



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EVOLUCIÓN EN LA CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL DE
LA CUAJADA DE LECHE DURANTE LA FORMACIÓN Y
MADURACIÓN DEL GEL**

Por:

M.C. JESÚS CRISTIAN AMARO HERNÁNDEZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE FISIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA ZONA
TEMPLADA

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

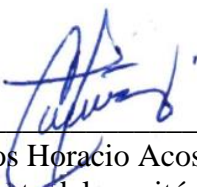
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús Cristian Amaro Hernández la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



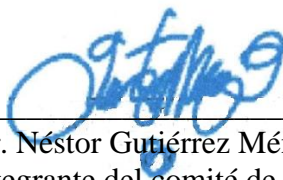
Dr. David Roberto Sepúlveda Ahumada
Director de Tesis



Dra. Guadalupe Isela Olivas Orozco
Integrante del comité de tesis



Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz
Integrante del comité de tesis



Dr. Néstor Gutiérrez Méndez
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evolución en la Conformación Estructural de la Cuajada de Leche Durante la Formación y Maduración del Gel” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Jesús Cristian Amaro Hernández, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de este posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. coordinación Cuauhtémoc por haberme permitido formar parte del programa de Doctorado en Ciencias.

A mi director de tesis el Dr. David R. Sepúlveda Ahumada por guiarme a través del camino de la investigación durante estos años.

A mis asesores de tesis, la Dra. Guadalupe Isela Olivas Orozco, el Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz y el Dr. Néstor Gutiérrez Méndez por su incondicional apoyo y su consejo oportuno.

Al personal técnico del CIAD, en especial a la Q.AI. Martha Verónica González Vigil y al I.Q.A. Ángel Esparza Chávez por la dedicación que tuvieron tanto hacia mi persona como a mi trabajo.

DEDICATORIA

Para Carla...
¡Siempre confiaste en todo lo que soñé!

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. SINOPSIS	11
1.1. Justificación	11
1.2. Antecedentes.....	11
1.2.1. Caseínas	12
1.2.2. Micela de Caseína.....	18
1.2.3. Fosfato de Calcio	20
1.2.4. Modelos Estructurales de la Micela de Caseína	21
1.2.5. Representación de las Micelas de Caseína	23
1.2.6. Efecto de Diferentes Condiciones Físico-Químicas sobre las Micelas de Caseína....	23
1.2.7. Coagulación de la Leche.....	24
1.2.8. Formación de la Cuajada de Leche.....	26
1.2.9. Sinéresis	27
1.2.10. Factores de proceso.....	28
1.2.11. Metodologías	31
1.3. Hipótesis	33
1.4. Objetivo general	33
1.5. Objetivos específicos.....	33
1.6. Sección integradora del trabajo	33
2. STRUCTURE REARRANGEMENT DURING RENNET COAGULATION OF MILK MODIFIES CURD DENSITY	36
3. CHEMICAL INTERACTIONS AMONG CASEINS DURING THE RENNET COAGULATION MILK	44
4. CONCLUSIONES GENERALES	54
5. RECOMENDACIONES	55
6. REFERENCIAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Secuencias de aminoácidos de las principales caseínas de la leche (Huppertz, 2013).....	13
2. Interacciones inter e intramoleculares en sistemas proteicos; SS: Enlaces disulfuro, EB: interacciones electrostáticas, CaB: puentes de calcio, Hy: Interacciones hidrofóbicas, HB: Puentes de hidrógeno, vdW: interacciones de van der waals; *: dipolo fluctuante (Keim, 2005).....	14
3. Diferentes modelos de la micela de caseína. a. Modelo de submicela (de Kruif et al., 2012); b. Modelo de submicela (Horne, 2006); c. Modelo de doble enlace (Fox et al., 2017a); d. Shukla et al. (2009); e. Modelo de nanoracimos (Holt, 2016); f. Modelo de red entrelazada (Mcmahon y Oommen, 2013); g. Modelo de red entrelazada (Dalglish, 2014); h. Dalglish (2011).....	22
4. Intercambio de agua, minerales y caseínas en función de diferentes condiciones físico-químicas (Broyard y Gaucheron, 2015)	24
5. Representación de la etapa de coagulación. [las tijeras indican el cuajo]. A. Leche adicionada con cuajo, b. Micelas de caseína parcialmente hidrolizadas por el cuajo, c. Micelas de caseína totalmente hidrolizadas por el cuajo, d. Agregación de micelas de paracaseína (Fox et al., 2017b).	26
6. Representación de la formación de la cuajada. a. Estructura tridimensional de micelas de paracaseínas agregadas, b. Cuajada de leche que consiste en una red de paracaseína con poros, ocupados por glóbulos de grasa y suero (Fox et al., 2017b).	27
7. Representación de la sinéresis; reordenamiento de las hebras de paracaseína (Fagan et al., 2017).	28

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Propiedades de interacción y composición de aminoácidos de las caseínas	17
2. Propiedades de la micela de caseína.....	19
3. Métodos que modifican las caseínas (Broyard y Gaucheron, 2015)	29
4. Metodologías aplicadas en el estudio de la transformación de la leche en cuajada	32

RESUMEN

La coagulación es la etapa que marca el inicio de la transformación de la leche para convertirse en una red tridimensional referida como cuajada. Las micelas de caseína son partículas coloidales que se encuentran dispersas en la leche, su estabilidad radica en la presencia de cadenas de aminoácidos afines al medio acuoso. Agentes coagulantes como la quimosina interrumpen la estabilidad de fase proteica de la leche constituida principalmente por micelas de caseína, dando origen a partículas de paracaseína. La alta hidrofobicidad de estas moléculas las hace susceptibles a la agregación. Como resultado se producen agregados de alta dimensionalidad con la capacidad de atrapar en su interior al resto de los componentes de la leche. A partir de la consolidación de una nueva estructura tridimensional se presentan una serie de reajustes internos dependientes del tiempo, los cuales originan el desplazamiento del suero contenido en su interior, produciendo una estructura con mayor compactación. Diferentes factores de proceso tienen la capacidad de reducir los tiempos de procesamiento, así como mejorar diferentes atributos de calidad en la industria láctea. La temperatura y la acidificación son parámetros de gran importancia durante la coagulación, la formación de la cuajada y su consolidación. Su modificación deriva en estructuras configuradas de diferente forma y su consecuente particularidad en el producto terminado. Debido a lo anterior, el enfoque adaptado en este estudio fue dirigido hacia la formación de la estructura de la red conocida como cuajada durante el periodo de curado. Las unidades experimentales fueron sometidas a diferentes condiciones de temperatura y acidez. Los reajustes estructurales presentes en las diferentes cuajadas fueron evaluados mediante los cambios de densidad experimentados a través del tiempo. Se obtuvo que la densidad de la fase proteica de la cuajada fue mayor en los tratamientos donde no existió variación en la acidez. A raíz de esto, se realizó un estudio para dilucidar el tipo de interacciones intra e intermoleculares responsables de los reajustes en la configuración del gel. Se encontró que los enlaces químicos presentes en la estructuración de la cuajada están regidos de manera jerárquica por la energía de formación de enlaces, obteniendo que las uniones más determinantes son los puentes de calcio, seguido de las interacciones electrostáticas, los puentes de hidrógeno, así como las interacciones hidrofóbicas. Aunque según las condiciones del proceso los enlaces pueden cambiar de manera significativa.

Palabras Clave: Coagulación, cuajada, reajustes, densidad, enlaces químicos.

ABSTRACT

Coagulation is the stage that marks the beginning of the transformation of milk to become a three-dimensional network referred to as curd. Casein micelles are colloidal particles that are dispersed in milk, and their stability lies in the presence of amino acid chains related to the aqueous medium. Coagulating agents such as chymosin interrupt the stability of the protein phase of milk, which is mainly made up of casein micelles, giving rise to paracasein particles. The high hydrophobicity of these molecules makes them susceptible to aggregation. As a result, high dimensional aggregates are produced with the ability to trap the rest of the milk components inside. From the consolidation of a new three-dimensional structure, a series of time-dependent internal rearrangements appear, which cause the displacement of the serum contained within, producing a structure with greater compaction. Different process factors can reduce processing times, as well as improve different quality attributes in the dairy industry. Temperature and acidification are parameters of great importance during coagulation, curd formation, and consolidation. Its modification results in structures configured in a different way and its consequent particularity in the finished product. Due to the above, the approach adopted in this study was directed towards the formation of the network structure known as curd during the curing period. The experimental units were subjected to different conditions of temperature and acidity. The structural rearrangements present in the different curds were evaluated by means of the density changes experienced over time. It was obtained that the density of the protein phase of the curd was higher in the treatments where there was no variation in acidity. As a result, a study was conducted to elucidate the intra and intermolecular interactions responsible for rearrangements in the gel configuration. It was found that the bonds present in the structuring of the curd are governed hierarchically by the bond energy, obtaining that the most determining bonds are calcium bridges, followed by electrostatic interactions, hydrogen bridges, as well as interactions hydrophobic. Although, depending on the conditions of the process, these links may change significantly.

Keywords: Coagulation, milk curd, rearrangements, density, chemical bonds.

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

En el proceso de fabricación de queso, la etapa de coagulación da comienzo a la transformación que experimenta la leche para convertirse en una red tridimensional compuesta principalmente por proteína y grasa. Esta modificación se lleva a cabo cuando las partículas coloidales conocidas como micelas de caseína son expuestas a agentes coagulantes, resultando en la destrucción de la barrera que daba estabilidad a estas estructuras. Como consecuencia, al carecer de esta barrera protectora de manera espontánea comienzan a interactuar entre ellas hasta formar una estructura tridimensional que atrapa al resto de los componentes de la leche. Una vez iniciada la etapa de agregación la formación de esta estructura se lleva a cabo de forma dinámica, lo cual indica que sufre de una serie de cambios en su interior derivados de reajustes estructurales.

El llevar a cabo un estudio relacionado con la formación y consolidación de la cuajada podría ayudarnos a dilucidar los mecanismos que causan esta serie de cambios en el interior de la cuajada; contribuyendo con la comunidad científica a través de generación de conocimiento auténtico que aporte nueva evidencia para el mejor entendimiento de este fenómeno.

1.2. Antecedentes

La leche es un sistema complejo, que consiste en tres fases principales con propiedades fisiológicas ampliamente caracterizadas; la fase continua formada suero, la fase de emulsión compuesta por glóbulos grasos y la fase de suspensión constituida por micelas de caseína (De Kruif *et al.*, 2012; Dalgleish, 2014). Además, existen numerosos componentes en menor proporción, principalmente en forma de trazas donde se encuentran minerales, vitaminas, hormonas, enzimas y compuestos diversos (Goulding *et al.*, 2020).

1.2.1. Caseínas

Las caseínas constituyen más del 80% de la proteína total de la leche bovina, casi toda agregada con fosfato cálcico. Inicialmente se definen como aquellas fosfoproteínas que precipitan de la leche cruda por acidificación a pH 4.6 a 20 ° C. Aunque hoy en día se definen por su secuencia y su homología con las cuatro especies genéticas diferentes que componen los miembros primarios de la leche bovina (Huppertz, 2013; Horne, 2016); refiriéndose a α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseínas que representan aproximadamente 38%, 10%, 35% y 12% respectivamente. Correspondiente en la misma forma a 12-15, 3-4, 9-11 y 2-4 g L⁻¹. La composición de aminoácidos de las caseínas se presenta en la Figura 1.

Entre las caseínas existe una micro heterogeneidad debido a pequeñas diferencias que surgen por los siguientes diferentes factores:

1. Variabilidad en el grado de fosforilación. Todas las caseínas están fosforiladas, pero en un grado variable, la α_{s1} tiene 8 o 9 P; α_{s2} 10 a 13P; β - 4 a 5P; κ - 1 o 2P por molécula, donde la letra P indica residuos de fosfato.

α_{s1} - Caseína			α_{s2} - Caseína		
1	10	20	1	10	20
Lys- Asn- Thr- Met- Glu- His- Val- SerP- SerP- SerP- Glu- Glu- Ser- Ile- Ile- SerP- Gln- Glu- Thr- Tyr-			Lys- Asn- Thr- Met- Glu- His- Val- SerP- SerP- SerP- Glu- Glu- Ser- Ile- Ile- SerP- Gln- Glu- Thr- Tyr-		
21	30	40	21	30	40
Lys- Gln- Glu- Lys- Asn- Met- Ala- Ile- Asn- Pro- Ser- Lys- Glu- Asn- Leu- Cys- Ser- Thr- Phe- Cys-			Lys- Gln- Glu- Lys- Asn- Met- Ala- Ile- Asn- Pro- Ser- Lys- Glu- Asn- Leu- Cys- Ser- Thr- Phe- Cys-		
41	50	60	41	50	60
Lys- Glu- Val- Val- Arg- Asn- Ala- Asn- Glu- Glu- Tyr- Ser- Ile- Gly- SerP- SerP- SerP- Glu- Glu-			Lys- Glu- Val- Val- Arg- Asn- Ala- Asn- Glu- Glu- Tyr- Ser- Ile- Gly- SerP- SerP- SerP- Glu- Glu-		
61	70	80	61	70	80
SerP- Ala- Glu- Val- Ala- Thr- Glu- Glu- Val- Lys- Ile- Thr- Val- Asp- Asp- Lys- His- Tyr- Gln- Lys-			SerP- Ala- Glu- Val- Ala- Thr- Glu- Glu- Val- Lys- Ile- Thr- Val- Asp- Asp- Lys- His- Tyr- Gln- Lys-		
81	90	100	81	90	100
Ala- Leu- Asn- Glu- Ile- Asn- Gln- Phe- Tyr- Gln- Lys- Phe- Pro- Gln- Tyr- Leu- Gln- Tyr- Leu- Tyr-			Ala- Leu- Asn- Glu- Ile- Asn- Gln- Phe- Tyr- Gln- Lys- Phe- Pro- Gln- Tyr- Leu- Gln- Tyr- Leu- Tyr-		
101	110	120	101	110	120
Gln- Gly- Pro- Ile- Val- Leu- Asn- Pro- Trp- Asn- Gln- Val- Lys- Arg- Asn- Ala- Val- Pro- Ile- Thr-			Gln- Gly- Pro- Ile- Val- Leu- Asn- Pro- Trp- Asn- Gln- Val- Lys- Arg- Asn- Ala- Val- Pro- Ile- Thr-		
121	130	140	121	130	140
Pro- Thr- Leu- Asn- Arg- Glu- Gln- Leu- SerP- Thr- SerP- Glu- Glu- Asn- Ser- Lys- Lys- Thr- Val- Asp-			Pro- Thr- Leu- Asn- Arg- Glu- Gln- Leu- SerP- Thr- SerP- Glu- Glu- Asn- Ser- Lys- Lys- Thr- Val- Asp-		
141	150	160	141	150	160
Met- Glu- Ser- Thr- Glu- Val- Phe- Thr- Lys- Lys- Thr- Lys- Leu- Thr- Glu- Glu- Glu- Lys- Asn- Arg-			Met- Glu- Ser- Thr- Glu- Val- Phe- Thr- Lys- Lys- Thr- Lys- Leu- Thr- Glu- Glu- Glu- Lys- Asn- Arg-		
161	170	180	161	170	180
Leu- Asn- Phe- Leu- Lys- Lys- Ile- Ser- Gln- Arg- Tyr- Gln- Lys- Phe- Ala- Leu- Pro- Gln- Tyr- Leu-			Leu- Asn- Phe- Leu- Lys- Lys- Ile- Ser- Gln- Arg- Tyr- Gln- Lys- Phe- Ala- Leu- Pro- Gln- Tyr- Leu-		
181	190	200	181	190	200
Lys- Thr- Val- Tyr- Gln- His- Gln- Lys- Ala- Met- Lys- Pro- Trp- Ile- Gln- Pro- Lys- Thr- Lys- Val-			Lys- Thr- Val- Tyr- Gln- His- Gln- Lys- Ala- Met- Lys- Pro- Trp- Ile- Gln- Pro- Lys- Thr- Lys- Val-		
201	210		201	210	
Ile- Pro- Tyr- Val- Arg- Tyr- Leu			Ile- Pro- Tyr- Val- Arg- Tyr- Leu		
β - Caseína			κ - Caseína		
1	10	20	1	10	20
Arg- Glu- Leu- Glu- Glu- Leu- Asn- Val- Pro- Gly- Glu- Ile- Val- Glu- SerP- Leu- SerP- SerP- SerP- Glu-			Gln- Glu- Gln- Asn- Gln- Glu- Gln- Pro- Ile- Arg- Cys- Glu- Lys- Asp- Glu- Arg- Phe- Phe- Ser- Asp-		
21	30	40	21	30	40
Glu- Ser- Ile- Thr- Arg- Ile- Asn- Lys- Lys- Ile- Glu- Lys- Phe- Gln- SerP- Glu- Glu- Gln- Gln- Gln-			Lys- Ile- Ala- Lys- Tyr- Ile- Pro- Ile- Gln- Tyr- Val- Leu- Ser- Arg- Tyr- Pro- Ser- Tyr- Gly- Leu-		
41	50	60	41	50	60
Thr- Glu- Asp- Glu- Leu- Gln- Asp- Lys- Ile- His- Pro- Phe- Ala- Gln- Thr- Gln- Ser- Leu- Val- Tyr-			Asn- Tyr- Tyr- Gln- Gln- Lys- Pro- Val- Ala- Leu- Ile- Asn- Asn- Gln- Phe- Leu- Pro- Tyr- Pro- Tyr-		
61	70	80	61	70	80
Pro- Phe- Pro- Gly- Pro- Ile- Pro- Asn- Ser- Leu- Pro- Gln- Asn- Ile- Pro- Pro- Leu- Thr- Gln- Thr-			Tyr- Ala- Lys- Pro- Ala- Ala- Val- Arg- Ser- Pro- Ala- Gln- Ile- Leu- Gln- Trp- Gln- Val- Leu- Ser-		
81	90	100	81	90	100
Pro- Val- Val- Val- Pro- Pro- Phe- Leu- Gln- Pro- Glu- Val- Met- Gly- Val- Ser- Lys- Val- Lys- Glu-			Asn- Thr- Val- Pro- Ala- Lys- Ser- Cys- Gln- Ala- Gln- Pro- Thr- Thr- Met- Ala- Arg- His- Pro- His-		
101	110	120	101	110	120
Ala- Met- Ala- Pro- Lys- His- Lys- Glu- Met- Pro- Phe- Pro- Lys- Tyr- Pro- Val- Glu- Pro- Phe- Thr-			Pro- His- Leu- Ser- Phe- Met- Ala- Ile- Pro- Pro- Lys- Lys- Asn- Gln- Asp- Lys- Thr- Glu- Ile- Pro-		
121	130	140	121	130	140
Glu- Ser- Gln- Ser- Leu- Thr- Leu- Thr- Asp- Val- Glu- Asn- Leu- His- Leu- Pro- Leu- Pro- Leu- Leu-			Thr- Ile- Asn- Thr- Ile- Ala- Ser- Gly- Glu- Pro- Thr- Ser- Thr- Pro- Thr- Thr- Glu- Ala- Val- Glu-		
141	150	160	141	150	160
Gln- Ser- Trp- Met- His- Gln- Pro- His- Gln- Pro- Leu- Pro- Pro- Thr- Val- Met- Phe- Pro- Pro- Gln-			Ser- Thr- Val- Ala- Thr- Leu- Glu- Asp- SerP- Pro- Glu- Val- Ile- Glu- Ser- Pro- Pro- Glu- Ile- Asn-		
161	170	180	161		
Ser- Val- Leu- Ser- Leu- Ser- Gln- Ser- Lys- Val- Leu- Pro- Val- Pro- Gln- Lys- Ala- Val- Pro- Tyr-			Thr- Val- Gln- Val- Thr- Ser- Thr- Ala- Val		
181	190	200			
Pro- Gln- Arg- Asp- Met- Pro- Ile- Gln- Ala- Phe- Leu- Leu- Tyr- Gln- Glu- Pro- Val- Leu- Gly- Pro-					
201					
Val- Arg- Gly- Pro- Phe- Pro- Ile- Ile- Val					

Figura 1 Secuencias de aminoácidos de las principales caseínas de la leche (Huppertz, 2013).

