

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**“ANÁLISIS COMPARATIVO DEL MÉTODO FORMOL
DE WALKER Y EL MÉTODO DE BIURET, EN LA
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE
CASEÍNA EN LA LECHE FRESCA”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

Presentado por:

Bach. Fredy Rober PARIONA ESCALANTE

**AYACUCHO – PERÚ
2014**

DEDICATORIA

A mi madre Yolanda Escalante Contreras, quien a pesar de las dificultades me brindó su apoyo en todo momento y por haberme enseñado el verdadero valor del trabajo, razón de mi fuerza para seguir siempre adelante.

AGRADECIMIENTOS

- *A mi alma mater Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a los docentes de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia y de manera muy especial a los docentes de mi Escuela de Formación Profesional de Ingeniería Agroindustrial por su empeño y esfuerzo con el que me brindaron sus conocimientos durante mi formación profesional.*
- *Al Ing. Agustín Julián PORTUGUEZ MAURTUA, por ser un buen guía académico y también como persona y haberme brindado su asesoramiento en la ejecución del presente trabajo.*
- *Al Ing. Saúl Ricardo CHUQUI DIESTRA, por su apoyo incondicional y haberme guiado en la parte experimental del presente trabajo.*
- *A mi familia, amigos y a todos quienes contribuyeron de una u otra forma en mi formación profesional.*
- *A mi abuelito Basilio Escalante Hinostroza, que en paz descansa y desde el cielo ilumina mi camino.*

A todos muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
I.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1. Antecedentes	5
1.2. Leche	6
1.3. Composición de la leche	8
1.3.1. Proteínas	11
1.3.2. Características de la caseína	12
1.3.3. Grasa láctea	15
1.3.4. Minerales	17
1.4.Variación de la proteína láctea	18
1.4.1. Variación de la proteína láctea por efectos no nutricionales	19
1.4.2. Variación de la proteína láctea por efectos nutricionales	19
1.4.3. Aptitud de la leche para la fabricación de quesos	20
1.5.Coagulación de la leche	21
1.6.Factores que afectan a la coagulación de la leche	23
1.6.1. Temperatura	23
1.6.2. Acidez y pH	23
1.6.3. Contenido de iones de calcio	25
1.6.4. Concentraciones de iones de sodio	25
1.7.Generalidades de fabricación del queso	25
1.7.1. Rendimiento de los quesos	28
1.8.Métodos de determinación de caseína en la leche fresca	29
1.8.1. Titulación con formol	29
1.8.2. Espectrofotometría	31
1.8.2.1.Dedución de la ley de Lambert – Beer	31

II. MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1.Muestra	35
2.2.Materiales, equipos y reactivos	36
2.2.1. Materiales, equipos e instrumentos	36
2.2.2. Reactivos	37
2.3.Métodos de análisis	37
2.3.1. Prueba del alcohol	37
2.3.2. Medición de la densidad	37
2.3.3. Medición del pH	37
2.3.4. Medición de la acidez	38
2.3.5. Determinación de sólidos totales	38
2.3.6. Determinación de grasa	38
2.3.7. Cuantificación de proteínas, método de Biuret	38
2.3.8. Determinación de caseína (Titulación con formol de Walker)	38
2.4.Metodología experimental	38
2.4.1. Tipo y diseño de investigación	38
2.4.2. Diseño estadístico	41
2.4.3. Unidad de análisis	41
2.4.4. Población de estudio	41
2.4.5. Tamaño de muestra	41
2.4.6. Selección de muestra	41
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1.Prueba de alcohol	42
3.2.Análisis de densidad	43
3.3.Determinación del pH	44
3.4.Prueba de acidez y determinación del número de Walker	44
3.5.Sólidos totales	46
3.6.Porcentaje de grasa	47
3.7.Determinación de la curva estándar	48
3.8.Determinación de la longitud de onda óptima	49
3.9.Lectura espectrofotométrica	51
3.10. Análisis estadístico de la determinación de caseína por el método de Biuret y el método de Walker.	52

CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	64
ANEXO 1: PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS	65
ANEXO 2: MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CASEÍNA	69
ANEXO 3: FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	72
ANEXO 4: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Composición proteica de la leche	7
Tabla 2: Componentes de la leche	9
Tabla 3: Resultados de la prueba de alcohol a las muestras de leche fresca	42
Tabla 4: Resultados de lectura de la densidad en las muestras de leche fresca	43
Tabla 5: Resultados de lectura del pH en las muestras de leche fresca	44
Tabla 6: Volumen de hidróxido de sodio gastado y determinación del número de Walker	45
Tabla 7: Porcentaje de sólidos totales de la muestra de leche fresca	46
Tabla 8: Porcentajes de grasa de leche fresca determinados	47
Tabla 9: Acondicionamiento de la caseína pura y determinación de su absorbancia y concentración	48
Tabla 10: Lectura de la absorbancia de la caseína a diferentes longitudes de onda	50
Tabla 11: Lectura de absorbancias de muestras de leche fresca y determinación del % de caseína.	51
Tabla 12: Análisis de varianza (ANVA) para las concentraciones en estudio en la determinación de caseína por el método Biuret	53
Tabla 13: Prueba de comparación de medias de DUNCAN para las diferentes concentraciones evaluadas en la determinación de caseína por el método de Biuret.	53
Tabla 14: Media e intervalos de confianza de los valores de caseína a las diferentes concentraciones de muestra	54
Tabla 15: Análisis de varianza (ANVA) para la determinación de caseína por los métodos BIURET Y WALKER	55
Tabla 16: Prueba de Duncan para los métodos de Biuret y Walker en la determinación de caseína.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Reacción de Biuret.	33
Figura 2: Diagrama de flujo de bloques de elaboración de queso fresco	39
Figura 3: Esquema de análisis de las muestras	40
Figura 4: Curva estándar de caseína	49
Figura 5: Determinación de longitud de onda óptimo	50

RESUMEN

La calidad de la leche tiene gran importancia en la industria quesera ya que pequeñas diferencias en el rendimiento reflejan grandes pérdidas para las plantas procesadoras de queso. El contenido de caseína de la leche, junto con el de la grasa son determinantes en la producción de queso, debido a que la suma de las mismas ejercen una gran influencia en el rendimiento quesero.

Para la evaluación de las características fisicoquímicas de la leche fresca recolectada, las cuales provenían de la “Industria Agropecuaria COLARG S.R.L.” se le realizaron los siguientes análisis: prueba de alcohol, resultando negativo; densidad determinándose el valor de 1,03021 g/ml; pH=6,7; acidez, determinándose el valor entre 0,17 – 0,211 %; sólidos totales, determinándose un valor de 12,28%; porcentaje de grasa, determinándose un valor de 3,48%; caseína por el método de Biuret y Walker, determinándose un valor de 3,559% y 3,2627% respectivamente, siendo el más sensible el método de Biuret en comparación con el método de Formol de Walker.

INTRODUCCIÓN

La leche se define desde el punto de vista utilitario, como el logro de una materia prima con la máxima calidad de composición de acuerdo a las exigencias industriales del producto final a elaborar y la misma cantidad de elementos ajenos al proceso fisiológico de síntesis y eyección que puedan ser alcanzados en la explotación del ganado vacuno, sin comprometer la salud del consumidor y en equilibrio con las posibilidades de producir e industrializar a costos competitivos (Comerón, 2001).

El potencial de la leche para la fabricación de quesos está determinado principalmente por el contenido de proteínas coagulables y materia grasa (Cunningham, 2000).

Las caseínas de la leche son las que en su totalidad contribuyen al rendimiento de queso, sin embargo es de resaltar que la industria quesera nacional se basa en el porcentaje de sólidos totales y de grasa para evaluar la calidad de la leche utilizada para la fabricación de queso, sin tomar en cuenta el contenido proteico.

El método para determinar el contenido de proteínas, es el método de Biuret, que es más sensible que el Kjeldahl y menos costoso y práctico; por lo tanto sería recomendable buscar un método alternativo como por ejemplo el Formol de Walker y que fuera más rápido y tan exacto como el método de Biuret, para poder realizar los análisis en el campo y tener resultados rápidos y confiables.

La competitividad de la industria quesera reside en optimizar los rendimientos en quesería; de ahí que conocer el contenido de proteínas en la leche cruda, ya que es una forma de evaluar la calidad de la misma en lo que compete al rendimiento quesero y un primer paso para trabajar en función de producción de leche de alto rendimiento para esa actividad, pudiéndose maximizar su porcentaje en la leche por vía alimentación.

Al tomar en cuenta el contenido en proteínas de la leche, los productores podrían obtener un mejor pago por su producto a pie de corral al ser destinado al sector industrial al que mejor se ajuste de acuerdo al producto final que se elabore, a su vez que una leche con mayor concentración en proteína resultaría más beneficioso para el consumidor.

Así que tomando en consideración la situación descrita, se propone en este estudio, evaluar la leche en cuanto a su contenido proteico, con énfasis en la caseína.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar un análisis comparativo del método formol de Walker y el método de Biuret en la determinación de la concentración de caseína en la leche fresca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar el análisis fisicoquímico de la leche fresca.
- ✓ Determinar la concentración de caseína en la leche por el método de Biuret.
- ✓ Determinar la concentración de caseína en la leche por el método formol de Walker.
- ✓ Analizar estadísticamente los resultados obtenidos por el método de Biuret y el formol de Walker, en la determinación de la concentración de caseína en la leche fresca.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ANTECEDENTES

Aleandri (1989), señala la relación que puede existir entre el contenido de grasa, la firmeza de la cuajada y el rendimiento esperado. Encontrándose que la fuerza de la cuajada se ve incrementada solo con un bajo nivel de grasa, trayendo como consecuencia un incremento en el rendimiento esperado, para que a niveles altos de grasa en la leche se obtiene una disminución en la estimación del rendimiento quesero y a niveles intermedios de grasa en la leche se obtiene un altísimo rendimiento quesero.

Banks (1990), estudió la influencia de los principales constituyentes de la leche sobre el rendimiento y la calidad del queso. Encontrándose que son la grasa y el contenido de caseína en la leche utilizada para la elaboración del queso los que determinan el rendimiento y la calidad del mismo.

Toro (1994), estudió el contenido de la proteína en la leche y en el queso duro artesanal “Llanero” y su relación con el rendimiento obteniendo que el factor que influye en el rendimiento quesero es la grasa, demostrando una mayor influencia con respecto a los demás componentes de la leche.

Tornadijo (1998), estudió la calidad química de la leche destinada a la fabricación de queso, obteniendo que el efecto de la presencia de sustancias inhibidoras, la aptitud de la leche para ser coagulada y la influencia de la composición química de la leche son los que determinan el rendimiento quesero.

1.2. LECHE

La “leche de vaca” se ha definido como la secreción, excluyendo el calostro, que se obtiene mediante los métodos de ordeña normales de las glándulas mamarias de vacas saludables y normalmente alimentadas, en la etapa de lactancia. Se considera que la leche tiene 3 componentes principales: agua, grasa y sólidos no grasos. La materia orgánica de la porción no grasa consiste, en su mayoría, en caseína y proteínas del suero, junto con lactosa y los ácidos láctico y cítrico.

La leche contiene principalmente dos tipos de proteínas, micelares (75 a 85%) que son caseínas asociadas con el calcio, el fosfato y el citrato, que tiene una estructura aleatoria abierta y precipitan a un pH de 4,6; y proteínas del suero (de 15 a 22%) que difieren en sus propiedades moleculares, físicas y funcionales, pero tiene una estructura globular y son solubles a un pH de 4,6.

