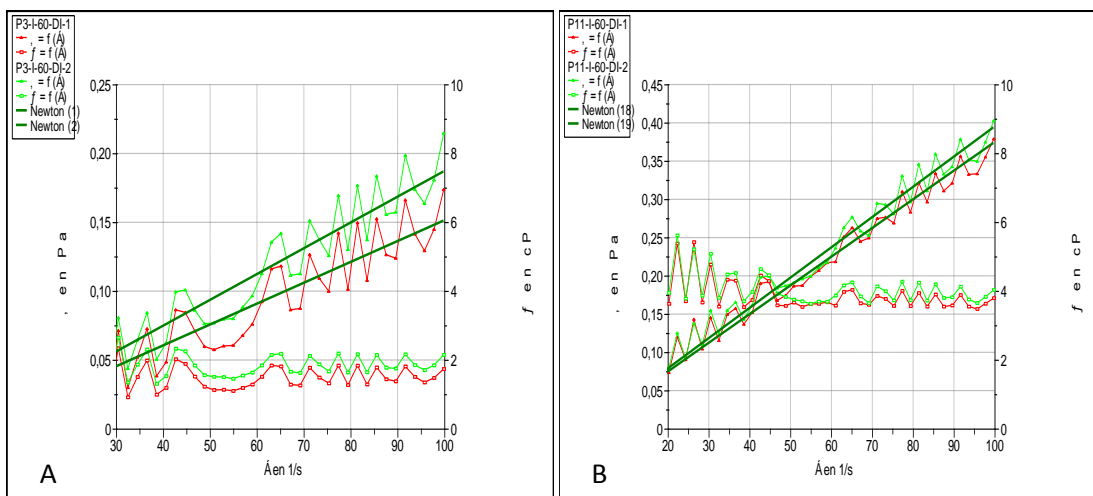


Figura 44. Representación del comportamiento reológico de dos ensayos con distinta concentración proteica en la disolución inicial. En la gráfica A (3% p/p) el eje Y está comprendido entre 0-0,25 Pa y en la gráfica B (11% p/p) entre 0-0,45 Pa.

Tabla XIV. Valores que caracterizan el fluido de estudio al 3 y 7% de concentración de proteína de la disolución.

<i>Concentración de alimentación (% p/p)</i>	<i>r</i>	<i>n</i>	<i>η a $100s^{-1}$</i>
3	0,94	1	1,95
11	0,98	1	3,92

Teniendo en cuenta las gráficas de la figura 48 y los datos observados en la tabla XIV, se pudo determinar que son fluidos newtonianos ($n=1$), es decir, la viscosidad permanece constante para cualquier valor de la velocidad de deformación y depende únicamente de la presión y temperatura para una sustancia dada. Además, presentan en ambos casos un ajuste al modelo de fluido newtoniano por encima del 90%. Por último, teniendo en cuenta los resultados, la viscosidad resultó ser mayor al aumentar la concentración de alimentación.

8.2.2.3 Separación de proteína insolubilizada por centrifugación

Otra de las variables de respuesta que se analizó es el porcentaje de proteína insolubilizada en la disolución inicial. Se observó que la disolución al 11% de proteína presentaba mayor porcentaje de proteína insolubilizada (4,76 %) que la del 3% (2,36%). Por tanto, parece ser que una mayor concentración proteica en la disolución aumenta el porcentaje de proteína insolubilizada.

Tras la disolución de la proteína, se ajustó la concentración en $CaCl_2$, que determina la fuerza iónica (0 mM, 45 mM y 90 mM), y se ajustó el pH (4, 5,5 y 7) según las condiciones del ensayo. Una vez ajustados los parámetros iniciales, la disolución es sometida a un tratamiento térmico.

8.2 TRATAMIENTO TÉRMICO

La disolución fue sometida a un proceso térmico de 80°C durante 50 minutos en continua agitación. Finalizado el periodo, se realizaron las analíticas correspondientes a cada variable de respuesta.

8.2.1 Resultados del tratamiento térmico

A continuación, se indica en la tabla XV los resultados obtenidos de cada variable de respuesta en la etapa de tratamiento térmico.

Tabla XV. Resultados del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad ($100s^{-1}$) y porcentaje de agregación proteica en el tratamiento térmico.

<i>Ensayo</i>	<i>pH</i>	<i>Concentración alimentación (% p/p)</i>	<i>Fuerza iónica (mM CaCl₂)</i>	<i>D(v, 0,5) (μm)</i>	<i>η a 100 s⁻¹ (cP)</i>	<i>Agregación proteica(%)</i>
1	5,5	7	45	44,28	361,90	35,29
2	5,5	7	45	43,09	383,95	31,90
3	5,5	7	45	36,67	360,10	34,37
4	4	3	45	10,28	6,04	15,87
5	5,5	11	90	205,4	2258	46,40
6	7	7	90	139,74	322,20	24,19
7	5,5	3	0	24,65	46,32	15,20
8	7	3	45	72,27	12,29	13,18
9	4	7	90	6,48	98,55	55,37
10	5,5	3	90	36,83	42,99	15,08
11	4	11	45	5,54	344,05	68,54
12	7	11	45	249,19	438,35	46,83
13	4	7	0	4,20	37,07	27,42
14	7	7	0	135,01	293,30	29,27
15	5,5	11	0	87,83	954,65	52,71

En la etapa de tratamiento térmico se descartaron los valores de viscosidad de tres ensayos (5, 14 y 15) que no se tuvieron en cuenta para realizar la superficie de respuesta. Los ensayos 5 y 15 se descartaron debió a problemas de agitación con el imán y control de la temperatura durante el periodo de tratamiento térmico, generando disoluciones de agregados de gran tamaño que dificultaban la agitación, dando lugar a valores de viscosidad muy poco fiables. Por otro lado, aunque no haya problemas de agitación ni de control de la temperatura, pueden surgir dificultades en la medida de la

viscosidad en el reómetro al obtener valores muy dispares entre réplicas de una misma muestra, como ocurrió en el ensayo 14. Estos errores de medición pudieron ser debidos a que la muestra no es homogénea, ya que unos de los requisitos importantes para evitar errores de medición en el reómetro es que la muestra sea homogénea para que el husillo del reómetro mida uniformemente.

Según los resultados presentes en la tabla XV, se observa que la variación de pH, concentración de proteína y fuerza iónica generan distintos resultados en cada una de las variables de estudio.

A continuación, se expondrán las gráficas correspondientes a dos ensayos del tratamiento térmico bastante diferenciados y comentarán las diferencias entre ellos en cuanto a las variables de respuesta de estudio.

Los ensayos seleccionados son los siguientes:

Tabla XVI. Comparativa del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad a 100 s^{-1} y porcentaje de agregación proteica de dos ensayos que difieren en los factores de experimentación en la etapa de tratamiento térmico.

<i>Ensayo</i>	<i>$D(v, 0,5)(\mu\text{m})$</i>	<i>η a $100 \text{ s}^{-1}(\text{cP})$</i>	<i>Agregación proteica (%)</i>
<i>pH 4/7%/0 mM CaCl_2</i>	4,20	37,07	27,42
<i>pH 5,5/3%/ 90 mM CaCl_2</i>	36,84	42,99	15,09

8.2.1.1 Tamaño de agregados

En la figura 45 se compara el tamaño de los agregados de dos ensayos diferentes en cuanto a pH, concentración proteica de la disolución y fuerza iónica.

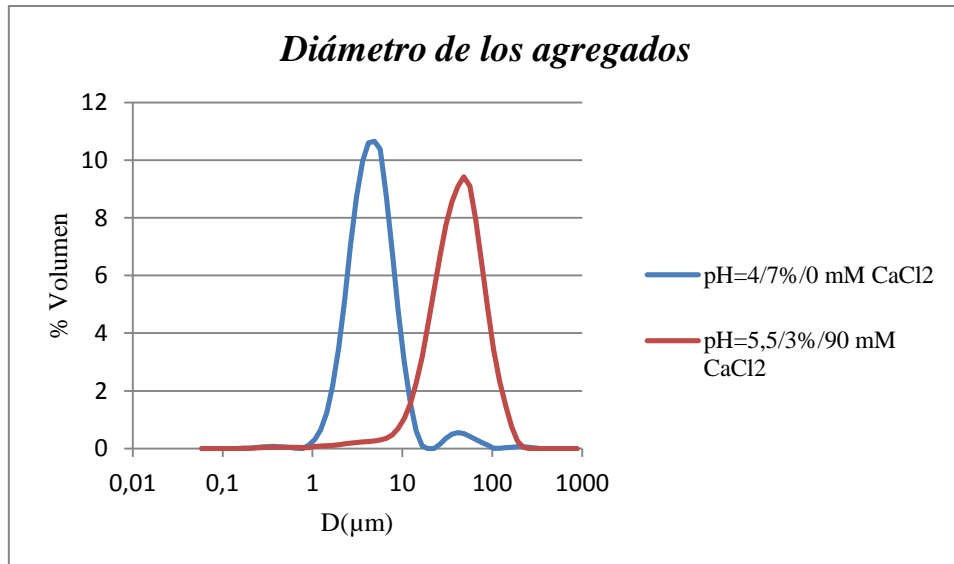


Figura 45. Comparativa del diámetro de partícula D (μm) en la etapa de tratamiento térmico de dos ensayos distintos.

En la figura 45 se observan diferencias en el tamaño de los agregados, siendo los de mayor diámetro aquellos correspondientes al ensayo realizado a pH 5,5, una concentración de alimentación del 3% y una fuerza iónica de 90 mM CaCl_2 , ya que la posición del pico representa una escala de mayor diámetro de partícula. Por tanto, esto significa que las variaciones en los factores experimentales influyen en el tamaño de los agregados en el tratamiento térmico. Estas diferencias significativas se explicarán posteriormente con más detalle.

8.2.1.2 Viscosidad

La siguiente variable que se analizó fue la viscosidad a 100 s^{-1} en el tratamiento térmico.

En las gráficas de la figura 46, se muestra la reología de dos réplicas de cada uno de los dos ensayos a comparar.

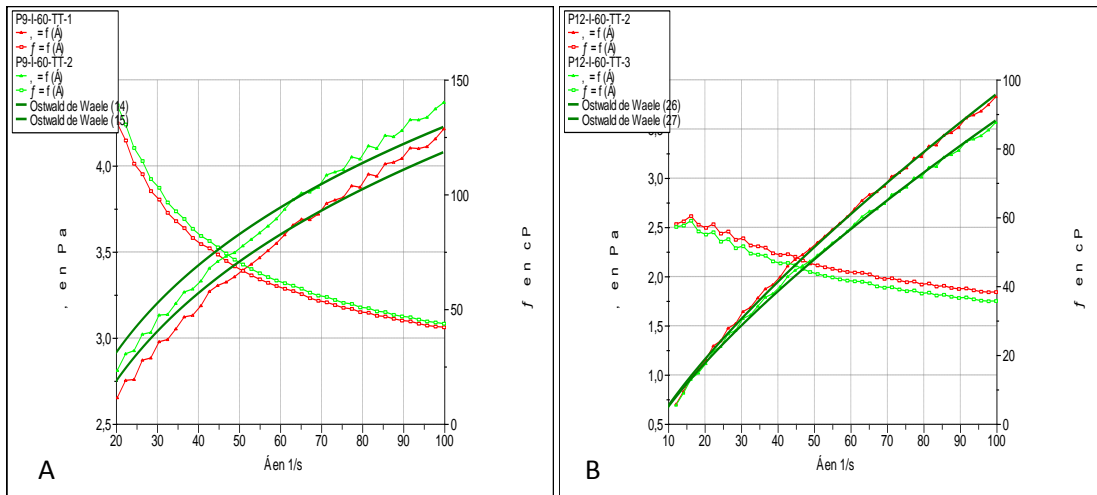


Figura 46. Representación del comportamiento reológico de dos ensayos con distinta concentración de la disolución en el tratamiento térmico. En la gráfica A (pH 4, 7% p/p, 0 mM CaCl_2) el eje Y está comprendido entre 2,5-4,5 Pa y en la gráfica B (pH 5,5, 3% p/p, 90 mM CaCl_2) entre 0,5-4,5.

Tabla XVII. Comparación de los parámetros que caracterizan la reología del fluido de cada uno de los ensayos de estudio.

Ensayo	R	k	n	$\eta 100 \text{ s}^{-1}(\text{cP})$
pH 4, 7%, fuerza iónica 0 mM CaCl_2	0,99	1,34	0,24	46,32
pH 5,5, 3%, fuerza iónica 90 mM CaCl_2	0,99	0,13	0,74	37,07

La curva que representa el fluido de la gráfica A de la figura 46 corresponde a un fluido no newtoniano, del tipo pseudoplástico ($n < 1$), ya que la viscosidad aparente disminuye al aumentar el esfuerzo cortante. Además, el fluido presenta un ajuste del 99% y una viscosidad a 100 s^{-1} de 46,32 cP.

Por otro lado, el fluido del ensayo correspondiente a la gráfica B también se caracteriza por ser pseudoplástico. Presenta un ajuste del 99% y una viscosidad a 100 s^{-1} de 37,07 cP, menor que en el caso anterior.

Comparando ambos ensayos, existen diferencias en la viscosidad observando que las variaciones en los factores experimentales generaron productos con diferentes viscosidades. Sin embargo, ambos presentan un mismo comportamiento reológico, lo que indica que dependiendo de las condiciones empleadas en el tratamiento térmico se

generan fluidos con un comportamiento más o menos pseudoplástico, según el valor de n . Estas diferencias se analizarán con mayor profundidad más adelante.

8.2.1.3 Porcentaje de proteína agregada tras centrifugación

La otra variable de respuesta que se analizó fue el porcentaje de proteína agregada en base al porcentaje centrifugado. Se observaron diferencias entre ambos ensayos, el primero (pH 4, 7% p/p, fuerza iónica 0 mM CaCl₂) presentó un 15,08 % de agregación proteica, en cambio el segundo (pH 5,5, 3% p/p, fuerza iónica 90 mM CaCl₂) un 27,42%.

Por tanto, se observó que las variaciones en cada uno de los factores experimentales generaron diferentes porcentajes de proteína agregada en el tratamiento térmico tras centrifugación. Dichas diferencias se estudiarán con mayor detalle posteriormente.

8.2.2 Superficie de respuesta del tratamiento térmico

Una vez se realizó la experimentación correspondiente a la etapa de tratamiento térmico del proceso de microparticulación, se procedió a introducir los resultados que se obtuvieron de cada variable de respuesta (tamaño, viscosidad y proporción de proteína agregada) con su ensayo correspondiente, caracterizado por las variables experimentales (pH, concentración de alimentación y fuerza iónica) empleadas, en el programa matemático y estadístico *Statgraphics (Centurion XV version) statistical analysis and data visualization software (Statpoint Technologies Inc, EEUU)*.

El programa estadístico *Statgraphics* permite construir una superficie de respuesta empleando un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que son útiles para la modelización y análisis en aplicaciones en las que una respuesta de interés es influenciada por distintas variables y el objetivo es optimizar esta respuesta [49].

En este proyecto, la superficie de respuesta permitió estudiar el efecto que tiene la variación de los factores experimentales sobre las variables de respuesta de estudio de manera conjunta.

A continuación, se muestran mediante gráficas la influencia de los factores de experimentación sobre cada tipo de variable de respuesta en la etapa de tratamiento térmico.

8.2.2.1 Tamaño de los agregados

El tamaño de partícula $D(v, 0,5)$ fue la primera variable de respuesta que se estudió. Presenta un ajuste, representado por el r^2 , del 96,84 % (Figura 47) y además cumple la siguiente ecuación matemática predictiva de la superficie de respuesta:

Tamaño $D(v, 0, 5)$

$$\begin{aligned}
 = & 296,49 - 68,6239 \cdot pH - 61,9741 \cdot \text{Concentración alimentación} \\
 & - 1,45837 \cdot \text{Fuerza iónica} + 5,70102 \cdot pH^2 + 7,56896 \cdot pH \\
 & \cdot \text{Concentración alimentación} + 0,00905556 \cdot pH \cdot \text{Fuerza iónica} \\
 & + 1,88436 \cdot \text{Concentración alimentación}^2 + 0,146368 \\
 & \cdot \text{Concentración alimentación} \cdot \text{Fuerza iónica} + 0,00848755 \\
 & \cdot \text{Fuerza iónica}^2
 \end{aligned}$$

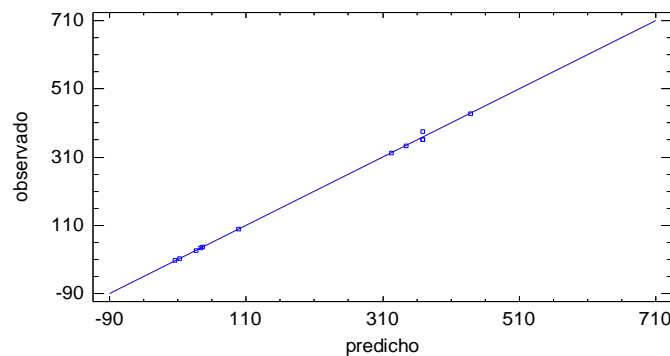


Figura 47. Comparativa de los resultados del tamaño observados con los predichos.

La figura 47 representa mediante puntos, los valores experimentales obtenidos correspondientes al tamaño, mientras que los representados por la recta corresponden a los predichos por la ecuación de la superficie de respuesta, es decir, se trata de una representación del grado de ajuste del r^2 . En este caso, los valores experimentales coinciden con gran exactitud con los predichos por la superficie de respuesta, justificando el buen ajuste de la superficie.

A continuación, se representan las gráficas que relacionan el efecto que tienen los distintos factores experimentales sobre el diámetro de partícula, en función del pH empleado en la experimentación (4, 5,5 y 7).

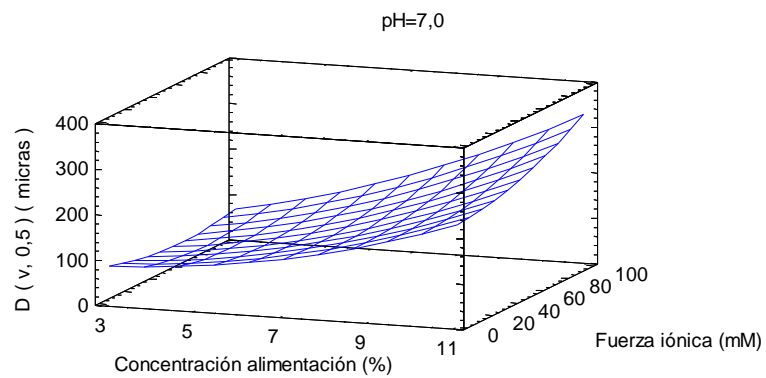
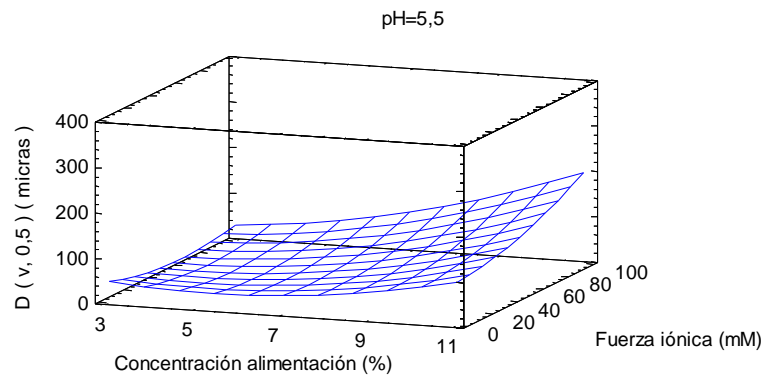
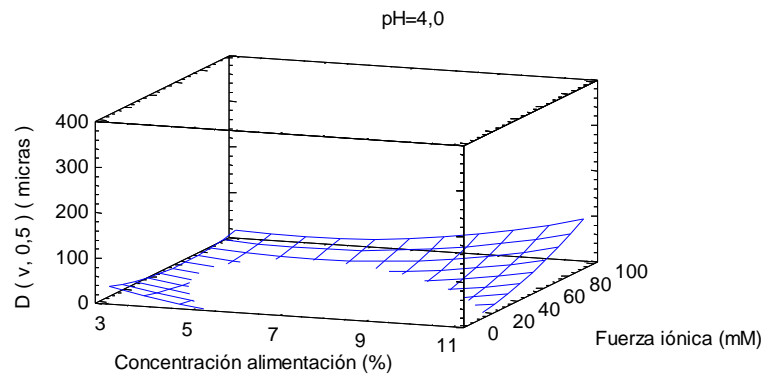


Figura 48. Superficie de respuesta del tamaño de partícula $D(v, 0,5)$ (μm) en función de la concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento térmico.