- Polimorfismo genético. Las variantes existentes en las proteínas de la leche se generan genéticamente, este fenómeno se denomina polimorfismo genético, lo que significa que hay una sustitución natural de residuos en diferentes lugares de las cadenas de aminoácidos que componen las caseínas.
- Enlace disulfuro. Las caseínas α_{s1} y β carecen de cisteína y cistina, pero las caseínas α_{s2} y κ contienen dos y 1/2 residuos de cistina, que se presentan como enlaces disulfuro intermoleculares. La α_{s2} -caseína existe como un dímero unido por enlaces disulfuro, y se pueden unir hasta 10 moléculas de kappa-caseína mediante enlaces disulfuro.
- Grado de glicosilación. La κ -caseína es la única caseína glicosilada; contiene galactosa, N-acetil-galactosamina y ácido N-acetilneuramínico (siálico), que se presentan como tri o tetra

sacáridos unidos a residuos de treonina, cuyo número varía de 0 a 4 por molécula de proteína (es decir, un total de nueve variantes) (Jensen *et al.*, 2015; Goulding *et al.*, 2020).

Por otro lado, las caseínas se pueden observar desde el punto de vista químico y estructural. La secuencia de aminoácidos de las proteínas se conoce como estructura primaria. Las interacciones intra e intermoleculares juegan un papel importante en la polimerización (significa estructura secundaria y terciaria) de las moléculas de proteína, así como en la agregación y formación de gel de proteínas. Estas interacciones se dividen en enlaces covalentes y no covalentes. La Figura 2 muestra los enlaces disulfuro covalentes (SS), las interacciones electrostáticas no covalentes (EB), los puentes de calcio (CaB), las interacciones hidrofóbicas (Hy), los puentes de hidrógeno (HB) y las interacciones de van der Waals (vdW) que se pueden formar entre y dentro de las proteínas (Keim, 2005).

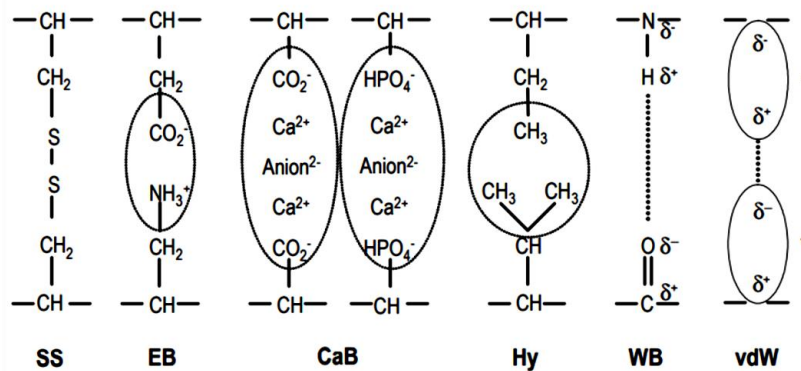


Figura 2. Interacciones inter e intramoleculares en sistemas proteicos; SS: enlaces disulfuro, EB: interacciones electrostáticas, CaB: puentes de calcio, Hy: interacciones hidrofóbicas, HB: puentes de hidrógeno, vdW: interacciones de van der Waals; *: dipolo fluctuante (Keim, 2005).

Los puentes disulfuro (SS) son enlaces formados a partir de la interacción entre grupos tiol presentes en las proteínas (Lamichhane *et al.*, 2018) (Lamichhane *et al.*, 2018), las cadenas de aminoácidos que componen las proteínas contienen grupos funcionales tiol, formados a partir de átomos de azufre e hidrógeno, su interacción es derivada de la afinidad del azufre formando puentes disulfuro (Vasbinder y De Kruif, 2003). En el caso de la leche, este tipo de enlace puede manifestarse entre los grupos tiol presentes tanto en las proteínas del suero como en las partículas de caseína (Kethireddipalli y Hill, 2015). Este tipo de enlace se rige principalmente por el efecto

de la temperatura, lo que lleva a la división de proteínas exponiendo los grupos tiol que existen en su interior (Havea *et al.*, 2004; Kethireddipalli y Hill, 2015; Lamichhane *et al.*, 2018).

Las interacciones electrostáticas (EB) son enlaces que involucran tanto a ácidos, bases, como a grupos polares que tienen carga eléctrica (Piazza, 2004; McMahon y Oommen, 2013), que juegan un papel importante en la conformación estructural de las proteínas (Munialo *et al.*, 2018). La presencia de este tipo de fuerzas determina tanto el límite como la proporción cuando se realiza la polimerización (Horne, 2014).

Durante la formación de puentes de hidrógeno (HB) existe una interacción entre átomos electronegativos (O, N, F y Cl) y átomos de hidrógeno (H) (Walstra, 2003; Lamichhane *et al.*, 2018). En las proteínas, los enlaces de hidrógeno están presentes entre los grupos carboxilo y amino presentes en las cadenas de aminoácidos. Además, la formación de estos enlaces contribuye a la formación de la estructura secundaria de proteínas globulares (Otte *et al.*, 2000; Munialo *et al.*, 2018). La presencia de puentes de hidrógeno permite la hidratación de proteínas (alrededor de 2-3 g H₂O / g proteína), en el caso de la caseína varios grupos funcionales (carbonilo, amino, amida y carboxilo) tienen la capacidad de formar interacciones con el agua a través de puentes de hidrógeno. (Lamichhane *et al.*, 2018; Horne, 2020). La asociación entre caseína y agua presenta dos tipos de agua bien definidos: agua ligada, que incluye la presencia de agua estructural (formando parte importante en la estabilidad de la proteína) y agua de hidratación (presente como una monocapa de moléculas de agua con dinámica orientación y movimiento restringido). Por otro lado, existe agua de hidratación no ligada o dinámica (se encuentra en forma libre y mantiene su capacidad como solvente) (Metwalli *et al.*, 2008; Lamichhane *et al.*, 2018; Dang *et al.*, 2019). Debido a lo anterior, los puentes de hidrógeno son una de las fuerzas responsables de la integridad estructural de las moléculas de caseína (McMahon y Oommen, 2013).

Las interacciones hidrofóbicas (Hy) son fuerzas de atracción de gran importancia, son enlaces que se dan entre los grupos no polares de las cadenas laterales de diferentes moléculas en solución (McClements *et al.*, 2009; Lamichhane *et al.*, 2018). Su origen se deriva del hecho de que las moléculas de agua pueden interactuar con moléculas relacionadas, pero sin poder establecer una relación con grupos apolares (Lamichhane *et al.*, 2018). En el caso de las proteínas de la leche, las

cadena de aminoácidos que componen la estructura de la caseína contienen regiones apolares, lo que permite la formación de este tipo de interacciones (Horne, 1998; Lamichhane *et al.*, 2018). Esto se debe a que los grupos no polares están ordenados dentro de la estructura mientras que los grupos polares están fuera de ella, por lo que este tipo de ligamiento da lugar al plegamiento de caseínas y el consiguiente tipo de compactación de proteínas (Merel-Rausch, 2007). Esta característica específica (hidrofobicidad) permite que las caseínas individuales se asocien para formar partículas esféricas llamadas micelas(Choi *et al.*, 2007; McMahon y Oommen, 2013; Ingham *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2018).

En relación a los puentes de calcio, se debe saber que el calcio existe como componente esencial tanto dentro como fuera de la fase coloidal de la leche (Wolfschoon-Pombo y Andlinger, 2013; Franzoi *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018), estando en equilibrio dinámico (Xu *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018). Su presencia es fundamental para la conformación de las micelas de caseína (Gaucheron, 2010; Franzoi *et al.*, 2018). Las estructuras primarias de las diferentes caseínas que componen la micela tienen sitios activos con capacidad para formar puentes con el calcio, estos sitios corresponden a los complejos de fosfoserina formados por aminoácidos serina y grupos fosfato (Wolfschoon-Pombo y Andlinger, 2013; Horne, 2016; Smith *et al.*, 2017; Considine *et al.*, 2020).

A esto se suma las interacciones de van der Waals (vdW) que se forman entre moléculas que no tienen un momento dipolar permanente. Sin embargo, estas moléculas no polares pueden polarizarse cuando chocan. Surgen momentos dipolares temporales (dipolos fluctuantes), que inducen un momento dipolar opuesto en la molécula vecina. Las moléculas se atraen entre sí. Las interacciones de Van der Waals son difíciles de diferenciar desde un punto de vista puramente químico y, por lo tanto, no son consideradas (Keim, 2005). El Cuadro 1 muestra información complementaria sobre las propiedades reactivas de las caseínas individuales.

Cuadro 1. Propiedades de interacción y composición de aminoácidos de las caseínas

Amino ácido	α_1 - caseína	α_2 - caseína	β - caseína	κ - caseína	Polaridad del grupo R	Posibles enlaces
Ala	9	8	5	15	NP	Hy
Arg	6	6	4	5	PC	Hy, EB, HB
Asp	7	4	4	4	NC	Hy, HB, CaB
Asn	8	14	5	7	PU	Hy, HB
Cys	0	2	0	2	PU	Hy, SS
Glu	24	25	18	12	NC	Hy, EB, CaB
Gln	15	15	21	14	PU	Hy, HB
Gly	9	2	5	2	NP	Hy
His	5	3	5	3	PC	Hy, EB, HB
Ile	11	11	10	13	NP	Hy
Leu	17	13	22	8	NP	Hy
Lys	14	24	11	9	PC	Hy, EB
Met	5	5	6	2	NP	Hy, HB
Phe	8	6	9	4	A	Hy
Pro	17	10	35	20	PU	Hy
Ser	8	6	11	12	PU	Hy, HB
Thr	5	15	9	14	PU	Hy, HB
Trp	2	2	1	1	A	Hy, HB
Tyr	10	12	4	9	A	Hy, EB
Val	11	14	19	11	NP	Hy, EB, HB
Total de amino ácidos	199	207	209	169		
Peso molecular	23,612	25,228	23,980	19,005		

Tipo de polaridad. Cargado negativamente, CN; No polar, NP; Cargado positivamente, CP; Polar sin carga, PU; Aromático, A.

Tipo de enlaces. Interacciones hidrofóbicas, Hy; Interacciones electrostáticas, EB; Puentes de hidrógeno, HB, Puentes disulfuro, SS; Puentes de calcio, CaB.

Contenido basado en estudios de Sathe (2012), Fox et al. (2017), Keim (2005).

Las cadenas laterales de aminoácidos juegan un papel crucial en el diseño de la conformación tridimensional. Se requieren varias fuerzas intermoleculares con los ángulos de torsión disponibles que hacen girar el enlace a su alrededor para estabilizar las estructuras secundarias en un pliegue tridimensional. En las proteínas, la estructura secundaria está indicada en gran medida por los patrones de enlaces de hidrógeno entre los grupos amida y carboxilo de la cadena principal (Kannan *et al.*, 2012).

Las estructuras secundarias de las proteínas ayudan a formar la estructura proteica tridimensional a través de interacciones entre los residuos de aminoácidos de la estructura polipeptídica inicial. Entre las cuales se encuentran las hélices α y las láminas β , los giros β , las hélices de poliprolina (poliprolina II; PPII) así como segmentos de la estructura no especificados (no plegados). Cada tipo de doblez tiene unas características particulares, en el caso de la α -hélice proporciona una conformación enrollada hacia la derecha o hacia la izquierda en la que cada grupo N - H del esqueleto dona un enlace de hidrógeno al grupo C = O de la columna vertebral del aminoácido, esto ocurre cada cuatro residuos ($1 + 4 \rightarrow 1$ enlace de hidrógeno). Mientras que la β -plegada consta de hebras β conectadas lateralmente por cinco o más enlaces de hidrógeno, formando una hoja

plegada generalmente retorcida. Una cadena β es un tramo de aminoácidos, generalmente de 5 a 10 aminoácidos de longitud, cuyas cadenas principales de péptidos están casi completamente extendidas. De estas dos formaciones se derivan las otras (Kannan *et al.*, 2012; Huppertz, 2013).

Las estructuras secundarias de las caseínas tienen una configuración particular. En el caso de $\alpha 1$, se han reportado valores que oscilan entre el 5% y el 20% para la formación de la α -hélice, en la β -plegada del 17 al 20% y del 29 al 35% de la β -en espiral. La $\alpha 2$ - tiene valores de α -hélice del 24% aunque puede llegar hasta el 54%, para β -plegada del 6% al 37%, para β -en espiral del 12 al 31% y finalmente estructuras PPII del 7 al 15%. Para β -caseína, el contenido de α -hélice puede ser del 7 al 25%, en una β -plegada los valores varían del 15 al 33%, del 20% al 30% en β -en espiral, y para el PPII de 20 % a 25%. Para la kappa-caseína, los valores de α -hélice son del 10% al 20%, β -plegada del 20% al 30%, del 15% al 25% para la β en espiral. En el caso particular de esta proteína, tiene una estructura con un alto grado de flexibilidad derivada de la presencia de un segmento hidrofílico conocido como macropéptido (glicomacropéptido: GMP) (Huppertz, 2013)

1.2.2. Micela de Caseína

Desde el punto de vista fisicoquímico, la micela se define como una formación supramolecular organizada que se origina en el interior de un líquido, compuesto por moléculas anfifílicas, con un rango de tamaño de 1-1000 nm (Fox y Brodkorb, 2008; Dalglish, 2011; Vert *et al.*, 2012). Estas moléculas individuales tienen una concentración orientada, donde los grupos cargados se ubican en la superficie, formando macromoléculas esféricas. Este tipo de estructuración permite que estas partículas coloidales existan en equilibrio dinámico dentro de la solución (Moroi, 1992).

Por lo anterior, los agregados de caseína pueden considerarse micelas. Dado que la superficie de estos agregados está formada por moléculas de κ -caseína (Hazlett *et al.*, 2018; Isis *et al.*, 2018), las cuales tienen propiedades anfifílicas (Slattery y Evard, 1973). La presencia de los segmentos hidrófilos orientados hacia la fase continua, le permite establecer diferentes interacciones con el medio, tales como fuerzas electrostáticas, estéricas e hidrófilas. El conjunto de interacciones le

permite estar en suspensión coloidal. Además, el tamaño de estas formaciones está dentro del rango permitido con tamaños de hasta 600 nm (O'Mahony y Fox, 2014; Horne y Lucey, 2017).

En la leche, la fase coloidal tiene una micela de caseína como componente principal, estas partículas son el resultado de la agrupación de caseínas individuales como la α -, β - y κ - (Dalglish, 2014). Estos agregados tienen un alto grado de complejidad, ya que a pesar de estar formados por las interacciones no covalentes entre caseínas (McMahon y Oommen, 2013), la intervención del calcio en el interior de la micela es fundamental, ya que actúa como puente para unir las caseínas, para mantener la integridad estructural de las micelas. Está presente en forma de nanoclusters de fosfato de calcio coloidal (Holt, 1992; Huppertz *et al.*, 2017; Horne, 2020). Respecto a estos agregados, la fracción proteica comprende alrededor del 93% de su masa seca, correspondiente a las caseínas individuales, mientras que el resto de sólidos micelares está constituido por el material inorgánico, denominado fosfato cálcico coloidal (CCP) o fosfato cálcico micelar (MCP) (De Kruif *et al.*, 2012). La Cuadro 2 muestra algunas características particulares de las micelas de caseína.

Cuadro 2. Propiedades de la micela de caseína

Característica	Valor
Diámetro	120 nm (rango 50 - 500 nm)
Área superficial	$8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$
Volumen	$2.1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$
Densidad (forma hidratada)	1.0632 g cm^{-3}
Masa	$2.2 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$
Contenido de agua	63%
Hidratación	$3.7 \text{ g H}_2\text{O} / \text{g}^{-1}$ de proteína
Voluminosidad	$4.4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$
Peso molecular (forma hidratada)	$1.3 \times 10^9 \text{ Da}$
Peso molecular (forma no hidratada)	$5 \times 10^8 \text{ Da}$
Numero de cadenas peptídicas	10^4
Numero de partículas por mL de leche	$10^{14} - 10^{16}$
Área superficial de las micelas por mL de leche	$5 \times 10^4 \text{ cm}^2$
Media de la distancia de separación	240 nm
Punto isoelectrico (pH)	4.60
Potencial Zeta	-20 mV

Otra característica particular de la micela de caseína es la sensibilidad al calcio, donde las caseínas α_2 , α_1 y β - son altamente susceptibles a la presencia de calcio, ordenadas de mayor a menor

como se acaba de indicar. Por el contrario, la única caseína insensible es la κ -, esta propiedad permite que se ubique hacia el exterior de la micela, y de esta forma proteger al resto de las caseínas de la exposición al calcio presente en la fase continua (Horne, 2020), puede estabilizar y proteger ~ 10 veces su masa (O'mahony y Fox, 2013).

La estructura de la micela de caseína es dinámica, ya que responde a cambios en su entorno, como las condiciones de acidificación, temperatura y presión. Como ejemplo de lo anterior está su comportamiento a bajas temperaturas, donde existe una solubilización principalmente de β -caseína pero también de α_1 -, α_2 - y κ - caseínas incluso en menor medida. Al volver a la temperatura inicial, este proceso de solubilización se invierte, dejando intacta la micela sin haber alterado su estructura interna (O'mahony y Fox, 2013; Horne, 2014).

Una perspectiva diferente relacionada con las micelas de caseína sugiere que tienen una estructura similar a una esponja, conteniendo una serie de canales internos ocupados por el suero, característica que le otorga la capacidad de interacción dinámica entre sus componentes y el ambiente (Cheema *et al.*, 2015).

1.2.3. Fosfato de Calcio

Una de las formas en las que el calcio se encuentra en la leche se conoce como fosfato de calcio, esta formación particular se encuentra en un estado coloidal ubicado dentro de la micela de caseína (Goulding *et al.*, 2020). Se define como agregados formados por la reticulación entre los grupos calcio y fosfato unidos a residuos de serina presentes en la estructura primaria de las proteínas (Guacheron, 2011; Bijl *et al.*, 2013), por lo que el cambio en las condiciones de acidez y temperatura afecta considerablemente el equilibrio de esta sal, afectando directamente la solubilidad y el estado de ionización de las especies iónicas que la componen (Goulding *et al.*, 2020). Por tanto, el fosfato de calcio tiene un papel importante en la estabilidad estructural de las micelas (Silva *et al.*, 2013).

1.2.4. Modelos Estructurales de la Micela de Caseína

A lo largo de los años se han propuesto y desarrollado diferentes modelos con la intención de describir la estructura de las micelas de caseína. El primer modelo inicialmente abordado por Slattery y Evard (1973) y posteriormente propuesto por Schmidt y Fox (1982) al que se le denominó modelo sub micelar, que posteriormente fue modificado por Walstra (1990) (De Kruif, 2014; Horne, 2014). En este modelo, la micela se concibe como una molécula formada por subunidades proteicas llamadas submicelas, que están unidas entre sí por nanoclusters de fosfato de calcio (Broyard y Gaucheron, 2015; Horne, 2020). En esta propuesta se sugiere que las regiones polares de las caseínas $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - y β - estén orientadas hacia el exterior de las submicelas, lo que reduce la repulsión electrostática entre los grupos cargados de las submicelas vecinas. Cada submicela se considera como un agregado rodeado por una capa superficial de κ -caseína, que en consecuencia dota a toda la micela de este recubrimiento (Goulding *et al.*, 2020). El conocimiento de que la kappa-caseína se encuentra principalmente en la superficie implica la existencia de dos tipos diferentes de submicelas; los que son ricos en kappa-caseína mirando hacia afuera y los pobres en kappa-caseína que se encuentran dentro de la micela (Dalglish y Corredig, 2012).

Con el tiempo, Holt (1992) propuso la segunda teoría denominada modelo de nanoclusters, en el que la micela de caseína se concibió como una estructura similar a una red altamente flexible formada por caseínas individuales. Donde el fosfato de calcio coloidal adquiere gran relevancia, ya que se distribuye estratégicamente, formando parte integral de la base estructural de la micela (Horne, 2020). Esta nueva perspectiva se derivó de la observación de la capacidad de los fosfopéptidos de β -caseína para unirse al fosfato de calcio, estas nuevas formaciones se denominan nanoclusters. En la misma línea, se encontró que las caseínas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ contienen una mayor cantidad de grupos fosfato en su cadena primaria lo que la hace más propensa a formar este tipo de interacciones (Dalglish y Corredig, 2012; Broyard y Gaucheron, 2015).