La composición porcentual de la fracción de caseína es de 39 a 46% de α_{s1} -caseína; 8 a 11% de α_{s2} -caseína; 25 a 35% de β -caseína; 8 a 15% de κ -caseína y 3 a 7% de γ -caseína. La composición porcentual de la fracción de proteínas de suero es de 7 a 12% de β -lactoglobulina; 2 a 5% de α -lactoglobulina; 0,7 a 1,3% de albúmina sérica y 1,9 a 3,3% de inmunoglobulinas (Brunner, 1981).

La leche es una disolución acuosa de proteínas, lactosa, minerales y ciertas vitaminas, que lleva emulsionados glóbulos grasos y coloidalmente dispersas micelas de caseína, formadas por proteína, fosfato, citrato y calcio.

Tabla 1: Composición proteica de la leche

Componente	% de la proteína total	g/L
Caseínas (totales)	<u>80</u>	<u>27</u>
α_s -Caseína	40	14
β -Caseína	24	8
κ -Caseína	12	4
γ -Caseína	4	1
Proteínas del suero (totales)	<u>20</u>	<u>7</u>
Lacto albúmina	12	4,2
Lacto globulina	5	1,8
Inmunoglobulinas	2	0,7
Otras (totales)	1	0,3

Fuente: Coultate, 1998

La caseína ácida se obtiene ajustando el pH de la leche descremada a 4,6 con ácido mineral o mediante una fermentación láctica. El cuajo que se precipita se separa, se lava y se seca, y tiene un bajo contenido de calcio y fosfatos, ya que estos quedan en solución.

La caseína de cuajo se obtiene como un coágulo mediante la acción específica de la quimosina, una enzima proteolítica del cuajo. Retiene el complejo de calcio y fosfato y se hace soluble al secuestrar el calcio por adición de fosfato de sodio.

Los caseinatos se fabrican solubilizando la caseína con álcalis o agentes secuestrantes y secando el producto resultante. Los caseinatos de sodio forman una solución traslúcida de alta viscosidad con propiedades enlazantes para el agua, mientras que los caseinatos de calcio forman soluciones opacas de baja viscosidad (Kirk et al, 1989).

La caseína se compone por lo menos de 4 diferentes fracciones identificadas como alfa, beta, gamma y kappa y es una de las pocas proteínas que contiene azufre y fósforo. La caseína en su forma natural en la leche ayuda a promover la estabilidad del sistema de leche coloidal en la forma de caseinato de calcio y quizá fosfocaseinato de calcio.

Cuando se utilizan ácidos, la precipitación se produce a un pH de 4,5 a 4,7 y esto se conoce como el punto isoelectrico de la caseína (Desrosier, 1983).

1.3. COMPOSICIÓN DE LA LECHE

En cuanto a la composición de la leche, esta varía considerablemente con la raza de la vaca, el estado de lactancia, alimento, época del año y muchos otros factores. Aun así, algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables y pueden ser utilizados para indicar si ha ocurrido alguna adulteración en la composición de la leche.

Aunque la leche parece una sustancia única, en realidad está compuesta por más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en solución, suspensión o emulsión en agua; por ejemplo la caseína proteína principal de la leche, se encuentra dispersa en un gran número de partículas llamadas micelas, tan pequeñas que no sedimentan

permaneciendo en suspensión, esta dispersión en la leche se llama suspensión coloidal; mientras que la grasa y las vitaminas liposolubles de la leche se encuentran en forma de emulsión, esto es, una suspensión de pequeños glóbulos líquidos que no se mezclan con el agua de la leche.

Por otra parte la lactosa (azúcar de la leche) y algunas proteínas (proteínas séricas), sales minerales y otras sustancias son solubles; esto significa que se encuentran totalmente disueltas en el agua de la leche (Wattiaux, 2003).

La gran variedad de componentes de la leche se clasifican corrientemente en la tabla 2.

Tabla 2: Componentes de la leche

Componentes	%
Sólidos totales	12,60 – 12,70
Grasa	3,58 – 3,61
Acidez	17,00 – 21,10
Proteínas	2,80 – 3,90
Caseína	2,37 – 2,41
Cenizas	0,70 – 0,74

Fuente: Clavijo, 1997.

Entre los componentes mayoritarios de la leche de vaca, las proteínas son las que poseen más importancia desde el punto de vista de la nutrición humana. El 5% del nitrógeno total de la leche está representado por sustancias nitrogenadas no proteicas y el 95% restante por proteínas el cual corresponde aproximadamente a un 78,5% de caseína, un 2,2% de albúmina, un 3,3% de globulinas y un 4% de proteasa-peptona. Ellas contienen todos los aminoácidos comunes y en particular los que son esenciales

para el hombre y especialmente para los niños (Poter, 1981; Alais 1991; Hart y Fisher, 1991).

Los principales constituyentes que influyen sobre el rendimiento y la calidad del queso son las grasas y el contenido de caseína en la leche utilizada para la elaboración del mismo. Esta conclusión se debe al estudio del rendimiento quesero realizada durante varias estaciones que reflejan la variación de los componentes lácteos. Para algunas regiones el contenido de grasa en la leche puede ser considerada como el factor que más influye en el rendimiento quesero, ya que el contenido de caseína en la leche es comparativamente constante en relación a la variación del contenido de grasa ya que se le atribuye a la grasa el 60% del contenido de grasa+caseína (Banks, 1990).

El contenido proteico de la leche está siendo cada día más tomado en cuenta al momento de obtener un mejor precio a la hora de venderla. En estados unidos por ejemplo, las plantas de quesos pagan un incentivo por la proteína cuando se encuentra en una cantidad superior al 3,2% siendo su precio mayor al que está estipulado para el diferencial por grasa (Johannsen, 1990). Esto es debido a que las proteínas son las responsables del rendimiento de la leche usada para producir quesos, es decir, de la proporción de materia coagulada en relación al total del líquido procesado (Canut, 1988).

No en todos los países ocurre lo mismo, ya que en algunos hay productores que envían a la industria leche con un contenido más alto de proteínas y sólidos no grasos, sin obtener un precio superior por su producto, a pesar de que la proteína adicional dé como resultado rendimientos más altos de la leche, no solo en la elaboración de quesos, sino también en la fabricación de leche en polvo y yogurt.

Venezuela es un país donde no se ha establecido el diferencial de precios basado en este componente lácteo (Bath et al, 1986; Johannsen, 1990).

1.3.1. Proteínas

Las sustancias nitrogenadas forman la parte más completa de la leche y se encuentra en una medida de 0,5 por 100 de nitrógeno, distribuido en diferentes fracciones de importancia variada, desde el punto de vista de la tecnología láctea y de la nutrición. Las proteínas lácteas representan una de las mayores contribuciones a la nutrición humana (Primo, 1973).

Estas sustancias se caracterizan por tener un elevado peso molecular comprendido en 15 000 y 200 000 Dalton, y por un conjunto de propiedades que se derivan de esta característica y de la estructura peptídica (Walastra y Jennes, 1987)

Las moléculas de proteínas son bastante grandes y están en las soluciones en forma coloidal. En muchas ocasiones la precipitación es reversible, lo que significa que se puede disolver proteínas ya precipitadas, tal como sucede cuando se emplean ácidos para precipitar la caseína, mientras que en otros casos es irreversible y ello ocurre cuando la proteína se desdobla (Guzmán, 1990).

La afinidad de las proteínas por el agua, depende mucho de las condiciones físico-químicas. Sus soluciones no poseen estabilidad de las soluciones de sustancias de moléculas pequeñas, como la lactosa. El pH tiene una gran influencia en el punto isoeléctrico, la carga neta es nula y cesa la repulsión de las moléculas, con tendencias a agregarse o flocular (Alais, 1991).

Según Walastra y Jennes (1987); la proteína de la leche está compuesta principalmente por tres componentes:

- La caseína, es un complejo de proteínas fosforadas y constituye la parte nitrogenada más característica de la leche; no existe ninguna sustancia parecida, ni en la sangre ni en los tejidos. La caseína precipita solo cuando se acidifica la leche hasta 4,6 ó cuando se encuentra bajo la acción de una enzima específica. Por ello se le ha llamado proteína insoluble de la leche.
- Las proteínas del lacto-suero o proteínas solubles, son una mezcla de holoproteínas (solo contienen aminoácidos) y de glicoproteínas (que contienen glúcidos) las más abundantes son α -globulinas y β -lactoalbúmina. Se insolubilizan por el calor antes de los 100°C. Una parte de estas proteínas no se sintetizan en la glándula mamaria; normalmente se encuentra en muy pequeñas cantidades en la leche de vaca.
- Las proteasas-peptonas, son sustancias con un peso molecular intermedio entre el de las proteínas y el de los péptidos. En la leche abundan poco.

1.3.2. Características de la caseína

De todos los componentes proteicos de la leche son probablemente las caseínas las que más se estudian, debido al papel determinante que tiene en el estado y estabilidad del sistema del que forma parte. Solamente se encuentra en la leche y es la de mayor porcentaje de 2,6 a 3% (Guzmán, 1990) pero (Cerbulis, 1973), señala que la cantidad promedio de caseína en la leche es de $2,89 \pm 0,51\%$, con una variación desde 1,53% hasta 4,15%.

Es una proteína de alto peso molecular, compuesta de 19 aminoácidos, diferenciándose de las restantes proteínas por poseer un alto contenido de ácido fosfórico (Alais, 1991).

La caseína es una sustancia heterogénea que consta de tres fracciones: α , β y κ que difieren en su contenido de fósforo y en su comportamiento frente al cuajo, las dos primeras fracciones coagulan por la acción del cuajo, la tercera no. La caseína de la leche de vaca está compuesta aproximadamente en un 33,7% de caseína α , un 58,9% de β y un 7,4% de κ . La riqueza de estas tres fracciones varía con la raza, la alimentación, el periodo de lactancia, etc. (Dilanjan, 1984).

La leche empleada para la elaboración de queso, debe contener al menos un 90% de caseína α y β , pues cuanto más alta sea su riqueza en estos dos tipos de caseína más queso se obtendrá a partir de igual cantidad de leche (Dilanjan, 1984; Guzmán, 1990).

La determinación del rendimiento de los productos lácteos es muy importante para la industria, especialmente las de los quesos y el yogurt. Las determinaciones de la composición de la leche, principalmente el contenido de caseína, son necesarias para el cálculo del rendimiento en la producción de quesos (Szijarto et al, 1973; Barbano y Sherbon, 1984).

Con la realización de estudios genéticos profundos se ha podido determinar que los fenotipos presentes en cada una de las fracciones que conforman a la caseína representan un papel muy importante en el rendimiento quesero, en el trabajo realizado por Marziali (1986), se determina que las leches que contengan una mayor proporción de β -caseína A'1 A1, κ -caseína BB y β -lactoglobulina BB son las más deseables para producir quesos con un máximo rendimiento ya que con la utilización de estas leches se observa una recuperación más eficiente en el queso de sus principales componentes como la grasa y la caseína, encontrándose un mínimo de sólidos totales, grasa y proteínas perdidas en el suero.

Una de las propiedades de la alfa, beta y kappa es la de poderse asociar y formar polímeros (asociación de moléculas diferentes). En presencia de calcio iónico, estos complejos se reúnen para formar agregados heterogéneos y que suelen llamarse micelas (Alais, 1991).