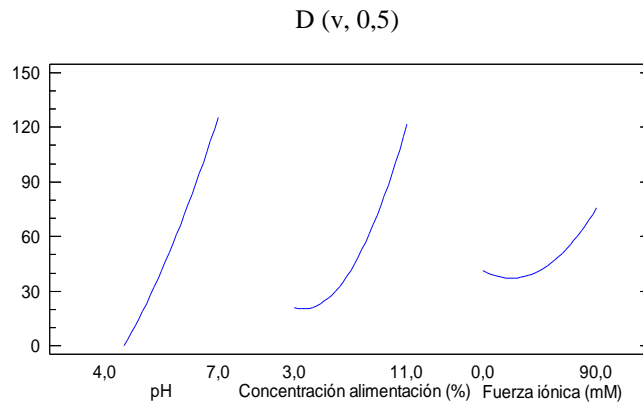


Figura 49. Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre el tamaño de partícula.

Se puede observar como en la figura 48 a pH 4 se aprecia una zona blanca que corresponde a los valores que son negativos. Esto se debió a que el programa utilizado aplica un modelo predictivo matemático y por tanto, estos valores se descartarán en la explicación de los resultados por carecer de sentido. Por otra parte, la figura 49 representa una combinación del diagrama de Pareto, es decir, la influencia de los diferentes factores experimentales, con la tendencia de cada uno de ellos.

De las figuras 48 y 49 se puede deducir que en la etapa de tratamiento térmico el pH, la concentración de proteína y la fuerza iónica influyen sobre el tamaño de partícula [50, 51], favoreciendo el incremento del mismo cuando aumentan cada uno de los factores experimentales.

Según la literatura, los agregados formados durante el tratamiento térmico presentaban un mayor peso molecular cuando se incrementaba la concentración de β -Lg (proteína mayoritaria), lo que demostró que el tamaño medio de los agregados aumentó con la concentración de proteína [16]. En cambio, se observaron diferencias importantes cuando varía el pH, consiguiéndose un mayor tamaño de partícula cuanto mayor es el valor del pH. En este caso, el mayor tamaño de los agregados tuvo lugar a pH 7. Sin embargo, se ha descrito anteriormente en previos trabajos que el mayor tamaño de agregado debería darse en el punto isoeléctrico (pI) [52]. El pI de la β -Lg es aproximadamente 5,1 [51] y a este pH la carga neta de la proteína es nula, y por tanto no existen repulsiones electrostáticas entre las proteínas. Como consecuencia de ello, se establecen interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y atracciones

electrostáticas localizadas entre grupos positivos de una proteína y grupos negativos de otra que van ser responsables de la gran tasa de agregación de proteína a ese pH [53]. Por tanto, según los resultados que se obtuvieron, el mayor tamaño de partícula debería obtenerse a un pH lo más próximo al pI de la β -Lg, que en este caso correspondió a pH 5,5 y no a pH 7, contradiciéndose con los resultados experimentales.

Sin embargo, estudios previos describieron que para cualquier pH comprendido entre 4,5 y 7, puede probarse que el número de partículas de β -Lg covalentemente enlazadas disminuye con la caída del pH [25], es decir, la unión entre proteínas tiende a disminuir, reduciéndose el tamaño de los agregados. Además, se describió también que el tamaño de partícula estuvo fuertemente influenciado entre pH 6,7 y 5,5, disminuyendo el mismo con la caída del pH [25]. Por tanto, esta referencia apoyaría los resultados experimentales que se obtuvieron, ya que la continua disminución del pH generó menores tamaños de partícula.

Se describió también que el efecto del pH fue muy complejo. Cuando este decrecía, se necesitaba más energía para exponer el grupo tiol de la β -Lg, que inducía a interacciones covalentes [11], por lo que sería más difícil formar enlaces covalentes y por tanto, más complicado enlazar proteínas de β -Lg para que el tamaño sea mayor. En cambio, cuando se incrementó el pH, tuvo lugar la formación de puentes disulfuro [11], favoreciendo la unión entre partículas y aumentando el diámetro de los agregados. Otras investigaciones también concluyeron que el aumento del pH determinó una mayor transformación de las proteínas nativas (monómeros/dímeros) a proteínas agregadas [11]. Por tanto, el incremento del pH justificó la formación de agregados de mayor tamaño como se observa en la figura 49.

Estudios realizados entre pH 6,5 y 8, determinaron que la β -Lg sufre un cambio conformacional y un replegamiento de las proteínas, conocido colectivamente como transición Tanford, provocando una mayor reactividad del grupo tiol de la proteína. *De la Fuente et. al* [16], identificaron el aminoácido responsable Glu89, que se encuentra oculto a pH 6,2, y queda expuesto a pH 7,1 y 8,2. Este cambio conformacional de la β -Lg tiene implicaciones funcionales para la liberación y unión reversible de ligandos. A pH 8 el grupo tiol de la β -Lg está fácilmente disponible para las reacciones, aumentando la tasa de polimerización a través de la interacción del grupo tiol y el enlace disulfuro, mientras que a valores por debajo de pH 7, la molécula tiene que ser desplegada de otra

forma para exponer el grupo tiol [16]. A pH neutro, los grupos tioles son los responsables del mecanismo de agregación durante el tratamiento térmico y en el caso de condiciones ácidas se piensa que los grupos tioles son inactivos [54]. En función a lo descrito, parece ser que a pH 7 se favoreció la agregación debido a una mejor disponibilidad del grupo tiol, lo cual explicaría por qué se generaron agregados de mayor tamaño respecto a los que se obtienen a pH 5,5 y 4.

Otro parámetro que influyó en el tamaño de partícula es la fuerza iónica. Se observa en la figura 49 que el tamaño de partícula se incrementa con la fuerza iónica.

Según estudios, la tasa de agregación de proteínas se correlacionó con el aumento de la concentración de sal y de proteína, y el efecto se aceleró con la temperatura [55]. Además, las altas temperaturas indujeron interacciones hidrófobas que conducen a la agregación en presencia de sal [55]. *Marangoni et al.*, [50] aseguraron que la adición de sales de CaCl_2 conduce a una disminución de las repulsiones electrostáticas entre las proteínas. Como consecuencia de ello, aumentó la tasa de agregación debido al efecto de reticulación del Ca^{+2} (*crosslinking*) mediante la formación de enlaces cruzados (puentes salinos) entre las proteínas [50], a través de un puente iónico entre dos grupos carboxilo adyacentes de diferentes cadenas de péptidos [56]. Por tanto, el aumento de la fuerza iónica condujo a la formación de partículas con un mayor diámetro [11, 51].

8.2.2.2 Viscosidad

La viscosidad es otra de las variables de respuesta que ha sido analizada en el tratamiento térmico. La superficie de respuesta construida en base a los resultados experimentales presenta un ajuste r^2 del 99,90 % (Figura 50).

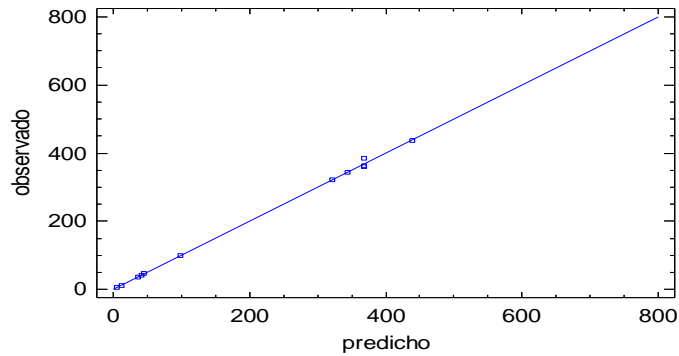


Figura 50. Comparativa de los resultados de viscosidad observados con los predichos.

En la figura 50 se observó una alta exactitud entre los valores experimentales y los predichos por la superficie de respuesta, confirmando el buen ajuste que presenta la viscosidad.

La viscosidad se representa con la siguiente fórmula matemática, donde se aprecia el efecto de las variables experimentales sobre la respuesta:

Viscosidad (100 s^{-1})

$$\begin{aligned}
 &= -1759,16 + 693,98 \cdot pH + 9,06508 \\
 &\cdot \text{Concentración alimentación} - 3,74708 \cdot \text{Fuerza iónica} \\
 &- 69,1539 \cdot pH^2 + 3,66873 \cdot pH \cdot \text{Concentración alimentación} \\
 &+ 1,28422 \cdot pH \cdot \text{Fuerza iónica} - 0,804457 \\
 &\cdot \text{Concentración alimentación}^2 + 0,661638 \\
 &\cdot \text{Concentración alimentación} \cdot \text{Fuerza iónica} - 0,0593116 \\
 &\cdot \text{Fuerza iónica}^2
 \end{aligned}$$

A continuación, se representan las gráficas que relacionan el efecto que tienen los distintos variables experimentales sobre la viscosidad, en función del pH empleado en la experimentación (pH 4, 5,5 y 7).

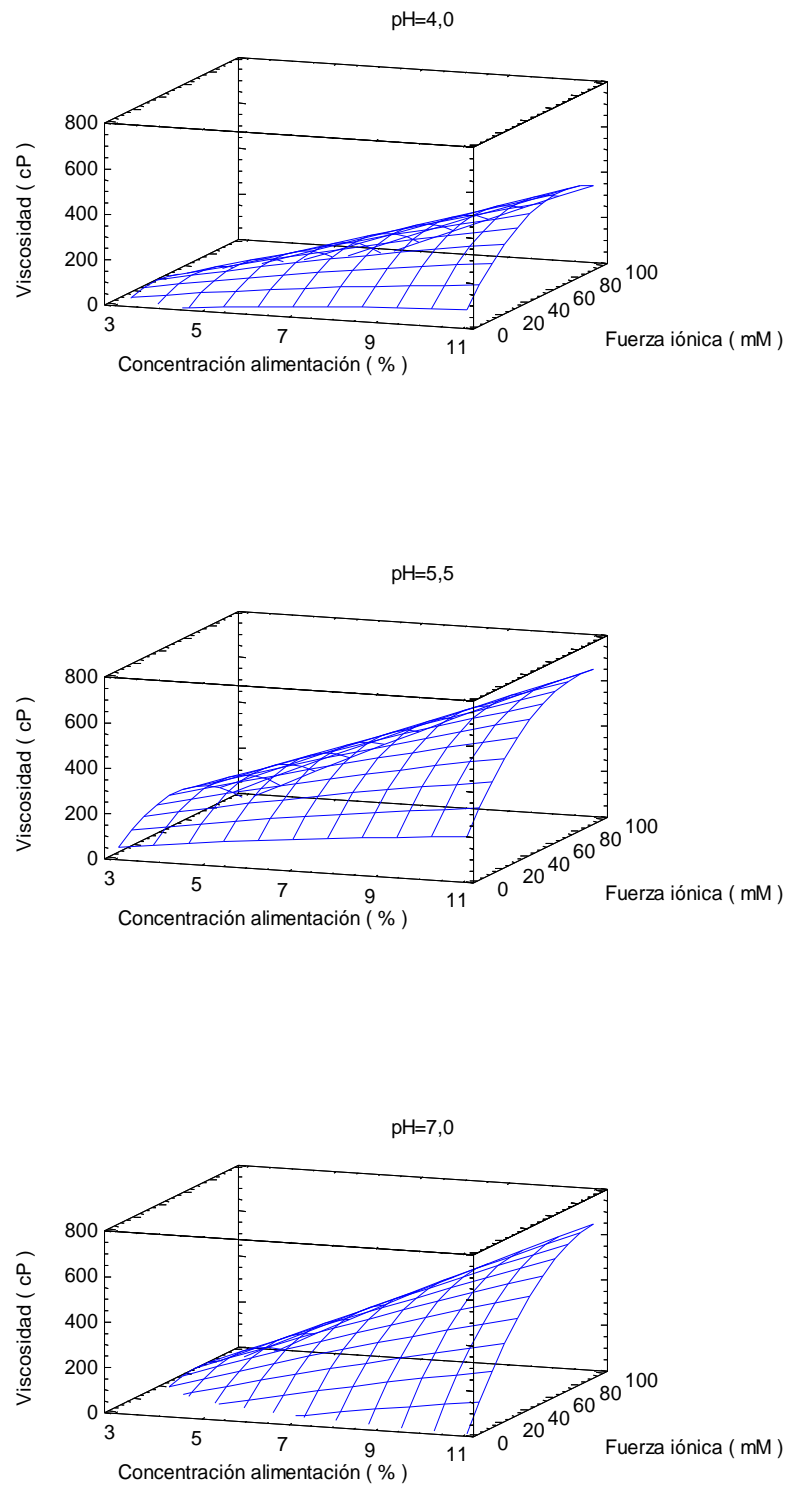


Figura 51. Superficie de respuesta de la viscosidad (100 s^{-1}) (cP), en función de la concentración proteica de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento térmico.

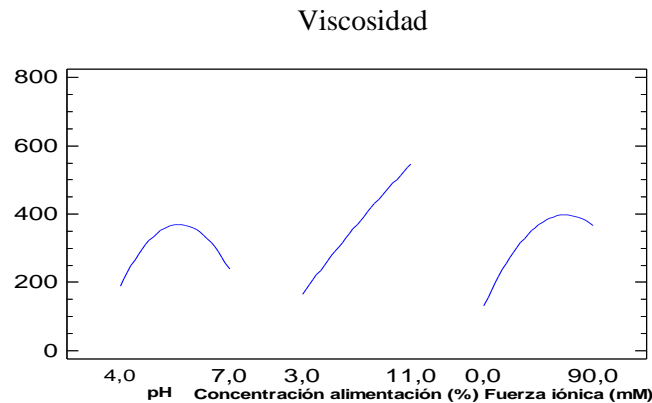


Figura 52. Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre la viscosidad.

Observando la figura 51 y 52, se puede concluir que la viscosidad del producto tratado térmicamente, aumentó con la concentración de alimentación y la fuerza iónica. Además, existen diferencias en la viscosidad cuando varían las condiciones de pH, obteniéndose valores inferiores de viscosidad a pH 4 respecto a pH 5,5 y 7.

A su vez, se demostró mediante estudios experimentales que la disminución del tamaño de partícula daba lugar a un descenso de la viscosidad y que se producían aumentos de viscosidad debido a una mayor agregación de las proteínas [57]. Por tanto, parece ser que puede existir una correlación entre el tamaño y la viscosidad, lo que explicaría que a pH 4 se alcancen también valores más bajos de viscosidad.

Por otro lado, es a pH 5,5 donde se consiguen los mayores valores de viscosidad porque es el pH más cercano al pI, donde las repulsiones electroestáticas entre las proteínas son mínimas y más se favorecerá la agregación de proteínas y mayor será la viscosidad. Mientras que a pH 7 la viscosidad resultó ser menor al alejarse del pI, predominando las cargas negativas y por ello, las repulsiones electroestáticas entre las proteínas serán mayores lo que disminuirán la asociación de partículas. Sin embargo, cuando se incrementa la fuerza iónica se alcanzaron valores muy similares de viscosidad tanto a pH 5,5 y 7 y además aumenta también a pH 4. Esto pudo ser debido a que al aumentar la concentración de CaCl_2 disminuyeron las repulsiones electroestáticas entre las proteínas y se establecieron enlaces iónicos que favorecen la asociación entre las partículas proteicas [50], favoreciendo el incremento del tamaño de los agregados y por tanto, la viscosidad del producto tratado térmicamente.

Además del estudio de la viscosidad, se analizó también el comportamiento reológico de los fluidos en el tratamiento térmico.

En el comportamiento reológico de los fluidos se estima “n” (índice de comportamiento del fluido). La superficie de respuesta construida en base a los resultados experimentales presenta un ajuste r^2 , del 99,97 % (Figura 53).

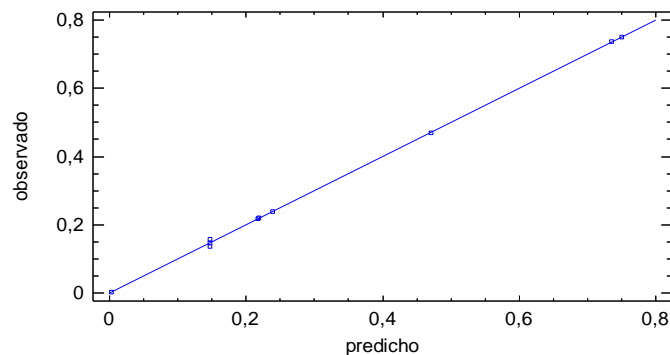


Figura 53. Comparativa de los resultados de "n" observados con los predichos en el tratamiento térmico.

Con la figura 53 se demostró que el ajuste de "n" es óptimo ya que los valores experimentales coinciden con los predichos por la superficie de respuesta.

Además, este índice cumple la siguiente ecuación predictiva de la superficie de respuesta:

$$\begin{aligned}
 n = & 4,93305 - 1,51943 \cdot pH + 0,0217979 \cdot \text{Concentración alimentación} \\
 & - 0,00691602 \cdot \text{Fuerza iónica} + 0,115511 \cdot pH^2 + 0,00928187 \cdot pH \\
 & \cdot \text{Concentración alimentación} + 0,00283728 \cdot pH \cdot \text{Fuerza iónica} \\
 & - 0,00775483 \cdot \text{Concentración alimentación}^2 - 0,00102467 \\
 & \cdot \text{Concentración alimentación} \cdot \text{Fuerza iónica} - 0,0000600493 \\
 & \cdot \text{Fuerza iónica}^2
 \end{aligned}$$

A continuación, se representan las gráficas que relacionan el efecto que tienen las diferentes variables experimentales sobre “n”, en función del pH empleado en la experimentación (pH 4, 5,5 y 7).