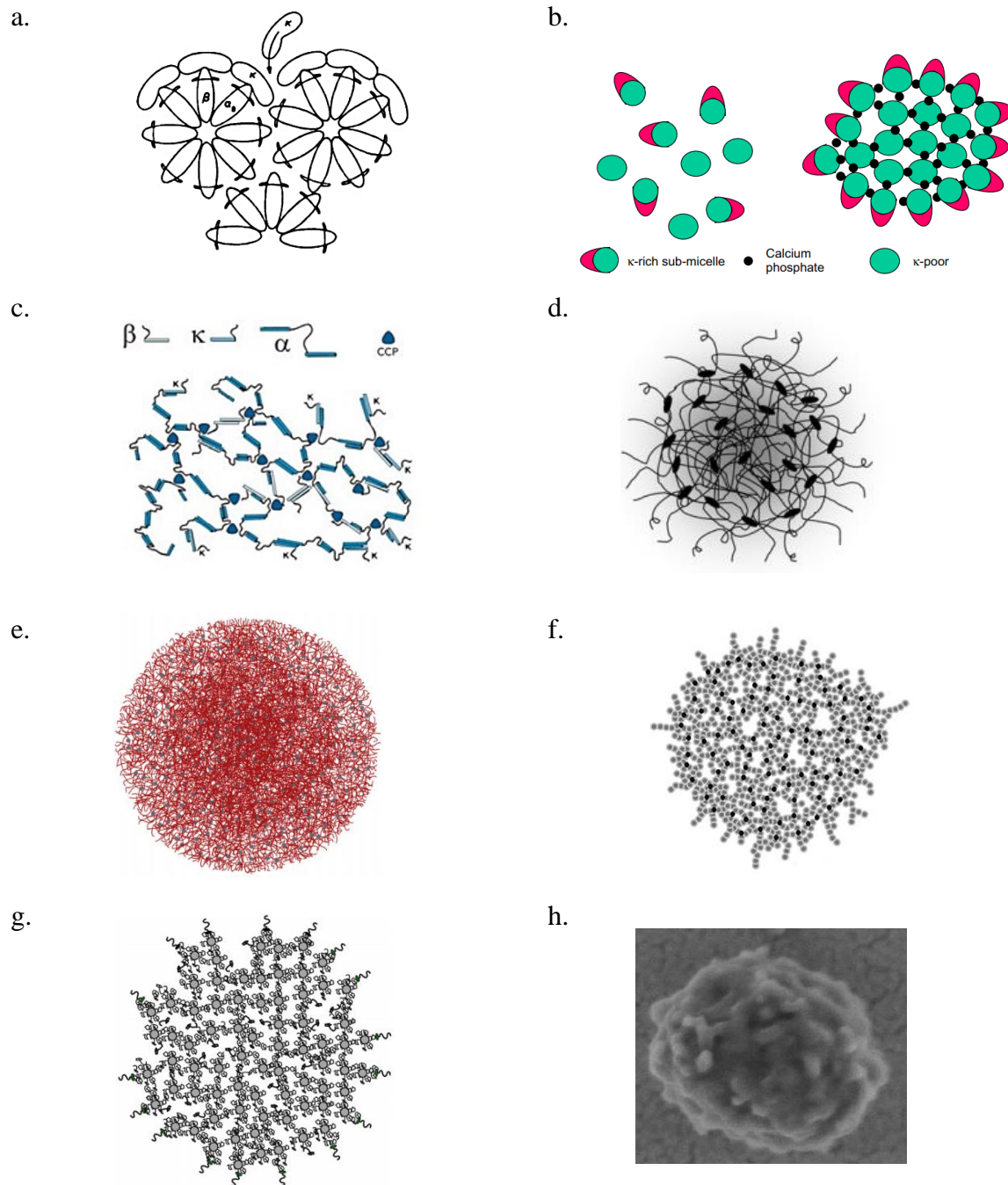


Figura 3. Diferentes modelos de la micela de caseína. a. Modelo de Submicela (De Kruif *et al.*, 2012); b. Modelo de Submicela (Horne, 2006); c. Modelo de Doble enlace (Fox *et al.*, 2017a); d. Shukla *et al.* (2009); e. Modelo de Nanoracimos (Holt, 2016); f. Modelo de Red entrelazada (McMahon y Oommen, 2013); g. Modelo de Red entrelazada (Dalgleish, 2014); h. Dalgleish (2011)

Algún tiempo después, surgió una nueva teoría estructural de la micela de caseína, que se llama unión dual, descrita por Horne (1998). En este nuevo enfoque, se considera que las moléculas de

caseína que componen la micela interactúan entre sí a través de los diferentes sitios activos que poseen. Una de estas uniones se realiza entre aminoácidos con dominios fosforilados, que se caracterizan por la presencia de grupos cargados e hidrófilos. Por otro lado, los enlaces que tienen dominios hidrofóbicos se presentan por tener principalmente grupos no cargados así como su característico rechazo de agua (Dalglish, 2014; Horne, 2020).

La presencia de interacciones y uniones hidrofóbicas con nanoagrupamientos de fosfato de calcio como fuerzas determinantes en la conformación estructural de la micela de caseína sugerida por Horne (1998) en el modelo de unión dual dio lugar a una nueva teoría propuesta por McMahon y Oommen (2008), en donde se destaca la formación de canales adicionales a través de los cuales circula el agua presente, lo que se denomina red entrelazada. Lo anterior vino a fortalecer de mejor manera la concepción de la estructura micelar.

En todos los modelos mencionados anteriormente se acuerda que la κ -caseína se ubica en la superficie de las micelas de caseína, lo que les confiere carga negativa y estabilidad debido a la repulsión electrostática y al impedimento estérico (Broyard y Gaucheron, 2015).

1.2.5. Representación de las Micelas de Caseína

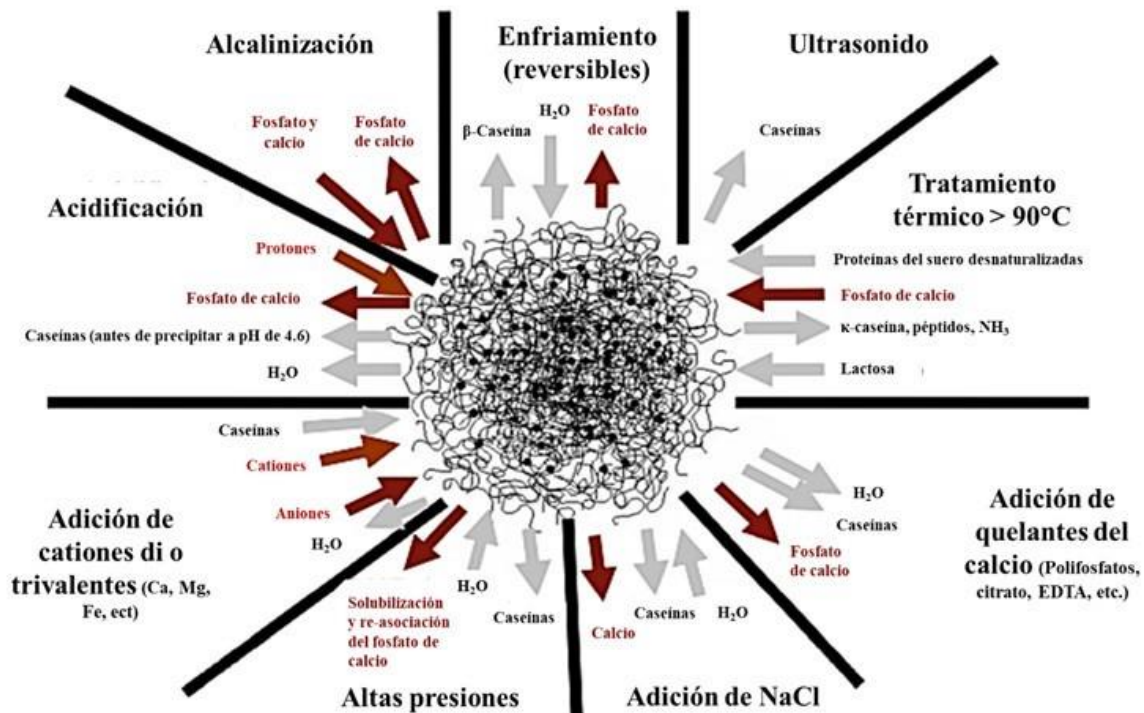
Es importante señalar que a lo largo de los años ha persistido la preocupación por poder describir con mayor certeza la estructura de la micela de caseína, luego en la Figura 3 se muestran las diferentes representaciones gráficas, así como las imágenes obtenidas en diferentes estudios.

1.2.6. Efecto de Diferentes Condiciones Físico-Químicas sobre las Micelas de Caseína

Las micelas de caseína están en equilibrio dinámico con la fase continua de la leche. Dependiendo de las condiciones fisicoquímicas en las que se encuentre el ambiente, pueden ocurrir cambios en los componentes de la leche; como moléculas de caseína, calcio, fosfato inorgánico y en agua. A

veces, algunos iones, así como las moléculas de caseína, pueden cambiar de estado, pasando de la fase micelar a la fase acuosa. Por otro lado, estos constituyentes podrían cambiar su estado natural y pasar a formar parte de las micelas de caseína (Broyard y Gaucheron, 2015). Estos tipos de cambios se muestran en la figura 4.

Figura 4. Intercambio de agua, minerales y caseínas en función de diferentes condiciones físico-químicas (Broyard y Gaucheron, 2015)



1.2.7. Coagulación de la Leche

La etapa de coagulación es un proceso complejo (Carlson *et al.*, 1986), considerado por muchos expertos como una de las etapas más importantes en la elaboración del queso. En esta fase se produce la conversión de la leche líquida en un gel tridimensional conocido como cuajada de leche (Horne y Banks, 2004).

La desestabilización de las micelas de caseína es el prelude de la formación de la cuajada, de las

etapas posteriores hasta obtener el queso como producto final (Zhao y Corredig, 2020). El principal constituyente de la leche involucrado en la etapa de coagulación son las micelas de caseína, estas partículas coloidales se encuentran suspendidas en la leche, sin embargo, al ser sometidas a la acción de agentes coagulantes su estabilidad se ve comprometida (Zhao y Corredig, 2020).

Existen dos procesos cinéticos principales involucrados en la etapa de coagulación (ver Figura 5). La primera es la fase hidrolítica, que obedece a la cinética de Michaelis-Menten (Lucey, 2014). El cuajo, como la quimosina, actúa directamente sobre el segmento C-terminal que sobresale de la κ -caseína llamada glicomacropéptido (residuos 106-169), que tiene propiedades altamente hidrófilas (Lucey, 2020). La quimosina tiene una gran especificidad por lo que actúa directamente sobre el enlace peptídico Phe105-Met 106 de la κ -caseína, dando lugar a dos cadenas peptídicas, la primera y más larga es la paracaseína, que está formada por caseínas altamente hidrófobas. Mientras que la segunda secuencia de péptidos se conoce como glicomacropéptido que se encuentra en la superficie micelar (Jensen *et al.*, 2015). Destacando que las micelas de caseína permanecen estables durante la etapa de hidrólisis hasta que se ha eliminado aproximadamente el 80% de la capa superficial de κ caseína (Horne y Banks, 2004; Dalglish, 2014; Liu *et al.*, 2014; Lucey, 2014). El segundo proceso cinético es la agregación, se lleva a cabo entre las micelas de paracaseína, su propiedad hidrofóbica no les permite permanecer suspendidas en la fase continua, por lo que tienden a aglutinarse y formar flóculos que luego se convierten en una red tridimensional. Este proceso sigue el modelo cinético de Von Smoluchowski (Fox *et al.*, 2017b).

Cuando se lleva a cabo la coagulación enzimática de la leche, la estabilidad de las micelas de caseína se ve comprometida, el potencial zeta se reduce al cambiar la carga neta negativa de -20 mV (Cuadro 2) a alrededor de 5-7 mV, lo que significa una reducción en repulsión electrostática entre micelas hidrolizadas (Horne y Banks, 2004). Adicionalmente, es importante resaltar que ambos procesos cinéticos presentes durante la etapa de coagulación se superponen, lo que significa que la agregación ocurre a pesar de que la hidrólisis no ha concluido (Lucey, 2014).

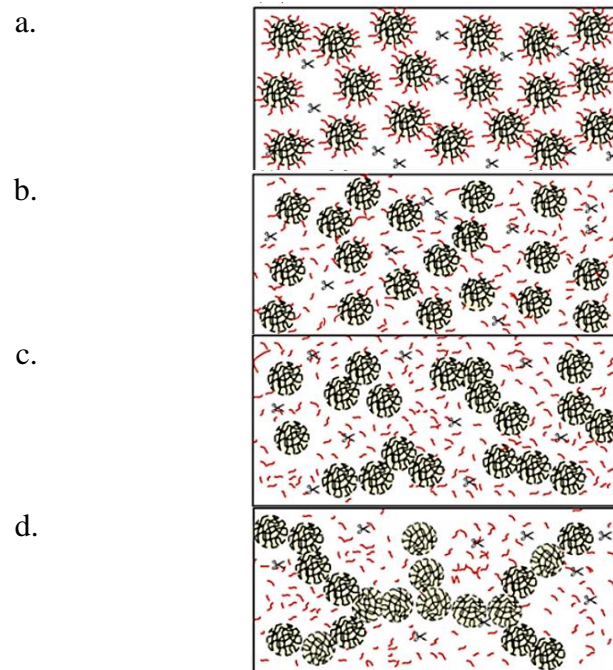


Figura 5. Representación de la etapa de coagulación. [Las Tijeras indican el cuajo]. a. Leche adicionada con cuajo, b. Micelas de caseína parcialmente hidrolizadas por el cuajo, c. Micelas de caseína totalmente hidrolizadas por el cuajo, d. Agregación de micelas de paracaseína (Fox *et al.*, 2017b).

1.2.8. Formación de la Cuajada de Leche

La cuajada de leche se forma a partir de la agregación de micelas de paracaseína, con la presencia de calcio iónico (Ca^{2+}) las micelas desestabilizadas interactúan entre sí iniciando la floculación, dando lugar a hebras que tienden a aumentar en longitud y dimensionalidad con el tiempo como se muestra en la Figura 6 (Horne y Banks, 2004; Dagleish y Corredig, 2012; Goulding *et al.*, 2020). Durante la formación paulatina de la red tridimensional, quedan atrapados el resto de constituyentes de la leche, principalmente el suero y los glóbulos grasos (Fox y Guinee, 2013; El-Bakry y Sheehan, 2014). Estas últimas pueden formar parte importante en la estructura de la cuajada debido a su membrana superficial que le permite interactuar tanto con las micelas de paracaseína como con la fase continua (Zamora *et al.*, 2012). De forma natural, las sales de la leche están en equilibrio, sin embargo, al desestabilizar la estructura nativa de las proteínas, este equilibrio desaparece, donde las sales pueden migrar a sitios activos relacionados y así poder consolidarse como parte de la estructura de la cuajada (Bijl *et al.*, 2013).



Figura 6. Representación de la formación de la cuajada. a. Estructura tridimensional de micelas de paracaseínas agregadas, b. Cuajada de leche que consiste en una red de paracaseína con poros, ocupados por glóbulos de grasa y suero (Fox *et al.*, 2017b).

1.2.9. Sinéresis

La sinéresis es un proceso crucial de elaboración de queso que ayuda a controlar la humedad de las partículas de cuajada que afectan las características finales del queso, como el rendimiento, las propiedades funcionales y sensoriales (Dejmek y Walstra, 2004; Giroux *et al.*, 2014; Lucey, 2014). Se considera como el proceso final de transformación de la leche en queso mediante el desplazamiento del suero de los granos de cuajada (Everard *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2015; Lu y McMahon, 2015).

La formación de cuajada se considera un fenómeno transitorio con la tendencia inherente a la separación de fases (la matriz proteína + grasa del suero) (Fagan *et al.*, 2017). Esto implica que las micelas de paracaseína que componen la estructura tienden a reordenarse, creando enlaces con mayor estabilidad, obteniendo una matriz más densa con grasa y suero intercalados en su estructura (O'Callaghan, 2011; Hickey *et al.*, 2015); Durante el reordenamiento reticular, el número de enlaces aumenta como resultado de la deformación y rotura de las interacciones inter-particulares, dando lugar a nuevos enlaces apoyados por el movimiento térmico de las moléculas (Figura 7), resultando en una disminución de la energía libre del sistema (Lucey, 2014; Fagan *et al.*, 2017).

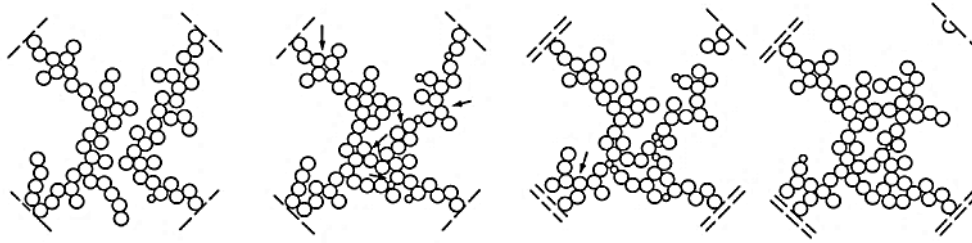


Figura 7. Representación de la sinéresis; Reordenamiento de las hebras de paracaseína (Fagan *et al.*, 2017).

Una vez consolidada la red de paracaseína tridimensional, se produce de forma natural un desplazamiento del suero desde el interior (Dejmek y Walstra, 2004; Giroux *et al.*, 2014), que se conoce como sinéresis endógena (Janhøj y Qvist, 2010). Al mantener la estructura inactiva y estable, puede perder alrededor del 65% del suero, pero esto cambia si se altera con métodos mecánicos como el corte pierde hasta el 90% del suero (Lucey, 2014; Hickey *et al.*, 2015).

Se considera que el proceso de sinéresis en la cuajada está gobernado por la ley de Darcy, la cual relaciona el factor de temperatura con la velocidad a la que fluye el suero (Everard *et al.*, 2009). Por otro lado, diversos estudios sugieren que la estructura de la red tridimensional está constituida por la superposición de agregados fractales; este concepto propone que la configuración de la red tiene la misma disposición molecular a lo largo de diferentes escalas de longitud. Coincidiendo en que la consolidación de la estructura de la cuajada se debe a los reordenamientos de la red a diferentes escalas (Van Vliet *et al.*, 2004; Law y Tamime, 2011; O’Callaghan, 2011).

Además, diferentes procesos mecánicos ayudan a promover la sinéresis de la cuajada, entre los que podemos mencionar el corte, la agitación, el cocimiento, el salado y el prensado (Choi *et al.*, 2015; Lamichhane *et al.*, 2017).

1.2.10. Factores de proceso

Las condiciones fisicoquímicas de la leche juegan un papel determinante en todo el proceso de elaboración del queso, factores como el pH y la temperatura tienen una influencia importante en

las diferentes etapas en las que se encuentran las micelas de caseína a lo largo de la transformación de la leche en una red tridimensional de caseínas.

Cuadro 3. Métodos que modifican las caseínas (Broyard y Gaucheron, 2015)

Métodos	Cambios bioquímicos	Carga eléctrica de las caseínas
Tratamiento térmico	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bloqueo de residuos de lisilo por lactosa ➤ Unión covalente de la β- lactoglobulina ➤ Precipitación de fosfato de calcio 	MN
Enfriamiento	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Solubilización del fosfato de calcio micelar ➤ Solubilización de la β-caseína 	ND
Altas presiones	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ruptura de las micelas de caseína 	ND
Ultrasonido	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ruptura de las micelas de caseína 	ND
Disminución del pH (6.7-4.6)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Protonación de la caseína ➤ Disminución de las interacciones cation-caseína 	MN
Incremento del pH (6.7-9.0)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Incrementa la ionización de la caseína ➤ Insolubilización del fosfato de calcio 	MAN
Adición de cationes divalentes	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Asociación directa a la caseína de los cationes adicionados ➤ Asociación de cationes-fosfato inorgánico con las micelas de caseína ➤ Incremento de la fuerza iónica 	MN
Adición de NaCl	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Solubilización del calcio micelar 	SE
Micro o ultrafiltración combinada con diafiltración	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Remoción de iones difusibles (disminución de la carga de protección) 	MAN
Adición de quelantes del calcio	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Disminución de la interacción caseína-calcio ➤ Solubilización del fosfato de calcio micelar 	MAN
Adición de compuestos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Unión de la caseína por uniones de hidrógeno e hidrofóbicas 	ND
Glicación / Lactosilación	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bloqueo de residuos de lisilo 	MAN
Reticulación química	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bloqueo de residuos de lisilo 	MAN
Succinilación	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bloqueo de residuos de lisilo 	MAN
Acetilación	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bloqueo de residuos de lisilo 	MAN
Fosforilación química	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Adición de fosfato 	MAN
Desfosforilación	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Remoción de fosfato orgánico de los residuos de fosforeril 	MN
Desamidación	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liberación de amonio de la transformación de la glutamina en residuos de glutamato 	MAN
Reticulación por transglutaminasa	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Entrecruzamientos entre lisilo y los residuos de la glutamina 	MAN
Desglicosilación de la κ -caseína por neuraminidasa	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liberación de NANA 	SE
Proteólisis de κ -caseína por quimosina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liberación del glicomacropéptido (106-169) cargado negativamente 	MN

La carga de las moléculas de caseína o de las micelas de caseína se determinó mediante la evaluación del potencial zeta.
 ND. No determinado, SE. Sin efecto, MN. Menos negativo, MAN. Más negativo

La estructura supramolecular de estas partículas coloidales cambia su naturaleza fisicoquímica debido a modificaciones en su entorno (McMahon y Oommen, 2013). El Cuadro 3 muestra diferentes metodologías que modifican la naturaleza de las caseínas.