Las micelas se encuentran bajo la forma de partículas esféricas cuya dimensión no es uniforme. En la leche de vaca, el mayor número de partículas tiene un diámetro comprendido entre 50 y 100 micrones. Algunos autores han señalado que existe una proporción constante entre los componentes de las micelas, para otros, la parte soluble es la más rica en κ -caseína y las pequeñas micelas la contienen en mayor proporción que las grandes. La κ -caseína es tal vez el factor que limita el tamaño de las micelas, si se admite que las más grandes pueden constituirse a partir de las pequeñas, lo posible dado al estado de equilibrio (Alais, 1991).

Lo anteriormente dicho es de considerable atención en lo que respecta al estudio del rendimiento quesero, ya que depende del tamaño de la micela de caseína el tiempo de coagulación (Veysseyre, 1980).

La micela de caseína en promedio contiene α -S1, β y κ -caseína en una relación 3:2:1 respectivamente. De cualquier modo todas las micelas contienen una alta concentración de κ -caseína. La composición típica de la micela es de 93% de proteína; 2,8% de calcio; 2,3% de fósforo orgánico; 0,4% de citrato y bajos niveles de Mg, Na y K. Los grupos PO_3 orgánicos en α -S1, β -caseína en particular, atan los iones de calcio a los niveles de subunidades. El fósforo inorgánico existe esencialmente en forma de complejo con calcio y citrato, una mitad coloidal uniformemente dispersa por toda la fase unicelular donde juega un rol estabilizante de la estructura intermolecular (Brunner, 1977).

Caseínas – α

Dan cuenta del 50-55% del total de las caseínas, constan de un componente mayoritario, caseína α_{s1} y cinco minoritarios α_{s0} , α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} , α_{s5} , de acuerdo con sus propiedades electroforéticas. La caseína α_{s1} tiene un peso molecular de 23600 y consta de 199 restos aminoacídicos. Los grupos fosfato fijan iones calcio y la caseína α_{s1} tiende a precipitar en presencia de este catión divalente. El resto de la cadena polipeptídica es hidrófoba y exhibe una fuerte asociación en la formación de micelas.

Caseínas – β

Representa el 30-35% del total de las caseínas. Está constituida por una sola cadena polipeptídica de 209 restos de aminoácidos, con un peso molecular de 24000. La β caseína se asocia a una velocidad inferior a la que lo hace la caseína α_{s1} y no precipita bajo la acción del calcio tan fácilmente como la α_{s1} .

Caseínas – κ

Supone alrededor de 15% del total de las caseínas y es la única caseína mayoritaria que contiene cisteína, tiene un peso molecular de 19000 y forman, vía enlaces disulfuro, polímeros de peso molecular entre 60000 y 600000 Dalton. La κ -caseína es la menos sensible a la precipitación por calcio y ejerce en la micelas un papel estabilizador de las restantes caseínas frente a la precipitación por el citado ión (Wong, 1995).

1.3.3. Grasa láctea

La materia grasa de la leche se presenta en forma de glóbulos rodeados por una membrana cuyos constituyentes son fosfolípidos y proteínas. El diámetro promedio de estos glóbulos varía entre 2,5 y 5 micrones, pudiendo variar de 0,1 a 22 micrones y el tamaño va a estar sujeto a factores de tipo fisiológico del animal. La leche

contiene un promedio de 3,9% de grasa y está constituida por triacilglicéridos (éster de glicerol y ácidos grasos). En la leche se han identificado más de 150 ácidos grasos, muchos de los cuales son esenciales. La presencia en la leche de ácidos linoleico y linolénico es particularmente interesante puesto que el organismo humano es incapaz de sintetizarlos y por lo tanto son constituyentes irremplazables de la dieta (Alais, 1991).

La materia grasa de la leche cuando se calienta está fundida totalmente y fría se encuentra en gran proporción en estado sólido, bajo la forma de una emulsión bastante fina. La solidificación ocurre entre los 18 y 23°C disolviéndose en el suero lácteo, constituyendo glóbulos de 2 a 5 micras en su mayoría. Los glóbulos de grasa están recubiertos por una membrana lipoprotéica bastante compleja, formada por triglicéridos que tienen un punto de fusión elevado y fosfolípidos, de manera especial lecitina. Esta fina capa protectora está recubierta por una más delgada, constituida por plasma de leche de manera especial (Guzmán, 1990).

La grasa de la leche tiene una marcada influencia en el aroma del queso, también en el rendimiento, mejora su consistencia. (Guzmán, 1990). Otro aspecto que es importante resaltar, es que la grasa de la leche, durante la maduración de los quesos, les da características muy particulares.

Según Aleandri (1989), en su intento por desarrollar una ecuación para predecir el rendimiento quesero, estudia la relación que puede existir entre el contenido de grasa, la firmeza de la cuajada y el rendimiento esperado, encontrando que la fuerza de la cuajada se ve incrementado solo con un bajo nivel de grasa, trayendo esto como consecuencia un incremento en el rendimiento esperado, para que a niveles altos de grasa en la leche se obtienen una disminución en la estimación del rendimiento

quesero y a niveles intermedios de grasa en la leche se obtiene un altísimo rendimiento quesero.

1.3.4. Minerales

Los minerales representan una pequeña fracción de los sólidos de la leche en relación con el contenido de proteína y grasa. Su concentración varía de 3 a 10 g por litro aproximadamente. Están formados principalmente por ácidos fosfóricos y cítricos, por el calcio y el magnesio. Esta fracción tiene gran importancia nutricional y tecnológica, en particular por los aportes de calcio y fósforo.

Una parte de los minerales de la leche se encuentran asociados a otros componentes. En una leche sin alteraciones el 65% de calcio, el 60% de magnesio y el 50% del fósforo se encuentran asociados a las caseínas (en forma coloidal). El sodio, el potasio y el cloruro están totalmente en solución. La leche contiene además oligoelementos (zinc, silicio, aluminio, hierro, etc.) cuyas variaciones están asociadas a cambios de alimentación y a aportes externos (contaminación atmosférica, por el material de ordeño).

Todas las micelas contienen calcio y fósforo, pero las proporciones de estos dos componentes varían con el diámetro micelar, la forma de asociarse del fosfato a la caseína no se ha determinado con certeza; puede tratarse de una inclusión mecánica, de una combinación de naturaleza física (tensiones superficiales) o de una unión química (Alais, 1991).

El fosfocaseinato sedimentado sobre las paredes de la ultracentrífuga se presenta bajo la forma de un gel traslúcido y el lactosuero es claro. Sin embargo, el aspecto blanco opaco de la leche se debe a la suspensión del fosfocaseinato y resulta de la reflexión total de la luz sobre la partícula (Alais, 1991).

Tal como existe en la leche, el complejo fosfocaseinato de calcio, forma un gel bajo la acción del cuajo que ocupa todo el volumen inicial. Este gel es bastante estable; se retrae lentamente (sinéresis) a pH 6,7 y a la temperatura ordinaria. La formación del gel característico depende de la presencia de la caseína κ , del calcio iónico y del fosfato de calcio coloidal. La sensibilidad del paracaseinato de los iones de calcio depende de la cantidad de fosfato presente.

El fosfato de calcio coloidal sensibiliza la paracaseína a los iones de calcio. El tiempo de coagulación disminuye a medida que el contenido en fosfato cálcico coloidal aumenta. Al mismo tiempo, puede constatarse un incremento de la firmeza del gel (Veysseyre, 1980).

Las variaciones de la concentración originaria de fosfato cálcico coloidal de una leche a otra puede explicar las diferencias de tensión, observadas a veces por las industrias queseras, en los geles obtenidos en el curso de un mismo proceso de fabricación.

El calcio en la leche tiene especial influencia sobre el tiempo de coagulación, ya que éste se encuentra por debajo de los niveles normales, el tiempo de coagulación aumenta significativamente, obteniéndose un gel débil y de muy poca calidad.

1.4. VARIACIÓN DE LA PROTEÍNA LÁCTEA

La concentración de proteína en la leche es de gran importancia en la industria láctea, ésta tiene importantes efectos en la calidad de la coagulación para la fabricación de queso y yogurt, siendo mejor con una mayor concentración de caseína, además está su efecto en rendimiento de la leche en queso, obteniéndose más queso por litro de

leche a medida que aumenta la concentración de proteína (Tornadijo et al., 1998). A continuación se detallan los factores que afectan el nivel de proteína en la leche.

1.4.1. Variación de la proteína láctea por efectos no nutricionales

Los factores que más influyen en la concentración de proteína en la leche son la genética y la alimentación siendo el más importante el primero de ellos, existiendo además otras fuentes de variación como son la edad, sanidad de la ubre, etapa de lactación (Madonald et al, 1999; Velásquez, 2000).

Madonald et al, (1999) señala que no solo existe una gran variación entre razas, sino que además varía bastante entre individuos dentro de una misma raza, también afirma que la raza Jersey produce la leche de mejor calidad, en tanto que la alta producción de la raza Holstein sería la causante de la peor calidad.

En este sentido Goddad y Wiggans (1996), señalan que la raza Holstein es la dominante a nivel mundial esto principalmente por su alta productividad, sin embargo la raza Jersey se está convirtiendo en una alternativa importante por sus altos contenidos de sólidos en la leche y su pequeño tamaño.

Otra fuente de variación de la proteína de la leche (y en general en los sólidos totales) es la etapa de la lactancia en que se encuentra la vaca. Su concentración declina gradualmente las primeras 12 semanas de lactación, posterior a ello vuelve a aumentar hasta llegar aproximadamente a los niveles con que se inició la lactancia (Phillips, 2001).

1.4.2. Variación de la proteína láctea por efectos nutricionales

Los efectos de la alimentación sobre la concentración de proteína son menores que los observados en la concentración de grasa, pero está claramente establecido que

existe una directa relación con el consumo de energía. Esta puede ser aumentada (la energía de la dieta) incrementando el consumo de concentrado o bien, mejorando la calidad del forraje (Phillips, 2001). El mismo autor señala que en términos generales un aumento de 10 MJ en el consumo de energía metabolizable (2,4 MCal aproximadamente), tiene una respuesta de 0,6 g/kg más de proteína en la leche, sin embargo, la respuesta es curvilínea, por lo tanto en altos niveles energéticos la respuesta es menor.

Por otro lado Depeters y Cant (1992), en resumen sobre el tema señalan que un resumen de 13 estudios encontró una correlación positiva entre consumo de energía y concentración proteica de la leche, incrementándose el nivel de proteína 0,015 unidades porcentuales por cada megacaloría incrementada en la energía neta. Tanto Phillips (2001), como Depeters y Cant (1992), coinciden que éste aumento en la concentración proteica va acompañado de un aumento en la producción de leche.

1.4.3. Aptitud de la leche para la fabricación de quesos

La calidad de la leche juega un papel muy importante en la producción del queso, por lo que debe ser seleccionada teniendo como base, lo siguiente (Revilla, 1985):

- a) La naturaleza físico-química de la leche debe ser normal, especialmente a lo que se refiere a su equilibrio de las sales minerales, en partículas de calcio, que es parte importante de la constitución micelar.
- b) El contenido de proteína coagulable debe ser alto. Se sabe que una leche proveniente de una vaca con mastitis, es pobre en caseína y en lactosa y con un pH bajo. Al principio de la lactación, las leches contienen poca caseína, por eso se usan las leches que se obtienen de 10 a 11 días después del parto.

- c) El contenido de microorganismos en la leche cruda debe ser bajo para evitar problemas de contaminación y favorecer el crecimiento de la flora láctica.
- d) Las leches que se utilizan para elaborar quesos deben cuajar rápidamente con la quimosina. Sin embargo, el tiempo de coagulación depende de otros factores, de la acidez (a menor pH mayor actividad de la enzima y por consiguiente, la gelatinización es más rápida), la composición de la leche, la alimentación del ganado, la raza, la época del año en que se produce la leche.
- e) La leche cruda no debe contener sustancias inhibidoras para los cultivos lácticos (antibióticos, detergentes, desinfectantes u otros), o sea que deben tener una buena predisposición para fermentar.