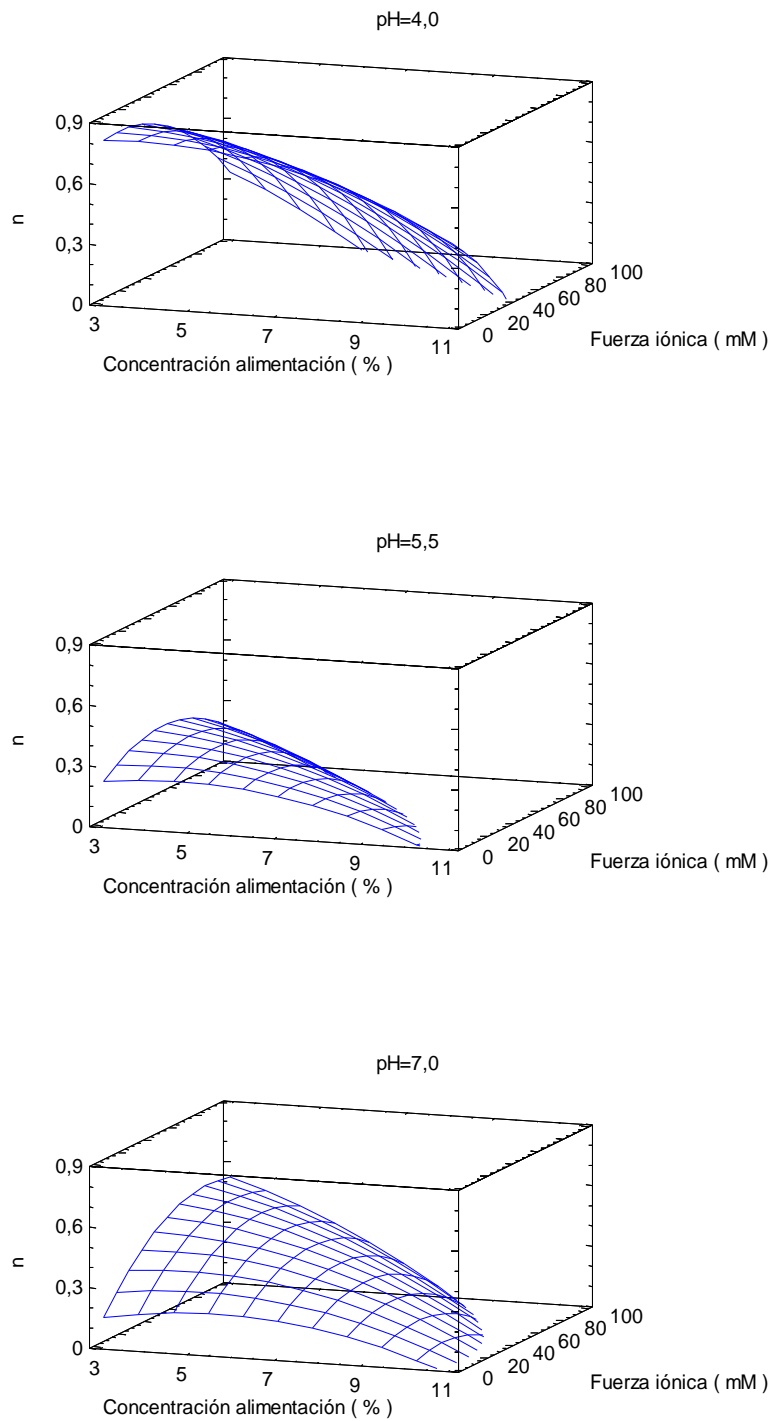


Figura 54. Superficie de respuesta de "n" en función de la concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento térmico.

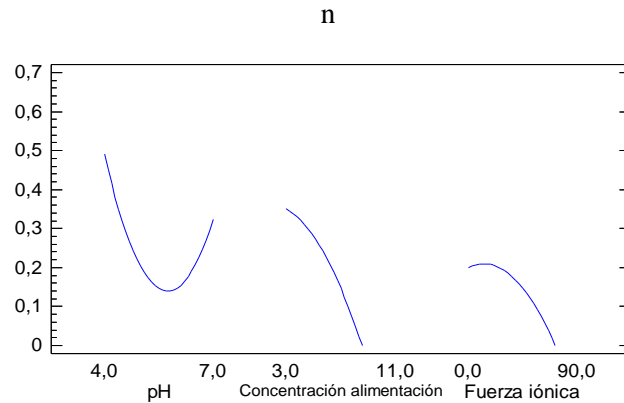


Figura 55. Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre “n” en el tratamiento térmico.

Antes de entrar en detalle con los resultados y su discusión, cabe recordar que los fluidos se clasifican en newtonianos ($n=1$) y no newtonianos (pseudoplásticos cuando $n<1$ y dilatantes $n>1$).

Teniendo en cuenta las superficies de respuesta (Figura 54) y las tendencias de cada factor experimental (Figura 55), el fluido resultó ser más pseudoplástico (más disminuye el valor de " n " < 1) cuanto mayor es la concentración de proteína, ya que al haber más proteína es más fácil que se agreguen a través de enlaces hidrofóbicos y disulfuro[58]. En cambio, el efecto del pH fue más complejo, ya que en la figura 60 se observa un mínimo (\sim pH 5,5) que corresponde al punto donde menor es el valor de “n”, indicando que el fluido fue más pseudoplástico que a pHs inferiores o superiores a dicho punto. Varios estudios confirmaron que los fluidos con bajas viscosidades tienden a tener un comportamiento newtoniano, por tanto, como a pH 4 la viscosidad fue menor respecto al resto, esto justificaría que el fluido sea el menos pseudoplástico de todos [58]. Por otro lado, un aumento en la fuerza iónica condujo a la formación de fluidos más pseudoplásticos. Posiblemente esto pudo deberse al efecto del CaCl_2 al disminuir las fuerzas electroestáticas entre las proteínas, las cuales estimulan la formación de agregados de mayor tamaño produciendo consecuentemente una mayor viscosidad del fluido.

8.2.2.3 Porcentaje de agregación tras centrifugación

La última variable de respuesta a estudiar es el porcentaje de agregación tras centrifugación. La superficie de respuesta construida en base a los resultados experimentales presenta un ajuste r^2 del 96,09 %, siendo la bondad del ajuste observable en la figura 56.

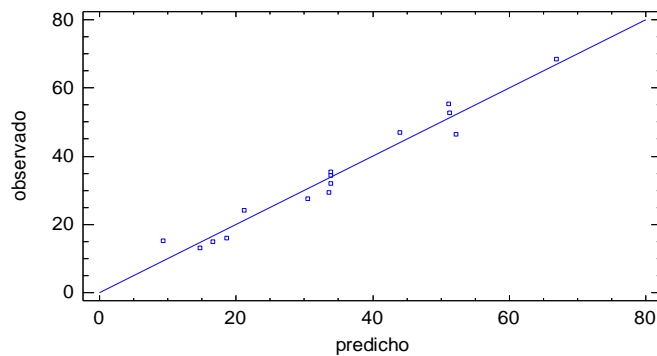


Figura 56. Comparativa de los resultados del porcentaje de agregación tras centrifugación observados con los predichos.

En la figura 56, los valores experimentales se ajustan adecuadamente con los predichos por la superficie de respuesta. No obstante, en algunos casos los resultados que se obtuvieron en la experimentación no coinciden en muchos casos con los predichos por la superficie de respuesta, por tanto, no presenta un ajuste r^2 tan óptimo como en otras variables de respuesta. Una de las principales causas que explique estas ligeras diferencias entre lo observado y lo predicho, pudo deberse a los posibles errores en la metodología empleada para calcular los volúmenes que determinan el porcentaje de agregación tras centrifugación.

Esta variable de respuesta se representa según los datos experimentales usados para construir la superficie, con la siguiente ecuación matemática:

$$\begin{aligned}
 &\textit{Agregación tras centrifugación}(\%) \\
 &= -15,2989 - 3,1213 \cdot \textit{pH} + 9,35927 \\
 &\quad \cdot \textit{Concentración alimentación} + 0,857532 \cdot \textit{Fuerza iónica} \\
 &\quad + 0,881481 \cdot \textit{pH}^2 - 0,7925 \cdot \textit{pH} \cdot \textit{Concentración alimentación} \\
 &\quad - 0,122333 \cdot \textit{pH} \cdot \textit{Fuerza iónica} + 0,0167708 \\
 &\quad \cdot \textit{Concentración alimentación}^2 - 0,00859722 \\
 &\quad \cdot \textit{Concentración alimentación} \cdot \textit{Fuerza iónica} - 0,000876132 \\
 &\quad \cdot \textit{Fuerza iónica}^2
 \end{aligned}$$

A continuación, se representan las gráficas que relacionan el efecto que tienen los distintos factores experimentales sobre el porcentaje de agregación proteica centrifugación, en función del pH empleado en la experimentación (pH 4, 5,5 y 7).

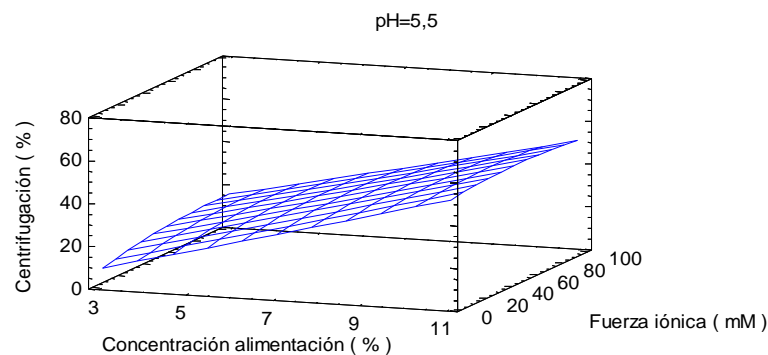
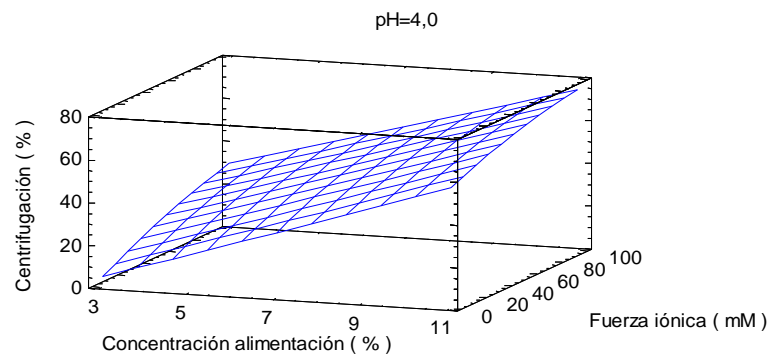


Figura 57 (parte 1).

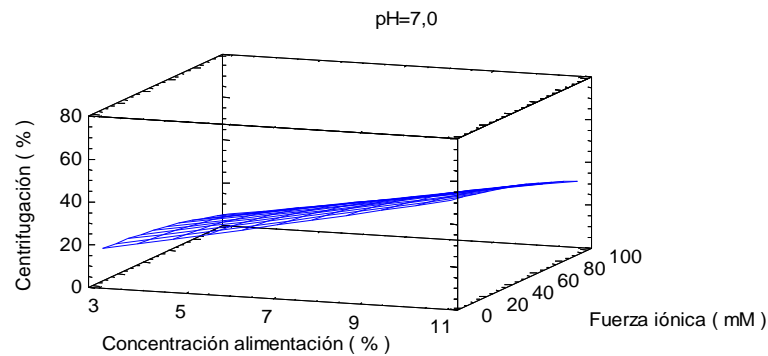


Figura 57. Superficie de respuesta del porcentaje de agregación tras centrifugación, en función de la concentración proteica de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl₂) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento térmico (parte 2).

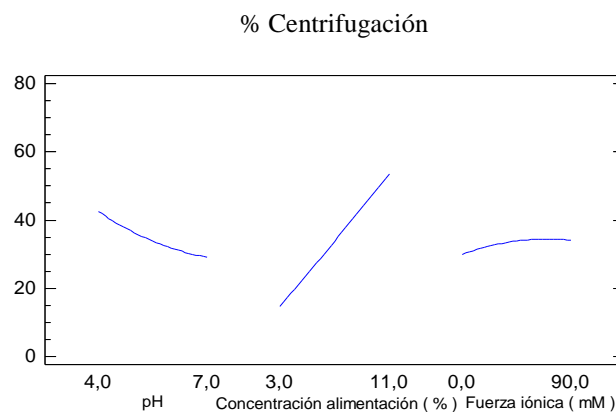


Figura 58. Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre el porcentaje de agregación tras centrifugación.

En referencia a la figura 57 y 58, se observó que el pH y la concentración de alimentación son los principales factores que influyeron en el porcentaje de agregación tras centrifugación, mientras que la fuerza iónica tuvo un efecto mucho más ligero.

El porcentaje de agregación tras centrifugación aumentó con la concentración proteica de la disolución, probablemente porque facilitaría la formación de agregados multiméricos con mayor peso molecular [59].

Se observaron diferencias importantes en el porcentaje de agregación tras centrifugación en función del pH, ya que la mayor agregación se obtuvo a pH 4 y la menor a pH 7. Por tanto, según los resultados experimentales la agregación aumentó a

menor pH. Como se comentó en la discusión del tamaño de partícula, el pI de la β -Lg (5,1), es el pH donde existe la mayor agregación de proteínas porque las cargas de las mismas son neutras y no existen repulsiones electrostáticas [53]. Como el pH 5,5 se encuentra más cercano al pI, en un principio se espera que exista mayor agregación respecto a pH 7, sin embargo, según los resultados existió mayor agregación a pH 4 que a pH 5,5. Varios estudios describieron que en el pI de la β -Lg las proteínas eran más estables a la desnaturalización, en cambio a medida que el pH se iba haciendo más ácido, el efecto protector de la lactosa sobre la β -Lg disminuía [25], favoreciéndose más la desnaturalización de las proteínas y una mayor agregación de las mismas, justificándose de este modo que exista una mayor proporción de agregación proteica a pH 4.

Por otro lado, estudios previos determinaron que a pHs comprendidos entre 3,7 y 5,2, se produce una asociación de β -Lg en forma de octámero de 144 kDa de peso molecular [53]. Además, se observó que los ensayos a pH 5,5, se presentan en forma de tetrámeros con un peso molecular de 74,2 kDa y a pH 7 en forma de monómeros con 12,5 kDa de peso molecular [53]. A su vez, *Dissanayake et al.*, [54] describieron que existe una mayor tendencia a formarse agregados de alto peso molecular cuando el medio era ácido que a pH 6, debido a la presencia de asociaciones covalentes entre los agregados. También, *de la Fuente et al.* [16], expusieron que los agregados formados durante el tratamiento térmico a pHs comprendidos entre 6,4 y 6,8, presentaban mayores pesos moleculares, una conformación más compacta y una menor carga negativa en comparación a los agregados formados a pH más altos. En definitiva, cuanto más ácido fue el pH, los agregados que se formaron presentaban un mayor peso molecular y por tanto una mayor agregación proteica tras la centrifugación (Figura 59), justificándose que la mayor proporción de agregación tras la centrifugación fuera mayor a pH 4.



Figura 59. Comparación de dos ensayos con distinto porcentaje de agregación tras centrifugación en el tratamiento térmico. Teniendo en cuenta el sedimento formado, el ensayo A presenta mayor agregación (pH 5,5, 3% p/p, 0 mM CaCl₂) que el ensayo B (pH 7, 3% p/p, 45 mM CaCl₂).

En la figura 59 se observó que el ensayo A (pH 5,5) presentó mayor porcentaje de agregación que el ensayo B (pH 7) tras la centrifugación, posiblemente a que en este último, las partículas difícilmente sedimentaron por su menor peso molecular y consecuentemente permanecieron en el sobrenadante.

El otro factor que también influyó sobre el porcentaje de agregación en el tratamiento térmico, aunque ligeramente, fue la fuerza iónica. Tanto a pH 4 como a pH 5,5 la fuerza iónica aumentó la agregación, siendo mayor el efecto a pH 4. En cambio, a pH 7 la fuerza iónica disminuyó ligeramente el porcentaje de agregación (Figura 57 y 58).

Como se dijo en la discusión del efecto de la fuerza iónica sobre el tamaño de partícula, la fuerza iónica a cualquier pH conduce a una disminución de las repulsiones electrostáticas entre las proteínas, favoreciendo la agregación proteica [50].

Se ha descrito que a bajos contenidos de lactosa, el Ca⁺² tiene un efecto estimulante sobre la desnaturalización, promoviendo el establecimiento de puentes iónicos y compensar las partículas cargadas negativamente [25]. Como a pH ácido disminuye el efecto protector de la lactosa frente a la desnaturalización térmica de la β -Lg, se favorece una mayor agregación [25]. Por tanto, esta explicación determina que a medida que el pH se va haciendo más ácido, más se favorece la acción de las sales de

CaCl₂ en el aumento de la agregación. Luego a pH 4 y 5,5 la fuerza iónica incrementa ligeramente el porcentaje de agregación.

Andersson et al., [11] describieron que la concentración crítica de sal necesaria para favorecer la agregación aumenta cuando se incrementa el pH, debido a la neutralización de las carga negativas de las proteínas por los iones Ca⁺². Esto significó, que cuanto mayor fue el pH, más concentración de sales fue necesaria para neutralizar las cargas y favorecer la agregación. Por tanto, según los resultados experimentales, a pH 7 la fuerza iónica tiende a disminuir la agregación, debido a que en esas condiciones de pH se necesita una mayor concentración de CaCl₂.

8.2.3 Comprobación de la superficie de respuesta del tratamiento térmico

Para comprobar las superficies de respuesta se ha llevado a cabo la optimización de la respuesta a través de *Statgraphics* con el objetivo de obtener las condiciones del ensayo experimental con un mayor porcentaje de agregación, ya que corresponde con una mayor cantidad de proteína agregada térmicamente y por tanto, dará lugar a una mayor cantidad de proteína microparticulada en el futuro tratamiento mecánico.

Las condiciones experimentales con los valores correspondientes de cada variable de respuesta se muestran en la tabla XVIII:

Tabla XVIII. Condiciones del ensayo tras la optimización con el máximo porcentaje de agregación.

<i>Ensayo</i>	<i>D(v, 0,5)(μm)</i>	<i>η 100s⁻¹(cP)</i>	<i>Agregación (%)</i>
<i>pH4, 10,91% p/p, fuerza iónica 90 mM CaCl₂</i>	76,14	367,56	73,44

Estas condiciones del ensayo se modificaron por dos razones: en primer lugar, el pH pasó de 4 a 6, ya que dicho producto como está destinado a la comercialización como ingrediente, debería venderse lo más cercano a la neutralidad para no producir desestabilizaciones indeseadas en el producto sobre el que se vaya añadir. En segundo lugar se modificó la concentración proteica de la disolución de 10,91% a 8% p/p con el fin de evitar problemas de atascamiento en el homogenizador cuando se trabaja en condiciones de alta concentración de alimentación. Dichas modificaciones en los

ensayos dieron lugar a las predicciones de cada una de las variables de respuesta ilustradas en la tabla XIX.

Tabla XIX. Condiciones del ensayo óptimo de interés para comprobar la superficie de respuesta.