El pH es un factor determinante durante la etapa de coagulación, el pH fisiológico de la leche es de 6,7. Sin embargo, se puede reducir mediante la adición de cultivos lácticos o reactivos acidificantes. Este cambio mejora la actividad coagulante durante la hidrólisis (Van Vilet *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 2010), además de reducir la repulsión electrostática entre las micelas de caseína y alterar la distribución del calcio entre la fase continua y coloidal (Zobrist *et al.*, 2005; Dalgleish y Corredig, 2012; Ong *et al.*, 2012). En cuanto al efecto de la temperatura, la medida de la tasa de variación de la temperatura referida al coeficiente Q10 en relación a la fase enzimática es 2-4 por 10 ° C, lo cual es típico de una reacción enzimática. Sin embargo, el Q10 para la fase de agregación es 13-16 (Bansal *et al.*, 2007).

Mientras tanto en la consolidación de la matriz de paracaseína, la reducción del pH altera el equilibrio del contenido mineral de la leche, lo que induce una solubilización del fosfato cálcico dentro de las micelas de caseína, modificando el contenido de calcio iónico presente en la fase continua (Wolfschoon-Pombo y Andlinger, 2013). De esta forma, la presencia de una mayor cantidad de cationes y aniones libres en solución cuando se forma el gel produce una estructuración con bases reforzadas que le otorgan mayor firmeza (Crabbe, 2004; Zobrist *et al.*, 2005). Por otro lado, aunque el cuajo actúa sobre las micelas de caseína hasta una temperatura de 0 ° C, estas partículas desestabilizadas no tienen la capacidad de agregarse por debajo de los 15 ° C. Por el contrario, a medida que aumenta la temperatura, la formación de la red tridimensional se produce a mayor velocidad (por ejemplo, alrededor de 50 ° C) (Horne y Banks, 2004; Bansal *et al.*, 2007).

En una etapa posterior de la sinéresis, se sabe que en la transición de este fenómeno se produce una serie de reordenamientos moleculares que dan lugar a una estructura más compacta. Estos cambios ocurren en interacciones inter e intramoleculares y aunque ocurren de forma natural, pueden ser potenciados tanto por la disminución del pH como por el aumento de la temperatura (Rovira *et al.*, 2011; Fox y Guinee, 2013; Fagan *et al.*, 2017; Lamichhane *et al.*, 2017). Ambas modificaciones desencadenan un desplazamiento del suero dentro de la red tridimensional (Ferreira, 2011; Law y Tamime, 2011; Giroux *et al.*, 2014).

1.2.11. Metodologías

En el estudio de la micela de caseína a nivel estructural, así como la etapa de coagulación y la formación de una red tridimensional formada por micelas de caseína desestabilizadas, se han aplicado una serie de metodologías que han contribuido significativamente al conocimiento de estas áreas. El Cuadro 4 muestra una lista de los métodos más recurrentes para estudiar los temas mencionados anteriormente.

Cuadro 4. Metodologías aplicadas en el estudio de la transformación de la leche en cuajada

Metodología	Fundamento	Equipo	Referencia
Medición de Glicomacropéptido (GMP)	Medición de la cantidad de NANA (ácido N-acetil-neuramínico) mediante el GMP liberado derivado de la acción de enzimas coagulantes.	Uso de ácido tricloroacético (TCA) / HPLC	De Kruif (1993) Furlanetti y Prata (2003) Bansal <i>et al.</i> (2007)
SDS-PAGE	Medición de la degradación de la paracaseína en péptidos y aminoácidos.	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	Zamora <i>et al.</i> (2012) Ghosh <i>et al.</i> (2013) Liu <i>et al.</i> (2014)
Turbidez	Medición de la transmisión de ondas electromagnéticas en muestras de leche a diferentes intervalos de la etapa de coagulación utilizando diferentes longitudes de onda.	Medidas de transmisión mediante espectrofotometría	McMahon <i>et al.</i> (1984) De Kruif (1993) Caron <i>et al.</i> (1997)
Reología	Medición de las propiedades viscoelásticas de muestras de leche durante su transformación en una red de cuajada	Reómetro oscilatorio dinámico de baja amplitud	Nájera <i>et al.</i> (2003) Ong <i>et al.</i> (2012) de Castro Leite <i>et al.</i> (2014)
Cromatografía	Método selectivo de separación física de los componentes del suero resultante del proceso de coagulación de la leche. La determinación se realiza mediante dos fases inmiscibles: una fase móvil fluye a través de una fase estacionaria	HPLC RP-HPLC HPLC-MS UHPLC	Kim <i>et al.</i> (2007) Lewis <i>et al.</i> (2014) Cheema <i>et al.</i> (2015) Jensen <i>et al.</i> (2015)
Microscopía	Medición de la transmisión en muestras de cuajada de leche a diferentes intervalos de la etapa de coagulación utilizando diferentes longitudes de onda para obtener parámetros estructurales esenciales de las redes de paracaseína.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) Microscopía láser de barrido confocal (CSLM) Electrones de barrido criogénico (Cryo-SEM) Microscopía electrónica de transmisión de barrido criogénico (Cryo STEM)	Kalab (1993) Ong <i>et al.</i> (2011) Uniacke-Lowe (2011) Munialo <i>et al.</i> (2018)
Dispersión de rayos X	De las ondas dispersas se puede deducir el orden atómico de las muestras de micelas de caseína.	Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) Dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS)	(De Kruif, 2014) (Gebhardt, 2014) (Bouchoux <i>et al.</i> , 2015)

1.3. Hipótesis

Los factores del proceso como la acidez y la temperatura afectan significativamente la conformación estructural de la cuajada durante su formación y maduración.

1.4. Objetivo general

Evaluar las modificaciones estructurales presentes durante la formación de la cuajada a través del tiempo de curado promovido por la variación en los factores del proceso como la acidez y la temperatura.

1.5. Objetivos específicos

- Evaluar el cambio de densidad de la cuajada durante el proceso de curado a diferentes condiciones de temperatura y acidez.
- Evaluar la presencia de los enlaces químicos determinantes en la estructura de la cuajada durante el proceso de curado a diferentes condiciones de temperatura y acidez.

1.6. Sección Integradora del Trabajo

La sección de antecedentes nos permite observar un panorama general sobre la coagulación de la leche, así como sus características y particularidades. El conocimiento de la complejidad de las micelas de caseínas y su papel como parte estructural de la red proteica conocida como cuajada es de gran importancia para el entendimiento de este fenómeno. En secciones posteriores se muestran dos proyectos de investigación desarrollados con la finalidad obtener nuevo conocimiento para poder entender de mejor manera el mecanismo de acción de la formación y maduración de la cuajada. El primer artículo tiene como objeto de estudio el cambio de densidad en cuajadas de leche a través del tiempo y como los factores temperatura y acidez contribuyen en la consolidación de la cuajada. La fase proteica es el principal componente estructural de la cuajada, el cambio dinámico que experimenta permite la reconfiguración de la red tridimensional a través del tiempo, lo cual repercute directamente en el cambio de densidad de la cuajada. La densidad de todas las muestras estudiadas mostró un pequeño aumento lineal durante el período de evaluación. Mientras que con la variación en los factores de proceso no se observó diferencia en la densidad de la cuajada entre las muestras con y sin acidificación. Aunque se observó un ligero efecto de la temperatura, a mayor temperatura se produjeron cuajadas con mayor densidad. La densidad de todas las cuajadas estudiadas se comportó de manera muy similar. Sin embargo, la evolución radicalmente diferente de la densidad de fase proteica de las muestras de cuajada respecto a la variación en acidez sugirió la existencia de 2 mecanismos independientes involucrados en el desarrollo de la estructura basada en proteínas de la cuajada. Por otra parte, el enfoque del segundo artículo está dirigido al estudio de los enlaces químicos involucrados en la formación y estructuración de la cuajada. Enlaces como puentes disulfuro, de hidrógeno y de calcio, así también interacciones hidrofóbicas y electrostáticas se evaluaron después del corte de la cuajada. Las interacciones hidrofóbicas presentes en las micelas de caseína nativas fueron sustituidas por enlaces electrostáticos, de hidrógeno y calcio durante todo el período de evaluación. Todo esto a raíz de que las micelas pierden su estabilidad y se vuelven parte de la configuración estructural de la cuajada. Se encontró que la formación de los enlaces estudiados sigue un nivel jerárquico derivado de su energía de formación. Mientras tanto la variación de los factores de proceso indicó que la temperatura actúa como un catalizador reduciendo el tiempo de formación de los enlaces, mientras que el desarrollo de acidez promueve la desestabilización de la estructura interna de las micelas de caseína mediante la solubilización el

fosfato de calcio. Se obtuvo que los enlaces químicos más fuertes tienden a reemplazar los enlaces más débiles a medida que la desagregación de la estructura deja al descubierto nuevos sitios reactivos disponibles.

2. STRUCTURE REARRANGEMENT DURING RENNET COAGULATION OF MILK MODIFIES CURD DENSITY

Publicado en: Journal of Dairy Science (JDS)

Fecha de publicación: febrero 2020

Volumen: 103

Páginas: 3088-3094

DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16998>

Colaboradores:

Dr. David R. Sepulveda Ahumada

Dra. G. Isela Olivas Orozco

Dr. Carlos H. Acosta Muñiz

Dr. Néstor Gutiérrez Méndez



Structure rearrangement during rennet coagulation of milk modifies curd density

J. C. Amaro-Hernández,¹ G. I. Olivas,¹ C. H. Acosta-Muñiz,¹ N. Gutiérrez-Méndez,² and D. R. Sepulveda^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Cuauhtemoc, Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial, Ciudad Cuauhtemoc, Chihuahua, Mexico, C.P. 31570

²Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Chihuahua, Chihuahua, Mexico, C.P. 31570

ABSTRACT

Milk curds are a semisolid structure resulting from the enzymatic coagulation of milk, consisting mainly of paracasein micelles, fat globules, and whey. This gel undergoes a series of changes in its composition and structure during setting and curing, affecting curd density. The present study investigated the composition and density of inoculated and noninoculated milk curds during a 60-min curing period conducted at 30, 35, and 40°C. The purpose of the study was to determine the density changes occurring in the protein phase of curds during curing under different conditions of temperature and pH to understand the nature of the structural changes happening in the paracasein matrix. Noninoculated curd density values oscillated between 1.0247 and 1.0294 g/cm³ after 60 min of curing, whereas inoculated treatments showed values between 1.0222 and 1.0321 g/cm³. This small difference in density between the studied samples was surprising because the whey content of samples differed greatly. Density of the protein phase reached values of 1.8002 and 1.4388 g/cm³ for noninoculated and inoculated curds, respectively, after 60 min of curing. Two independent mechanisms involved in the development of the protein-based structure of curds were identified upon comparison of the development of protein phase density in inoculated and noninoculated curds. Although the larger increase in protein phase density observed in noninoculated curds was probably due to the concurrent action of calcium-mediated electrostatic bonds and temperature-dependent hydrophobic bonds, inoculated curds showed a lower protein phase density caused by calcium solubilization and by a decrease in the net charge of paracasein micelles induced by pH reduction.

Key words: curd density, curd temperature, curd pH, curd protein phase density, curd syneresis

INTRODUCTION

Rennet coagulation of milk is a physicochemical phenomenon that has been known for millennia (Sørensen et al., 2011). During rennet coagulation, liquid milk turns into a semisolid gel that evolves through time (curing), losing whey and gaining firmness (O'Callaghan, 2011). Although there is a consensus identifying paracasein micelles as the milk components responsible for the formation of the semisolid matrix, the actual mechanism through which the structure of the gel is formed and evolves through time is not well known (Fox et al., 2017).

Shrinking of curds after gelling suggests the rearrangement of paracasein micelles forming the gel network (Lucey, 2011). Such rearrangement is likely caused by an increment in the number of protein-protein interactions, leading to the formation of thicker paracasein micelle strands and thus reducing the available space for whey (Meakin, 1987). Intramicellar rearrangements, individual micelle shifts, and strand rearrangements have been suggested as potential mechanisms involved in rennet-induced casein gel curing (Mellema et al., 2000). Particle fusion (disintegration of the micellar structure within the newly created hyperdimensional strands) has also been suggested as a relevant phenomenon potentially taking place during milk gel aging (Mellema et al., 2002).

These structural rearrangements, together with composition changes caused by syneresis, undoubtedly modify the density of curds. Three main phases may be identified within the gel structure: fat globules, which for structural purposes can be considered an inert filler with homogeneous physical properties (Horne and Banks, 2004); liquid whey, also a structure-filling substance with homogeneous physical properties (Walstra et al., 2005; Yadav et al., 2015); and a protein-based solid-like network comprising mainly paracasein micelles, minerals in soluble and insoluble form, and some hydration whey (Akkerman, 1992; Ong et al., 2011; Hickey et al., 2015). This third phase, the most complex of the 3, has unknown and changing composi-

Received May 21, 2019.

Accepted December 6, 2019.

*Corresponding author: dsepulveda@ciad.mx

tion and physical properties, which depend on environmental conditions (pH, ionic force, temperature) and the degree of advance of the curing process. Paracasein micelles (spherical, highly hydrated, open structures in liquid milk) may also change their configuration during the curing process, contributing to the modification of the physical properties of the proteinaceous part of the structure (Dagleish and Law, 1988).

Taking into account all of these conditions, in the present study the composition and density of rennet-coagulated milk were monitored during curing processes with and without microbial acidity development in an attempt to estimate changes in the density of the protein-based network through measurement of the density of curds, whey, and fat phases as well as their relative abundances. It is expected that this knowledge will shed some light on the nature of the structural rearrangements happening in the paracasein network during aging of milk gels.

MATERIALS AND METHODS

The density and composition of curds were measured during gel curing under different conditions of acidity and temperature. The density of the protein phase was calculated based on the density and relative abundance of the rest of the curd components.

Curd Manufacture and Conditioning

Pasteurized bovine whole milk (2 L/treatment) was conditioned at 3 temperatures (30, 35, and 40°C) with and without the addition of lactic cultures. For inoculated samples, 0.8 U of lactic acid bacteria was added (RTS 743, Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark). Milk was then coagulated by adding 100 µL (50 international milk-clotting units) of a solution of Chy-Max M 1000 (Ch. Hansen). Subsequently, each mixture was stirred and left undisturbed for 30 min to complete curd formation.

After obtaining a uniform gel, it was cut into cubes of about 1 cm, leaving the curd pieces in the vat to start the undisturbed curing period. Curd samples were taken during this stage (0, 15, 30, 45, and 60 min), considering time 0 as the moment immediately following cut. Composition, pH, and density were evaluated for each sample at each sampling time.

Composition and Physicochemical Analyses

Moisture and fat contents of curds were measured using the AOAC International (2002) method 926.08 and AOAC International (2006) method 989.05 test protocols, respectively. Soluble solids content of whey

was measured using the AOAC International (2002) method 990.20 test protocol to determine the whey content of curds based on their measured moisture content. The pH was measured potentiometrically (Hanna HI5222, Hanna Instruments, Woonsocket, RI).

Whey and fat densities were measured using a 2-mL pycnometer (Hubbard/Carmick, Pyrex, Greencastle, PA). Pure milk fat was obtained using the Gerber method. Curd density was determined via the water displacement method using a 25-mL pycnometer (Hubbard/Carmick, Pyrex) as follows. Curd samples (~3 g) were placed inside the 25-mL pycnometer and weighed on an analytical balance after taring. Afterward, the pycnometer was filled to the 25-mL mark with distilled water. The weight increase caused by water addition was then used to estimate the water volume, considering water density. Curd sample volume was determined by subtracting the estimated water volume from the pycnometer's 25-mL nominal volume. Curd density was obtained by dividing curd weight by curd volume.

Determination of Protein Phase Density

Walstra et al. (2005) established that the density (ρ) of a multicomponent mixture such as curds can be determined by adding the quotients obtained from dividing the mass fraction of each one of its individual components (m_x) by their respective densities (ρ_x):

$$\frac{1}{\rho} = \sum \left(\frac{m_x}{\rho_x} \right) \quad [1]$$

Curds comprise whey, fat, and a protein phase of complex composition (mainly casein, whey, and minerals). The mass fraction of each of these 3 components may be calculated by dividing their respective measured weights over the total curd weight. For this purpose, the weight of the protein phase may be calculated by subtracting the measured weights of fat and whey from the total curd weight. Considering that fat, whey, and curd densities were experimentally determined, Equation 1 may be solved for protein phase density ($\rho_{\text{protein phase}}$), yielding Equation 2:

$$\rho_{\text{protein phase}} = \frac{m_{\text{protein phase}}}{\left(\frac{1}{\rho_{\text{curds}}} \right) - \left(\frac{m_{\text{whey}}}{\rho_{\text{whey}}} \right) - \left(\frac{m_{\text{fat}}}{\rho_{\text{fat}}} \right)}, \quad [2]$$

where m_{fat} , m_{whey} , and $m_{\text{protein phase}}$ stand for the mass fraction of fat, whey, and the protein phase, respectively, ρ_{fat} , ρ_{whey} , and ρ_{curds} stand for the density of fat, whey, and curds, respectively.

Statistical Analysis

The experiment was conducted in triplicate. Analyses of variance were conducted for each response variable, considering a $2 \times 3 \times 5$ factorial experimental design (2 inoculation levels: inoculated and noninoculated; 3 temperature levels: 30, 35, and 40°C; 5 time levels: 0, 15, 30, 45, and 60 min), using SAS statistical software (SAS Institute Inc., Cary, NC), considering a significance level of $P \leq 0.01$.

RESULTS AND DISCUSSION

pH

The pH of studied curd samples is shown in Figure 1. As expected, higher incubation temperatures caused a larger decrease in pH than lower temperatures, whereas noninoculated samples did not develop any acidity throughout the studied time. The pH of all studied samples was around 6.5 before conducting the tests. Lactic acid bacteria inoculation took place 90 min before the time presented as time 0 in Figure 1. Inoculated samples showed linear acidification trends with respect to time, displaying coefficients of determination of 0.9577, 0.9776, and 0.9965 at 30, 35, and 40°C, respectively. Previously published studies reported similar acidification trends in inoculated curds. Gonçalves and Cardarelli (2019) used *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* for the manufacture of mozzarella cheese, inducing an acidity increase from a pH of 6.50 to 5.1 during a period of 60 min.

Acidification plays an important role in curd setting and curing, influencing the physicochemical properties of casein micelles and therefore potentially modifying the density of the protein phase of curds. The enzymatic activity of chymosin is favored at lower pH, increasing the rate of proteolysis, which is the first step in curd formation (Van den Bijgaart, 1988; Janhøj and Qvist, 2010). Acidity development also plays an important role in increasing the rate of aggregation of paracasein micelles during gel formation (Mellema et al., 2000), producing rearrangements inside the protein matrix that simultaneously result in a firmness increase and in greater whey expulsion (van Vliet et al., 2004). The Z potential of paracasein micelles increases gradually during acidity development (from -18 to -11 mV in a pH range of 6.7–5.5), causing a decrease in net negative charge and reducing the space between micelles (Van den Bijgaart, 1988; Janhøj and Qvist, 2010). Colloidal calcium phosphate from the interior of micelles is also dissociated at lower pH, promoting the weakening of the micellar structure (Lodaite et al., 2000; Choi et al., 2015).

Whey Content

Figure 2 shows whey syneresis of curd samples during the 60 min of the study. Whey content of all studied samples was about 93 g of whey/100 g of curds at the beginning of the study. However, as gels cured, inoculated samples incubated at 35 and 40°C lost whey at a higher rate than the rest of the studied samples. No significant difference in whey content was found between noninoculated samples and the inoculated sample incubated at 30°C, indicating that small decreases in pH (those resulting in pH values >5.75) do not cause a significant change in whey loss rate. All studied samples lost whey in a fairly linear trend (R^2 values between 0.9624 and 0.9932). Noninoculated samples, together with the inoculated sample incubated at 30°C, lost whey at an average rate of 0.1408 g of whey/min. Inoculated samples incubated at 35 and 40°C lost whey at rates of 0.2113 and 0.4451 g of whey/min, respectively. It is important to point out that noninoculated samples lost some whey even though their pH remained constant during the study, suggesting that other factors besides pH play a relevant role in whey loss.