La disposición que tenga la leche para coagular por el cuajo es un factor importante en la fabricación de quesos. Más si la leche procede de diferentes fincas o haciendas, se pide apreciar las diferencias en tiempo de coagulación de las leches. Otro factor importante que influye en la coagulación es la acidez que actúa favorablemente activando la eficiencia del cuajo. Una elevada acidez y bajo pH, facilita al cuajo una gelificación más rápida de la caseína y la cuajada será más consistente aunque quede menos mineralizada (Dilanjan, 1984).

Una inefectiva acción del cuajo produce una cuajada blanda y hay un mal desarrollo de la microflora, la que incide más adelante en la calidad del queso (Guzmán, 1990).

1.5. COAGULACIÓN DE LA LECHE

Es la operación de separar la caseína y los elementos que van a formar el queso, en forma de cuajada (Garassini, 1964).

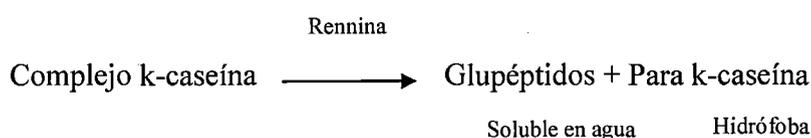
La coagulación se produce debido a que la caseína, en presencia de cuajo, modifica su estado físico-químico y precipita en forma de paracaseinato de calcio insoluble.

Este compuesto, conjuntamente con la grasa y una parte del suero, constituye la llamada cuajada. La acción coagulante del cuajo es debido a la presencia de una enzima, que se encuentra en el estómago de muchos mamíferos (cuajar). Esta enzima se hace activa en presencia de sales solubles de calcio. Esto implica porque con leches calentadas a altas temperaturas o hervidas se obtienen cuajadas muy débiles, pues el calor insolubiliza las sales de calcio y las precipita (Garassini, 1964).

El proceso de coagulación se divide en dos fases:

Primera fase:

Interviene la enzima renina que cataliza la siguiente reacción



La cadena de aminoácidos de la molécula k-caseína, es hidrolizada por la renina del cuajo descomponiendo los complejos k-caseína en:

- Cadena de aminoácidos insolubles, que forman la paracaseína que forma el coágulo.
- Cadena de aminoácidos con carbohidratos que hacen solubles esta fracción, por lo que se va con el suero.

Segunda fase:

La paracaseína formada precipita en presencia de iones de calcio formando agregados moleculares cada vez mayores que crecen incluyendo a los glóbulos de grasa. La adición de cloruro de calcio a la leche aumenta la presencia de iones de calcio lo que beneficia al proceso de coagulación.

Existe una tercera fase, donde la enzima activa del cuajo sigue actuando durante la formación del queso, descomponiendo proteínas de forma no específica, durante la

maduración del queso, contribuyendo a la proteólisis y esta de no ser muy activa es beneficiosa ya que contribuye a la maduración y formación de aromas, pero si es muy fuerte puede originar un sabor amargo a los quesos (Madrid, 1999).

1.6. FACTORES QUE AFECTAN A LA COAGULACIÓN DE LA LECHE

1.6.1. Temperatura

La temperatura óptima de actividad del cuajo es de 40 a 41 °C (Santos, 1998).

En la práctica se suele trabajar a unos 30 – 32 °C, haciendo necesario aumentar la dosis del cuajo, lo que tiene ciertas ventajas como señala (Madrid, 1999):

- Una dosis más alta de cuajo hace que el coágulo sea más duro.
- Se estimula el desarrollo bacteriano.
- Se favorece la maduración.

Hacia los 40 – 42 °C, la actividad relativa del cuajo es máxima, bajando considerablemente por debajo de 28 °C o por encima de los 50°C (Madrid, 1999).

La temperatura de coagulación de la leche debe ser menor a la óptima del cuajo, esta oscila entre 27 – 35°C y que a temperaturas más altas las bacterias lácticas no se desarrollan (Santos, 1998).

1.6.2. Acidez y pH

Es importante aclarar que no es mismo acidez que pH, aunque existe una relación constante entre ellos. La acidez de la leche tiene más influencia en el aspecto físico-químico de la coagulación que el enzimático. Por lo general si la coagulación de la leche se verifica a un pH cercano a la neutralidad, la micela forma una red tridimensional más fuerte porque está desmineralizada, aunque tarda más tiempo en hacerlo. La cuajada que se obtiene es más flexible, elástica, compacta, impermeable,

contráctil y contiene poca agua. Debido a su carácter compacto tolera la acción de fuerzas mecánicas que facilitan la contracción del coágulo y la salida del suero; sin esta acción, el gel no desuera por su impermeabilidad. Su firmeza ayuda que sea resistente a la deformación (Santos, 1998).

La leche recién ordeñada, higiénica proveniente de vacas sanas, sanitariamente hablando, tiene un pH en el orden de 6,4 a 7,2; las proteínas aportan en 1,5 a 2,0 del pH, los gases 0,4 a 0,8; el ácido fosfórico monosustituido y algunas sales el 4,0 a 4,4. La acidez de la leche activa la quimosina del cuajo, a mayor acidez más rápido es la coagulación y más consistente sale la cuajada, lo que trae como consecuencia mayor rendimiento quesero (Guzmán, 1990).

Con respecto al pH, la leche presenta una reacción débilmente ácida con valores que comprenden entre 6,6 y 6,8; como consecuencia de la caseína y de los iones fosfóricos y cítricos principalmente. El pH no es un valor constante, puede variar en el curso del ciclo de la lactación y bajo la influencia de la alimentación (Alais, 1991). Durante la elaboración de quesos, el pH ejerce un particular efecto sobre el proceso de coagulación, inactivando el cuajo en medio alcalino. Cuando el pH es inferior a 7,0 se observa una aceleración de la gelificación por dos razones: en primer lugar nos acercamos al pH óptimo de actuación de la enzima que es de 5,5 y por otra parte se reducen las cargas eléctricas de las micelas de caseína con lo que disminuye su estabilidad (Veisseyre, 1980).

Una disminución del pH supone un aumento en la actividad del cuajo, por ello es importante la adición de fermentos lácticos que producen ácido láctico, bajando el pH del medio para que así actúe mejor el cuajo (Madrid, 1999).

1.6.3. Contenido de iones de calcio

Adicionando cloruro cálcico a la leche aumenta la concentración de iones de calcio, facilitando la actuación del cuajo.

El calcio tiene un papel muy importante en la formación de la red tridimensional (favorece el endurecimiento de la cuajada), mejora el proceso de desuerado y facilita la retención de grasa (Madrid, 1999).

1.6.4. Concentraciones de iones de sodio

Al igual que el calcio, los iones de sodio también afectan la actividad del cuajo, pero en una proporción 10 veces menor (Madrid, 1999).

1.7. GENERALIDADES DE FABRICACIÓN DEL QUESO

Se debe procurar utilizar leche de composición constante para que la coagulación sea similar día tras día (Madrid, 1999).

En condiciones normales, los síntomas de coagulación se observan a partir de los 5 minutos seguidos a la acción del cuajo. El tiempo total de coagulación, para elaborar quesos semi-duros, fluctúa entre 25 y 40 minutos, mientras que en quesos blandos entre 1 y 2 horas. La coagulación rápida tiende a volver la cuajada dura y demora más la concentración y si es lenta, la cuajada es más blanda. La coagulación ha finalizado y la cuajada esta lista para cortarla cuando se extrae un pedazo de la tina y al cortarse con un cuchillo su aspecto interior es brillante y deja salir suero de su interior (Guzmán, 1990).

El queso es definido como el producto obtenido coagulado por medio del cuajo, ácido láctico o fermentos adecuados, la leche higienizada procedente de animales

sanos, ya sea entera o parcialmente descremada sometida o no a proceso de maduración o fermentación.

Se define al queso como producto fresco o madurado, sólido o semi-sólido obtenido:

- a) Coagulando leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema de suero, suero o mantequilla o una combinación cualquiera de estas materias primas por la acción del cuajo u otros coagulantes aprobados y escurriendo parcialmente el suero que se produce como consecuencia de tal coagulación.
- b) Mediante técnicas de elaboración que comprenden la coagulación de la leche y/o de las materias obtenidas de la leche y que dan un producto final que posee las mismas características esenciales físicas, químicas y organolépticas.

La leche para fabricación de quesos en general debe ser de óptima calidad higiénica para que se pueda obtener una buena cuajada libre de contaminación que pueda producir deterioro rápidamente representando pérdidas de materia prima.

El queso puede hacerse con leche de cualquier mamífero, pero la más utilizada es la leche de vaca.

La leche contiene grasa, proteínas, lactosa, minerales y agua. Cuando se le añade ácido o alguna enzima específica o ambos, tiene lugar la coagulación de la caseína, que arrastra la mayoría de la grasa, parte de la lactosa y agua (Poter, 1981).

El quesero en el pasado dependía del uso de fermentos lácticos, iniciadores o “estárter” en la leche, los cuales llegaban por vía contaminación espontánea, luego se empleó el suero ácido o suero fermentado y por último se comenzaron a aislar bacterias para la preparación de cultivos puros para las leches fermentadas y para los quesos.

Los iniciadores son un compendio de cepas selectas y especies de bacterias ácido lácticas que son más frecuentemente usadas como mezclas para producir la acidez óptima y el desarrollo del sabor y aroma requerido durante la fabricación (Gordon y Shapton, 1977). Así mismo destacan, que la importancia de los iniciadores radica en que ellos puedan enfatizar el sabor y el aroma de los productos lácteos, de la misma forma señalan que de ellos depende en buena parte el éxito o fracaso de los productos lácteos fermentados.

Entre las actividades más importantes de los fermentos lácticos tenemos:

- Glicólisis, transformación de la lactosa en ácido láctico.
- Proteólisis, degradación de las cadenas proteicas en sustancias más sencillas como peptonas, péptidos, aminoácidos, etc.
- Lipólisis, hidrólisis de los ácidos grasos, transformándolos en cetoácidos, cetonas, ésteres, etc.
- Formación de sustancias aromáticas y de CO₂ (Madrid, 1999).

Es muy conocido el papel desempeñado por las bacterias ácido lácticas en la fermentación de la lactosa de la leche durante la elaboración del queso, dando origen a ácido láctico, principalmente, el cual ayuda en la formación del coágulo por el cuajo, favorece la concentración de la cuajada y por ende la expulsión del suero y esto permite que el queso adquiriera la textura típica. También al lograr un bajo pH (5,0 – 5,2) se puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas y de los contaminantes deteriorativos ácido sensibles, también la inhibición y/o destrucción lograda con la formación de antibióticos naturales o bactericidas.

El cuajo es una sustancia (enzima) que se emplea para coagular la leche. Puede ser de origen animal o vegetal. El cuajo animal se obtiene del cuarto estómago (abomaso) de los mamíferos a la edad lactante. Una vez agregado el cuajo se agita la

leche (3 a 5 minutos) y luego se deja en reposo hasta que ocurra la coagulación completa de la leche, lo cual se determina, generalmente de manera visual y manual. Una vez logrado el proceso de coagulación, se procede al corte de la cuajada, esto consiste en una fragmentación, generalmente con una lira de acero inoxidable la cual pasa por el recipiente que tiene la cuajada en forma vertical y horizontal varias veces. Luego de cortada la cuajada se procede al desuerado, paso importante para regular el contenido de humedad de la cuajada y del queso. La extracción del suero varía de un queso a otro, pero en el proceso artesanal siempre se hace con la mano. Es importante retener la mayor cantidad posible de partículas de cuajada para evitar pérdidas.