<i>Ensayo óptimo</i>	<i>D(v,0,5) (μm)</i>	<i>η 100 s⁻¹(cP)</i>	<i>Agregación (%)</i>
<i>pH 6, 8% p/p, fuerza iónica 31,26 mM CaCl₂</i>	79,11	343,56	36,47

Para comprobar lo predicho por la superficie de respuesta se seleccionó dicho ensayo óptimo (Tabla XIX), del cual se decidió realizar tres réplicas para comprobar el ajuste de los valores. Posteriormente, estos ensayos fueron aprovechados para el estudio de la etapa del tratamiento mecánico cuando varían las condiciones de presión y número de pases en el homogenizador.

A continuación, se muestra en la tabla XX la comparación de los resultados que se obtuvieron en cada una de las tres réplicas experimentales con las predicciones de la superficie de respuesta de cada variable de respuesta de estudio.

Tabla XX. Comparación de los resultados experimentales con la predicción de la superficie de respuesta a pH 6, 8% concentración de proteína de la disolución y fuerza iónica 31,26 mM CaCl₂ en el tratamiento térmico.

<i>pH 6,8% p/p, fuerza iónica 31,26 mM CaCl₂</i>	<i>D(v, 0,5)(μm)</i>	<i>η 100s⁻¹ (cP)</i>	<i>Agregación (%)</i>
Ensayo 1	45,58	420,10	33,87
Ensayo 2	50,12	347,40	29,92
Ensayo 3	43,51	348,10	32,81
Predicho	79,11	343,56	36,47

En la tabla XX, se representan los valores obtenidos de cada una de las variables de respuesta analizadas en las tres réplicas del ensayo seleccionadas como óptimas (pH 6, 8% p/p, fuerza iónica 31,26 mM CaCl₂). Se observó bastante similitud entre cada una de las variables de respuesta con las predicciones establecidas, salvo en el tamaño donde las diferencias son algo mayores. En definitiva, en función a los resultados descritos, la superficie de respuesta en el tratamiento térmico resultó bastante óptima.

8.3 TRATAMIENTO MECÁNICO INVARIABLE

Aprovechando los ensayos anteriores, cada uno de los productos del tratamiento térmico fueron sometidos a un tratamiento mecánico a través de un homogeneizador a unas condiciones fijas de presión y número de pases (300 bar, 1 pase).

8.3.1 Resultados del tratamiento mecánico

En la siguiente tabla se muestran los resultados de cada una de las variables de respuesta en el tratamiento mecánico en función de las condiciones experimentales de cada ensayo.

Tabla XXI. Resultados del tamaño D (v, 0,5), viscosidad ($100s^{-1}$) y porcentaje de proteína microparticulada en la etapa de tratamiento mecánico.

<i>Ensayo</i>	<i>pH</i>	<i>Concentración alimentación (% p/p)</i>	<i>Fuerza iónica (mM CaCl₂)</i>	<i>D(v, 0,5) (μm)</i>	<i>η 100s⁻¹ (cP)</i>	<i>Proteína microparticulada (%)</i>
1	5,5	7	45	3,65	6,04	23,57
2	5,5	7	45	3,06	6,23	27,34
3	5,5	7	45	2,52	6,48	26,77
4	4	3	45	3,42	4,29	13,28
5	5,5	11	90			
6	7	7	90	2,91	4,93	20,93
7	5,5	3	0	2,45	2,06	10,24
8	7	3	45	1,16	2,16	5,08
9	4	7	90	8,20	62,76	34,16
10	5,5	3	90	1,42	1,48	10,24
11	4	11	45			
12	7	11	45			
13	4	7	0	2,29	13,67	28,35
14	7	7	0	3,62	7,80	6,15
15	5,5	11	0	4,52	82,17	40,32

En la tabla XXI, los resultados de los ensayos 5 y 12 no fueron representados porque el producto que se obtuvo tras el tratamiento térmico no pudo ser pasado por el homogeneizador y por tanto, no se pudo recoger muestra para realizar el análisis de cada una de las variables de respuesta. Por otro lado, se ha descartado también el ensayo 11 por la presencia de valores ilógicos en cada una de las variables de estudio.

Comparando los resultados de la tabla XXI con los correspondientes a la etapa de tratamiento térmico, se observó que el tratamiento mecánico disminuye notablemente los valores de cada una de las variables de respuesta.

A continuación, se expondrán las gráficas correspondientes a dos ensayos del tratamiento mecánico bastante diferenciados y comentar las diferencias entre ellos en cuanto a las variables de respuesta de estudio.

Los ensayos seleccionados se muestran en la tabla XXII:

Tabla XXII. Comparativa del tamaño $D(v, 0,5)$, viscosidad a 100 s^{-1} y porcentaje de agregación proteica por centrifugación de dos ensayos que difieren en los factores de experimentación en la etapa de tratamiento térmico.

<i>Ensayo</i>	<i>$D(v, 0,5)(\mu\text{m})$</i>	<i>η a $100 \text{ s}^{-1}(\text{cP})$</i>	<i>Agregación proteica (%)</i>
<i>pH 4;7%;0 mM CaCl_2</i>	2,29	13,67	28,35
<i>pH 5,5;3%;90 mM CaCl_2</i>	1,42	1,48	10,24

8.3.1.1 Tamaño de partícula

En la figura 60 se comparan el tamaño de partícula de dos ensayos distintos en cuanto a pH, concentración de alimentación y fuerza iónica.

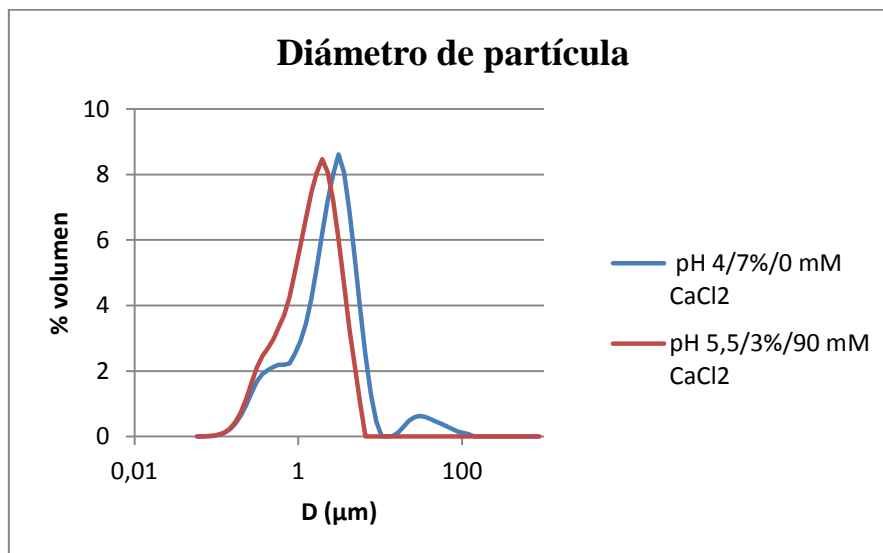


Figura 60. Comparativa del diámetro de partícula $D(\mu\text{m})$ de dos ensayos diferentes en la etapa de tratamiento mecánico.

Al igual que en el tratamiento térmico, en el eje de ordenadas se representa el D (μm) y en el de abscisas el porcentaje en volumen.

En la figura 60 se observó que el mayor tamaño de partícula corresponde al ensayo que se realizó a pH 4, una concentración proteica de la disolución al 7% y una fuerza iónica de 90 mM CaCl₂, ya que el pico se sitúa a una escala de mayor diámetro de partícula respecto al otro ensayo. Comparando el tratamiento térmico con el mecánico, en este último se observó que el tamaño de partícula es mucho menor, debido al efecto del homogenizador. No obstante, no se observaron diferencias importantes entre el tamaño de ambos ensayos, mientras que en el tratamiento térmico las diferencias eran mucho mayores.

8.3.1.2 Viscosidad

La siguiente variable que se analizó fue la viscosidad a 100 s⁻¹. En las gráficas de la figura 61, se muestra la reología de dos réplicas de cada uno de los dos ensayos a comparar.

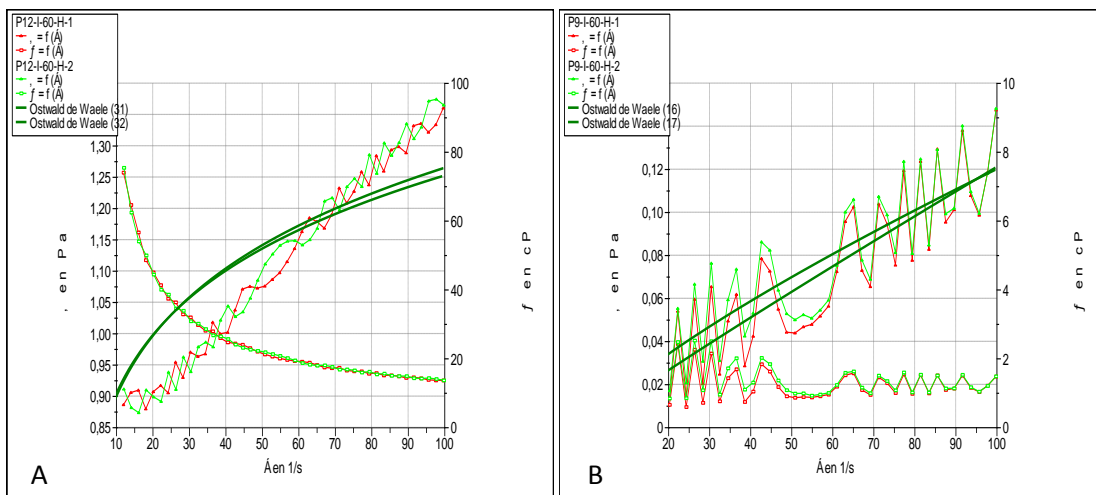


Figura 61. Representación de la reología de dos ensayos: A (pH 4, concentración de proteína de la disolución 7% p/p, fuerza iónica 0 mM CaCl₂) y B (pH 5,5, concentración de proteína de la disolución 3% p/p, fuerza iónica 90 mM CaCl₂) en la etapa de tratamiento mecánico.

Tabla XXIII. Comparación de los parámetros que caracterizan la reología del fluido de cada uno de los ensayos de estudio en el tratamiento mecánico.

<i>Ensayo</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>η</i> 100 s ⁻¹ (cP)
<i>pH 4, 7% p/p, fuerza iónica 0 mM CaCl₂</i>	0,75	0,65	0,14	13,67
<i>pH 5,5, 3% p/p, fuerza iónica 90 mM CaCl₂</i>	0,87	0,002	0,86	1,48

Observando la figura 61, el ensayo correspondiente a la gráfica A se caracterizó por presentar un fluido con un comportamiento no newtoniano del tipo

pseudoplástico ($n < 1$), debido a que la viscosidad aparente disminuye al aumentar el esfuerzo cortante. Se trató de un fluido con un ajuste (r) del 75% y una viscosidad a 100 s^{-1} de $13,67 \text{ cP}$.

Por otro lado, el fluido del ensayo B presentó un comportamiento menos pseudoplástico que el anterior, porque el valor de " n " cada vez se aproxima más a un fluido newtoniano ($n=1$). A su vez, presentó un ajuste (r) del 87% y una viscosidad a 100 s^{-1} de $1,48 \text{ cP}$, muchísimo menor que en el caso anterior.

El efecto del tratamiento mecánico disminuye la viscosidad respecto al tratamiento térmico (de $46,32$ a $13,67 \text{ cP}$ en el ensayo A y de $37,07$ a $1,48 \text{ cP}$ en el B), no obstante, se estudiará su influencia con mayor detalle más hacia adelante.

8.3.1.3 Porcentaje de proteína microparticulada

Otra de las variables de respuesta que se analizó es el porcentaje de proteína microparticulada en base a la centrifugación. Se observó que el ensayo a pH 5,5, con una concentración de alimentación del 3% p/p y una fuerza iónica de 90 mM CaCl_2 presentaba mayor porcentaje de proteína microparticulada (28,35%) que el ensayo pH 4, con una concentración de alimentación del 7% p/p y una fuerza iónica de 0 mM CaCl_2 . Se demuestra, por tanto, que las diferencias en las variables experimentales influyen en el porcentaje de proteína microparticulada en el tratamiento mecánico.

Posteriormente se analizará con mayor detalle la influencia de los diferentes factores experimentales sobre cada una de las variables de respuesta de estudio en el tratamiento mecánico.

8.3.2 Superficie de respuesta del tratamiento mecánico

Al igual que se comentó con el tratamiento térmico, los resultados de cada una de las variables de respuesta del tratamiento mecánico se introducen en el programa matemático y estadístico *Statgraphics*, con el objetivo de construir una superficie de respuesta y estudiar el efecto de los factores experimentales sobre las variables de respuesta de estudio de manera independiente mediante la representación gráfica.

8.3.2.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula es la primera variable de respuesta que se estudió en el tratamiento mecánico. La superficie de respuesta construida en base a los resultados experimentales presenta un ajuste r^2 del 98,23 % (Figura 62).

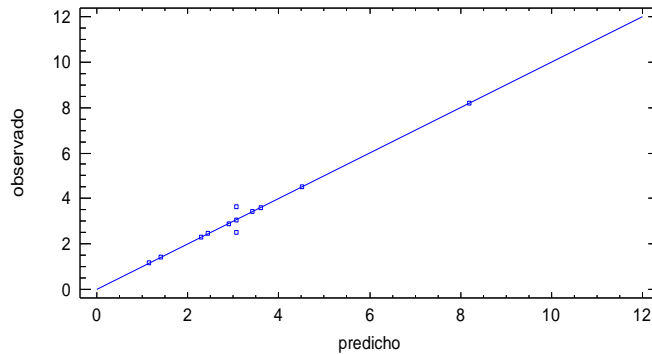


Figura 62. Comparativa de los resultados del tamaño de partícula observados con los predichos.

En referencia a la figura 62, los valores experimentales coinciden prácticamente con los predichos por la superficie de respuesta, justificando el buen ajuste r^2 . No obstante, existen un par de valores que se alejan de la recta y que pudo deberse a la dificultad de ajustar la presión (300 bar) en el homogenizador.

El tamaño se representa con la siguiente fórmula matemática, donde se aprecia el efecto de las variables experimentales sobre la respuesta:

Tamaño $D(v, 0, 5)$

$$\begin{aligned}
 &= 13,1346 - 3,47025 \cdot pH - 1,00732 \cdot \text{Concentración alimentación} \\
 &+ 0,0746921 \cdot \text{Fuerza iónica} + 0,340648 \cdot pH^2 + 0,0235417 \cdot pH \\
 &\cdot \text{Concentración alimentación} - 0,0245 \cdot pH \cdot \text{Fuerza iónica} \\
 &+ 0,0811849 \cdot \text{Concentración alimentación}^2 + 0,0100903 \\
 &\cdot \text{Concentración alimentación} \cdot \text{Fuerza iónica} + 0,000203189 \\
 &\cdot \text{Fuerza iónica}^2
 \end{aligned}$$

A continuación, se muestran las gráficas que relacionan el efecto que tienen los distintos factores experimentales sobre el tamaño de partícula en el tratamiento mecánico, en función del pH empleado en la experimentación (pH 4, 5,5 y 7).

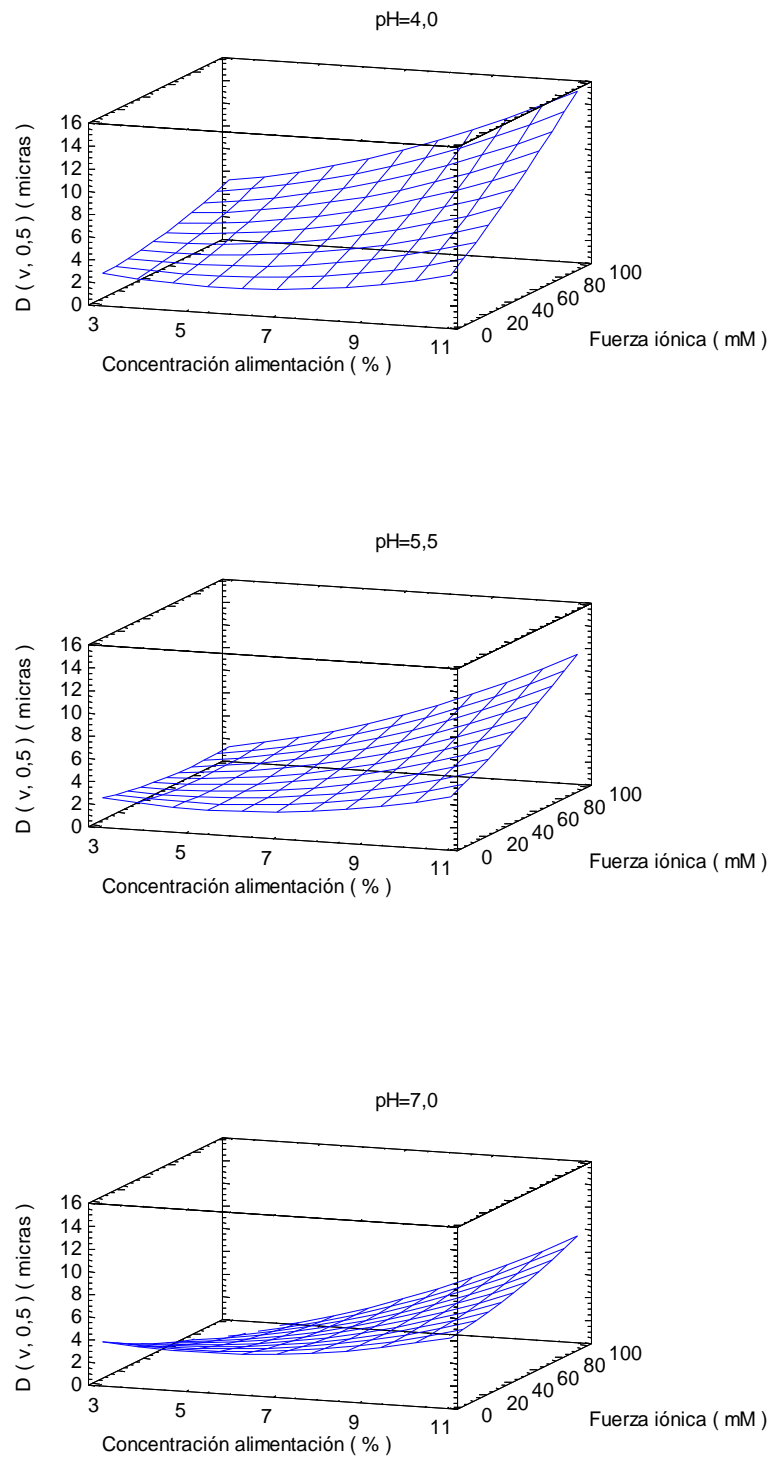


Figura 63. Superficie de respuesta del tamaño de partícula $D(v, 0.5)$ (μm), en función de la concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase).

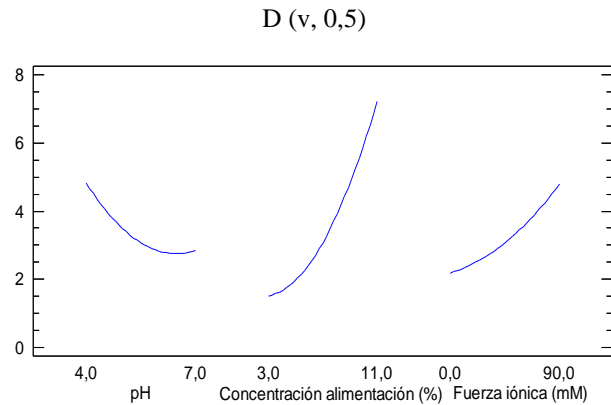


Figura 64. Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre el tamaño de partícula.