Several authors agree that treatments with acidified milk improve the properties of rennet curds during formation and maturation, including increasing firmness, whey displacement, and whey loss rate. Lodaite et al. (2000) evaluated the syneresis of blocks of curds of different thickness using pH 6.4 and 6.0. These researchers measured the relative flow rate of whey and, using Darcy's law, concluded that curds with a greater degree

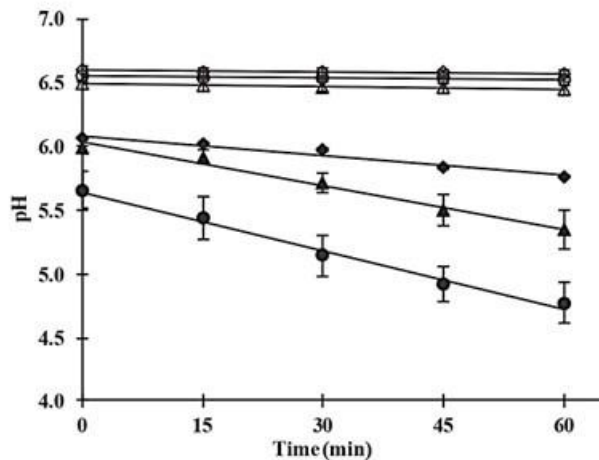


Figure 1. The pH development of inoculated and noninoculated curds incubated at 3 temperatures. Noninoculated samples are represented by empty symbols: 30°C (◇), 35°C (Δ), and 40°C (○). Inoculated samples are represented by filled symbols: 30°C (◆), 35°C (▲), and 40°C (●). Error bars indicate SD.

of acidity and thickness show higher shrinkage due to whey loss. Van den Bijgaart (1988) studied the effect of the endogenous pressure inside curds on samples at pH 6.68, 6.48, and 6.33 and found that the internal pressure of curds was affected by pH, reporting endogenous pressure values of 0.25, 1.10, and 2.00 Pa, respectively. In a similar study, Marshall (1982) measured the synthesis of undisturbed curds during the maturation process at pH 6.6, 6.3, and 6.0 using a stainless steel mesh to prevent curd movement when collecting displaced whey, obtaining values of 0.2, 0.35, and 0.4% of whey loss, respectively.

The presence of some specific chemical bonds during aggregation is of great importance. Hydrophobic and electrostatic (calcium bridges) interactions give paracasein particles the ability to join together and form a 3-dimensional structure (Fox and Guinee, 2013). The increase in the number of links between molecules of paracasein produces a series of internal rearrangements in the protein network that manifests as shrinkage, as if the curd was naturally squeezed from the inside (Özilgen and Kauten, 1994; Lucey, 2014). Electrostatically driven internal changes are potentiated by lowering pH to about 5.2, causing an increase in the speed of molecular rearrangements, resulting in an increase in the permeability of the curd (van Vliet and Walstra, 1994; Janhøj and Qvist, 2010).

Hydrophobic interactions also play a transcendent role by giving a capillary force to the surface of undisturbed gels (hydrophobic regions oriented to the air). However, cutting and stirring (wetting) trigger the

contraction of the structure and the expulsion of whey (Renault et al., 1997; Walstra et al., 2005).

Density

Curd Density. Figure 3 shows changes in curd density observed during the 60 min of the study. Curd density increased in a linear trend with respect to time at a rate of 0.0003, 0.0002, and 0.0003 g/cm³ per minute at 30, 35, and 40°C, respectively, showing coefficients of determination higher than 0.9875. Surprisingly, only the factors temperature and time were statistically significant ($P \leq 0.01$). Lactic acid bacteria inoculation was not a statistically significant factor, indicating that pH does not play a relevant role in defining curd density during the studied period, as temperature and time do. These findings are intriguing because whey content of inoculated and noninoculated samples is very different, especially at longer curing times (Figure 2), and such marked composition difference was expected to cause a significant effect on curd density. It is also worth noting that although the factor temperature was statistically significant, the maximum observed density difference among treatments was less than 0.01 g/cm³, which for practical purposes is a very small difference. Curd density was lower than whey density (1.0221 g/cm³) during the first 30 min at all temperatures, implying that curds float on whey during the early phases of curd curing and cooking, as previously reported by Munro and Tan (1984), Van den Bijgaart (1988), and Walstra (1993).

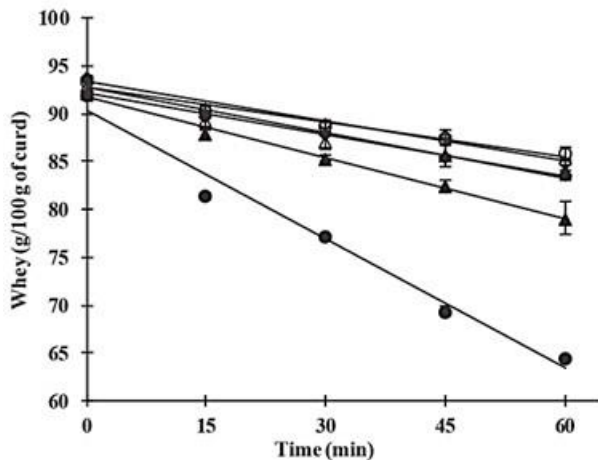


Figure 2. Whey loss in inoculated and noninoculated curds incubated at 3 temperatures. Noninoculated samples are represented by empty symbols: 30°C (◇), 35°C (Δ), and 40°C (○). Inoculated samples are represented by filled symbols: 30°C (◆), 35°C (▲), and 40°C (●). Error bars indicate SD.

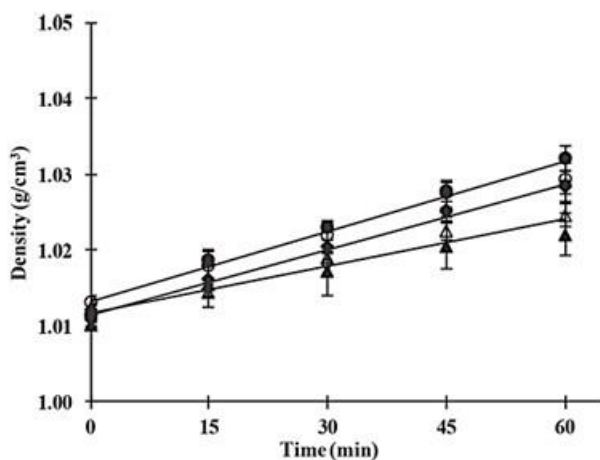


Figure 3. Density of inoculated and noninoculated curds incubated at 3 temperatures. Noninoculated samples are represented by empty symbols: 30°C (◇), 35°C (Δ), and 40°C (○). Inoculated samples are represented by filled symbols: 30°C (◆), 35°C (▲), and 40°C (●). Error bars indicate SD.

Table 1. Reported values of casein density in different forms in milk and curds

Component	Density (g/cm ³)	Method ¹	Reference
Rennet casein hydrated	1.030–1.180	WD	Munro (1980)
Rennet casein dry	1.453	WD, MM	Munro (1980)
Lactic casein dry	1.362	WD, MM	Munro (1980)
Sulfuric acid casein dry	1.385	WD, MM	Munro (1980)
Calcium caseinate	1.430	WD, MM	Munro (1980)
Curd particle	1.035	NSp	Van den Bijgaart (1988)
Calcium paracaseinate	1.390	NSp	Van den Bijgaart (1988)
Curd particle	1.028–1.057	WD	Akkerman (1992)
Paracaseinate	1.438	NSp	Akkerman (1992)
Casein micelle	1.100	NSp	Walstra et al. (2005)
Casein micelle	1.078	MM	de Kruif and Huppertz (2012)
Micellar solids (casein micelle plus micellar calcium phosphate)	1.420	MM	de Kruif and Huppertz (2012)
Casein micelle	1.063	NSp	Broyard and Gaucheron (2015)
Casein micelle	1.036	NSp	Fox et al. (2015)

¹WD = water displacement; MM = mathematical model; NSp = none specified.

Previous attempts to measure curd density have yielded results similar to the ones obtained in the present study (Table 1). Munro (1980) calculated the density of milk casein obtained by different means (lactic acid, sulfuric, and rennet), reporting that the density of rennet casein with high moisture content has a value of approximately 1.030 g/cm³. Van den Bijgaart (1988) evaluated the effect of gravity-induced pressure on a recently formed gel, reporting a density of curd particles of 1.035 g/cm³. Akkerman (1992) measured Gouda cheese curd density through flotation on sodium chloride solutions at different concentrations (5–9%), obtaining values of density of the curds between 1.028 and 1.057 g/cm³.

Protein Phase Density. Development of the calculated protein phase density of curds through time is shown in Figure 4. To avoid overlapping of the data, curves corresponding to noninoculated samples are plotted on the left side (panel a) and inoculated

samples are presented on the right side (panel b). All studied samples showed an initial protein phase density of around 0.83 g/cm³. However, noninoculated samples showed a temperature-dependent linear increase in their protein phase density up to 1.80 g/cm³ ($R^2 = 0.960, 0.997, \text{ and } 0.997$ at 30, 35, and 40°C, respectively), whereas inoculated samples showed a nonlinear increase in their protein phase density, changing slope at around 15 to 30 min and reaching a density of about 1.43 g/cm³ after 60 min regardless of treatment temperature, showing asymptotic behavior. This value (1.43 g/cm³) is similar to the one used by Van den Bijgaart (1988) when calculating the gravitational pressure exerted on curds; this study used a value of 1.39 g/cm³ for calcium paracaseinate. Similarly, Munro (1980) reported a value of 1.43 g/cm³ for casein and caseinate in water suspension.

As described before, protein phase density was calculated based on the density and relative abundance of the

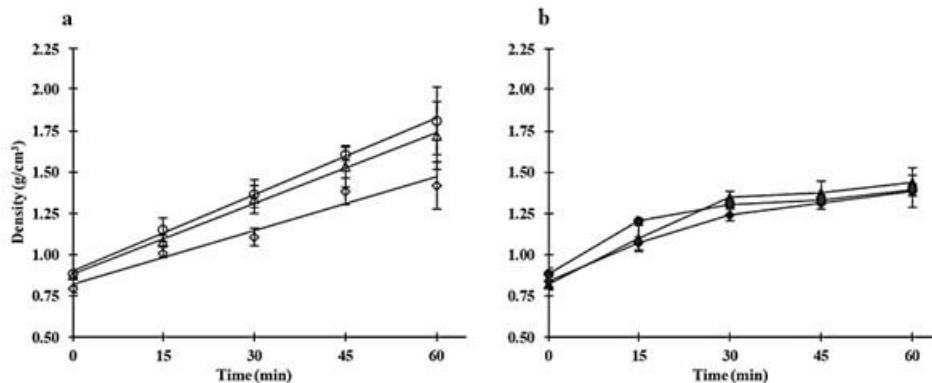


Figure 4. Protein phase density of inoculated and noninoculated curds incubated at 3 temperatures. Noninoculated samples are represented by empty symbols: 30°C (◇), 35°C (Δ), and 40°C (○). Inoculated samples are represented by filled symbols: 30°C (◆), 35°C (▲), and 40°C (●). Error bars indicate SD.

rest of the curd components using Equation 2. Whey mass fraction was estimated by considering moisture content and a TS content in whey of 6.61% (wt/wt), which is similar to the value of 6.8% (wt/wt) reported by Walstra et al. (2005). Dry-basis fat content of curds remained constant at approximately 3.21% (wt/wt) during the 60 min of the study, although its wet-basis value increased due to whey loss. On the other hand, the experimental values obtained in the present study for whey and fat density remained constant throughout the study, showing values of 1,022 and 0.914 g/cm³, respectively. These values have great similarity to those reported in the literature for whey (1.020–1.023 g/cm³; Akkerman, 1992; de Kruif and Huppertz, 2012) and fat (0.90–0.92 g/cm³; Walstra et al., 2005; Fox et al., 2015).

The nonlinear behavior of inoculated samples shown in Figure 4b resembles the result of the addition of 2 linear trends of different slope, suggesting 2 different phenomena with an effect on protein phase density happening at the same time. The first one, starting at time 0, is a trend shared by inoculated and noninoculated samples, where temperature plays a relevant role. At this time, pH plays no role in protein phase density (the same trends are observed on inoculated and noninoculated samples). The second one, which becomes evident around 15 to 30 min, is a different phenomenon that interferes with the first one, restraining inoculated samples from increasing their protein phase density in a temperature-dependent linear fashion as noninoculated samples do (although a new temperature-independent linear trend of different slope is set). This second phenomenon seems to be related to pH development, as the protein phase density of inoculated samples incubated at 30°C (slowest pH development) is very similar to that of noninoculated samples incubated at the same temperature. From these observations, we may conclude that what is witnessed in Figure 4a is the result of the unhindered aggregation of paracasein micelles through ionic (calcium mediated) and hydrophobic interactions, the later ones being strongly dependent on temperature (Carlson et al., 1986; Bansal et al., 2007; Kumar et al., 2010). On the other hand, the pH decrease observed in inoculated samples promotes the reduction in the net electrostatic charge of micelles, causing the solubilization of ionic calcium (Choi et al., 2015). This in turn causes the weakening of the protein structure and the reduction of the density of the protein phase (or rather prevents it from reaching the density values observed in noninoculated samples). Modification of the protein phase density by the presence of bacterial cells in inoculated samples (density = 1.035–1.093 g/cm³; Bakken and Olsen, 1983) is another possible explanation for the differences observed in Figure 4a and b. However, this

seems unlikely because bacteria grow in an exponential fashion, whereas the observed effect seems to be linear.

CONCLUSIONS

Development of curd density under various temperature and pH conditions throughout a 60-min curing period is reported here for the first time. The protein phase density of inoculated and noninoculated curds was successfully calculated using the proposed methodology. Inoculated curd samples developed lower pH levels than noninoculated samples, concurrently showing higher whey loss during the curing process. Whey loss and pH showed a linear dependence with time and temperature. Higher incubation temperatures and longer incubation times induced larger pH decreases and higher whey loss. Density of all studied samples showed a small linear increase during the curing period. No difference in curd density was observed between inoculated and noninoculated samples. Although a slight effect of temperature was observed (higher incubation temperatures produced denser curds), the density of all studied curds behaved in a very similar way throughout curing time. This behavior was surprising because the whey content of inoculated and noninoculated samples differed greatly, and such composition differences were expected to have an influence on curd density. The radically different evolution of the protein phase density of inoculated and noninoculated curd samples suggested the existence of 2 independent mechanisms involved in the development of the protein-based structure of curds. Noninoculated curds displayed a larger increase in protein phase density, probably due to the concurrent action of calcium-mediated electrostatic bonds and temperature-dependent hydrophobic bonds. Inoculated curds, on the other hand, showed signs of weakening of the protein structure (compared with noninoculated samples), probably caused by calcium solubilization and the reduction in the net charge of paracasein micelles induced by the reduction in pH. Further studies are necessary to corroborate these hypotheses.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Veronica Gonzalez and Angel Esparza (Centro de Investigacion en Alimentacion y Desarrollo A.C., Unidad Cuauhtemoc, Ciudad Cuauhtemoc, Chihuahua, Mexico) for their technical assistance. Author Amaro-Hernandez thanks the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico City) for providing the financial support for his graduate studies. The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

- Akkerman, J. C. 1992. Drainage of curd. PhD Diss. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.
- AOAC International. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AOAC International. 2006. Official Methods of Analysis. 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Bakken, L. R., and R. A. Olsen. 1983. Buoyant densities and dry-matter contents of microorganisms: Conversion of a measured biovolume into biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1188–1195.
- Bansal, N., P. F. Fox, and P. L. McSweeney. 2007. Aggregation of rennet-altered casein micelles at low temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 55:3120–3126. <https://doi.org/10.1021/jf0631427>.
- Broyard, C., and F. Gaucheron. 2015. Modifications of structures and functions of caseins: A scientific and technological challenge. *Dairy Sci. Technol.* 95:831–862. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y>.
- Carlson, A., G. C. Hill, and N. F. Olson. 1986. The coagulation of milk with immobilized enzymes: A critical review. *Enzyme Microb. Technol.* 8:642–650. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90059-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90059-1).
- Choi, J., D. Horne, and J. Lucey. 2015. Effect of insoluble calcium concentration on endogenous syneresis rate in rennet-coagulated bovine milk. *J. Dairy Sci.* 98:5955–5966. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9527>.
- Dalgleish, D. G., and A. J. R. Law. 1988. pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Res.* 55:529–538. <https://doi.org/10.1017/S0022029900033306>.
- de Kruif, C. G., and T. Huppertz. 2012. Casein micelles: Size distribution in milks from individual cows. *J. Agric. Food Chem.* 60:4649–4655. <https://doi.org/10.1021/jf301397w>.
- Fox, P. F., and T. P. Guinee. 2013. Cheese science and technology. Pages 357–389 in *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. 1st ed. P. A. Haenlein, ed. Wiley, Hoboken, NJ.
- Fox, P. F., T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. McSweeney. 2017. *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, New York, NY.
- Fox, P. F., T. Uniacke-Lowe, P. L. H. McSweeney, and J. A. O'Mahony. 2015. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
- Gonçalves, M. C., and H. R. Cardarelli. 2019. Composition, microstructure and chemical interactions during the production stages of Mozzarella cheese. *Int. Dairy J.* 88:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.005>.
- Hickey, C., M. Auty, M. Wilkinson, and J. Sheehan. 2015. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 41:135–148. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.10.006>.
- Horne, D. S., and J. M. Banks. 2004. Rennet-induced coagulation of milk. Pages 47–70 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1: General Aspects. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee, ed. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.
- Janhoj, T., and K. Qvist. 2010. The formation of cheese curd. Pages 130–165 in *Technology of Cheesemaking*. 2nd ed. B. A. Law and A. Y. Tamime, ed. Wiley-Blackwell, Ames, IA.
- Kumar, A., S. Grover, J. Sharma, and V. Batish. 2010. Chymosin and other milk coagulants: Sources and biotechnological interventions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30:243–258. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.483459>.
- Lodaite, K., K. Östergren, M. Paulsson, and P. Dejmek. 2000. One-dimensional syneresis of rennet-induced gels. *Int. Dairy J.* 10:829–834. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00027-9).
- Lucey, J. 2011. Curd syneresis. Pages 591–594 in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. J. W. Fuquay, ed. Academic Press, Cambridge, MA.
- Lucey, J. A. 2014. Milk protein gels. Pages 493–523 in *Milk Proteins: From Expression to Food*. 2nd ed. M. Boland, H. Singh, and A. Thompson, ed. Academic Press, Cambridge, MA.
- Marshall, R. J. 1982. An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *J. Dairy Res.* 49:329–336. <https://doi.org/10.1017/S0022029900022433>.
- Meakin, P. 1987. Fractal aggregates. *Adv. Colloid Interface Sci.* 28:249–331. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(87\)80016-7](https://doi.org/10.1016/0001-8686(87)80016-7).
- Mellema, M., J. Heesackers, J. Van Ophuesden, and T. van Vliet. 2000. Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry. *Langmuir* 16:6847–6854. <https://doi.org/10.1021/la000135i>.
- Mellema, M., P. Walstra, J. Van Ophuesden, and T. van Vliet. 2002. Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Adv. Colloid Interface Sci.* 98:25–50. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(01\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(01)00089-6).
- Mumro, P. 1980. The densities of casein curd particles and caseinate solutions. *N. Z. J. Dairy Sci.* 15:225–238.
- Mumro, P. A., and B. K. Tan. 1984. Inclusion of gas in casein and leaf protein precipitate particles and its effect on particle density. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34:279–290. <https://doi.org/10.1002/jctb.280340408>.
- O'Callaghan, D. 2011. Gel firmness and its measurement. Pages 585–590 in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. J. W. Fuquay, ed. Academic Press, Cambridge, MA.
- Ong, L., R. R. Dagastine, S. E. Kentish, and S. L. Gras. 2011. Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Lebensm. Wiss. Technol.* 44:1291–1302. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.026>.
- Özilgen, M., and R. J. Kauten. 1994. NMR analysis and modelling of shrinkage and whey expulsion in rennet curd. *Process Biochem.* 29:373–379. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)87007-1](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)87007-1).
- Renault, C., E. Gastaldi, A. Lagaude, J. Cuq, and B. T. Fuente. 1997. Mechanisms of syneresis in rennet curd without mechanical treatment. *J. Food Sci.* 62:907–910. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15004.x>.
- Sørensen, J., D. S. Palmer, K. B. Qvist, and B. Schiøtt. 2011. Initial stage of cheese production: A molecular modeling study of bovine and camel chymosin complexed with peptides from the chymosin-sensitive region of κ -casein. *J. Agric. Food Chem.* 59:5636–5647. <https://doi.org/10.1021/jf104898w>.
- Van den Bijgaart, H. J. C. M. 1988. Syneresis of rennet-induced milk gels as influenced by cheesemaking parameters. PhD Diss. Department of Food Science, Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands.
- van Vliet, T., C. M. Lakemond, and R. W. Visschers. 2004. Rheology and structure of milk protein gels. *Curr. Opin. Colloid In.* 9:298–304.
- van Vliet, T., and P. Walstra. 1994. Water in casein gels; How to get it out or keep it in. *J. Food Eng.* 22:75–88. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)90026-4).
- Walstra, P. 1993. The syneresis of curd. Pages 141–191 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P. F. Fox, ed. Springer, New York, NY.
- Walstra, P., P. Walstra, J. T. Wouters, and T. J. Geurts. 2005. *Dairy Science and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Yadav, J. S. S., S. Yan, S. Pilli, L. Kumar, R. Tyagi, and R. Surampalli. 2015. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* 33:756–774. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>.