El salado puede ser realizado en alguna fase de la fabricación y es aplicado a todas las variedades de queso. La concentración media de sal en el queso es el orden del 1 al 2% y algunos quesos pueden alcanzar el 3%. La sal afecta la sinéresis, el crecimiento bacteriano, la actividad enzimática y los cambios físicos de las proteínas y en la textura de los quesos (Madrid, 1999).

1.7.1. Rendimiento de los quesos

El rendimiento quesero es la expresión matemática de la cantidad de queso obtenida a partir de una determinada cantidad de leche y se expresa en kilogramos de queso por 100 kilogramos de leche (Eck, 1990).

El rendimiento quesero depende de múltiples factores (Guzmán, 1990):

- De la composición de la leche
- De la caseína desprendida y que se va en el suero (fluctúa entre 3 y 5%)
- De la grasa que se pierde en el suero que llega muchas veces hasta el 5,5%
- De la cantidad de sal aplicada durante la salazón.

- De la pérdida de humedad.
- De los métodos de maduración.

La determinación del rendimiento de los productos lácteos es muy importante para la industria, especialmente la del queso. Las determinaciones de la composición de la leche, principalmente el contenido de caseína son necesarias para el cálculo del rendimiento en la producción del queso y derivados (Szijarto et al, 1973; Barbano y Sherbon, 1984)

El contenido de caseína en la leche para quesos es una variable esencial para predecir el rendimiento por medio de ecuaciones porque la coagulación de la caseína forma la cuajada del queso y ésta influye directamente en el rendimiento (Kindstedt, 1983).

1.8. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CASEÍNA EN LA LECHE FRESCA

1.8.1. Titulación con formol

Cuando se añade formol a una solución acuosa neutralizada que contiene proteína, el grupo $-NH_2$ reacciona para formar el grupo metilen-amino- $N=CH_2$ con la liberación de un protón tituable. El procedimiento fue descrito por Taylor (1957) (Kirk *et al*, 1989).

Se utiliza para la determinación rápida de proteínas en leche fresca. El método depende del hecho de que, al agregar formaldehído a la leche neutralizada, se produce un ácido libre (que puede titularse con álcali) en proporción a la cantidad de proteínas presentes. El contenido proteico se obtiene a continuación multiplicando el valor obtenido en la titulación por un factor empírico, que depende de la relación entre la caseína y la albúmina y también de la técnica que se emplee en particular. El

método propuesto por Pyne (1932), que evita la interferencia debida al calcio agregando oxalato, da resultados bastante buenos:

A 10 ml de leche se agregan 0,5 ml de indicador de fenolftaleína al 0,5% y 0,4 ml de oxalato de potasio saturado y neutro. Se mezcla la solución y se deja reposar algunos minutos; se neutraliza con hidróxido de sodio 0,1 M hasta el color rosado estándar descrito con anterioridad. Se agregan exactamente 2 ml de formalina y se mezcla. Se deja reposar la solución algunos minutos y se titula la nueva acidez producida con hidróxido de sodio 0,1 M hasta el mismo color rosa (mililitros de titulación a). Después se titula por separado 2 ml de formalina + 10 ml de agua con el álcali 0,1 M (ml de b) como testigo. A continuación se calcula el contenido de proteína de la leche (equivalente a $N \times 6,38$ del método Kjeldahl como $1,7(a-b)$ por ciento.

Cuando se omite el uso de oxalato, la primera titulación de la acidez y en general, es conveniente utilizar un factor de formol más alto, como las proteínas = $1,95(a-b) \%$ (KIRK et al, 1989).

Principio de titulación con formol de Walker:

El formol se une a los grupos amino de los aminoácidos dejando libre los grupos carboxilo, los cuales pueden valorarse volumétricamente.

Procedimiento:

- Neutralizar 10 ml de leche con NaOH.
- Añadir 2-3 ml de formol, previamente neutralizado por el mismo procedimiento.
- Valorar la acidez liberada.

Expresión de los resultados:

- ml de NaOH N/10 gastados en la segunda valoración se multiplican por 2,24 y el resultado se expresa en proteínas. (Si se emplea NaOH N/9 por 2,46).

- El % de caseína se obtiene cuando al ml de NaOH N/10 gastados en la segunda valoración se multiplican por 1,63 (caseína es aproximadamente el 78,5 % de la proteína total).

1.8.2. Espectrofotometría

El espectrofotómetro es un instrumento que permite medir la intensidad de luz transmitida, en el espectro, comprendido entre los 340 y 950 nm de longitud de onda que incluye a la región ultravioleta, pasando por el espectro visible, hasta el infrarrojo. Cada sustancia tiene un espectro de absorción característico cuya lectura nos indicará la absorbancia que tiene; el que nos va permitir conocer la concentración de la solución problema.

La mayor ventaja de este método consiste en que no es necesario el aislamiento del compuesto y que pueden determinar los constituyentes de una mezcla compleja, tal como la sangre, sin que requiera mucho tratamiento previo.

1.8.2.1. Deducción de la ley de Lambert – Beer

El fundamento matemático de la absorción lumínica nos indica que cuando una intensidad de luz I atraviesa un espesor dx de disolución coloreada, de concentración c sufre una absorción dI proporcional al espesor, a la intensidad incidente y a la concentración de la disolución. Dependiendo también de la naturaleza de la sustancia en estudio, lo que se refleja en un parámetro k característicos conocido como coeficiente de absorción o coeficiente de extinción molar.

$$-dx = I \cdot k \cdot c \cdot dx$$

El signo negativo (-) nos indica que se pierde intensidad (Mamani, 1998).

Absorción: “Es la disminución de la intensidad luminosa de una radiación por unidad de espesor del medio atravesado”

No se crea que solo las sustancias coloreadas tienen la propiedad de absorber las radiaciones espectrales, muchísimas sustancias incoloras ostentan dicha característica aún en el espectro luminoso. Es así como la mayor parte de los líquidos por incoloros que sean, detienen (absorben) las radiaciones de corta longitud de onda.

Ley de Beer: “La absorción de la luz, a espesor de capa constante, depende de la concentración de la sustancia absorbente y es proporcional a la intensidad del rayo luminoso” (Oriol y Anguera, 1952).

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis, en la que se usan regiones de espectro ultravioleta y el visible y en algunos casos el infrarrojo, determinándose cualitativa o cuantitativamente, en función de la longitud de onda. Se basa en la ley de Lambert – Beer.

$$A = \alpha \cdot l \cdot c$$

Dónde:

A = Absorbancia

α = Coeficiente de absorción

l = Distancia que la luz atraviesa por el cuerpo

c = Concentración de la sustancia absorbente en el medio.

Para hacer una lectura correcta, la muestra debe estar diluida para que ninguna molécula quede oculta o a sombra de otra. Mínimo 0,01 mol/L (Madrid, 1999).

Las proteínas ocupan un lugar de máxima importancia entre las moléculas constituyentes de los seres vivos (biomoléculas). Prácticamente todos los procesos biológicos dependen de la presencia o la actividad de este tipo de moléculas (Berg et al, 2008).

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta,

cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, para el diagnóstico de enfermedades, así como para muchos otros propósitos. Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en:

- a) La propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV.
- b) Para la formación de derivados químicos.
- c) La capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

La reacción de Biuret es una reacción coloreada (violeta) debida a la formación de un complejo de Cu^{+2} en un medio alcalino en compuestos que poseen más de un enlace peptídico, como las proteínas (Segal, 2005).

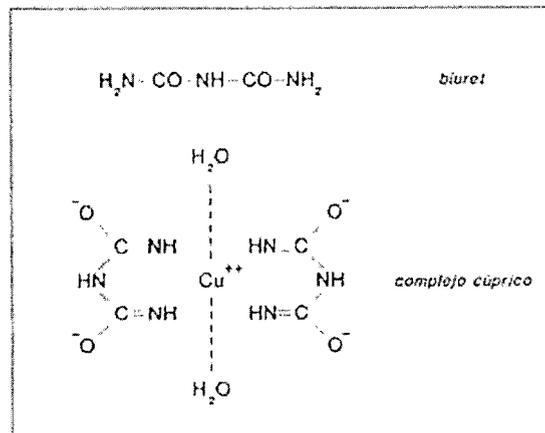


Figura 1: Reacción de Biuret.

La curva patrón es un método de química analítica empleado para medir la concentración de una sustancia en una muestra por comparación con una serie de elementos de concentración conocida. Se basa en la existencia de una relación en principio lineal entre un carácter medible (por ejemplo la absorbancia en los enfoques de espectrofotometría) y la variable a determinar (la concentración). Para

ello, se efectúan diluciones de unas muestras de contenido conocido y se produce su lectura y el consiguiente establecimiento de una función matemática que relacione ambas; después, se lee el mismo carácter en la muestra problema y, mediante la sustitución de la variable independiente de esa función, se obtiene la concentración de esta. Se dice pues que la respuesta de la muestra puede cuantificarse y, empleando la curva patrón, se puede interpolar el dato de la muestra problema hasta encontrar la concentración (Harris, 2003).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTRA

Las muestras de leche cruda, fueron recolectadas directamente de la sala de ordeño de la empresa: Industria agropecuaria “COLARG S.R.L.” que se encuentra ubicada en el Centro Poblado de Llumchicancha del distrito Los Morochucos, Provincia de Cangallo, Región Ayacucho.

La leche cruda se deposita en envases de polietileno previamente esterilizadas con una capacidad de 1 L y se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio de Biotecnología Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia-UNSCH.

La toma de muestra se realizó durante un mes, desde el 01 de setiembre, hasta el 30 de setiembre del 2014 cada tres días, que es una época de secano, hasta completar el total de muestras requeridas siguiendo los lineamientos de la toma de muestra, que consiste en tomar una muestra representativa del lote del cual procede, los utensilios y materiales a utilizar deben estar limpios y secos de manera que no haya posibilidad de contaminación física, química o microbiológica, es importante que se mezcle de forma homogénea.

2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. Materiales, equipos e instrumentos

- Balanza analítica Marca AND HR 200
- Espectrofotómetro Labomed Inc. U.S.A. 2000 RSP 110 – 220 V
- Centrífuga QUIMIS modelo 0222TM296 220 V
- Centrífuga Gerber CIMATEC Nova Safety 220 V
- Estufa Marca HOT AIR OVEN modelo YCO-010.
- Agitador magneto térmico CAT serie 128758
- Lactodensímetro, °Quevenne
- Potenciómetro marca HANNA INSTRUMENTS USA.
- Butirómetro de Gerber
- Termómetro
- Equipo de filtración
- Matraces de 250 ml
- Espátulas
- Vasos de precipitados
- Fiolas de 100 ml, 50 ml, 500 ml, 1000 ml
- Pipetas de 5 ml, 10 ml, 1 ml
- Probeta 250 ml
- Gradilla y tubos de ensayo
- Luna de reloj
- Pinzas
- Placas petri

2.2.2. Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH 0,1N y 6N)
- Formaldehído 38%
- Fenolftaleína 1%
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) QP
- Yoduro de potasio (KI) QP
- Ácido etilendiaminotetraacéticodihidratado ($\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) QP
- Caseína QP
- Ácido sulfúrico QP
- Alcohol amílico

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.3.1. Prueba del alcohol

Para efectuar este análisis, se seguirá el procedimiento descrito en el anexo 1.1 y si existe coagulación, será indicador que la leche es de baja calidad con posible descomposición microbiana.