En la figura 63 y 64, se observó que en la etapa de tratamiento mecánico, al igual que ocurre en el tratamiento térmico, cuanto mayor es la concentración de proteína y la fuerza iónica mayor fue el tamaño de partícula. En cambio, la influencia del pH sobre el tamaño de partícula en ambos tratamientos fue diferente. En el tratamiento mecánico cuanto menor fue el pH mayor resultó ser el tamaño de partícula, mientras que en el tratamiento térmico ocurrió lo contrario. Por tanto, el mayor tamaño de los agregados en el tratamiento mecánico fue a pH 4 y en el tratamiento térmico a pH 7.

Diversos autores han descrito que la homogenización a alta presión reducía significativamente el tamaño de partícula y la mejora de la estabilidad y la sedimentación [58]. A su vez, el tamaño de partícula también se reducía a un ritmo creciente a través de la velocidad de cizallamiento [25]. En definitiva, según los estudios descritos se confirmó que el tamaño de partícula disminuyó con el tratamiento mecánico.

Según *Erabit et al.* [60], la fuerza de cizalla tuvo un mayor efecto sobre los agregados de mayor tamaño. Según estos autores, se puede pensar que los agregados de mayor tamaño cuando son sometidos a una determinada presión en el tratamiento mecánico, se generan tamaños de partícula finales más pequeños que en el caso de que agregados más pequeños sean sometidos al mismo tratamiento. En función a esta hipótesis, se pudo comprender por qué en el tratamiento mecánico cuanto más bajo es el pH mayor es el tamaño de partícula, y al contrario con el tratamiento térmico. En definitiva, esto justificó que en el tratamiento mecánico se obtuvieran mayores tamaños

de partícula a pH 4 respecto a pH 5,5 y 7, aunque teniendo en cuenta la escala, no existen diferencias muy destacables entre ellos.

8.3.2.2 Viscosidad

La viscosidad es la siguiente variable de respuesta a estudiar en el tratamiento mecánico. La superficie de respuesta construida en base a los resultados experimentales presenta un ajuste² del 99,99 %, representándose el grado de dicho ajuste en la figura 65, observándose un ajuste perfecto ya que los valores experimentales coinciden exactamente con los predichos por la superficie de respuesta.

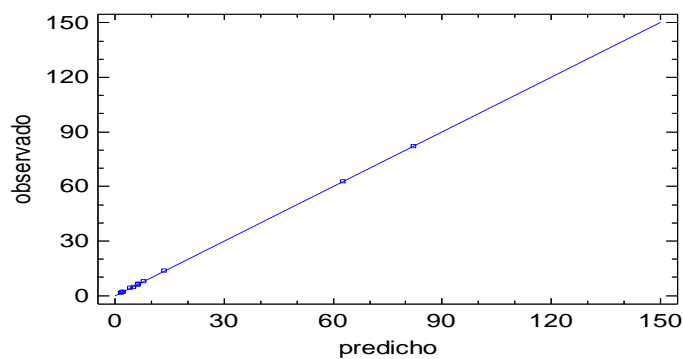


Figura 65. Comparativa de los resultados de viscosidad observados con los predichos en el tratamiento mecánico.

La viscosidad se representa con la siguiente fórmula matemática, donde se aprecia el efecto de las variables experimentales sobre la respuesta:

Viscosidad($100s^{-1}$)

$$\begin{aligned}
 &= 87,7361 - 27,363 \cdot pH - 11,4759 \cdot \text{Concentración alimentación} \\
 &+ 0,530559 \cdot \text{Fuerza iónica} + 3,88585 \cdot pH^2 - 2,47675 \cdot pH \\
 &\cdot \text{Concentración alimentación} - 0,19247 \cdot pH \cdot \text{Fuerza iónica} \\
 &+ 2,5079 \cdot \text{Concentración alimentación}^2 + 0,0658181 \\
 &\cdot \text{Concentración alimentación} \cdot \text{Fuerza iónica} + 0,00360107 \\
 &\cdot \text{Fuerza iónica}^2
 \end{aligned}$$

A continuación, se representan las gráficas que relacionan el efecto que tienen los distintos factores experimentales sobre la viscosidad, en función del pH empleado en la experimentación (pH 4, 5,5 y 7) en el tratamiento mecánico.

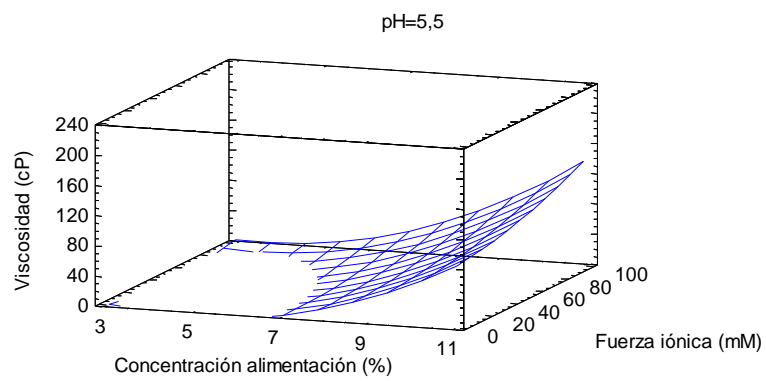
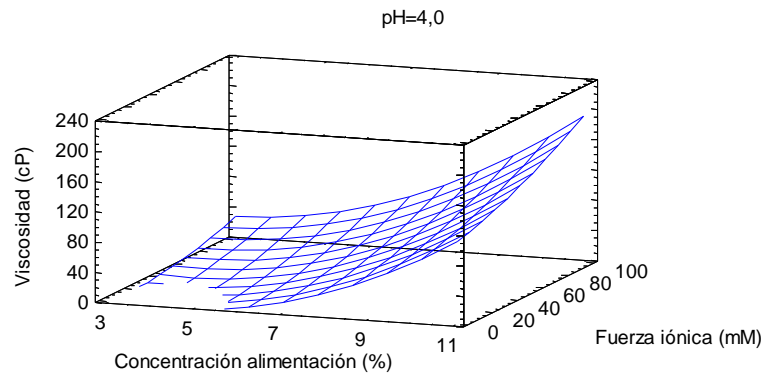


Figura 66 (parte 1).

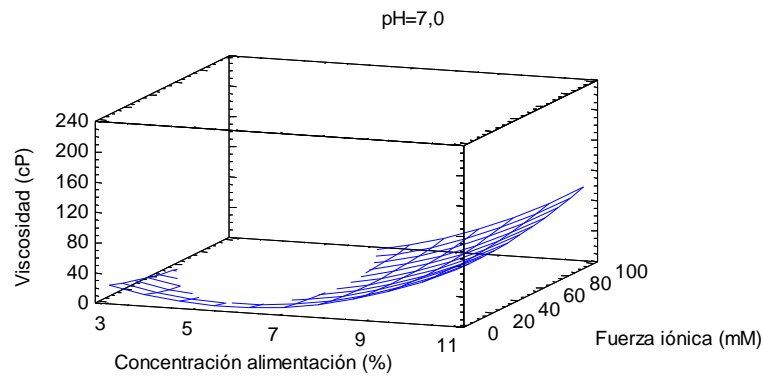


Figura 66. Superficie de respuesta de la viscosidad 100 s^{-1} (cP), en función de la de concentración de proteína en la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento mecánico (parte 2).

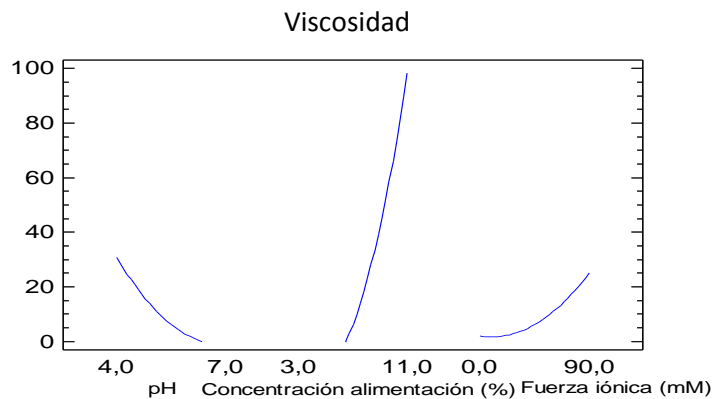


Figura 67. Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre la viscosidad en el tratamiento mecánico.

Al igual que se mencionó en otro apartado, las áreas blancas observadas en las diferentes gráficas de la figura 66 corresponden a valores negativos, los cuales se descartan en la explicación de los resultados. No obstante, cabe decir que los descensos por debajo de cero no son nada bruscos atendiendo al sentido y dirección de las superficies.

Las superficies de respuesta (Figura 66) y las tendencias (Figura 67), determinan que el incremento en la concentración de alimentación generó un aumento importante de la viscosidad, mientras que el incremento de la fuerza iónica tuvo un efecto más reducido. A su vez las variaciones en el pH influyeron sobre dicha variable de respuesta,

encontrándose mayores viscosidades a pH 4 que a pH 5,5 y 7. Por tanto, la viscosidad aumenta cuanto más disminuye el pH, del mismo modo que el tamaño de partícula.

En conclusión los comportamientos observados en el producto microparticulado tras el tratamiento mecánico son muy similares a los observados en el tratamiento térmico, ya que en ambos casos el aumento del tamaño de partícula conduce a un incremento de la viscosidad. La principal diferencia es que el tratamiento mecánico reduce el tamaño de partícula y por tanto, la viscosidad. Varios autores describieron que aquellas soluciones que fueron tratadas térmicamente y no homogenizadas presentaban viscosidades más altas que las homogenizadas, debido a que las primeras formaban una red tridimensional a partir de la capacidad que tenían los agregados de gran tamaño de atrapar grandes cantidades de disolvente en las cavidades de los poros [58].

Al igual que en el tratamiento térmico, se analizó también el comportamiento reológico de los fluidos a partir de los valores de "n" (índice de comportamiento del fluido) obtenidos para cada ensayo para construir las superficies de respuesta correspondientes. La superficie de respuesta, en base a los resultados experimentales, presenta un ajuste r^2 del 99,48 %, siendo un ajuste perfecto, al coincidir los valores experimentales con los descritos por la superficie de respuesta (Figura 68).

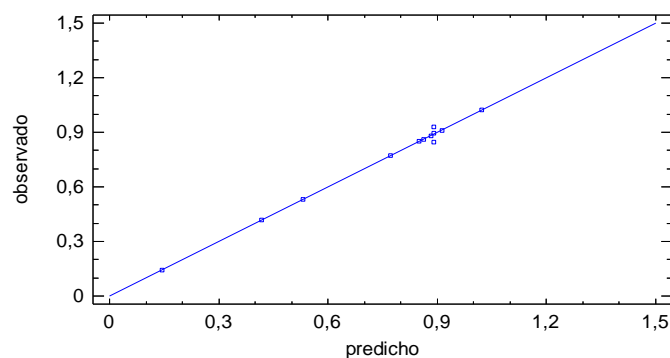


Figura 68. Comparativa de los resultados de "n" observados con los predichos en el tratamiento mecánico.

Esta variable "n" cumple la siguiente ecuación matemática, donde se aprecia el efecto de las variables experimentales sobre la respuesta:

$$\begin{aligned} n = & -3,18914 + 1,55166 \cdot pH - 0,256614 \cdot \text{Concentración alimentación} \\ & + 0,00595 \cdot \text{Fuerza iónica} - 0,130752 \cdot pH^2 + 0,0188896 \cdot pH \\ & \cdot \text{Concentración alimentación} - 0,00142389 \cdot pH \cdot \text{Fuerza iónica} \\ & + 0,00993503 \cdot \text{Concentración alimentación}^2 + 0,000664792 \\ & \cdot \text{Concentración alimentación} \cdot \text{Fuerza iónica} - 0,0000208233 \\ & \cdot \text{Fuerza iónica}^2 \end{aligned}$$

A continuación, se representan las gráficas que relacionan el efecto que tienen las diferentes variables experimentales sobre "n", en función del pH empleado en la experimentación (pH 4, 5,5 y 7) en el tratamiento mecánico.

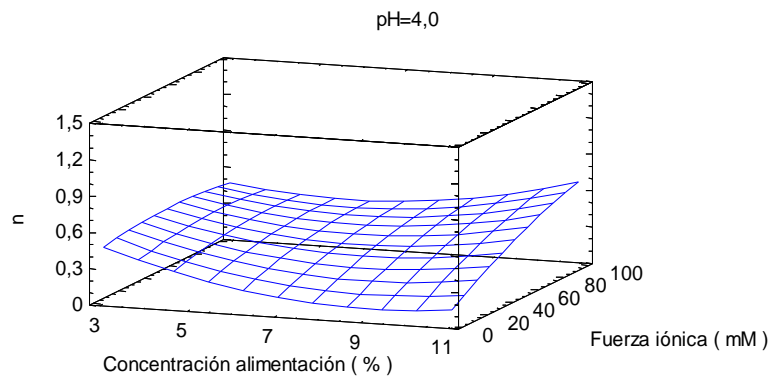


Figura 69 (parte 1).

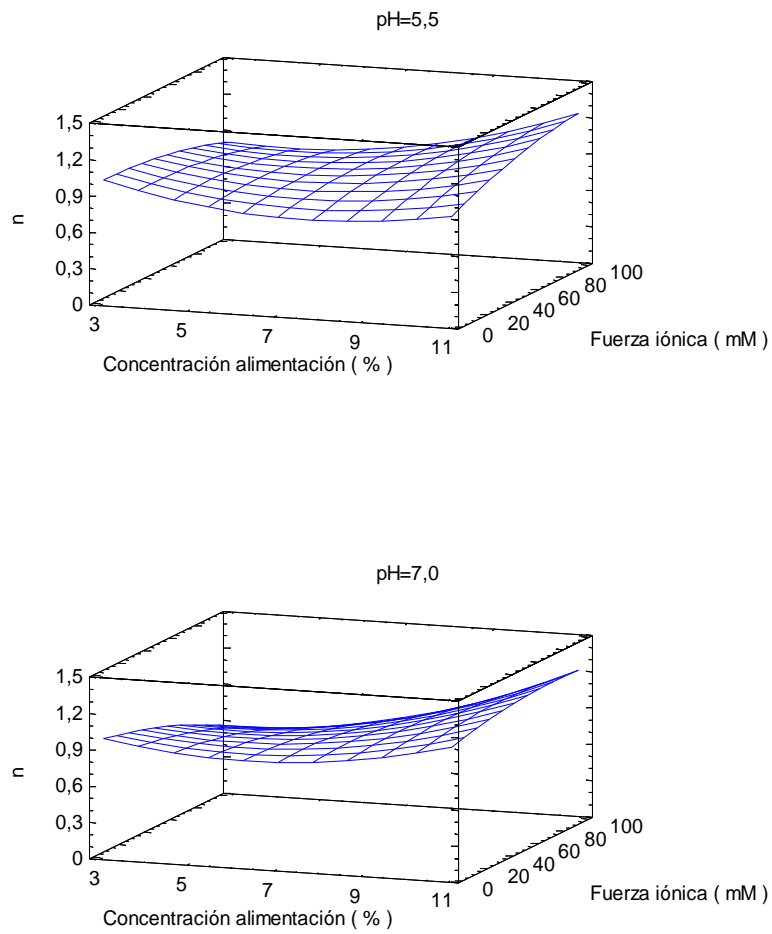


Figura 69. Superficie de respuesta de "n" en función de la concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4, 5,5 y 7 en la etapa de tratamiento mecánico (parte 2).

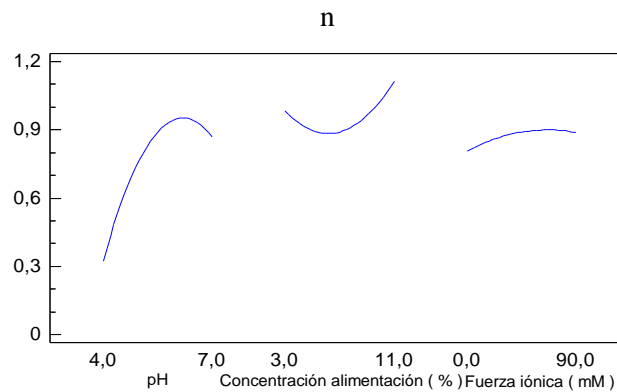


Figura 70. Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre “n” en el tratamiento mecánico.

La mayor parte de los ensayos presentaron un comportamiento pseudoplástico, ajustándose al modelo *Otswald de Waele*, aunque en determinados ensayos los fluidos eran menos pseudoplásticos, acercándose a un comportamiento newtoniano por la proximidad de los valores de "n" a 1. Sin embargo, en el tratamiento térmico todos los fluidos fueron pseudoplásticos al ajustarse correctamente al modelo *Otswald de Waele*.

Teniendo en cuenta las figuras 69 y 70, la influencia de los distintos factores experimentales sobre “n” es muy compleja. Por un lado, la influencia de la concentración de proteína fue bastante baja, ya que se observó un discreto aumento de “n” en los extremos de la concentración de proteína (3-11% p/p aproximadamente). Además, aunque también la influencia de la fuerza iónica fue bastante baja, se mostró también que las altas concentraciones de CaCl_2 aumentaron ligeramente el valor de “n”, tendiendo a comportarse los fluidos como newtonianos. En cambio, en el tratamiento térmico el efecto de la fuerza iónica fue al contrario, donde los fluidos fueron más pseudoplásticos a altas concentraciones de sales. Por último, las variaciones en el pH produjeron cambios en el comportamiento reológico del fluido, observándose a pH 4 un comportamiento del fluido más pseudoplástico ($n < 1$), mientras que a pH 5,5 y 7 los fluidos tienden a presentar un comportamiento más cercano al newtoniano ($n = 1$).

8.3.2.3 Porcentaje de proteína microparticulada

La última variable de respuesta a estudiar en el tratamiento mecánico invariable es el porcentaje de proteína microparticulada. La superficie de respuesta construida en base a los resultados experimentales presenta un ajuste r^2 del 99,43 %, representándose el grado de dicho ajuste en la figura 71, donde se determina que los valores experimentales coinciden exactamente con los predichos por la superficie de respuesta.

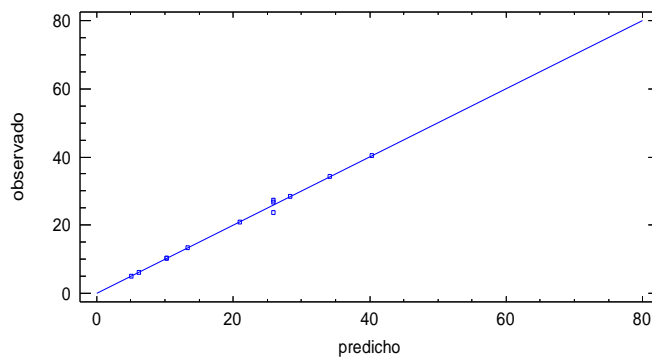


Figura 71. Comparativa de los resultados del porcentaje de proteína microparticulada observados con los predichos.