ORCIDS

N. Gutiérrez-Méndez  <https://orcid.org/0000-0002-0791-3211>
 D. R. Sepulveda  <https://orcid.org/0000-0002-0400-8873>

3. CHEMICAL INTERACTIONS AMONG CASEINS DURING THE RENNET COAGULATION MILK

Aceptado en: Journal of Dairy Science (JDS)

Fecha de aceptación: 06 de octubre del 2021

DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21071>

Colaboradores:

Dr. David R. Sepulveda Ahumada

Dra. G. Isela Olivas Orozco

Dr. Carlos H. Acosta Muñiz

Dr. Néstor Gutiérrez Méndez

Dr. Claudio Ríos Velasco



J. Dairy Sci. 105

<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21071>

© 2022 American Dairy Science Association®. Published by Elsevier Inc. and FASS Inc. All rights reserved.

Chemical interactions among caseins during rennet coagulation of milk

J. C. Amaro-Hernández,¹ G. I. Olivas,¹ C. H. Acosta-Muñoz,¹ N. Gutiérrez-Méndez,² C. Rios-Velasco,¹ and D. R. Sepulveda^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Cuauhtémoc, Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México, C.P. 31570

²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitario 8, Campus UACH II, Chihuahua, Chihuahua, México, C.P. 31125

ABSTRACT

Rennet milk curds were prepared under 4 different temperature and acidity conditions. The development of different types of inter-protein chemical bonds (disulfide, hydrophobic, electrostatic, hydrogen, and calcium bridges) was monitored for 60 min after curd cutting. Hydrophobic inter-protein interactions originally present in casein micelles in milk were substituted by electrostatic, hydrogen, and calcium bonds throughout the curd curing period. Disulfide bonds were not disturbed by the experimental conditions employed in the study, remaining at a constant level in all studied treatments. Acidification of curds increased the availability of soluble ionic calcium, increasing the relative proportion of calcium bridges at the expense of electrostatic-hydrogen bonds. Although pH defined the nature of the interactions established among proteins in curd, temperature modified the rate at which such bonds were formed.

Key words: milk curd, inter-casein chemical bonds, curd caseins interactions

INTRODUCTION

Bovine milk gels under the action of rennet, forming a complex protein-based tridimensional arrangement (Sinaga et al., 2017; Lamichhane et al., 2018; Mehta, 2018). Paracasein micelles in curd interact mainly by exposing their hydrophobic cores and through electrostatic and calcium-mediated ionic bonds (Panteli et al., 2015; Ono et al., 2017). After the onset of coagulation, some additional rearrangements of the structure occur (Lucey, 2014). External factors such as pH and temperature play an important role in determining the establishment of the various types of chemical bonds among caseins during this period (Corredig and Salvatore, 2016; Mehta, 2018). The continuous paracasein matrix

physically entraps fat and whey (Geng et al., 2011), creating a structure of high dimensionality supported by casein strands that get thicker through time (Fagan et al., 2017). Depending on the nature and abundance of the formed chemical bonds, the tridimensional protein structure develops a specific capacity to retain whey or to lose it (Mehta, 2018). The driving force behind whey loss is the formation of strong inter-casein interactions that promote micro-syneresis (Walstra et al., 2005), expelling whey as the protein structure becomes denser (Amaro-Hernández et al., 2020).

Although the general mechanism behind curd setting and curing has been abundantly discussed in the literature, the specifics regarding the role played by different types of inter-casein chemical bonds on the development of the proteinaceous curd structure during gel curing remain mostly unknown. An analytical technique reported by Van Camp et al. (1997) and further developed by Keim and Hinrichs (2004) has been suggested as a feasible method to quantify the relative proportion of hydrophobic, electrostatic, hydrogen, calcium, and disulfide bonds in milk gels and other dairy products (Gonçalves and Cardarelli, 2019), providing a means to advance the knowledge in this field.

Based on this, the objective of the present study was to determine the relative proportion of hydrophobic, electrostatic or hydrogen, calcium, and disulfide bonds in curd during a curing period of 60 min under different conditions of pH and temperature.

MATERIALS AND METHODS

The relative proportions of hydrophobic, electrostatic, hydrogen, calcium and disulfide bonds among proteins were measured on curd prepared from lactic acid bacteria-inoculated, and uninoculated milk, tempered at 30 and 40°C, resulting in 4 different treatments. Curd samples were taken every 15 min starting at cutting time, which was considered as time 0. Whey content and pH of each sample were determined as well throughout the curing period.

Received July 27, 2021.

Accepted October 6, 2021.

*Corresponding author: dsepulveda@ciad.mx

Curd Manufacturing and Conditioning

Four pasteurized bovine whole milk aliquots (2 L each) were conditioned at 2 different temperatures (2 at 30°C, and 2 at 40°C). One sample of each temperature was inoculated with 0.8 U of lactic acid bacteria (LAB; RTS 743, Chr. Hansen). A resting period of about half an hour allowed inoculated samples to reach a pH value of 6.2 after a little lag time, ensuring strong LAB activity. Uninoculated samples remained at the original pH of milk (about 6.7). Once milk samples were LAB and temperature preconditioned, milk coagulation was performed by addition of 100 µL (50 international milk clotting units) of a solution of Chy-Max M 1000 (Chr. Hansen). Each sample was left undisturbed for 30 min until curd formation was complete. Afterward, the set curd was cut into cubes of about 1 cm and cured immersed in whey, undisturbed, for a period of 60 min. Curd samples were taken every 15 min (0, 15, 30, 45, and 60 min) for pH, whey content, and analytical characterization of inter-protein chemical bonds.

Whey Content and pH Determinations

The moisture content of curds was determined for each sample by the standard method 926.08 (AOAC International, 2006a). Soluble solids content of whey was measured employing standard method 990.20 (AOAC International, 2006b), to determine the whey content of curds based on their moisture and soluble solids content. The pH was measured potentiometrically (Orion Star A211, Thermo Scientific).

Inter-Protein Chemical Bonds

The method used to characterize chemical bonds is based on selective solubilization of curd protein in different buffer solutions. The assay was performed according to the methodology described by Gonçalves and Cardarelli (2019) with some modifications. Two grams of curd sample was placed in 85-mL polycarbonate tubes together with 20 mL of 1 of the 4 buffer solutions, A, B, C, or D (Table 1). Each buffer solution dissolves a given protein fraction depending on its particular bond-destabilizing properties. Curds in buffer were homogenized (Ultra-Turrax T25) at room temperature for 5 min at 13,500 rpm. Samples were then shaken for 20 min in an orbital agitation shaker (Incubator Shaker Series I26) and centrifuged at 15,000 × g for 23 min at 20°C (Allegra 64R centrifuge/rotor F0685). Afterward, samples were filtered through 0.2-µm paper, and the total nitrogen content of each sample was determined using the Kjeldahl method (AOAC International, 2006c). The nitrogen content of each buffer (by itself)

Table 1. Chemical composition of buffers employed for selective protein solubilization

Buffer	Composition ¹	pH	Destabilized bonds ²
A	Tris 12.12 g/L SDS 1 g/L	7.2	EB, HB, Hy
B	Tris 12.12 g/L SDS 1 g/L DTT 5 g/L	7.2	EB, HB, Hy, SS
C	NaCl 9 g/L NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 7.8 g/L	7.2	EB, HB
D	EDTA 14.6 g/L	8.0	EB, HB, CaB

¹Millipore water for buffer preparation; HCl/NaOH for pH adjustment; DTT = dithiothreitol.

²EB = electrostatic interactions; HB = hydrogen bridges; Hy = hydrophobic interactions; SS = disulfide bridges; CaB = calcium bridges.

was also determined and subtracted from the nitrogen content found for each sample, to block out the buffer's contribution.

Considering the different protein fractions solubilized by each buffer (Table 1), a set of equations was composed to determine the relative abundance of each type of bond from the assayed nitrogen contents:

$$P(SS) = \frac{N_{bond,B}}{N_s} - \frac{N_{bond,A}}{N_s}; \quad (1)$$

$$P(Hy) = \frac{N_{bond,A}}{N_s} - \frac{N_{bond,C}}{N_s}; \quad (2)$$

$$P(EB) + P(HB) + P(ub) = \frac{N_{bond,C}}{N_s}; \quad (3)$$

$$P(CaB) = \frac{N_{bond,D}}{N_s} - \frac{N_{bond,C}}{N_s}, \quad (4)$$

where $N_{bond,A}$, $N_{bond,B}$, $N_{bond,C}$, and $N_{bond,D}$ correspond to the nitrogen content measured in buffer solutions A, B, C, and D, respectively (g/g); N_s is the total nitrogen content of curd (g/g); and P is the proportion of protein (%) stabilized by a given specific interaction: electrostatic bonds (EB), hydrogen bridges (HB), hydrophobic interactions (Hy), disulfide bridges (SS), calcium bonds (CaB), and free protein (ub). Due to their similar nature, electrostatic and hydrogen bonds are quantified as a single group in the present study (Equation [3]).

Statistical Analysis

The experiment was independently repeated 3 times. For each response variable, ANOVA were conducted, considering a 2 × 2 × 5 factorial experimental design,

with 2 inoculation levels (inoculated and uninoculated), 2 temperature levels (30 and 40°C), and 5 curing time levels (0, 15, 30, 45, and 60 min). Statistical analyses were performed using SAS software (SAS System for Windows 9.0; SAS Institute Inc.), considering a significance level of $P \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The 4 studied treatment conditions produced different chemical and physical characteristics on the studied curd during the 60-min curing period. The pH of the studied samples developed as expected (Figure 1), showing a temperature-dependent decrease in inoculated samples caused by the metabolic activity of LAB. Uninoculated samples, by contrast, remained at a constant pH level around 6.7 for the duration of the experiment. Concomitantly, LAB-inoculated samples showed a steeper whey loss trend than uninoculated samples (Figure 2), being more pronounced at higher curing temperature (0.373 g of whey/min). Uninoculated samples cured at 40°C showed a whey loss trend similar to that of inoculated samples cured at 30°C (0.150 g of whey/min), with uninoculated samples cured at 30°C showing the least whey loss among the studied samples (0.076 g of whey/min). This behavior is consistent with previous reports indicating that curd syneresis increases as temperature and acidity increase (Van Vliet et al., 2004; Janhøj and Qvist, 2010).

Regarding the development of the different types of inter-protein chemical bonds during the curing period, it is relevant to mention that disulfide bridges remained at a constant average level of 1.58% for all treatments during the 60-min curing period, showing no statisti-

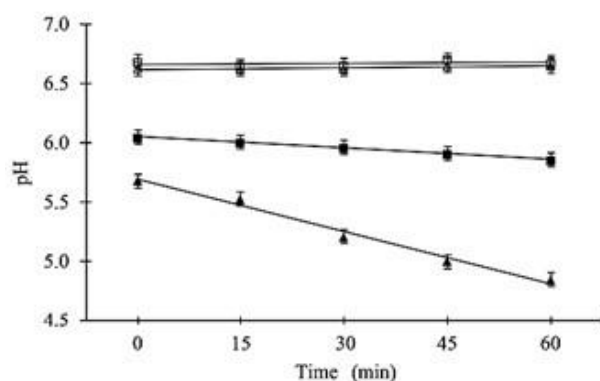


Figure 1. pH development of inoculated and uninoculated curds incubated at different temperatures. Empty markers correspond to uninoculated samples incubated at 30°C (□) and 40°C (Δ). Inoculated samples are represented by filled markers: 30°C (■) and 40°C (▲). Error bars represent SE.

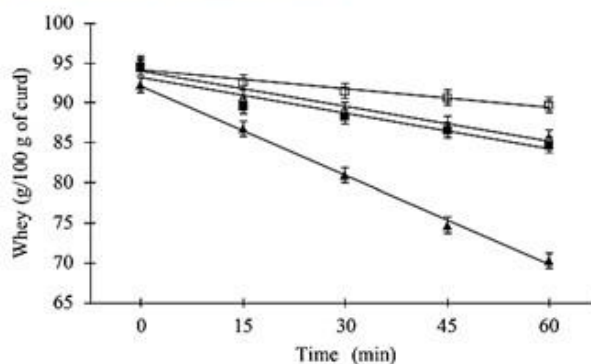


Figure 2. Whey loss in inoculated and uninoculated curds incubated at different temperatures. Empty markers correspond to uninoculated samples incubated at 30°C (□) and 40°C (Δ). Inoculated samples are represented by filled markers: 30°C (■) and 40°C (▲). Error bars represent SE.

cally significant difference among them. (The whole model was not statistically significant, showing no effect of temperature, acidification, time, or any of their interactions.) This observation suggests that disulfide bonds are not disturbed by the experimental conditions employed in this study, which is consistent with previous reports by Gonçalves and Cardarelli (2019), who found 2% disulfide bridges in Mozzarella cheese during the stretching stage. Similarly, Keim et al. (2006) reported 0.5% disulfide bridges in rennet-induced milk gels. In both cases, the researchers mention that standard processing conditions are not able to change the proportion of disulfide bonds, probably due to their high intrinsic energy (Table 2). The small proportion of disulfide bridges found in curd, in any case, is due to the limited number of thiols in caseins, which is reduced to 2 in α_{S2} -casein and 2 in κ -casein (Broyard and Gaucheron, 2015; Fox et al., 2017). Reports mentioning higher proportions of disulfide bridges in curd typically include binding of cysteine-rich whey proteins (Table 3).

Statistical analyses for the rest of the studied types of bonds (hydrophobic, electrostatic+hydrogen, and calcium bridges) indicated statistically significant effects of temperature and LAB inoculation (acidification) in all of them, establishing the unequivocal dependence of bond formation with acidity and temperature. The effect of temperature in the case of formation of electrostatic+hydrogen bonds appeared to be interdependent on time, as a statistically significant interaction between temperature and time was found. In a similar way, hydrophobic bond formation showed a statistically significant interaction between temperature and acidification. Finally, calcium bond formation showed a

statistically significant effect of all studied factors and their interactions, although 80% of the model's sum of squares was taken by the acidification factor, indicating the great relevance of pH on calcium bond formation.

Inter-Protein Chemical Bonds in Uninoculated Curd at 30°C

The relative proportion of hydrophobic, electrostatic+hydrogen, and calcium bonds in uninoculated curd during the 60 min of curing at 30°C is shown in Figure 3. From a theoretical point of view, this treatment is the mildest studied condition. The absence of pH development ensures constant solubility, concentration, ionization, and general chemical reactivity characteristics, for all present chemical species throughout the studied period. The low temperature used in this treatment limits the rate of chemical reactions compared with the higher temperature used in other treatments.

Under these conditions, Figure 3 shows how some regions of paracasein micelles, structurally stabilized through hydrophobic interactions in their original configuration, are disassembled throughout the curing time, reducing the proportion of hydrophobic interactions from 58% to 33%.

Simultaneously, some new electrostatic+hydrogen and calcium bonds start to emerge in the newly formed proteinaceous structure, increasing from 21 to 38% and from 20 to 29%, respectively. Previous reports have established that casein micelle destabilization caused by external factors gives rise to the formation of new links (Choi et al., 2007; Dalgleish, 2014). Casein amino acid residues such as Asp, Glu, and the HPO_4 ion of the phosphoserine complex, are capable of establish-

ing both electrostatic and calcium bonds, whereas Lys forms only electrostatic bonds (Gaucheron, 2011; Koutina et al., 2015; Mehta, 2018). Amino acid residues of Asn, Thr, Ser, Gln, Met, Tyr, and Trp are capable of establishing hydrogen bridges, whereas His and Arg are capable of forming both electrostatic and hydrogen interactions (Keim, 2005).

Electrostatic and hydrogen bonds developed more quickly than calcium bonds under the studied conditions, probably because soluble ionic calcium is not readily available at this pH level (pH 6.7). The moderate development of new electrostatic+hydrogen and calcium inter-protein bonds resulted in a moderate increase in protein-protein interactions, translating into a limited whey loss (4.8% loss), as shown in Figure 2, for this treatment.

The hydrophobically stabilized region in the original micelle structure was only possible thanks to the colloidal stability conferred upon micelles by the glycomacropeptide in κ -caseins (Fox and Guinee, 2013). Once absent, the old structure must turn into a new more thermodynamically stable one, which, to be formed, requires the dissolution of old bonds and the establishment of new ones (Huppertz, 2013). This bond reorganization process takes place following a hierarchical order, $\text{CaB} > \text{EB} > \text{HB} > \text{Hy}$, in which stronger bonds tend to replace weaker bonds as the disaggregation of the structure exposes new reactive sites (Table 2).

Some punctual values similar to those obtained in the present study have been reported in the literature (Table 3). Lefebvre-Cases et al. (1998) reported HB values of 30% in rennet skim milk gels of constant pH at 30°C. Keim et al. (2006) reported values of 23% for EB+HB in rennet gels under similar conditions. Benyahia-Krid et al. (2016) reported values of 42 to 46% for

Table 2. Properties of various interactions stabilizing inter-casein structures

Type of interaction	Energy (kJ/mol)	Functional groups involved	Reference
Peptide bond	300–400	NH-CO	Messens et al. (1997) Keim (2005)
Disulfide bridges (SS)	200	Cystine S-S	Messens et al. (1997) Keim (2005)
Calcium bridges (CaB)	90–97	H donor Tyr, Thr, Ser residues Residue HPO_4^- Asp and Glu	Keim (2005) Gaucheron (2011) Permyakov and Kretsinger (2011)
Electrostatic interactions (EB)	42–84	Deprotonated COO^- Carboxyl COO^- (Asp, Glu) Amino NH_3^+ (His, Arg, Lys)	Messens et al. (1997) Keim (2005)
Hydrogen bridges (HB)	8–40	H atom of OH, NH (donor), or CO (acceptor) groups	Messens et al. (1997) Keim (2005)
Hydrophobic interactions (Hy)	4–12	Residues with aliphatic (Leu, Ile, Val) or aromatic (Phe, Tyr) side chains	Messens et al. (1997) Keim (2005)

Table 3. Reported values of chemical bonds present in different milk gel types

Gel type ¹	Type of bond ²	Bonds destabilized ³ (%)	Dissociating agent ³	Reference
Whey protein concentrate gels at pH 6.0	HB+CaB Hy SS	63 8 24	(1) Demineralized water (2) 1 + Tris + Gly + Na ₂ EDTA (3) 2 + Urea + SDS (4) 3 + DTT	Van Camp et al. (1997)
Skim milk gels: acidified/rennet	HB Hy CaB	30/30 ~12/60 27/76	Urea (1 M) SDS (1 g/L) EDTA (2 mM)	Lefebvre-Castes et al. (1998)
Whey protein isolate gels, different pressure application: build up/holding/release time	Non-covalent SS	98/18/8 ~0/63/71	Tris + SDS Tris + SDS + DTT	Fertsch et al. (2003)
Whey milk gels: nontreated/induced by high pressure (600 MPa)	EB+HB Hy SS	95/12 5/5 <5/80	NaCl + NaH ₂ PO ₄ Tris + SDS Tris + SDS + DTT	Keim and Hinrichs (2004)
Rennet-induced gel/heat-induced gel/pressure-induced gel (reconstituted milk)	EB+HB Hy SS	23/27/51 ~0/~0/4 0.5/21/9	NaCl + NaH ₂ PO ₄ Tris + SDS Tris + SDS + DTT	Keim et al. (2006)
Cheddar cheese: full fat/half fat (heating to 180°C for 25 min)	CaB HB Hy SS	74/67/40 76/82 57/58 42/41	EDTA + Na ₃ citrate Urea SDS Mercaptoethanol	Kim et al. (2011)
Rennet milk gels: raw milk/homogenized-pasteurized milk/ultra-high pressure homogenization milk (3.6% fat content)	CaB HB Hy CaB	41/42 66/73/49 99/100/83 16/20/20	EDTA Urea SDS EDTA	Zanora et al. (2012)
Rennet milk gels: rennet/chicken pepsin (skim milk powder)	HB Hy CaB	46/42 67/65 32/28	Urea SDS EDTA	Benyahia-Krid et al. (2016)
Mozzarella cheese: during/after stretching	EB+HB Hy SS CaB	~0/35 24/10 2/<2 ~0/42	NaCl + NaH ₂ PO ₄ Tris + SDS Tris + SDS + DTT EDTA + Na ₃ citrate	Gonçalves and Cardarelli (2019)

¹Values in the "Bonds destabilized" column separated by a slash refer to the corresponding parameters separated by slashes in the "Gel type" column.