2.3.2. Medición de la densidad

Para efectuar esta prueba, se seguirá el procedimiento descrito en el anexo 1.2, siendo la densidad promedio de la leche aproximadamente $1,030 \pm 0,02$ g / ml, valores inferiores a este margen, indica adulteración de la leche.

2.3.3. Medición del pH

Para realizar la lectura del pH, se utilizará el instrumento, denominado pH-metro y se seguirán los procedimientos señalados en el anexo 1.3; cuyo valor promedio oscila entre 6,5 y 6,8; valores inferiores a esta indica la descomposición de la leche.

2.3.4. Medición de la acidez

Se realizará como indica el procedimiento en el anexo 1.4

2.3.5. Determinación de sólidos totales

Los sólidos totales de la leche son el residuo obtenido de la desecación de la leche mediante procedimientos normalizados, se realizará según al procedimiento descrito en el anexo 1.5.

2.3.6. Determinación de grasa

Se efectuará en función al procedimiento descrito en el anexo 1.6.

2.3.7. Cuantificación de caseína, método de Biuret

Para la determinación de caseína por el método de Biuret, se realizó con el procedimiento descrito en el anexo 2.1.

2.3.8. Determinación de caseína (Titulación con formol de Walker)

Para la determinación de caseína por el método de formol de Walker, se realizó con el procedimiento descrito en el anexo 2.2.

2.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para poder realizar la investigación, se ha realizado primero la determinación de las variables dependientes y las variables independientes y con ello se ha determinado el indicador.

Variables independientes: Métodos y técnicas de análisis.

Variables dependientes: Contenido caseínico.

Indicador: % de contenido caseínico.

2.4.1. Tipo y diseño de investigación

Se realizará un método específico, de tipo experimental de nivel II. La toma de muestra se realizará en la siguiente etapa del diagrama de flujo de bloques siguiente:

DIAGRAMA DE FLUJO DE BLOQUES, DE LA ELABORACIÓN DEL

QUESO FRESCO

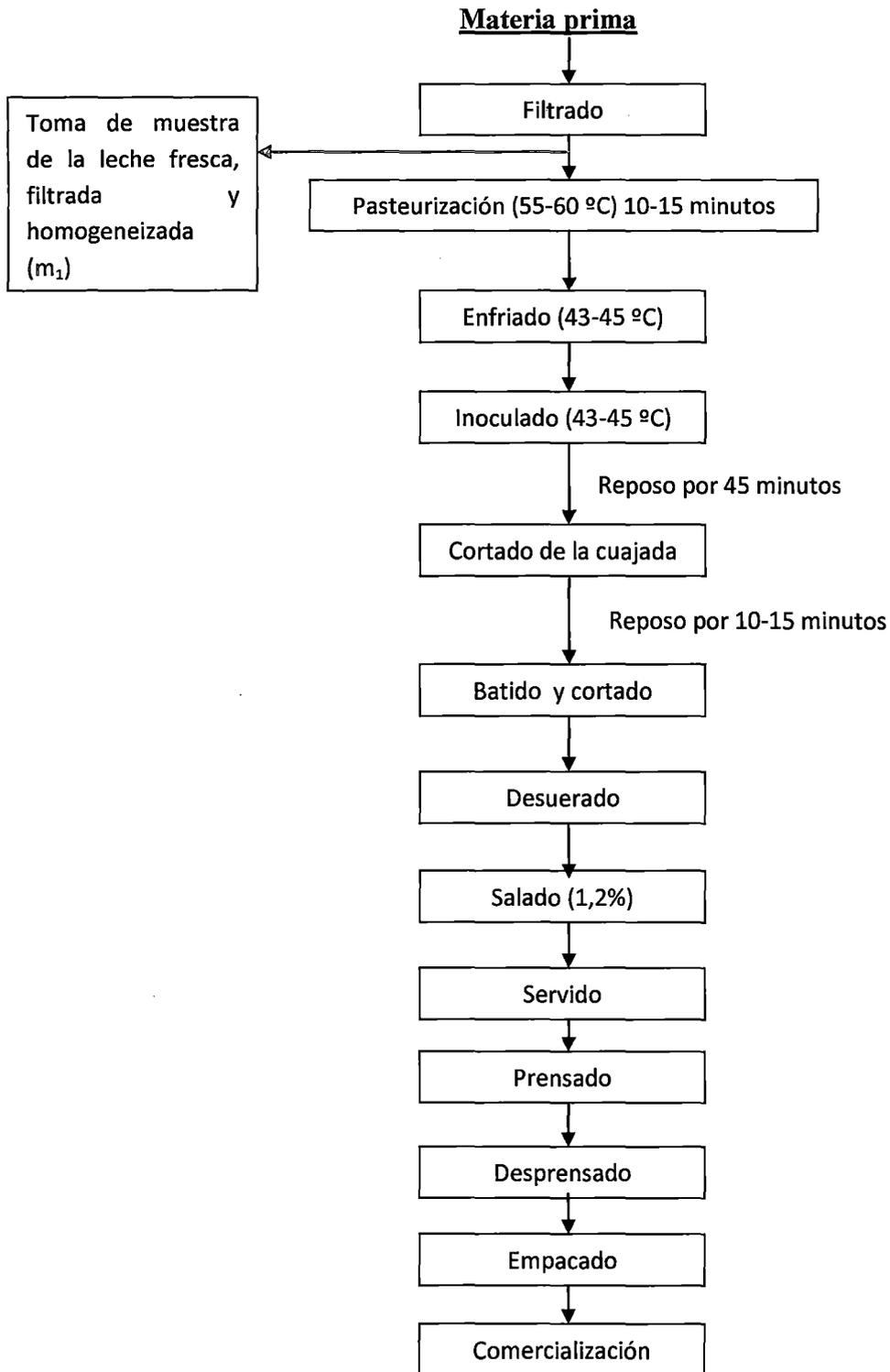


Figura 2: Diagrama de flujo de bloques de elaboración de queso fresco

ESQUEMA DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

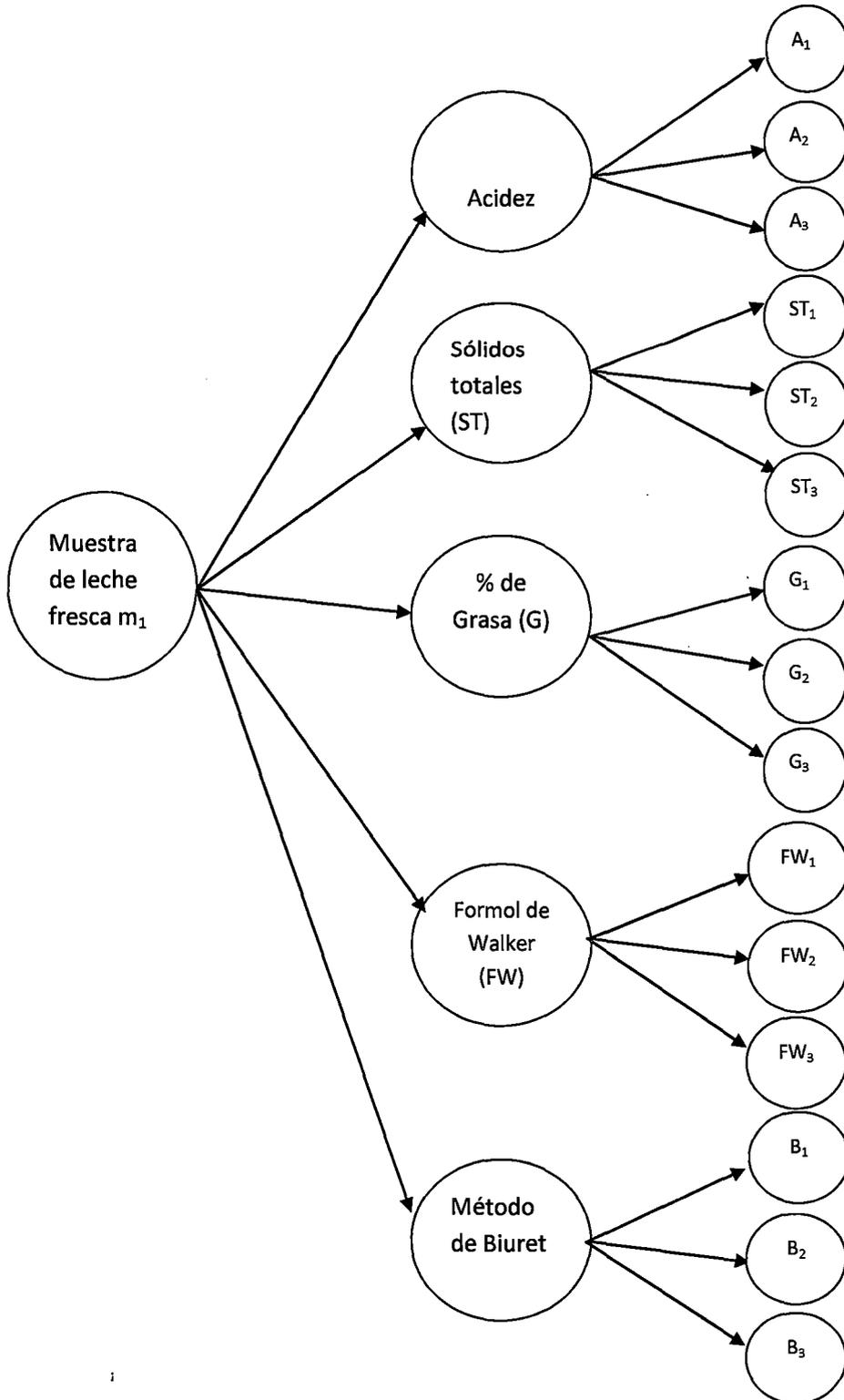


Figura 3: Esquema de análisis de las muestras

2.4.2. Diseño estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, utilizando el software SPSS versión 21.

2.4.3. Unidad de análisis

La muestra, será tomada de la “Industria Agropecuaria COLARG S.R.L.”, muestras representativas de cada lote de producción, en envases estériles y transportados al lugar donde serán analizados (laboratorio de Biotecnología Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia-UNSCH).

2.4.4. Población de estudio

El estudio servirá para mejorar la calidad de análisis en la “Industria Agropecuaria COLARG S.R.L.”, ubicado en el Centro Poblado de Llumchicancha, Distrito Los Morochucos, Provincia de Cangallo, Región Ayacucho.

2.4.5. Tamaño de muestra

Se tomará una muestra representativa del lote de producción cada tres días, en condiciones estériles, luego de ser filtrada y homogeneizada.

2.4.6. Selección de muestra

La muestra será tomada aleatoriamente, de forma representativa de cada lote de producción.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PRUEBA DE ALCOHOL

Se procedió a tomar la muestra (5 ml) y alcohol en la misma proporción, mezclándola suavemente, y no se observó floculación como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3: Resultados de la prueba de alcohol a las muestras de leche fresca

Nº de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Coagula (si/no)	no									
	no									
	no									

Estos resultados, nos refleja que la muestra de leche no tiene una descomposición por acción microbiana, además se tuvo el cuidado de transportar la leche fresca desde el lugar de ordeño al laboratorio en condiciones higiénicas y en refrigeración, si la

leche hubiese tenido indicios de descomposición, al realizar la prueba de alcohol hubiera presentado coágulos.