Esta variable de estudio cumple la siguiente ecuación matemática, donde se aprecia el efecto de las variables experimentales sobre la respuesta:

$$\begin{aligned}
 &\textit{Proteína microparticulada}(\%) \\
 &= -9,62894 + 9,2869 \cdot \textit{pH} + 3,08797 \\
 &\quad \cdot \textit{Concentración alimentación} - 0,214384 \cdot \textit{Fuerza iónica} \\
 &\quad - 1,01241 \cdot \textit{pH}^2 - 0,792917 \cdot \textit{pH} \cdot \textit{Concentración alimentación} \\
 &\quad + 0,0332222 \cdot \textit{pH} \cdot \textit{Fuerza iónica} + 0,359505 \\
 &\quad \cdot \textit{Concentración alimentación}^2 + 0,0285972 \\
 &\quad \cdot \textit{Concentración alimentación} \cdot \textit{Fuerza iónica} - 0,00060144 \\
 &\quad \cdot \textit{Fuerza iónica}^2
 \end{aligned}$$

A continuación, se representan las gráficas que relacionan el efecto que tienen los distintos factores experimentales sobre el porcentaje de proteína microparticulada, en función del pH empleado en la experimentación (pH 4, 5,5 y 7) en el tratamiento mecánico.

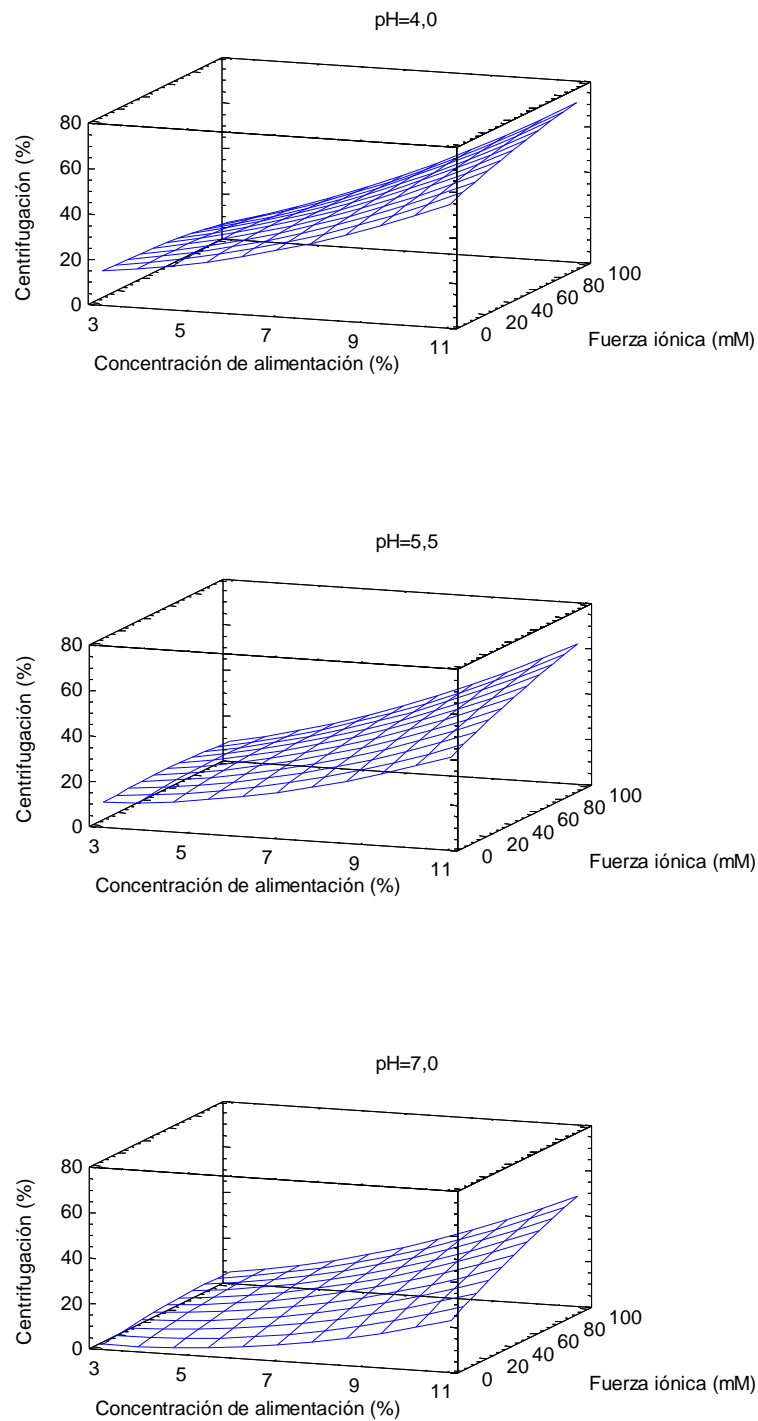


Figura 72. Superficie de respuesta del porcentaje de proteína microparticulada, en función de la de concentración de proteína de la disolución y la fuerza iónica (mM CaCl_2) a pH 4,0; 5,5 y 7,0 en la etapa de tratamiento mecánico.

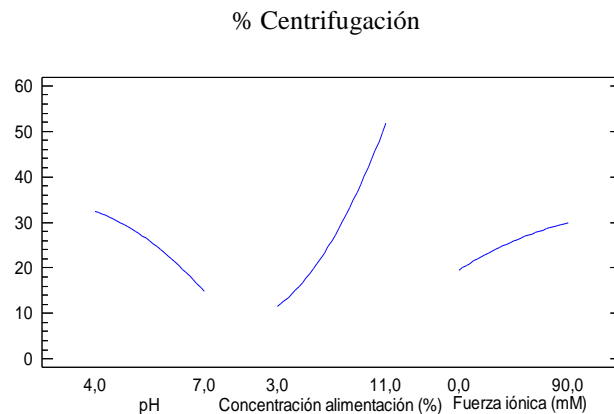


Figura 73. Representación del peso y la tendencia de cada factor experimental sobre el porcentaje de proteína microparticulada.

Examinando la figura 72 y 73, se determinó que las tendencias de los distintos factores experimentales son las mismas que en el tratamiento térmico, ya que el porcentaje de proteína microparticulada aumentó con la concentración de proteína, con la fuerza iónica y cuanto menor fue el pH. Sin embargo, varios estudios determinaron que los valores de solubilidad de proteínas de las soluciones microparticuladas a bajo pH fueron más altos en comparación con aquellas a pH neutro [61]. Por tanto, según estos autores cuanto menor fuese el pH, menor sería el porcentaje de proteína microparticulada, contradiciéndose de esta forma los resultados de la superficie de respuesta.

Comparando el porcentaje de agregación en el tratamiento térmico y el de proteína microparticulada se observaron diferencias destacables, salvo a pH 4, donde fueron menores. Según estudios experimentales el tratamiento por microfluidización (tratamiento mecánico) de una solución de suero lácteo tratado térmicamente a pH 3,8, presentó valores de sedimentos más bajos que aquellas soluciones que no fueron microfluidizadas [62]. Esto se debió a que como consecuencia del tratamiento mecánico, aquellos agregados insolubles se convirtieron en partículas de tamaño más reducido, disminuyendo los valores de sedimentación [62]. Según los resultados que se obtuvieron, las muestras correspondientes al tratamiento térmico presentaron un sobrenadante más transparente, mientras que en las muestras microfluidizadas fue más turbio, como se ilustra en la figura 74. Esto se debió a la acción del tratamiento mecánico sobre los agregados macroestructurales formados durante la etapa térmica,

formando estructuras más reducidas que se dispersan en la solución [62]. De este modo, se justifica que exista un mayor porcentaje de agregación en el tratamiento térmico que de proteína microparticulada en el tratamiento mecánico.

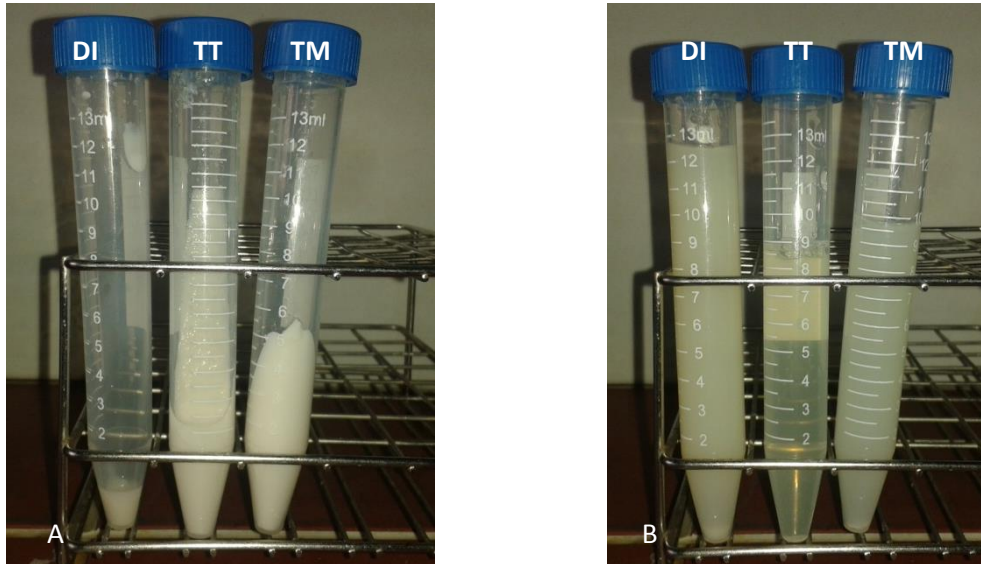


Figura 74. Comparación de los agregados (A) y sobrenadantes (B) de un determinado ensayo obtenidos tras la centrifugación de la disolución inicial (DI), tratamiento térmico (TT) y tratamiento mecánico (TM).

En la figura 74, se apreció que el sobrenadante del tratamiento térmico fue mucho más transparente que el obtenido tras la homogenización, debido a que la acción del tratamiento mecánico genera partículas más pequeñas que se dispersan en el sobrenadante. Por tanto, esta imagen confirma las diferencias entre ambos tratamientos.

8.3.3 Comprobación de la superficie de respuesta del tratamiento mecánico

Con el objetivo comprobar la superficie de respuesta en el tratamiento mecánico, se partió del ensayo óptimo que se estableció en el tratamiento térmico. Mediante el programa *Statgraphics*, se determinaron los valores predictivos de cada una de las variables de respuesta en el tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase), que se muestran en la tabla XXIV.

Tabla XXIV. Resultados predichos por la superficie de respuesta en el tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase).

<i>Ensayo</i>	<i>D(v, 0,5)(μm)</i>	<i>η 100s⁻¹ (cP)</i>	<i>Proteína microparticulada (%)</i>
<i>pH 4, 10,91% p/p, fuerza iónica 90 mM (300 bar, 1 pase)</i>	13,86	177,92	69,07

Estas condiciones del ensayo fueron modificadas por dos razones que fueron comentadas anteriormente en el apartado del tratamiento térmico. Dichas variaciones en los factores experimentales de cada ensayo, dieron lugar a las predicciones de cada una de las variables de respuesta de estudio (Tabla XXV).

Tabla XXV. Resultados predichos por la superficie de respuesta según las condiciones experimentales de interés en el tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase).

<i>Ensayo de interés</i>	<i>D(v, 0,5) (μm)</i>	<i>η 100s⁻¹ (cP)</i>	<i>Proteína microparticulada (%)</i>
<i>pH 6, 8% p/p, fuerza iónica 31,26 mM (300 bar, 1 pase)</i>	3,31	13,73	25,39

El producto del primer ensayo que se obtuvo del tratamiento térmico se hizo pasar por el homogenizador a 300 bar y 1 pase. A continuación, se comparó en la tabla XXVI los resultados de cada variable de respuesta con las predicciones de la superficie de respuesta del tratamiento mecánico.

Tabla XXVI. Comparación de los resultados experimentales con la predicción de la superficie de respuesta a pH 6, 8% concentración proteica de la disolución y fuerza iónica 31,26 mM CaCl₂ en el tratamiento mecánico (300 bar, 1 pase).

<i>Producto (pH 6, 8% p/p, fuerza iónica 31,26 mM CaCl₂) (300 bar, 1 pase)</i>	<i>D(v, 0,5)(μm)</i>	<i>η 100s⁻¹ (cP)</i>	<i>Proteína microparticulada (%)</i>
Ensayo	1,91	5,12	26,40
Predicho	3,31	13,73	25,40

En la tabla XXVI, se observa una alta exactitud en el porcentaje de proteína microparticulada y bastante similitud en el tamaño de partícula. Sin embargo, existen diferencias destacables en la viscosidad debido a que posiblemente algún ensayo sea responsable de generar esos altos valores de viscosidad. Parece ser que el ensayo anormal sería el realizado a pH 5,5, 11% p/p de concentración proteica de alimentación y una fuerza iónica de 0 mM de CaCl_2 , aunque es difícil de determinar, puesto que no existe ningún tratamiento para compararlo ya que todos los que no han pasado por el homogenizador son a condiciones de pH 5,5 y 11% p/p de concentración proteica de alimentación. Una posible solución para minimizar las diferencias de viscosidad entre lo obtenido experimentalmente y lo predicho por la superficie de respuesta, sería descartar el ensayo, no obstante, esto no podría llevarse a cabo ya que el programa no podría construir la superficie de respuesta si son descartados más ensayos ya que los grados de libertad del sistema se ven afectados.

8.4 TRATAMIENTO MECÁNICO: EFECTO DE LA PRESIÓN Y EL NÚMERO DE PASES

Además de estudiar la superficie de respuesta del tratamiento mecánico en condiciones prefijadas, se analizó también el efecto que tiene la variación de la presión y el número de pases en el homogenizador sobre cada una de las variables de respuesta de estudio.

8.4.3 Resultados del tratamiento mecánico variable

Para estudiar la influencia de la presión y el número de pases, se seleccionó el producto considerado como óptimo según los intereses buscados (pH 6, concentración proteica de alimentación 8% p/p, fuerza iónica 31,26 mM CaCl_2). Como en el tratamiento térmico se realizaron tres réplicas del ensayo óptimo de interés, el primer ensayo se sometió a una presión de 300 bar, el segundo a 500 bar y el tercero a 700 bar, realizando 5 pases por el homogenizador y recogiendo muestra en el primer, segundo y quinto pase. A continuación, se muestra en la tabla XXVII el diseño de los experimentos:

Tabla XXVII. Resultados de cada una de las variables de respuesta de estudio en el tratamiento térmico y en el tratamiento mecánico, en función de la presión y el número de pases, de las tres réplicas realizadas.

<i>Producto</i> (pH 6,8% p/p, fuerza iónica 31,26 mM CaCl ₂)	<i>Tratamiento térmico y número de pases en el homogenizador</i>	<i>D(v, 0,5) (μm)</i>	<i>η 100s⁻¹ (cP)</i>	<i>Proteína microparticulada (%)</i>
	<i>Tratamiento térmico</i>	45,58	420,10	33,87
<i>ENSAYO 1</i>	<i>1 pase</i>	1,91	5,12	26,40
<i>(300 bar)</i>	<i>3 pases</i>	1,13	3,74	22,83
	<i>5 pases</i>	0,99	3,51	23,62
	<i>Tratamiento térmico</i>	50,12	347,40	29,92
<i>ENSAYO 2</i>	<i>1 pase</i>	1,55	4,16	23,85
<i>(500 bar)</i>	<i>3 pases</i>	0,86	3,46	24,03
	<i>5 pases</i>	0,79	3,63	21,88
	<i>Tratamiento térmico</i>	43,51	348,10	32,81
<i>ENSAYO 3</i>	<i>1 pase</i>	0,96	3,28	24,81
<i>(700 bar)</i>	<i>3pases</i>	0,75	3,21	23,85
	<i>5 pases</i>	0,7	3,18	23,26

En la tabla XXVII, se pueden observar las diferencias que existen en el tratamiento mecánico a medida que aumenta la presión y el número de pases realizados en el homogenizador. En la columna del porcentaje de proteína microparticulada se descartaron dos valores (Ensayo 2, 500 bar, 1 pase y el ensayo 1, 300 bar, 3 pases) al salirse mínimamente de la tendencia, ya que son menores que en aquellos casos donde predominan un mayor número de pases, cuando en principio cuanto mayor es el número de pases aplicados a una misma presión, menor debe ser el porcentaje de proteína microparticulada; hipótesis que se justificará posteriormente. Además, hay que tener en cuenta que la sensibilidad del método de determinación del porcentaje de proteína microparticulada no es relativamente alto y se pudieron generar errores en su determinación.

A continuación, se expondrán las gráficas correspondientes de dos ensayos del tratamiento mecánico con diferente presión y número de pases (Tabla XXVIII), para comentar las diferencias entre ellos en función de la variable de respuesta de estudio:

tamaño de partícula $D(v,0,5)$, viscosidad (100 s^{-1}) y porcentaje de proteína microparticulada.

Tabla XXVIII. Comparativa de los valores de cada una de las variables de respuesta analizadas de dos ensayos a diferente presión y número de pases en el tratamiento mecánico.

<i>Producto</i> <i>pH 6, 8% p/p, fuerza iónica</i> <i>31,26 mM CaCl₂</i>	<i>D(v, 0,5(μm)</i>	<i>η 100s⁻¹</i> <i>(cP)</i>	<i>Proteína</i> <i>microparticulada (%)</i>
<i>300 bar, 1 pase (A)</i>	<i>1,91</i>	<i>5,12</i>	<i>26,40</i>
<i>700 bar, 5 pase (B)</i>	<i>0,7</i>	<i>3,18</i>	<i>23,26</i>

8.4.3.1 Tamaño de partícula

En la figura 75 se muestra la comparativa del diámetro de partícula de dos ensayos que difieren en la presión y el número de pases aplicados en el homogenizador.

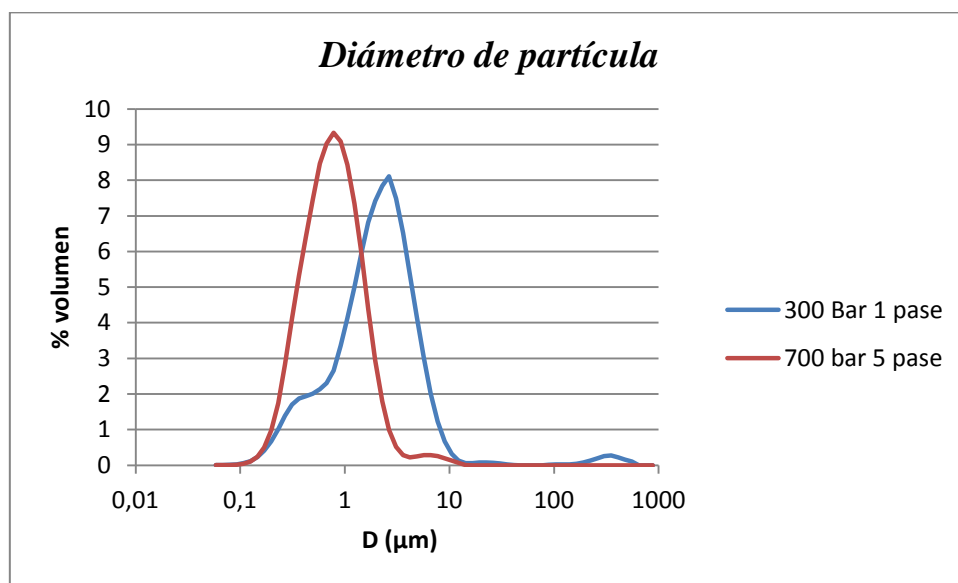


Figura 75. Comparativa del diámetro de partícula en la etapa de tratamiento mecánico de dos ensayos a diferente presión y número de pases.