²EB = electrostatic interactions; HB = hydrogen bridges; Hy = hydrophobic interactions; SS = disulfide bridges; CaB = calcium bridges.

³DTT = dithiothreitol.

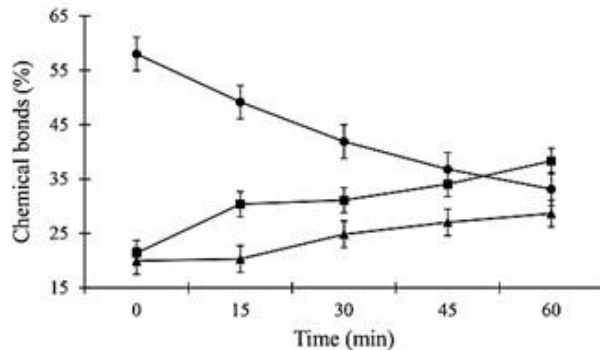


Figure 3. Inter-protein chemical bonds in uninoculated curd samples at 30°C are represented by different markers: hydrophobic interactions (●), electrostatic bonds and hydrogen bridges (■), and calcium bonds (▲). Error bars represent SE.

HB, and 28 to 32% for CaB in skim milk powder gels prepared with different types of coagulant agents. Finally, Zamora et al. (2012) reported CaB values around 20% in curd made of milk subjected to high pressure.

Inter-Protein Chemical Bonds in Uninoculated Curd at 40°C

Figure 4 shows the relative proportion of hydrophobic, electrostatic+hydrogen, and calcium bonds found in uninoculated curd cured at 40°C for 60 min. This treatment, similar to the one previously described, did not induce curd pH changes during the studied period, ensuring constant chemical reactivity properties of all the present chemical species. The higher temperature employed in this treatment, however, increased the kinetic energy of the system, roughly doubling the reaction rate of all chemical changes, as established by the Arrhenius law. In agreement with this, the relative proportion of all studied chemical bonds at 40°C after 30 min coincided almost exactly with the values found at 30°C after 60 min, showing an average difference of only 0.64%.

Curd tempering at 40°C induced faster changes from the beginning of the curing process. By the first measurement (time 0), a large percentage of the hydrophobic interactions had already been severed, quickly reaching an asymptotic value around 34%, which is nearly the same level of hydrophobic bond content found after 60 min at 30°C (Figure 3). The reduction of hydrophobic bonds was obviously caused by formation of new electrostatic+hydrogen bonds, which accounted for a much larger proportion (44%) at time 0 in curd at 40°C. Calcium bridges, on the other hand, again showed a low initial proportion (22%), similar to what was observed at 30°C, confirming the unavailability of soluble ionic

calcium at high pH (Lamichhane et al., 2018; Horne, 2020). Calcium bridges increased up to 33% after 60 min at the expense of electrostatic+hydrogen bonds, which gradually yielded reaction sites to calcium. Whey loss increased under these conditions, roughly doubling whey loss at 30°C after 60 min.

Inter-Protein Chemical Bonds in Inoculated Curd at 30°C

The relative proportions of chemical bonds in LAB-inoculated curd samples cured at 30°C are shown in Figure 5. The low temperature employed in this treatment induced low chemical reaction rates, similar to what was observed in uninoculated curds at 30°C. Nevertheless, the pH decrease resulting from moderate LAB metabolic activity in this treatment modified the reactivity of some chemical species and increased the availability of soluble ionic calcium, as previously reported (Bijl et al., 2013; McMahon and Oommen, 2013). Soluble ionic calcium may interact with non-protonated Glu and Asp, whose abundance depends on pH, becoming scarcer as pH lowers. Proteins are also capable of reacting with calcium through the amino acids Ser, Thr, and Tyr via intermediation of a phosphate group forming calcium-reactive phosphoserine, phosphothreonine, and phosphotyrosine (Keim, 2005; Horne, 2016). The relative abundance of these amino acids in individual caseins determines their potential for interaction through calcium bridges or other electrostatic interactions (Cooke and McSweeney, 2017; Sinaga et al., 2017; Kern et al., 2018).

The effect of the increase in soluble ionic calcium is immediately apparent, as the relative proportion of calcium bridges between proteins in this treatment is notably larger than in the rest of the studied treat-

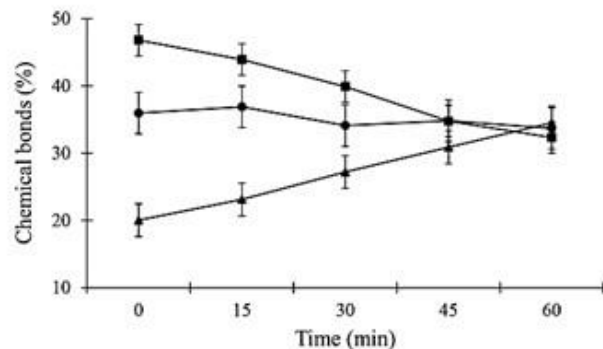


Figure 4. Inter-protein chemical bonds in uninoculated curd samples at 40°C are represented by different markers: hydrophobic interactions (●), electrostatic bonds and hydrogen bridges (■), and calcium bonds (▲). Error bars represent SE.

ments (68%). The observed values are similar to those reported by Keim et al. (2006) under similar conditions. The gradual decrease in hydrophobic bonds observed in uninoculated curds at 30°C in this case occurs abruptly even before the first measurement is conducted (time 0), probably forced by the sturdy structure developed by strong calcium bridges, reducing it below the levels previously observed (10%). Although similar to what was observed in uninoculated curds at 40°C, in this case hydrophobic interactions are mainly extinguished by calcium bridges and, to a lesser extent, by generic electrostatic+hydrogen bonds. Curd structure remains mainly calcium bridge-stabilized until the end of the 60-min curing period, although a slight recovery of hydrophobic interactions occurs at the expense of electrostatic+hydrogen bonds (32% reduction) and, to a lesser extent, of calcium bridges (13% reduction). This increase of hydrophobic bonds during the curing period may be related to the decrease of electrostatic repulsion experienced among caseins as pH lowers, reducing their net charge (Gonçalves and Cardarelli, 2019). Curd whey content remained relatively high throughout the curing period, similar to what was observed in uninoculated curd cured at 40°C. The limited pH reduction marginally modified the water holding capacity of curds (Lin et al., 2018; Mehta, 2018).

Inter-Protein Chemical Bonds in Inoculated Curd at 40°C

Finally, assessment of the relative proportions of chemical bonds found in LAB-inoculated curd cooked at 40°C for 60 min is shown in Figure 6. In this treatment, hydrophobic bonds maintained relative abundance levels around 22% throughout the studied 60-min period. This value is roughly double what was observed at the beginning of the curing period at 30°C, as higher temperatures increase the dominance of hydrophobic interactions, reducing the contribution of electrostatic interactions (Giroux et al., 2014; Lamichhane et al., 2018). Generic electrostatic+hydrogen bonds developed more quickly at 40°C than at 30°C, as predicted by the Arrhenius law, limiting the proportion of calcium bonds formed in the initial stages of the curing period. Nevertheless, calcium bonds quickly recovered their preponderance. As the curing period proceeded, calcium bonds gradually substituted electrostatic bonds, accumulating over time. The sum of calcium and electrostatic+hydrogen bonds remained practically constant throughout curing time. The relative proportion of calcium bonds found in inoculated curd cured at 40°C for 60 min seems to coincide with the value which calcium bonds in inoculated curd cured at 30°C approached after 60 min (52%).

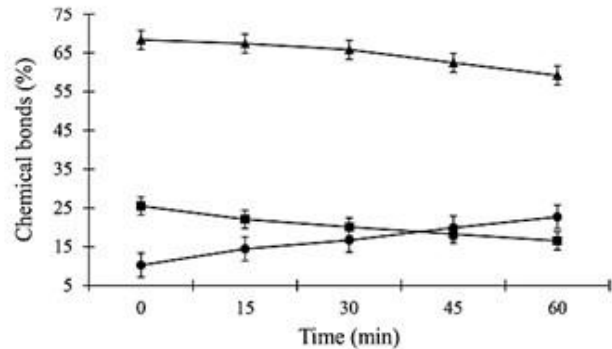


Figure 5. Inter-protein chemical bonds in inoculated curd samples at 30°C are represented by different markers: hydrophobic interactions (●), electrostatic bonds and hydrogen bridges (■), and calcium bonds (▲). Error bars represent SE.

The water binding capacity of curd was drastically reduced at 40°C, as pH in this treatment is much lower than at 30°C (Giroux et al., 2014; Lamichhane et al., 2018). Therefore, although the proportion of hydrophobic bonds to combined calcium, electrostatic, and hydrogen bonds at 60 min is roughly 20:80 in both 30 and 40°C treatments, their whey content differs greatly (Figure 2).

CONCLUSIONS

Although visually all studied conditions coagulated milk in a similar manner, different temperature and acidity conditions strongly affected the relative proportions of inter-protein chemical bonds found in curd. Disulfide bridges were not affected by the experimental conditions, remaining at a constant level of 1.58% in all treatments. Electrostatic interactions (including

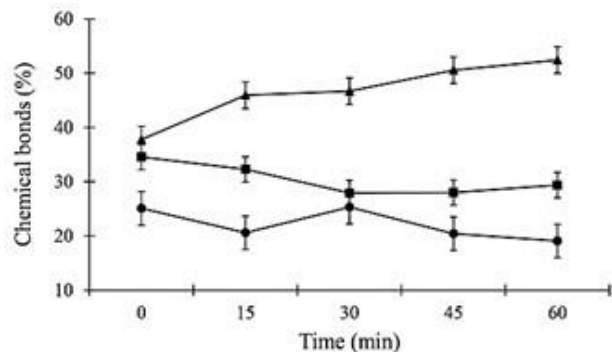


Figure 6. Inter-protein chemical bonds in inoculated curd samples at 40°C are represented by different markers: hydrophobic interactions (●), electrostatic bonds and hydrogen bridges (■), and calcium bonds (▲). Error bars represent SE.

calcium and hydrogen bridges) quickly substituted the hydrophobic interactions that stabilized the original structure of casein micelles in milk before the action of chymosin. Treatment temperature affected reaction rate, as established by the Arrhenius law. pH-dependent soluble ionic calcium availability defined the balance between electrostatic+hydrogen bonds and calcium bridges. In general, stronger bonds tended to replace weaker bonds as the disaggregation of the structure exposed new reactive sites, following the hierarchical order CaB > EB > HB > Hy. The different combinations of pH and temperature during curd curing promoted the establishment of different proteinaceous structures. Although pH defined the nature of the interactions among proteins in curd, temperature modified the rate at which such bonds were formed. Determining how the differently stabilized curd structures translate into the microstructure and physical properties of finished cheese and other intermediate products remains a relevant topic.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Veronica Gonzalez and Angel Esparza (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Cuauhtémoc, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, Mexico) for their technical assistance. Author Amaro-Hernández thanks the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT; Mexico City) for providing financial support for his graduate studies. The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

- Amaro-Hernández, J. C., G. I. Olivares, C. H. Acosta-Muñoz, N. Gutiérrez-Méndez, and D. R. Sepulveda. 2020. Structure rearrangement during rennet coagulation of milk modifies curd density. *J. Dairy Sci.* 103:3088–3094. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16998>.
- AOAC International. 2006a. Moisture in cheese, method no. 926.08. Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC International.
- AOAC International. 2006b. Solids (total) in milk, method no. 990.20. Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC International.
- AOAC International. 2006c. Kjeldahl method, method no. 2001.14. Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC International.
- Benyahia-Krid, F., O. Aissaoui-Zitoun, H. Boughellout, F. Adoui, and A. Harkati. 2016. Chicken pepsin and rennet gels: Internal bonds, rheology and microstructure. *J. Vet. Sci. Technol.* 7:375. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000375>.
- Bijl, E., H. Van Valenberg, T. Huppertz, and A. Van Hooijdonk. 2013. Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives. *J. Dairy Sci.* 96:5455–5464. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6497>.
- Broyard, C., and F. Gaucheron. 2015. Modifications of structures and functions of caseins: A scientific and technological challenge. *Dairy Sci. Technol.* 95:831–862. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y>.
- Choi, J., D. Horne, and J. Lucey. 2007. Effect of insoluble calcium concentration on rennet coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.* 90:2612–2623. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-814>.
- Cooke, D. R., and P. L. McSweeney. 2017. From micelle to melt: The influence of calcium on physico-chemical properties of cheese. Pages 20–44 in *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*. 1st ed. P. Papademas and T. Bintsis, ed. John Wiley & Sons.
- Corredig, M., and E. Salvatore. 2016. Enzymatic coagulation of milk. Pages 287–307 in *Advanced Dairy Chemistry*. P. L. H. McSweeney and P. F. Fox, ed. Springer.
- Dalgleish, D. G. 2014. The basis of structure in dairy-based foods: Casein micelles and their properties. Pages 83–105 in *Food Structures, Digestion and Health*. 1st ed. M. Boland, M. Golding, and H. Singh, ed. Elsevier.
- Fagan, C. C., D. J. O'Callaghan, M. J. Mateo, and P. Dejmeck. 2017. The syneresis of rennet-coagulated curd. Pages 145–177 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 4th ed. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee, ed. Elsevier.
- Fertsch, B., M. Müller, and J. Hinrichs. 2003. Firmness of pressure-induced casein and whey protein gels modulated by holding time and rate of pressure release. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4:143–150. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00008-0).
- Fox, P. F., and T. P. Guinee. 2013. Cheese science and technology. Pages 357–389 in *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*, 1st ed. Y. W. Park and G. F. W. Haenlein, ed. Wiley Blackwell.
- Fox, P. F., T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. McSweeney. 2017. Chemistry of milk constituents. Pages 71–104 in *Fundamentals of Cheese Science*. P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. H. McSweeney, ed. Springer.
- Gaucheron, F. 2011. Milk salts: Distribution and analysis. Pages 908–916 in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. P. McSweeney, J. Fuquay, and P. Fox, ed. Elsevier.
- Geng, X. L., F. W. van den Berg, A. N. Bager, and R. Ipsen. 2011. Dynamic visualization and microstructure of syneresis of cheese curd during mechanical treatment. *Int. Dairy J.* 21:711–717. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.013>.
- Giroux, H. J., C. Bouchard, and M. Britten. 2014. Combined effect of renneting pH, cooking temperature, and dry salting on the contraction kinetics of rennet-induced milk gels. *Int. Dairy J.* 35:70–74. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.016>.
- Gonçalves, M. C., and H. R. Cardarelli. 2019. Composition, microstructure and chemical interactions during the production stages of Mozzarella cheese. *Int. Dairy J.* 88:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.005>.
- Horne, D. 2016. Casein: Micellar structure (Dual-binding model). Pages 1–8 in *Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- Horne, D. S. 2020. Casein micelle structure and stability. Pages 213–250 in *Milk Proteins*. 3rd ed. M. Boland and H. Singh, ed. Elsevier.
- Huppertz, T. 2013. Chemistry of the caseins. Pages 135–160 in *Advanced Dairy Chemistry*. P. L. H. McSweeney and P. F. Fox, ed. Springer.
- Janhøj, T., and K. Qvist. 2010. The formation of cheese curd. Pages 130–165 in *Technology of Cheesemaking*. 2nd ed. B. A. Law and A. Y. Tamime, ed. Wiley-Blackwell.
- Keim, S. 2005. Hydrostatic, Thermal, Acid and Rennet Induced Casein and Whey Protein Gels: Stabilizing Bonds and Textural Properties. Shaker.
- Keim, S., and J. Hinrichs. 2004. Influence of stabilizing bonds on the texture properties of high-pressure-induced whey protein gels. *Int. Dairy J.* 14:355–363. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.010>.
- Keim, S., U. Kulozik, and J. Hinrichs. 2006. Texture and stabilizing bonds in pressure-induced, heat-induced and rennet-induced milk protein gels. *Milchwissenschaft* 61:363–366.
- Kern, C., J. Weiss, and J. Hinrichs. 2018. Additive layer manufacturing of semi-hard model cheese: Effect of calcium levels on thermorheological properties and shear behavior. *J. Food Eng.* 235:89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.029>.
- Kim, S. Y., S. Lim, and S. Gunasekaran. 2011. Protein interactions in reduced-fat and full-fat Cheddar cheeses during melting. *Lebensm. Wiss. Technol.* 44:582–587. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.07.011>.

- Koutina, G., J. C. Knudsen, U. Andersen, and L. H. Skibsted. 2015. Influence of colloidal calcium phosphate level on the microstructure and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *Lebensm. Wiss. Technol.* 63:654–659. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.035>.
- Lamichhane, P., A. L. Kelly, and J. J. Sheehan. 2018. Symposium review: Structure-function relationships in cheese. *J. Dairy Sci.* 101:2692–2709. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13386>.
- Lefebvre-Cases, E., E. Gastaldi, V. Vidal, S. Marchessau, A. Lagaude, J.-L. Cuq, and B. T. De La Fuente. 1998. Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *J. Dairy Sci.* 81:932–938. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75653-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75653-X).
- Lin, L., M. Wong, H. Deeth, and H. Oh. 2018. Calcium-induced skim milk gels using different calcium salts. *Food Chem.* 245:97–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.081>.
- Lucey, J. A. 2014. Milk protein gels. Pages 493–523 in *Milk Proteins: From Expression to Food*. A. Thompson, M. Boland, and H. Singh, ed. Elsevier.
- McMahon, D. J., and B. S. Oommen. 2013. Casein micelle structure, functions, and interactions. Pages 185–209 in *Advanced Dairy Chemistry*. P. L. H. McSweeney and P. F. Fox, ed. Springer.
- Mehta, B. M. 2018. Microstructure of cheese products. Pages 145–179 in *Microstructure of Dairy Products*, 1st ed. M. El-Bakry, A. Sanchez, and B. M. Mehta. John Wiley & Sons.
- Messens, W., J. Van Camp, and A. Huyghebaert. 1997. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 8:107–112. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01015-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01015-7).
- Ono, W., D. Oka, A. Hamakawa, T. Noguchi, and K. Takano. 2017. Effects of κ -casein dissociation from casein micelles on cheese curd formation. *Food Sci. Technol. Res.* 23:743–748. <https://doi.org/10.3136/fstr.23.743>.
- Panteli, M., E. Zoidou, and G. Moatsou. 2015. Comparative study of the paracasein fraction of two ewe's milk cheese varieties. *J. Dairy Res.* 82:491–498. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000254>.
- Permyakov, E., and R. H. Kretsinger. 2011. Stoichiometry, kinetics, and thermodynamics of calcium binding. Pages 71–82 in *Calcium Binding Proteins*. E. A. Permyakov and R. H. Kretsinger. John Wiley & Sons.
- Sinaga, H., N. Bansal, and B. Bhandari. 2017. Effects of milk pH alteration on casein micelle size and gelation properties of milk. *Int. J. Food Prop.* 20:179–197. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1152480>.
- Van Camp, J., W. Messens, J. Clément, and A. Huyghebaert. 1997. Influence of pH and sodium chloride on the high pressure-induced gel formation of a whey protein concentrate. *Food Chem.* 60:417–424. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00362-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00362-7).
- van Vliet, T., C. M. Lakemond, and R. W. Visschers. 2004. Rheology and structure of milk protein gels. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9:298–304. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.002>.
- Walstra, P., J. T. Wouters, and T. J. Geurts. 2005. Cheese manufacture. Pages 583–639 in *Dairy Science and Technology*. P. Walstra, J. T. M. Wouters, T. J. Geurts, ed. CRC Press.
- Zamora, A., A. Trujillo, E. Armaforte, D. Waldron, and A. Kelly. 2012. Effect of fat content and homogenization under conventional or ultra-high-pressure conditions on interactions between proteins in rennet curds. *J. Dairy Sci.* 95:4796–4803. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5351>.