3.2. ANÁLISIS DE DENSIDAD

Se realizó la lectura de la densidad, utilizando el lactodensímetro cuya calibración estaba en grados Quevenne a una temperatura de 15 °C, colocando la muestra de leche en una probeta de 500 ml e introduciendo el lactodensímetro con cuidado, hasta que se encuentre estable, procediendo a realizar la lectura correspondiente cuyos resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Resultados de lectura de la densidad en las muestras de leche fresca

Nº de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	30	33	28	31	30	30	29	30	29,2	30
	30	34	29	31,1	31	30	30	29,5	29	29,8
	29,5	34	29,1	31,1	30	30	29,5	30	29,3	29,9
Promedio	30	33,7	28,5	31	30,3	30	29,5	30	29,2	29,9
Densidad corregida (°Quevenne)	30	33,67	28,50	31	30,33	30	29,5	30	29,17	29,9

El promedio de la densidad de la leche, de las 10 muestras fue de 30,21 °Quevenne que es igual a 1,03021 g/ml, lo que indica que se encuentra en el rango adecuado de 1,028 – 1,030 g/ml, ya que valores inferiores a esta, indicaría la adulteración con agua y si el valor es mayor indicaría que la leche ha sido desnatada.

3.3. DETERMINACIÓN DEL pH

Se procedió a medir el pH, utilizando el pH-metro, previa calibración, los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Resultados de lectura del pH en las muestras de leche fresca

Nº de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	6,6	6,8	6,7	6,8	6,9	6,7	6,5	6,8	6,9	6,8
	6,7	6,7	6,8	6,8	6,8	6,5	6,6	6,7	6,8	6,7
	6,5	6,8	6,5	6,9	6,6	6,9	6,6	6,9	6,9	6,7
pH Promedio	6,6	6,8	6,7	6,8	6,8	6,7	6,6	6,8	6,9	6,7

La lectura de pH, indica un valor adecuado, que se encuentra en promedio de pH=6,7; lo que indica que se encuentra en buen estado de conservación, ya que valores superiores al rango de pH de 6,5 – 6,8 indicaría que son leches mastíticas, mientras que valores inferiores indican la presencia de calostro o descomposición bacteriana.

Según Arango et al., (1998), la causa de mastitis en leches es causado por la disminución en productos ácidos como la caseína y el ácido cítrico o en la aparición de compuestos básicos como el amoníaco,

3.4. PRUEBA DE ACIDEZ Y DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE WALKER

La acidez se determinó luego de titular una muestra de 10 ml de leche, añadiendo gotas de fenolftaleína, titulado con NaOH 0,1 N hasta virar de color, anotándose el gasto como se muestra en la tabla 6. Luego se agregó 2 ml de formaldehído al 40%,

procediéndose a titular nuevamente y este nuevo gasto de NaOH 0,1 N que se obtuvo es el denominado número de Walker. Para todos los casos se realizaron tres repeticiones. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6. Los cálculos realizados se muestran en el anexo 1.4 y el anexo 2.2.

Tabla 6: Volumen de hidróxido de sodio gastado y determinación del número de Walker

Nº de muestra	Vol. NaOH (ml)	% de acidez	Nº de Walker	% de caseína
1	2	0,18	2	3,26
	2	0,18	2,1	3,42
	2	0,18	2	3,26
2	1,7	0,153	2,25	3,67
	1,7	0,153	2,2	3,59
	1,65	0,149	2,2	3,59
3	1,85	0,167	1,8	2,93
	1,95	0,176	1,7	2,77
	1,9	0,171	1,75	2,85
4	1,7	0,153	2,3	3,75
	1,7	0,153	2,35	3,83
	1,75	0,158	2,35	3,83
5	2,1	0,189	1,8	2,93
	2,05	0,185	2	3,26
	1,95	0,176	2,02	3,29
6	2,3	0,207	1,8	2,93
	2,1	0,189	2,01	3,28
	2,2	0,198	2,01	3,28
7	2,2	0,198	2	3,26
	2,1	0,189	2,05	3,34
	2,2	0,198	2,05	3,34
8	2,1	0,189	2	3,26
	2,2	0,198	2	3,26
	2,1	0,189	2,1	3,42
9	2	0,18	2	3,26
	1,9	0,171	2	3,26
	2	0,18	1,7	2,77
10	2	0,18	1,8	2,93
	2,05	0,185	1,9	3,1
	2	0,18	1,8	2,93

La acidez determinada en las muestras, refleja la buena calidad de la leche, ya que valores fuera del rango de 0,17 – 0,211 % (Clavijo, 1997); reflejaría mala calidad de la leche que presentaría cierto grado de descomposición debido a la carga microbiana presente.

3.5. SÓLIDOS TOTALES

Se colocó 5 ml de muestra de leche en placas petri pesadas respectivamente y se sometió a secado a 50 °C por espacio de 3 horas, los resultados se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: Porcentaje de sólidos totales de la muestra de leche fresca

Nº de muestra	% de sólidos totales
1	12,72
	12,97
	12,32
2	12,76
	11,32
	13,12
3	12,56
	12,47
	12,42
4	12,48
	12,81
	11,94
5	11,99
	12,42
	12,57
6	11,70
	12,08
	12,33
7	12,31
	11,14
	12,03
8	11,74
	12,36
	12,27

9	12,06
	11,87
	12,42
10	12,29
	12,54
	12,36

En promedio, se obtiene un contenido de sólidos totales de 12.28%, que es un valor menor al rango de 12,6 - 12,7% (Clavijo, 1997), esto podría deberse a la raza del ganado, tipo de alimentación y al periodo de lactancia (Dilanjan, 1984), también podría deberse a la edad del ganado, sanidad de la ubre (Madonald *et al*, 1999 y Velásquez, 2000).

3.6. PORCENTAJE DE GRASA

La metodología de esta determinación analítica se encuentra descrita en el anexo 1.6, obteniéndose los siguientes resultados, que se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Porcentajes de grasa de leche fresca determinados

Muestra	1	2	3
% de grasa	3,5	3,4	3,6
	3,4	3,5	3,5
	3,6	3,4	3,4
% de grasa promedio	3,5	3,43	3,5

De las muestras analizadas, el promedio del contenido de grasa es de 3,48%; y se encuentra en el rango de 3,58 – 3,61% (Clavijo, 1997).

3.7. DETERMINACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

Para determinar la curva estándar, se realizó el siguiente procedimiento: se diluyeron 0,125 g de caseína QP/ 100 ml de agua, en una fiola de 100 ml, como se dificultaba en disolverse, se agregó gotas de hidróxido de sodio (NaOH 0,1 N) y agitando constantemente a 50 °C, luego de ser homogeneizada, se procedió a tratar la muestra en 5 tubos de ensayo como se muestra en la tabla, siendo el primero el blanco y los otros 4 las diluciones respectivas.

Luego se procedió a determinar la curva patrón, graficando Absorbancia vs concentración de caseína (%), siendo la curva ajustada por regresión lineal.

En la figura 4 se muestra la curva estándar de caseína, con su respectiva ecuación lineal y el coeficiente de correlación lineal.

Tabla 9: Acondicionamiento de la caseína pura y determinación de su absorbancia y concentración

Tubo	Estándar 0,125g/100 ml	H ₂ O (ml)	Biuret (ml)	Concentración de caseína (%)	Absorbancia a 550 (nm)			Promedio de absorbancia
Blanco	0	10	10	0	0	0	0	0
1	2,5 ml	7,5	10	0,03125	0,02	0,02	0,02	0,02
2	5 ml	5	10	0,0625	0,032	0,032	0,032	0,032
3	7,5 ml	2,5	10	0,09375	0,044	0,044	0,044	0,044
4	10 ml	0	10	0,125	0,054	0,054	0,054	0,054

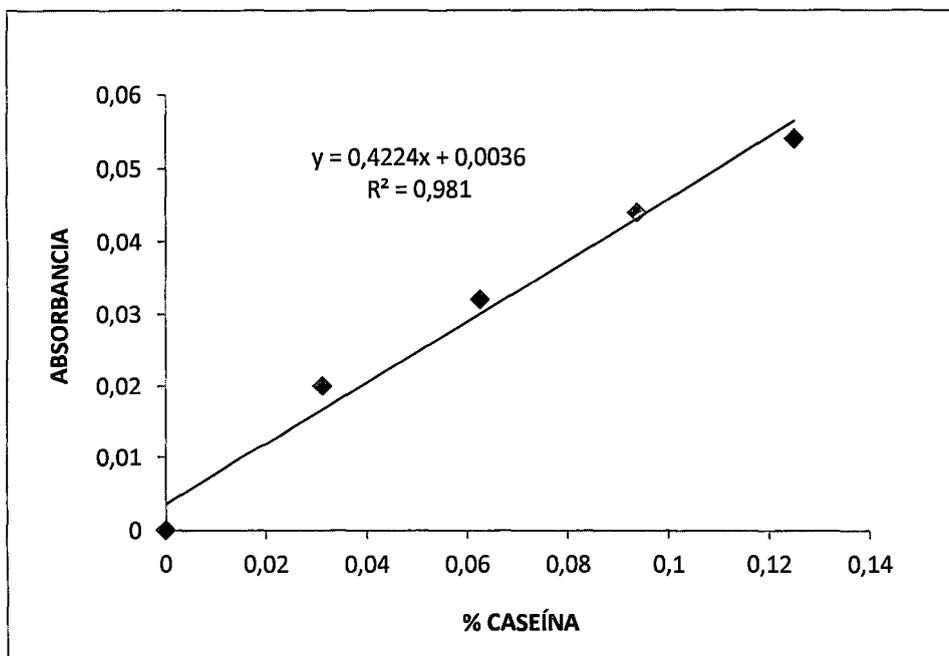


Figura 4: Curva estándar de caseína

3.8. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA

Para determinar la longitud de onda óptima, se disolvió 0,5 g de caseína en 50 ml de agua, luego se tomó de esta disolución 10 ml vertiéndose en un tubo de ensayo y en la misma proporción se adicionó el reactivo de Biuret, realizándose la lectura de las absorbancias a diferentes longitudes de onda, como se muestra en la tabla 10.

Luego se graficó absorbancia vs longitud de onda (nm), para determinar en qué longitud de onda se da la mayor absorbancia, y con dicha longitud de onda determinada, se realizó las lecturas de las absorbancias de las diferentes diluciones de las muestras como se muestra en la siguiente figura 5:

Tabla 10: Lectura de la absorbancia de la caseína a diferentes longitudes de onda

Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia
400	0,095
420	0,124
440	0,206
460	0,296
480	0,345
500	0,412
520	0,486
540	0,534
560	0,531
580	0,479
600	0,423
620	0,302
640	0,241
660	0,197
680	0,104
700	0,05

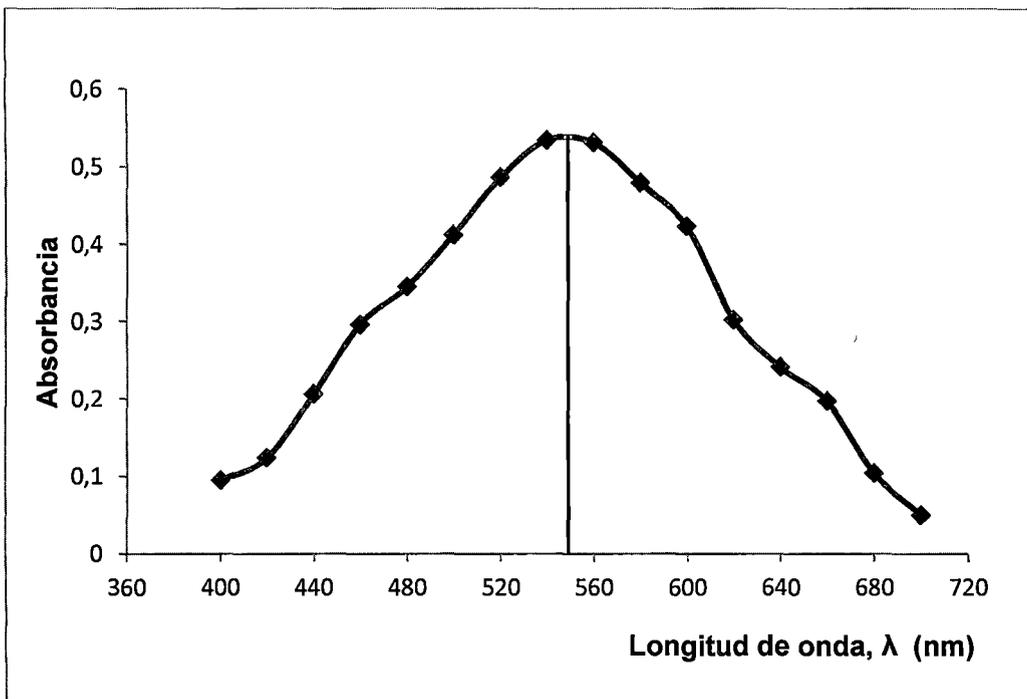


Figura 5: Determinación de longitud de onda óptimo

Como se observa en la figura, la mayor absorbancia se da a los 550 nm, a esta longitud de onda se realizarán todas las lecturas de los tratamientos en estudio.