En la figura 75, se observan diferencias claras en el tamaño de partícula, siendo los de mayor diámetro aquellos productos sometidos a menor presión y número de pases (300 bar y 1 pase). Por tanto, en un principio parece ser que las variaciones en la presión y el número de pases en el homogenizado influyen en el tamaño de partícula, aunque se analizará con mayor detalle más adelante.

8.2.3.2 Viscosidad

En las gráficas de la figura 76 se muestra la reología de dos réplicas de cada uno de los dos ensayos comparados, con diferencias en la presión y el número de pases aplicados en el homogenizador durante el tratamiento mecánico.

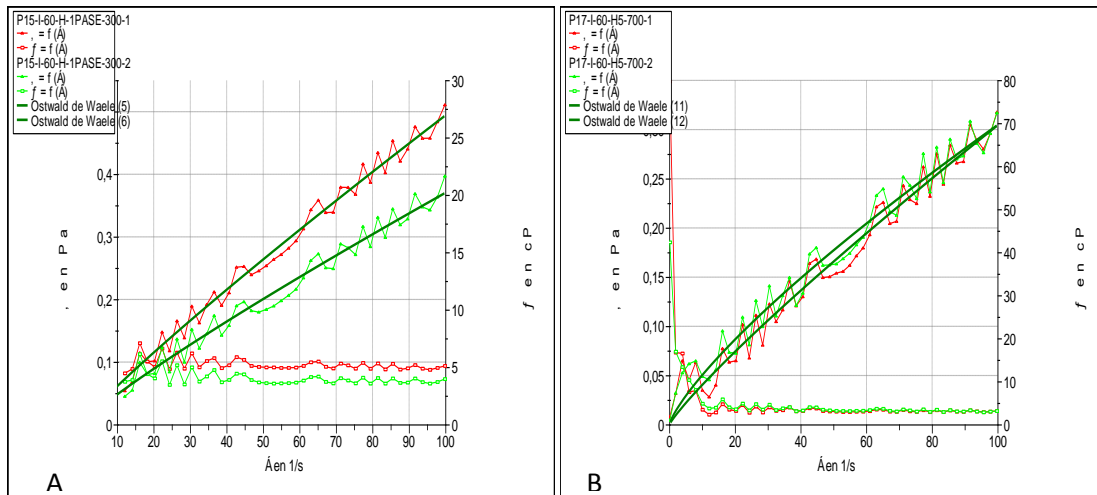


Figura 76. Representación de la reología de dos ensayos en la etapa de tratamiento mecánico a diferente presión y número de pases.

Tabla XXIX. Comparación de los parámetros que caracterizan la reología del fluido de de dos ensayos a diferente presión y número de pases en el tratamiento mecánico.

<i>Producto (pH 6, 8% p/p, 31,26 mM CaCl₂)</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>n</i>	<i>η 100 s⁻¹ (cP)</i>
300 bar, 1 pase (A)	0,99	0,007	0,90	4,55
700 bar, 5 pase (B)	0,98	0,007	0,83	3,18

En referencia a la figura 76 y la tabla XXIX, tanto el ensayo A como el B se caracterizaron por ser fluidos con un comportamiento pseudoplástico ($n < 1$) pero muy próximo a newtoniano ($n = 1$). Por otro lado, la viscosidad a 100 s^{-1} es mayor cuanto menor es la presión y el número de pases.

8.4.3.3 Porcentaje de proteína microparticulada

Los ensayos que fueron sometidos a homogenización a 300 bar y 1 pase presentaron un mayor porcentaje de proteína agregada por centrifugación (26,40%) que aquellos tratados a 700 bar y 5 pases (23,26%), aunque las diferencias fueron poco significativas.

A continuación, se explicará con mayor profundidad la influencia de la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico sobre cada una de las variables de respuesta de estudio.

8.4.4 Superficie de respuesta del tratamiento mecánico: efecto de la presión y el número de pases.

Al igual que en anteriores apartados, todos los resultados de cada variable de respuesta, fueron introducidos en el programa *Statgraphics* con el objetivo de construir una superficie de respuesta para poder estudiar la influencia que tienen la presión y el número de pases sobre cada una de las variables de estudio.

8.4.4.1 Tamaño de partícula

La superficie de respuesta construida en base a los resultados experimentales del tamaño de partícula, en función de la presión y el número de pases, presentó un ajuster² del 97,50 %. En la figura 77, se representa un buen grado de ajuste de la superficie, al coincidir aproximadamente los valores experimentales con los predichos por la superficie de respuesta.

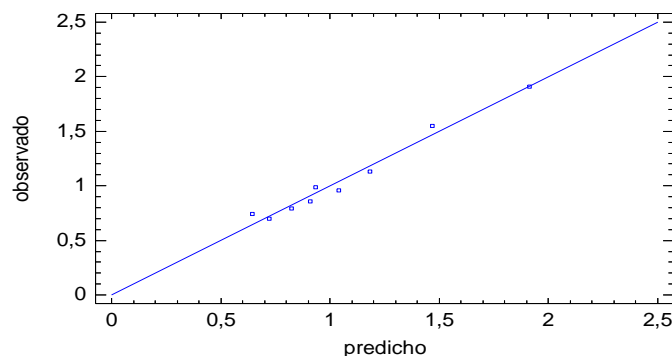


Figura 77. Comparativa de los resultados del tamaño observados con los predichos.

El tamaño de partícula cumple la siguiente ecuación matemática, donde se aprecia el efecto de los factores experimentales sobre la respuesta:

Tamaño $D(v, 0, 5)$

$$= 3,26132 - 0,0027375 \cdot \text{Presión} - 0,725417 \cdot \text{Pases} + 1,45833E \\ - 7 \cdot \text{Presión}^2 + 0,0004125 \cdot \text{Presión} \cdot \text{Pases} + 0,0595833 \cdot \text{Pases}^2$$

A continuación, se muestra gráficamente la influencia de la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico sobre el tamaño de partícula.

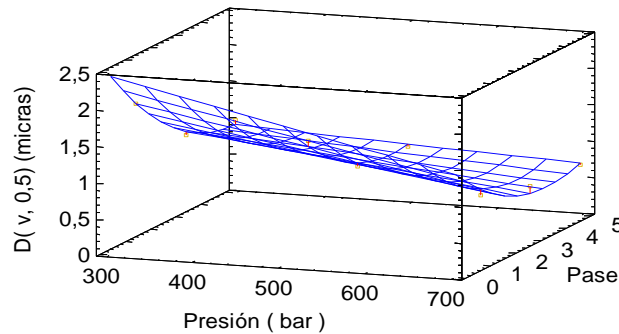


Figura 78. Superficie de respuesta del tamaño $D(v, 0,5)$ (μm) en función de la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico.

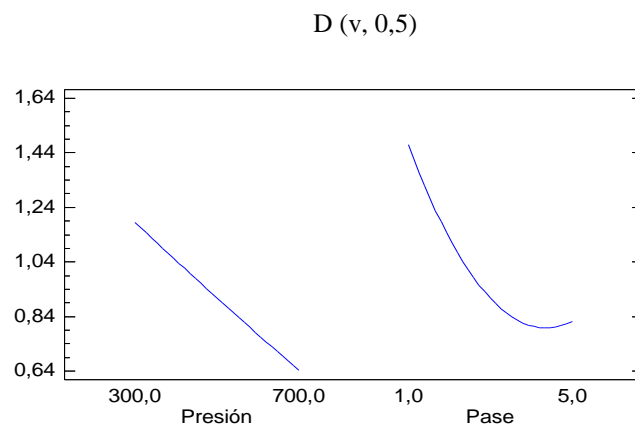


Figura 79. Representación del peso y la tendencia de la presión y el número de pases del tratamiento mecánico sobre el tamaño.

Antes de entrar en detalle en la explicación de los resultados, cabe señalar que la línea roja representada en la figura 78 corresponde a la distancia comprendida entre el valor real (punto amarillo) y lo predicho por la superficie de respuesta (azul).

La figura 78 y 79 muestran la influencia y la tendencia de la presión y los pases en el tratamiento mecánico sobre el tamaño de partícula. Se observó que cuanto mayor es la presión y el número de pases menor es el tamaño de los microparticulados [29]. Sin embargo, existe un límite donde el homogenizador no es capaz de reducir más el tamaño de partícula para una presión considerada.

La influencia de la presión sobre el tamaño de partícula fue descrita recientemente, indicando que la homogenización a altas presiones (414 bar, 1 pase) redució significativamente el tamaño de partícula y mejoró la estabilidad y sedimentación[58]. Esta teoría fue reforzada también a partir de estudios que determinaron que el tratamiento por microfluidización de proteínas de suero lácteo generaba una disminución del volumen del sedimento [62], otros observaron que el tamaño de partícula disminuía con la velocidad de cizalla [25]. Por tanto, se confirma que cuanto mayor es la presión aplicada menor es el tamaño de los microparticulados.

8.4.4.2 Viscosidad

La viscosidad es la siguiente variable de respuesta a analizar. La superficie de respuesta construida mediante los valores experimentales, presentó un ajuste r^2 del 95,15 %, siendo la bondad del ajuste observable en la figura 80, donde los valores experimentales se encuentran próximos a los predichos por la superficie.

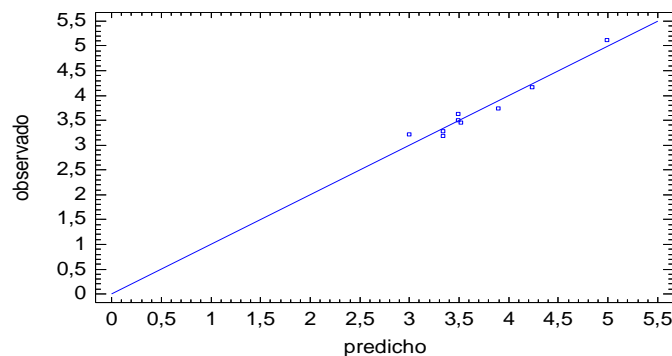


Figura 80. Comparativa de los resultados de viscosidad observados con los predichos en el tratamiento mecánico.

La viscosidad cumple la siguiente ecuación matemática predictiva de la superficie de respuesta, en función de la presión y el número de pases.

Viscosidad(100s⁻¹)

$$\begin{aligned}
 &= 6,91507 - 0,00316458 \cdot \text{Presión} - 1,17354 \cdot \text{Pases} \\
 &- 0,00000191667 \cdot \text{Presión}^2 + 0,00094375 \cdot \text{Presión} \cdot \text{Pases} \\
 &+ 0,0858333 \cdot \text{Pases}^2
 \end{aligned}$$

La influencia de la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico sobre la viscosidad se mostrará a continuación mediante una serie de gráficas.

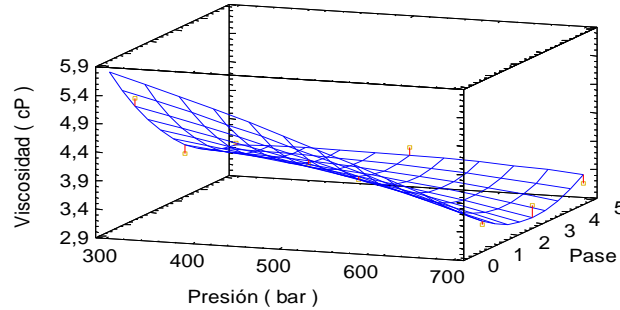


Figura 81. Superficie de respuesta de la viscosidad (100 s^{-1}) (cP) en función de la presión y número de pases en el tratamiento mecánico.

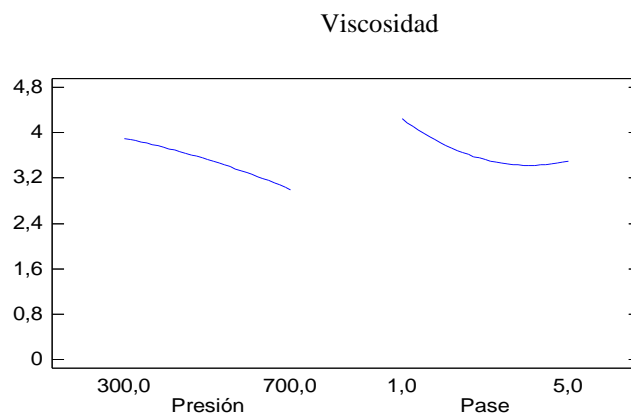


Figura 82. Representación del peso y la tendencia de la presión y el número de pases del tratamiento mecánico sobre la viscosidad.

En referencia a la superficie de respuesta (Figura 81) y las tendencias (Figura 82), la viscosidad disminuyó a mayor presión y número de pases [57, 58].

Al comparar la superficie de respuesta del tamaño con la de la viscosidad, se observó que muestran la misma tendencia cuando varía la presión y el número de pases.

En definitiva, el incremento combinado de la presión y el número de pases ocasionó una reducción del tamaño de partícula, disminuyendo la capacidad de atrapar disolvente a través de la cavidad de los poros, generando un descenso de la viscosidad [58].

8.4.4.3 Porcentaje de proteína microparticulada

La superficie de respuesta construida en base a los valores experimentales del porcentaje de proteína microparticulada, presentó un ajuste r^2 del 96,4%, siendo la bondad del ajuste observable en la figura 83.

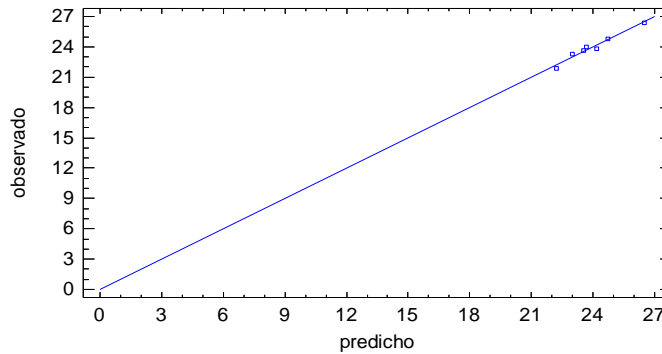


Figura 83. Comparativa de los resultados de porcentaje de proteína microparticulada observados con los predichos en el tratamiento mecánico.

En la figura 83, los valores experimentales se ajustan perfectamente con los predichos por la superficie.

La ecuación matemática predictiva de la superficie de respuesta de dicha variable de estudio es la siguiente:

Proteína microparticulada(%)

$$\begin{aligned}
 &= 33,9334 - 0,0316363 \cdot \text{Presión} - 0,493375 \cdot \text{Pases} \\
 &+ 0,000026475 \cdot \text{Presión}^2 + 0,00076875 \cdot \text{Presión} \cdot \text{Pases} - 0,079 \\
 &\cdot \text{Pases}^2
 \end{aligned}$$

A continuación, se muestra gráficamente la influencia de la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico sobre el porcentaje de proteína microparticulada.

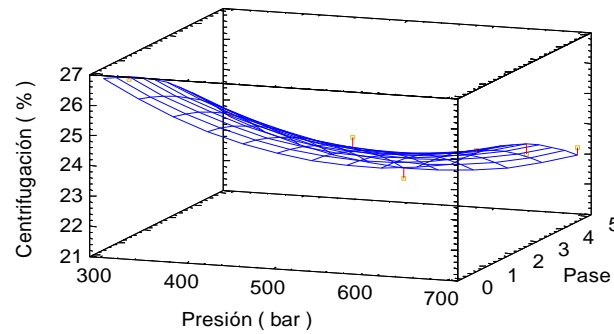


Figura 84. Superficie de respuesta del porcentaje de proteína microparticulada por centrifugación en función de la presión y número de pases en el tratamiento mecánico.

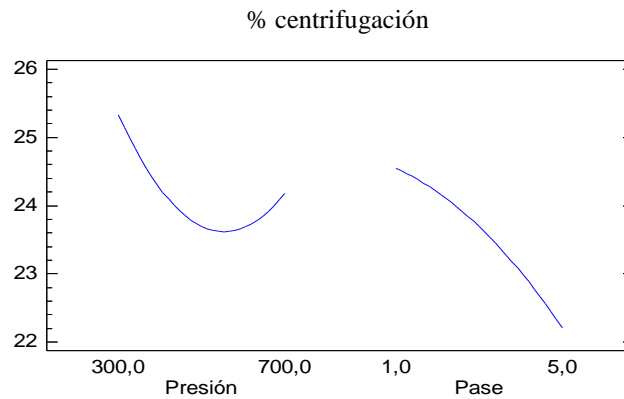


Figura 85. Representación del peso y la tendencia de la presión y el número de pases del tratamiento mecánico sobre el porcentaje de proteína microparticulada.

Las figuras 84 y 85, mostraron que el porcentaje de proteína microparticulada disminuye cuanto mayor fue la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico. En cambio, se observó un límite próximo a 700 bar, indicando que el porcentaje de proteína microparticulada no disminuyó más por más presión que se aplicó.

Según estudios previos, los productos de suero lácteo que fueron sometidos a un tratamiento de microfluidización presentaron menor sedimentación que antes de ser sometidos a dicho tratamiento [62]. Es decir, la presión redujo el grado de sedimentación porque el tratamiento mecánico convirtió los grandes agregados insolubles en partículas de tamaño cada vez más reducido[62], disminuyendo la sedimentación y por tanto, el porcentaje de proteína microparticulada. Luego, cuanto

mayor es la presión y el número de pases menor será el tamaño de partícula y consecuentemente la proporción de proteína microparticulada.

8.4.5 Comprobación de la superficie de respuesta en el tratamiento mecánico: efecto de la presión y el número de pases

Para comprobar la superficie de respuesta del efecto de la presión y número de pases en el del tratamiento mecánico, se seleccionaron unas condiciones de tratamiento mecánico diferentes a las que fueron estudiadas (400 bar, 2 pases en el homogenizador). Mediante el programa *Statgraphics* se determinaron las predicciones de la superficie de respuesta para ese tratamiento mecánico.

En la tabla XXX se compararon los resultados experimentales con las predicciones de la superficie de respuesta del tratamiento mecánico seleccionado (400 bar, 2 pases).

Tabla XXX. Comparación de los resultados experimentales con la predicción de la superficie a 400 bar y 2 pases en el tratamiento mecánico.

Producto (pH 6, 8% p/p, fuerza iónica 31,26 mM CaCl ₂)		D(v, 0,5) (μm)	η 100 s⁻¹ (cP)	Proteína microparticulada (%)
Tratamiento térmico	<i>Ensayo experimental</i>	49,92	325,2	28,24
	Predicho	79,11	343,56	36,47
Tratamiento mecánico (400 bar, 2 pases)	<i>Ensayo experimental</i>	1,03	3,22	22,76
	Predicho	1,31	4,094	24,83

La tabla XXX muestra los valores experimentales del tratamiento térmico y mecánico (400 bar, 2 pases) con sus predicciones. En este apartado, los que mayor interés tienen son los del tratamiento mecánico, observándose que los resultados experimentales de cada una de las variables de estudio mostraron bastante exactitud con los predichos por la superficie de respuesta.