ORCID

- G. I. Olivas  <https://orcid.org/0000-0001-8242-8614>
 N. Gutiérrez-Méndez  <https://orcid.org/0000-0002-0791-3211>
 D. R. Sepulveda  <https://orcid.org/0000-0002-0400-8873>

4. CONCLUSIONES GENERALES

Las micelas de caseína poseen una naturaleza compleja, su diseño estructural le confiere la capacidad de permanecer suspendida en la leche, sin embargo, al ser desestabilizadas por agentes coagulantes sus nuevas propiedades modifican su forma de coexistir en el medio. Su hidrofobicidad interna queda expuesta presentando una tendencia a formar agregados que con el tiempo constituyen una red particulada. Aunque la consolidación de los geles de leche se lleva a cabo de forma natural y se manifiesta con el desplazamiento del suero, la variación en los factores temperatura y acidez tiene un papel determinante en la configuración estructural de los geles que se refleja en un incremento en el desuerado. Durante el desarrollo de este proyecto doctoral se estudió este fenómeno midiendo el cambio en la densidad de la cuajada a través del tiempo. Se encontró que a pesar de la variación en los factores de proceso no existió diferencia en los valores de densidad de la cuajada, sin embargo, en la estimación de la densidad de la fase proteica del gel se presenta un cambio significativo, donde, contrario a lo esperado, el efecto de la acidez redujo el cambio en la estructuración de la red proteica otorgando este cambio a la presencia tanto de enlaces electrostáticos mediados por calcio como de enlaces hidrofóbicos dependientes de la temperatura. Debido a estos descubrimientos, se utilizó una metodología basada en la solubilización selectiva de proteínas mediante el uso de diferentes soluciones buffer, con la intención de caracterizar los enlaces químicos presentes en la cuajada de leche durante el periodo de maduración. Como resultado de esta determinación, se obtuvo que la conformación de la red constituida por partículas de paracaseína está gobernada por diferentes tipos de enlaces químicos destacando las interacciones electrostáticas, los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas, los puentes disulfuro y los puentes de calcio. A través del tiempo de evaluación, el cambio en temperatura y acidez provocó que estos enlaces interactuaran entre ellos, ya que las cadenas de aminoácidos que conforman las proteínas tienen diferentes sitios activos con la capacidad de formar diferentes tipos de enlaces. Observando que las condiciones de proceso promueven que el orden jerárquico en las energías de formación de los enlaces sea claramente diferenciable, permitiendo la formación de cuajadas con diferente estructura interna.

5. RECOMENDACIONES

Se sugiere la aplicación de los métodos utilizados en esta tesis, para continuar con la línea de investigación y dilucidar el tipo de interacciones intra e intermoleculares que se originan en etapas posteriores a la formación de la cuajada, como la cocción y maduración. Sería interesante incluir variables de respuesta adicionales como pueden ser la caracterización fisicoquímica de las nuevas etapas a estudiar, perfil de textura, comportamiento reológico, etc.

6. REFERENCIAS

- Bansal, N., P. F. Fox, and P. L. McSweeney. 2007. Aggregation of rennet-altered casein micelles at low temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3120-3126. <https://doi.org/10.1021/jf0631427>.
- Bijl, E., H. Van Valenberg, T. Huppertz, and A. Van Hooijdonk. 2013. Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives. *J. Dairy Sci.* 96: 5455-5464. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6497>.
- Bouchoux, A., J. Ventureira, G. Gésan-Guiziou, F. Garnier-Lambrouin, P. Qu, C. Pasquier, S. Pézenec, R. Schweins, and B. Cabane. 2015. Structural heterogeneity of milk casein micelles: a SANS contrast variation study. *Soft Matter.* 11: 389-399. <https://doi.org/10.1039/c4sm01705f>.
- Broyard, C. and F. Gaucheron. 2015. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Sci. Technol.* 95: 831-862. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y>.
- Carlson, G. Hill, and N. Olson. 1986. The coagulation of milk with immobilized enzymes: a critical review. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 642-650. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90059-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90059-1).
- Caron, A., D. St-Gelais, and Y. Pouliot. 1997. Coagulation of milk enriched with ultrafiltered or diafiltered microfiltered milk retentate powders. *Int. Dairy J.* 7: 445-451.
- Cheema, M., M. Mohan, S. Campagna, J. Jurat-Fuentes, and F. M. Harte. 2015. The association of low-molecular-weight hydrophobic compounds with native casein micelles in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 98: 5155-5163. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9461>.
- Choi, J., D. Horne, and J. Lucey. 2007. Effect of insoluble calcium concentration on rennet coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.* 90: 2612-2623. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-814>.
- Choi, J., D. Horne, and J. Lucey. 2015. Effect of insoluble calcium concentration on endogenous syneresis rate in rennet-coagulated bovine milk. *J. Dairy Sci.* 98: 5955-5966. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9527>.
- Considine, T., J. Flanagan, S. M. Loveday, and A. Ellis. 2020. Interaction between milk proteins and micronutrients. 537-571. *Milk proteins*. Elsevier.
- Crabbe, M. 2004. Rennets: general and molecular aspects. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology.* 1: 19-45.
- Dalgleish, D. G. 2011. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter.* 7: 2265-2272. <https://doi.org/10.1039/c0sm00806k>.
- Dalgleish, D. G. 2014. The Basis of Structure in Dairy-Based Foods: Casein Micelles and their Properties. 83-105. *Food Structures, Digestion and Health*. Elsevier.
- Dalgleish, D. G. and M. Corredig. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes

- during processing. *Annual review of food science and technology*. 3: 449-467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>.
- Dang, B. P., A. F. Wolfschoon Pombo, and U. Kulozik. 2019. Physicochemical changes during the creaming reaction in acid curd fresh cheese: Water mobility and forced syneresis. *Int. J. Dairy Technol.* 72: 295-302. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12585>.
- de Castro Leite, B. R., A. A. L. Tribst, M. M. de Oliveira, and M. Cristianini. 2014. Characterization of rennet-induced gels using calf rennet processed by high pressure homogenization: Effects on proteolysis, whey separation, rheological properties and microstructure. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 26: 517-524. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.05.007>.
- De Kruif, C. 1993. The turbidity of renneted skim milk. *Journal of colloid and interface science*. 156: 38-42. <https://doi.org/10.1006/jcis.1993.1077>.
- De Kruif, C. 2014. The structure of casein micelles: a review of small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*. 47: 1479-1489. <https://doi.org/10.1107/S1600576714014563>.
- De Kruif, C. G., T. Huppertz, V. S. Urban, and A. V. Petukhov. 2012. Casein micelles and their internal structure. *Adv. Colloid Interface Sci.* 171: 36-52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>.
- Dejmek, P. and P. Walstra. 2004. The syneresis of rennet-coagulated curd. 71-103. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd Ed. Elsevier.
- El-Bakry, M. and J. Sheehan. 2014. Analysing cheese microstructure: a review of recent developments. *J. Food Eng.* 125: 84-96. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.030>.
- Everard, C., D. O'Callaghan, M. Mateo, M. Castillo, F. Payne, and C. O'Donnell. 2009. The use of colour parameters derived from an online fibre-optic sensor to monitor curd syneresis during cheese making. *J. Food Eng.* 94: 1-6.
- Fagan, C. C., D. J. O'Callaghan, M. J. Mateo, and P. Dejmek. 2017. The Syneresis of Rennet-Coagulated Curd. 145-177. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 4th Ed. Elsevier.
- Ferreira, T. G. 2011. Optimization of Coagulation and Syneresis Processes in Cheesemaking Using a Light Backscatter Sensor Technology.
- Fox, P. and A. Brodkorb. 2008. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. *Int. Dairy J.* 18: 677-684.
- Fox, P. F. and T. P. Guinee. 2013. *Cheese Science and Technology*. 357-389. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. 1st. P. a. Haenlein. John Wiley & Sons.
- Fox, P. F., T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. McSweeney. 2017a. Chemistry of Milk Constituents. 71-104. *Fundamentals of Cheese Science*. Springer.
- Fox, P. F., T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. McSweeney. 2017b. Enzymatic coagulation of milk. 185-229. *Fundamentals of cheese science*. Springer.
- Franzoi, M., G. Niero, M. Penasa, M. Cassandro, and M. De Marchi. 2018. Development and validation of a new method for the quantification of soluble and micellar calcium, magnesium, and potassium in milk. *J. Dairy Sci.* 101: 1883-1888.

<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13419>.

- Furlanetti, A. M. and L. F. Prata. 2003. Free and total GMP (glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation. *Food Science and Technology (Campinas)*. 23: 121-125.
- Gaucheron, F. 2010. Analysing and improving the mineral content of milk. 207-228. *Improving the Safety and Quality of Milk*. Elsevier.
- Gebhardt, R. 2014. Effect of filtration forces on the structure of casein micelles. *Journal of Applied Crystallography*. 47: 29-34. <https://doi.org/10.1107/S1600576713029841>.
- Ghosh, D., D. K. Chattoraj, and P. Chattopadhyay. 2013. Studies on changes in microstructure and proteolysis in cow and soy milk curd during fermentation using lactic cultures for improving protein bioavailability. *Journal of food science and technology*. 50: 979-985. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0421-1>.
- Giroux, H. J., C. Bouchard, and M. Britten. 2014. Combined effect of renneting pH, cooking temperature, and dry salting on the contraction kinetics of rennet-induced milk gels. *Int. Dairy J.* 35: 70-74. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.016>.
- Goulding, D. A., P. F. Fox, and J. A. O'Mahony. 2020. Milk proteins: An overview. 21-98. *Milk proteins*. Elsevier.
- Guacheron, F. 2011. Milk salts. Distribution and Analysis. 908-916. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd Ed.
- Havea, P., A. J. Carr, and L. K. Creamer. 2004. The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels. *J. Dairy Res.* 71: 330-339. <https://doi.org/10.1017/S002202990400024X>.
- Hazlett, R., C. Schmidmeier, and J. A. O'Mahony. 2018. Milk Proteins. Pages 138-147 in *Encyclopedia of Food Chemistry*. Vol. Volume 1.
- Hickey, C., M. Auty, M. Wilkinson, and J. Sheehan. 2015. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 41: 135-148. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.10.006>.
- Holt, C. 1992. Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in protein chemistry*. 43: 63-151.
- Holt, C. 2016. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. *Int. Dairy J.* 60: 2-13.
- Horne. 2006. Casein micelle structure: models and muddles. *Curr. Opin. Colloid In.* 11: 148-153.
- Horne. 2014. Casein Micelle Structure and Stability. 169-200. *Milk Proteins From Expression to Food*. second edition. M. B. Harjinder Singh, and Abby Thompson.
- Horne and Banks. 2004. Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. 1: 47-70.
- Horne, D. 2016. Casein: Micellar Structure (Dual-Binding Model). 1-8. *Reference Module in Food Science*.
- Horne, D. S. 1998. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy

- products. *Int. Dairy J.* 8: 171-177. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00040-5).
- Horne, D. S. 2020. Casein micelle structure and stability. 213-250. *Milk Proteins*. Elsevier.
- Horne, D. S. and J. A. Lucey. 2017. Rennet-induced coagulation of milk. 115-143. *Cheese* (Fourth Edition). Elsevier.
- Huppertz, T. 2013. Chemistry of the caseins. 135-160. *Advanced Dairy Chemistry*. Springer.
- Huppertz, T., I. Gazi, H. Luyten, H. Nieuwenhuijse, A. Alting, and E. Schokker. 2017. Hydration of casein micelles and caseinates: Implications for casein micelle structure. *Int. Dairy J.* 74: 1-11.
- Ingham, B., G. Erlangga, A. Smialowska, N. Kirby, C. Wang, L. Matia-Merino, R. Haverkamp, and A. Carr. 2015. Solving the mystery of the internal structure of casein micelles. *Soft Matter*. 11: 2723-2725. <https://doi.org/10.1039/C5SM00153F>
- Isis, R. T. R., T. P. Italo, T. G. M., S. Pierre, and F. d. C. Antonio. 2018. Physicochemical Characteristics of Raw Milk. 29-43. *Raw Milk Balance Between Hazards and Benefits*. N. L. Augusto and Antonio, F. d. C.
- Janhøj, T. and K. Qvist. 2010. The formation of cheese curd. 130-165. *Technology of Cheesemaking*. Wiley-Blackwell, Ames, IA.
- Jensen, H. B., K. S. Pedersen, L. B. Johansen, N. A. Poulsen, M. Bakman, D. E. Chatterton, and L. B. Larsen. 2015. Genetic variation and posttranslational modification of bovine κ -casein: Effects on caseino-macropeptide release during renneting. *J. Dairy Sci.* 98: 747-758. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8678>.
- Kalab, M. 1993. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. *Food structure*. 12: 11.
- Kannan, A., N. Hettiarachchy, and M. Marshall. 2012. Food Proteins–Peptides: Chemistry and Structure. *Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization*. 1.
- Keim, S. 2005. Hydrostatisch, thermisch, säure-und labinduzierte Casein-und Molkenprotein-Gele: stabilisierende Bindungen und Textureigenschaften. *Shaker*.
- Kethireddipalli, P. and A. R. Hill. 2015. Rennet coagulation and cheesemaking properties of thermally processed milk: Overview and recent developments. *J. Agric. Food Chem.* 63: 9389-9403. <https://doi.org/10.1021/jf504167v>.
- Kim, S. B., I. S. Seo, M. A. Khan, K. S. Ki, M. S. Nam, and H. S. Kim. 2007. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *Int. Dairy J.* 17: 625-631.
- Kumar, A., S. Grover, J. Sharma, and V. Batish. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 243-258. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.483459>.
- Lamichhane, P., A. Kelly, and J. Sheehan. 2017. Invited review: Structure-function relationships in cheese. *J. Dairy Sci.*
- Lamichhane, P., A. L. Kelly, and J. J. Sheehan. 2018. Symposium review: Structure-function relationships in cheese. *J. Dairy Sci.* 101: 2692-2709. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13386>.

- Law, B. A. and A. Y. Tamime. 2011. Technology of cheesemaking. 18. John Wiley & Sons.
- Lewis, M. J., L. M. Chove, A. S. Grandison, and A. Issa-Zacharia. 2014. Detection of proteolysis in high temperatures treated milk by Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *African Journal of Food Science*. 8: 80-86.
- Lin, L., M. Wong, H. Deeth, and H. Oh. 2018. Calcium-induced skim milk gels using different calcium salts. *Food Chem*. 245: 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.081>
- Liu, X., H. Zhang, F. Wang, J. Luo, H. Guo, and F. Ren. 2014. Rheological and structural properties of differently acidified and renneted milk gels. *J. Dairy Sci*. 97: 3292-3299. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7568>.
- Lu, Y. and D. McMahon. 2015. Effects of sodium chloride salting and substitution with potassium chloride on whey expulsion of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci*. 98: 78-88.
- Lucey, J. A. 2014. Milk Protein Gels. 493-523. *Milk Proteins From Expression to Food*. M. B. Harjinder Singh, and Abby Thompson.
- Lucey, J. A. 2020. Milk protein gels. 599-632. *Milk proteins*. Elsevier.
- McClements, D. J., E. A. Decker, Y. Park, and J. Weiss. 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*. 49: 577-606. <https://doi.org/10.1080/10408390902841529>.
- McMahon, D. J., R. Brown, G. Richardson, and C. Ernstrom. 1984. Effects of Calcium, Phosphate, and Bulk Culture Media on Milk Coagulation Properties1. *J. Dairy Sci*. 67: 930-938.
- McMahon, D. J. and B. Oommen. 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. *J. Dairy Sci*. 91: 1709-1721.
- McMahon, D. J. and B. S. Oommen. 2013. Casein micelle structure, functions, and interactions. 185-209. *Advanced Dairy Chemistry*. Springer.
- Merel-Rausch, E. 2007. Hydrostatic high pressure treatment of casein to generate defined particle and gel structures.
- Metwalli, E., J.-F. Moulin, R. Gebhardt, R. Cubitt, A. Tolkach, U. Kulozik, and P. Müller-Buschbaum. 2008. Hydration behavior of casein micelles in thin film geometry: a GISANS study. *Langmuir*. 25: 4124-4131. <https://doi.org/10.1021/la802602g>.
- Moroi, Y. 1992. Micelle Formation. 41-96. *Micelles: theoretical and applied aspects*. Springer Science & Business Media.
- Munialo, C. D., S. R. Euston, and H. H. J. de Jongh. 2018. Protein Gels. 501-521. *Proteins in Food Processing*. 2nd Ed. Woodhead Publishing.
- Nájera, A., M. De Renobales, and L. Barron. 2003. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chem*. 80: 345-352.
- O'Mahony, J. A. and P. F. Fox. 2014. Milk: An Overview. 19-73. *Milk Proteins From Expression to Food*. Second Edition. M. B. Harjinder Singh, and Abby Thompson.
- O'Callaghan, D. 2011. Gel Firmness and Its Measurement. 585-590. *Encyclopedia of Dairy Science*. 2nd.

- O'mahony, J. and P. Fox. 2013. Milk proteins: Introduction and historical aspects. 43-85. *Advanced dairy chemistry*. Springer.
- Ong, L., R. R. Dagastine, S. E. Kentish, and S. L. Gras. 2011. Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. *LWT Food Sci. Technol.* 44: 1291-1302.
- Ong, L., R. R. Dagastine, S. E. Kentish, and S. L. Gras. 2012. The effect of pH at renneting on the microstructure, composition and texture of Cheddar cheese. *Food research international*. 48: 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.020>.
- Otte, J., M. Zakora, and K. Qvist. 2000. Involvement of Disulfide Bonds in Bovine β -Lactoglobulin B Gels Set Thermally at Various pH. *J. Food Sci.* 65: 384-389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16012.x>.
- Piazza, R. 2004. Protein interactions and association: an open challenge for colloid science. *Curr. Opin. Colloid In.* 8: 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.01.008>.
- Rovira, S., M. López, E. Ferrandini, and J. Laencina. 2011. Hot topic: microstructure quantification by scanning electron microscopy and image analysis of goat cheese curd. *J. Dairy Sci.* 94: 1091-1097. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3996>.
- Schmidt, D. and P. Fox. 1982. *Developments in Dairy Chemistry-1 Proteins*. Applied Science Publication. 63-110.
- Shukla, A., T. Narayanan, and D. Zanchi. 2009. Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter*. 5: 2884-2888.
- Silva, N. N., M. Piot, A. F. de Carvalho, F. Violleau, A.-L. Fameau, and F. Gaucheron. 2013. pH-induced demineralization of casein micelles modifies their physico-chemical and foaming properties. *Food Hydrocolloid*. 32: 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.004>.
- Slattery, C. W. and R. Evard. 1973. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*. 317: 529-538.
- Smith, J. R., A. J. Carr, M. Golding, and D. Reid. 2017. Mozzarella Cheese—A Review of the Structural Development During Processing. *Food Biophysics*. 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9511-6>.
- Uniacke-Lowe, T. 2011. *Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems*.
- Van Vilet, T., S. Roefs, P. Zoon, and P. Walstra. 1989. Rheological properties of casein gels. *J. Dairy Res.* 56: 529-534. <https://doi.org/10.1017/S0022029900029022>.
- Van Vliet, T., C. M. Lakemond, and R. W. Visschers. 2004. Rheology and structure of milk protein gels. *Curr. Opin. Colloid In.* 9: 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.002>.
- Vasbinder, A. J. and C. G. De Kruif. 2003. Casein–whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *Int. Dairy J.* 13: 669-677. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00120-1).
- Vert, M., Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, and F. Schué. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*. 84: 377-410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>.

- Walstra, P. 1990. On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73: 1965-1979.
- Walstra, P. 2003. Bonds and interaction forces. 46-58. *Physical chemistry of foods*. Marcel Dekker, New-York, USA. Marcel Dekker, Inc.
- Wolfschoon-Pombo, A. F. and D. J. Andlinger. 2013. Micellar calcium in acid curd cheese with different pH values, fat and protein levels. *Int. Dairy J.* 32: 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.011>.
- Xu, Y., D. Liu, H. Yang, J. Zhang, X. Liu, J. M. Regenstein, Y. Hemar, and P. Zhou. 2016. Effect of calcium sequestration by ion-exchange treatment on the dissociation of casein micelles in model milk protein concentrates. *Food Hydrocolloid.* 60: 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.026>.
- Zamora, A., A. Trujillo, E. Armaforte, D. Waldron, and A. Kelly. 2012. Effect of fat content and homogenization under conventional or ultra-high-pressure conditions on interactions between proteins in rennet curds. *J. Dairy Sci.* 95: 4796-4803. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5351>.
- Zhao, Z. and M. Corredig. 2020. Effects of pH-modification on the rennet coagulation of concentrated casein micelles suspensions. *Food Chem.* 316: 126199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126199>
- Zobrist, M., T. Huppertz, T. Uniacke, P. Fox, and A. Kelly. 2005. High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. *Int. Dairy J.* 15: 655-662. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.025>.