8.5 FUTURO: APLICACIÓN INDUSTRIAL DE SUERO MICROPARTICULADO EN YOGURT

Con las investigaciones y los resultados obtenidos es posible tratar de incorporar este tipo de microparticulados a productos como quesos, yogures y helados, entre otros.

Una de las investigaciones más recientes es el empleo de suero microparticulado en yogurt.

La gran cantidad de suero lácteo que se genera diariamente en las industrias lácteas se aprovecha en parte en la fabricación de WPCs-35. Este es sometido a un proceso de microparticulación proteica a unas determinadas condiciones (pH, temperatura y tiempo de calentamiento, presión y número de pases en el homogenizador) para conseguir un tamaño de partícula lo más similar posible a los glóbulos grasos de un yogurt (1-2 μm). Una vez conseguido el suero líquido microparticulado, es llevado a una torre de secado por atomización con el fin de obtener un producto microparticulado en polvo con un 96% de extracto seco.

En estos sistemas de secado, el proceso consiste en pulverizar el fluido dentro de una cámara por donde circula una corriente controlada de aire caliente. Este fluido es atomizado en millones de microgotas mediante un disco rotativo o boquilla de pulverización. A través de este proceso el área de la superficie de contacto del producto pulverizado se aumenta enormemente y cuando se encuentra dentro de la cámara con la corriente de aire caliente de secado produce la vaporización rápida del solvente del producto, generalmente agua, produciéndose el fenómeno de secado [63].

Una vez conseguido el microparticulado en polvo, se realizan pruebas a escala de laboratorio para la elaboración de yogures con el microparticulado. El objetivo consiste en sustituir parte de la leche en polvo que se utiliza en la formación del yogurt por el microparticulado en polvo. El proceso consta de una etapa de mezclado del microparticulado con la leche líquida y en polvo, seguido de un proceso de pasteurización (90°C, 5 minutos), homogenización (250 bar), fermentación (3 mL/100 gramos), calentamiento a 45°C, hasta alcanzar el pH 4,6 (4-5 horas aproximadamente), y finalmente un enfriamiento.

Con dichos yogures se realizan catas con el objetivo de evaluar sus características organolépticas, es decir, se evalúa su grumosidad, cremosidad y acidez

entre otros más parámetros. Si el producto presenta características bastante óptimas, se realiza una prueba a escala piloto con el fin de obtener un producto lo más representativo posible al producto final. Este nuevamente es evaluado y se plantea la realización de una prueba industrial con la idea cercana de lanzar el producto al mercado.

Otro de los productos lácteos que se están comenzando a investigar para incorporarles proteína microparticulada son los helados.

Durante la congelación del helado, la acción de batido y la cristalización del hielo desestabilizan la emulsión de grasa. La grasa desestabilizada actúa como cemento y proporciona soporte a las burbujas de aire primariamente bordeadas por las proteínas. La combinación de estas proteínas y las grasas parcialmente fusionadas proporciona dureza y estructura al helado [7].

Sin embargo, el reto de trabajar con helados bajos en grasa guarda relación con el hecho de que la estructura de los glóbulos de grasa puede estar rota o ausente, lo que puede impactar seriamente en la textura del producto [64], resultando ser uno de los principales problemas en la elaboración de helados con proteína microparticulada.

9 CONCLUSIONES

Se estudió el proceso de microparticulación proteica empleando como materia prima un WPC-60. Para ello, se analizó la influencia de los diferentes parámetros que intervienen en el proceso de microparticulación (pH, concentración proteica de la alimentación, fuerza iónica y presión y número de pases en el homogenizador) sobre las variables de estudio seleccionadas: tamaño de partícula, viscosidad y porcentaje de proteína microparticulada.

El objetivo de este trabajo consistió en obtener diferentes microparticulados con un amplio rango de tamaño de partícula, viscosidad y porcentaje de proteína microparticulada con el fin de ser aplicados a diferentes alimentos como ingrediente sustitutivo de la grasa mejorando las propiedades sensoriales de productos bajos en grasa.

Las variables de estudio seleccionadas aumentaron con la concentración proteica de la alimentación y la fuerza iónica. Esta última, disminuye las repulsiones electrostáticas entre las proteínas favoreciendo la agregación de las mismas.

El tamaño de los agregados se incrementó con el pH al aumentar la actividad del grupo tiol de la β -Lg ya que facilita el establecimiento de puentes disulfuro entre las proteínas.

En el tratamiento térmico se obtuvo una mayor viscosidad a pH 5,5, debido a su proximidad al punto isoeléctrico de la β -Lg (5,1), donde las cargas de las proteínas son neutras, facilitando la agregación de las mismas.

El porcentaje de agregación en el tratamiento térmico aumentó al disminuir el pH, debido a que el efecto protector de la lactosa sobre la desnaturalización térmica de las proteínas disminuye, facilitando el despliegue de las mismas y la posterior agregación generándose asociaciones de β -Lg con mayor peso molecular.

El tratamiento mecánico ejerció un efecto de cizalla superior sobre los agregados de mayor tamaño, del tal forma que, al contrario de lo ocurrido en el tratamiento térmico, los microparticulados de mayor tamaño se obtuvieron a pH 4.

Las diferentes variables de estudio se vieron reducidas con la presión y el número de pases en el tratamiento mecánico.

Las muestras correspondientes al tratamiento térmico presentaron un comportamiento pseudoplástico, sin embargo, el producto microparticulado obtenido tras homogenización tendió a ser cada vez menos pseudoplástico, comportándose en ocasiones como newtoniano a mayor presión y número de pases.

Fijando las condiciones de trabajo en pH 4,0-7,0, concentración proteica de la alimentación 3-11% p/p, fuerza iónica 0-90 mM CaCl₂, presión 300-700 bar y 1-5 pases en el homogenizador se obtuvieron microparticulados con tamaños de partícula de 0,70-8,20 μm , viscosidades a 100 s^{-1} de 1,48-82,17 cP y porcentajes de proteína microparticulada de 5,08-40,32%.

La Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) permitió estudiar la influencia de los factores experimentales sobre cada una de las variables de estudio. Por otra parte, se optimizó el tratamiento térmico en base al máximo porcentaje de agregación y se obtuvieron superficies y ecuaciones predictivas para cada variable de respuesta en la etapa de tratamiento mecánico con el objetivo de controlar las características finales del microparticulado.

Con las investigaciones y los resultados obtenidos, la incorporación de este tipo de microparticulados a productos como quesos, yogures, helados, batidos y otros alimentos, sustituyendo a la grasa y confiriendo nuevas propiedades funcionales/tecnológicas y organolépticas (mayor elasticidad y textura, y mejora en la percepción del sabor y la cremosidad), es viable.

10 SÍMBOLOS

<i>BSA</i>	Albúmina de suero bovino.
<i>Ca⁺²</i>	Ión calcio.
<i>CaCl₂</i>	Cloruro de calcio.
<i>cP</i>	Centipoise.
<i>D</i>	Diámetro.
<i>Da</i>	Dalton.
<i>DI</i>	Disolución inicial.
<i>D(v, 0,1)</i>	Tamaño por debajo del cual queda el 10% de la distribución.
<i>D(v, 0,5)</i>	Tamaño por debajo del cual queda el 50% de la distribución.
<i>D(v, 0,9)</i>	Tamaño por debajo del cual queda el 90% de la distribución.
<i>D(4, 3)</i>	Diámetro medio en volumen.
<i>F.i</i>	Fuerza iónica.
<i>F/A</i>	Fuerza por unidad de superficie.
<i>HCl</i>	Ácido clorhídrico.
<i>IGs</i>	Inmunoglobulinas.
<i>mM</i>	Milimolar.
<i>mL</i>	Mililitro.
<i>Modo CR</i>	Modo de velocidad controlada.
<i>Modo CS</i>	Modo de esfuerzo controlado.
<i>Modo CD</i>	Modo de deformación controlado.
<i>MSR</i>	Metodología de superficies de respuesta.
<i>n</i>	Índice de comportamiento del fluido.
<i>NaOH</i>	Hidróxido de sodio.
<i>NNP</i>	Nitrógeno no proteico.
<i>p</i>	Peso.
<i>Pa</i>	Pascales.
<i>pI</i>	Punto isoeléctrico.
<i>PM</i>	Peso molecular.
<i>r</i>	Parámetro de ajuste.
<i>RLW</i>	Suero reducido de lactosa.
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto.

<i>s</i>	Segundo.
<i>-SH</i>	Grupo tiol.
<i>S-S</i>	Puente disulfuro.
<i>TM</i>	Tratamiento mecánico.
<i>TT</i>	Tratamiento térmico.
<i>WPC</i>	Concentrado de proteínas del lactosuero.
<i>WPC-60</i>	Concentrado de proteínas del lactosuero del 60%.
<i>WPI</i>	Aislados de proteína del lactosuero.
<i>α-La</i>	α -Lactoalbúmina.
<i>β-Lg</i>	β -Lactoglobulina.
<i>η</i>	Viscosidad.
<i>γ</i>	Velocidad de deformación.
<i>τ</i>	Esfuerzo cortante.
<i>μm</i>	Micrómetro.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Loaliza, M., Aprovechamiento del suero de leche para la elaboración de una bebida funcional, Tesis doctoral, Universidad de las Américas (2011).
2. Manual de Industrias Lácteas. , in Procesado del Lactosuero. Gösta, B.; López, A., Manual de Industrias lácteas TETRA PAK. Ediciones Mundi Prensa: Madrid, 1994.
3. Parzanese, M., Tecnologías para la Industria Alimentaria. Procesamiento de lactosuero. Alimentos Argentinos: p. 9.
4. Londoño, M.S., J. Hernández, A. y Parra, J. , Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*, Facultad Nacional de Agronomía, 2008.
5. Suero de leche propiedades y usos. Recuperado el 20 de junio del 2014 de: <http://es.scribd.com/doc/47261459/Suero-de-leche-propiedades-y-usos>.
6. Viteri, C.A., L.F.Q.: Procesos lácteos. Suero lácteo. Recuperado el 20 de junio del 2014 de: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211613/Modulo_zip/leccin_35_suero_lcteo.html.
7. Adapa, S., et al., Rheological Properties of Ice Cream Mixes and Frozen Ice Creams Containing Fat and Fat Replacers. *Journal of Dairy Science*, 2000. 83(10): p. 2224-2229.
8. Proteínas del lactosuero. Recuperado el 1 de junio del 2014 de: <http://milksci.unizar.es>
9. Riera, F.A., La Industria Láctea. Máster en Biotecnología Alimentaria, Universidad de Oviedo, España (2014).
10. Huerta, T., Análisis Conformacional de la Beta-Lactoglobulina: Encapsulación de Principios Activos, Proyecto de Investigación, Universidad de Oviedo, España (2011).
11. Ryan, K.N., Modifying Whey Proteins to Improve Thermal Stability at Neutral pH, Tesis doctoral, North Carolina State University (2011).

12. Hollar, C.M., et al., Factors Affecting the Denaturation and Aggregation of Whey Proteins in Heated Whey Protein Concentrate Mixtures. *Journal of Dairy Science*, 1995. 78(2): p. 260-267.
13. Almécija, M.C., Obtención de lactoferrina bovina mediante ultrafiltración del lactosuero, Tesis doctoral, Universidad de Granada, España, (2007).
14. Liu, H.C., W.L. Chen, and S.J.T. Mao, Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 2007. 90 (2): p. 547-555.
15. Ballester, M., La β -lactoglobulina y su aplicación en transgénesis, Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona (2005).
16. de la Fuente, M.A., H. Singh, and Y. Hemar, Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 2002. 13 (8): p. 262-274.
17. Zydney, A.L., Protein Separations Using Membrane Filtration: New Opportunities for Whey Fractionation. *International Dairy Journal*, 1998. 8 (3): p. 243-250.
18. La lactoalbúmina. Recuperado el 22 de junio del 2014 de: <http://blog.hsnstore.com/lactoalbumina>.
19. Parra, R.A., Lactosuero: importancia en la industria de alimentos, Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia (2009).
20. Microparticulación del Suero de Quesería, Máster en Gestión y Desarrollo en la Industria Alimentaria (2013).
21. Microparticulación proteica para el remplazo de grasas en helados, Máster Biotecnología Alimentaria, Universidad de Oviedo (2014).
22. Microparticulation of Whey Proteins ,Applications in Dairy, Santiago (Chile), 2011.
23. Microparticulación de proteínas procedentes del lactosuero. Recuperado el 27 de Junio del 2014 de: www.perinox.com.
24. Dissanayake, M. and T. Vasiljevic, Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*, 2009. 92 (4): p. 1387-1397.

25. Andersson, P., Microparticulated whey protein:Description and application, Grant Report, 2008. p. 55.
26. Molecola, Nuevo Homogenizador para Laboratorio. Recuperado el 5 de julio del 2014 de: www.symtecenlinea.com
27. Quintanilla, M.X., Estudio sobre la distribución de α -tocoferol en microcápsulas obtenidas por secado por aspersión, Tesis Doctoral, Universidad de México (2011).
28. Tang, S.Y., P. Shridharan, and M. Sivakumar, Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions – Comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013. 20(1): p. 485-497.
29. Forbes Medi-Tech Inc. 200-750, West Pender Street Vancouver, British Columbia V6C 2T8, CA. Método para preparar micropartículas de fitoesteroles o fitostanoles. Zawistowski, J.,Int. CI: 7A23L 1/30, nº 2204503. 1 mayo 2004.
30. Santiago, K.P., Proyecto de Microparticulación, Máster en Gestión y Desarrollo en la Industria Alimentaria, Universidad de Oviedo, España (2014).
31. El sistema APV LeanCreme. Microparticulación de proteína de suero.
32. HRS Serie Unicus: Intercambiador de Calor de Superficie Rascada. Recuperado el 28 de junio del 2014 de: www.hrs-heatexchangers.com.
33. Tetra Therm MicroPart. Unit for microparticulation of whey proteins.
34. Paredes, B. Laca, A., Propiedades texturales de productos alimentarios, Prácticas de laboratorio, Máster de Biotecnología Alimentaria 2013/2014.
35. Sáenz, M.C., Evaluación de los gránulos obtenidos del fraccionamiento de yema de huevo de gallina y su aplicación como agente emulgente en la elaboración de mayonesas, Proyecto Fin de Máster Biotecnología Alimentaria, Universidad de Oviedo, España (2008).
36. Laca, A.L., Fraccionamiento y aprovechamiento de la yema de huevo,Tesis doctoral, Universidad de Oviedo, España (2010).
37. Schramm, G., A Practical Approach to Rheology and Rheometry.2ª Ed.,Thermo Electron (Karlsruhe) GmbH, Federal Republic of Germany (2004).

38. Praktikum 2011 en la ETS Ingeniería Agronómica Medio Natural. Recuperado el 1 de julio del 2014 de: <http://praktikum2011etsiamn.blogs.upv.es>.
39. Introducción a la mecánica de fluidos. Comportamiento reológico de las sustancias. Recuperado el 3 de julio del 2014 de: www.mecanicadefluidosft.blogspot.com.es.
40. Puebla, J.C., Distribución de tamaño de partículas por tecnología de difracción láser, BFI Optilas, S.A., 2002.
41. Difracción de la luz de láser. Laboratorio de fundamentos físicos de la ingeniería E-T.S.I.T (2004-2005).
42. La teoría de Mie. Enciclopedia FRITSCH. Recuperado el 6 de mayo del 2014 de: www.fritsch-sizing.es.
43. Tamaño de partícula. Mastersizer 2000. Recuperado el 7 de julio del 2014 de: <http://www.cecoltec.com/catalogo/21>.
44. Diseño de experimentos, Máster en Ingeniería de Procesos y Ambiental (2010-2011). p. 27.
45. Fernández, C.D., Piñeiro, M., Superficies de respuesta. Métodos y diseños.
46. A. García, A.N., J.L. Cortizo, J.M. Sierra, A. Higuera, Diseño de experimentos y su aplicación en la investigación de la predicción del desgaste de recubrimientos Ni-Cr-B-Si, Dpto. Construcción e Ingeniería de Fabricación, Universidad de Oviedo (2010).
47. Baş, D. and İ.H. Boyacı, Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 2007. 78 (3): p. 836-845.
48. Torres, I.C., J.M. Amigo Rubio, and R. Ipsen, Using fractal image analysis to characterize microstructure of low-fat stirred yoghurt manufactured with microparticulated whey protein. *Journal of Food Engineering*, 2012. 109 (4): p. 721-729.
49. Martínez, E., Estrems, M., Valentín, M., Garrido, A., Guillén, J.A., Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para la optimización de parámetros de soldadura en función de la distribución térmica resultante, 2009.
50. Marangoni, A.G., et al., On the structure of particulate gels—the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 2000. 14 (1): p. 61-74.

51. Nicolai, T., M. Britten, and C. Schmitt, β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, 2011. 25 (8): p. 1945-1962.
52. Bryant, C.M. and D.J. McClements, Ultrasonic spectrometry study of the influence of temperature on whey protein aggregation. *Food Hydrocolloids*, 1999. 13(6): p. 439-444.
53. Martínez, M.J., Impacto de la interacción entre β -lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos encoloides alimentarios, Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, (2010).
54. Dissanayake, M., et al., Influence of heat and pH on structure and conformation of whey proteins. *International Dairy Journal*, 2013. 28 (2): p. 56-61.
55. Ryan, K.N., et al., Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts. *Food Hydrocolloids*, 2012. 27 (2): p. 411-420.
56. Kimberlee, K.J., Whey Protein Heat Stability, Technical Report, 2012.
57. Onwulata, C.I., R.P. Konstance, and P.M. Tomasula, Viscous Properties of table Microparticulated Dairy Proteins and Sucrose. *Journal of Dairy Science*, 2002. 85 (7): p. 1677-1683.
58. Chung, C., B. Degner, and D.J. McClements, Development of Reduced-calorie foods: Microparticulated whey proteins as fat mimetics in semi-solid food emulsions. *Food Research International*, 2014. 56 (0): p. 136-145.
59. Dissanayake, M., Modulation of Functional Properties of Whey Proteins by Microparticulation, Thesis, Victoria University (2011).
60. Erabit, N., D. Flick, and G. Alvarez, Effect of calcium chloride and moderate shear on β -lactoglobulin aggregation in processing-like conditions. *Journal of Food Engineering*, 2013. 115 (1): p. 63-72.
61. Dissanayake, M., S. Liyanaarachchi, and T. Vasiljevic, Functional properties of whey proteins microparticulated at low pH. *Journal of Dairy Science*, 2012. 95(4): p. 1667-1679.
62. Iordache, M. and P. Jelen, High pressure microfluidization treatment of heat denatured whey proteins for improved functionality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2003. 4(4): p. 367-376.

63. Secado por atomización. Recuperado el 16 de junio del 2014 de: www.sprayprocess.com.br/espanhol/secado-por-atomizacion.asp
64. Aime, D.B., et al., Textural analysis of fat reduced vanilla ice cream products. *Food Research International*, 2001. 34 (2–3): p. 237-246.
65. Sánchez, L.N., Microparticulación proteica a partir de concentrados de proteína: WPC-35, Proyecto fin de Master Biotecnología Alimentaria, Universidad de Oviedo, España (2014).