3.9. LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA

Para realizar la lectura espectrofotométrica, se diluyó 0,5 ml de leche fresca en 100 ml de agua, en una fiola de 100 ml, luego se procedió a centrifugar a 2500 rpm por un tiempo de 5 minutos, al terminar el centrifugado, se observa en la parte superficial de la muestra una capa de grasa, la que posteriormente es filtrada, luego de este filtrado, se procede a realizar los respectivos tratamientos a la muestra, como se muestra en la tabla 11, realizándose las lecturas de las absorbancias a 550 nm.

Los cálculos de concentración (%), % de caseína calculada según dilución, factor de dilución y porcentaje de caseína en la muestra, se realizaron según las fórmulas que se muestran en el anexo 4.8.

Tabla 11: Lectura de absorbancias de muestras de leche fresca y determinación del % de caseína

Nº de muestra	Tubo de ensayo Nº	Estándar (0.5 ml de leche/100ml)	Agua (ml)	Biuret (ml)	Concentración (%)	Absorbancia	% Caseína calculada según dilución	Factor de dilución	% Caseína en la muestra
1	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0223	0,0443	80	3,548
	2	5	5	10	0,25	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0570	0,1264	26,67	3,372
	4	10	0	10	0,5	0,0753	0,1698	20	3,396
2	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0227	0,0451	80	3,611
	2	5	5	10	0,25	0,0387	0,0830	40	3,321
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0563	0,1248	26,67	3,330
	4	10	0	10	0,5	0,0730	0,1643	20	3,286
3	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0230	0,0459	80	3,674
	2	5	5	10	0,25	0,0380	0,0814	40	3,258
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0557	0,1233	26,67	3,287
	4	10	0	10	0,5	0,0727	0,1635	20	3,270

4	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0220	0,0436	80	3,485
	2	5	5	10	0,25	0,0370	0,0791	40	3,163
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0540	0,1193	26,67	3,182
	4	10	0	10	0,5	0,0727	0,1635	20	3,270
5	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0220	0,0436	80	3,485
	2	5	5	10	0,25	0,0373	0,0799	40	3,194
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0570	0,1264	26,67	3,372
	4	10	0	10	0,5	0,0750	0,1690	20	3,381
6	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0223	0,0443	80	3,548
	2	5	5	10	0,25	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0563	0,1248	26,67	3,330
	4	10	0	10	0,5	0,0747	0,1682	20	3,365
7	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0227	0,0451	80	3,611
	2	5	5	10	0,25	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0563	0,1248	26,67	3,330
	4	10	0	10	0,5	0,0753	0,1698	20	3,396
8	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0223	0,0443	80	3,548
	2	5	5	10	0,25	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0570	0,1264	26,67	3,372
	4	10	0	10	0,5	0,0753	0,1698	20	3,396
9	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0220	0,0436	80	3,485
	2	5	5	10	0,25	0,0413	0,0893	40	3,573
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0560	0,1241	26,67	3,308
	4	10	0	10	0,5	0,0753	0,1698	20	3,396
10	1	2,5	7,5	10	0,125	0,0227	0,0451	80	3,611
	2	5	5	10	0,25	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,0550	0,1217	26,67	3,245
	4	10	0	10	0,5	0,0743	0,1675	20	3,349

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DETERMINACIÓN DE CASEÍNA POR EL MÉTODO DE BIURET Y EL MÉTODO DE WALKER.

Para realizar el análisis estadístico de los resultados en la determinación de caseína en la leche fresca, se utilizó el software SPSS versión 21.

Tabla 12: Análisis de varianza (ANVA) para las concentraciones en estudio en la determinación de caseína por el método Biuret

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CASEÍNA	0,951	3	0,317	69,108	0,000
MUESTRAS	0,346	9	0,038	8,372	0,000
Error	0,491	107	0,005		
Total	1399,684	120			
Total corregida	1,787	119			

El porcentaje de caseína obtenido a las diferentes concentraciones (0,125; 0,25; 0,375 y 0,50 %) de muestras de leche evaluadas, según el análisis de varianza de la tabla 12 , se observa que estadísticamente son altamente significativas, es decir que algunas de las concentraciones se diferencian de las demás en las determinaciones analíticas.

Por lo tanto se realiza la prueba de comparación de medias, en la tabla 13, se muestra la prueba de DUNCAN, para las diferentes concentraciones evaluadas en la determinación del porcentaje de caseína.

Tabla 13: Prueba de comparación de medias de DUNCAN para las diferentes concentraciones evaluadas en la determinación de caseína por el método de Biuret.

CONCENTRACIONES (%)	Subconjunto		
	1	2	3
0,375	3,32947		
0,50	3,35483		
0,250		3,40903	
0,125			3,55900

Alfa =0,05

Del cuadro anterior se puede concluir que el mejor porcentaje de caseína se obtiene cuando se utiliza la concentración de 0,125% de leche en la solución.

En la tabla 14, se muestra la media, y los intervalos de confianza al nivel de confianza del 95% de los valores de caseína a las diferentes concentraciones de muestras de leche evaluadas.

Tabla 14: Media e intervalos de confianza de los valores de caseína a las diferentes concentraciones de muestra

CONCENTRACIÓN (%)	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Límite inferior	Límite superior
0,125	3,559	3,534	3,584
0,250	3,409	3,385	3,434
0,375	3,329	3,305	3,354
0,50	3,355	3,330	3,379

En la tabla 15, se muestra el análisis de varianza de los valores de caseína por el método Biuret del mejor porcentaje obtenido en la tabla anterior (Tabla 14) con los valores de caseína obtenidos por el método Walker.

Tabla 15: Análisis de varianza (ANVA) para la determinación de caseína por los métodos BIURET Y WALKER

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (p)
METODOS	1,326	1	1,326	28,802	0,000*
Error	2,670	58	0,046		
Total	701,819	60			
Total corregida	3,997	59			

*Si: $p > 0,05$: No hay significancia
 $0,01 < p < 0,05$: Hay significancia
 $p < 0,01$: Altamente significativo

De la tabla 15, el análisis de varianza realizado a ambos métodos, determina que existen diferencias altamente significativas, es decir que los métodos empleados en la determinación del porcentaje de caseína, se ven influenciadas al aplicar Biuret o Walker. Por lo tanto se realiza la prueba de comparación de medias, para determinar estadísticamente cuál de los dos métodos es el que me confiere mejor promedio del porcentaje de caseína, además de precisar el menor margen de error del método aplicado.

Tabla 16: Prueba de Duncan para los métodos de Biuret y Walker en la determinación de caseína.

MÉTODOS	Subconjunto	
	1	2
BIURET	3,5590	
WALKER		3,2617

De la tabla 16, se puede observar que el mejor método en la determinación de caseína es el de Biuret, esto se debe a que el método espectrofotométrico es mucho más reproducible que el método volumétrico de Walker, además el grado de

precisión del espectrofotométrico es más sensible y en el caso del método de Walker no se puede determinar ni estandarizar un grado de precisión por ser un procedimiento de valoración o titulación.

CONCLUSIONES

1. En el análisis comparativo se encontró que el método Biuret presentó mejores resultados que el método de Formol de Walker.
2. De acuerdo al análisis de la leche fresca de la zona, presenta características fisicoquímicas muy buenas que están dentro de los rangos normales, al no coagular con el alcohol, con una densidad de 1,03021 g/ml; un pH de 6,7; acidez de 0,17 - 0,211%; contenido de sólidos totales de 12,2794% y un porcentaje de grasa de 3,477%.
3. La concentración de caseína de la leche por el método de Biuret, que presenta mejores resultados es el de 0,125% de la muestra, con una determinación del porcentaje de caseína de 3,56% en la muestra de leche fresca.
4. La concentración de caseína en la leche por el método volumétrico de Formol de Walker siendo el de 3,26%; que es menor al obtenido por el método Biuret.
5. Según los resultados del ANVA, al haber diferencia altamente significativa y luego de realizar el análisis de DUNCAN se concluye que estadísticamente el método espectrofotométrico de Biuret reportó mejores resultados en comparación con el método formol de Walker en la determinación de caseína en la leche fresca.

RECOMENDACIONES

1. De acuerdo a los resultados, en cuanto a la determinación de caseína en la leche fresca, se sugiere considerar este parámetro para efecto del pago de la leche.
2. Utilizar el método Biuret en la industria para la determinación de caseína.
3. Tomar en cuenta el factor genético y de alimentación en vacas lecheras para así obtener un mejor rendimiento en cuanto a la calidad de la leche especialmente en el contenido caseínico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALAIS, C. 1991. "Ciencia de la leche, principios de técnica lechera" Edit. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México.
2. ALEANDRI, R. 1989. "Evaluation of milk for cheese production base don milk characteristics and form graph measures. Journal of dairy science". U.S.A.
3. ANTONIO ORIOL Y ANGUERA.1952. "Químico-física para biólogos" Edit. Labor, S.A. Argentina.
4. ARANGO, L.; OROZCO, M y QUICAZÁN, M. 1998. Caracterización química de leches normales y mastíticas. Revista de la Facultad de ciencias. Universidad de Medellín. Colombia.
5. BADUI DERGAL, SALVADOR. 2006. "Química de los alimentos" 4ta edición Edit. Continental, S.A. México.
6. BANKS, J. 1990. The quality of milk in relation to cheese manufacture journal of the society of dairy technology U.S.A.
7. BARBANO, D Y SHERBON, J. 1984. "Cheddar y cheese yields in new cork". Journal Dairy sciences.
8. BATH, D; DICKINSON, F; TUCKER, H Y APPLEMAN, R. 1986. "Ganado lechero: principios, prácticas, problemas y beneficios". México Nueva editorial interamericana.
9. BERG et al. 2008 "Biochemistry" 5ta edición Standford Univerity.
10. BRUNNER, R. 1977. Food proteins aviconecticud U.S.A.
11. CANUT, R. 1988. "Manual de quesos, queseros y quesomanos". Madrid Temas de hoy S.A.

12. CERBULIS, J. 1973. "Composition of milk of dairy cattle. I protein lactose an fat contents an distribution of protein fraction. Journal of dairy science". U.S.A.
13. CHARLES ALAIS. 1970. "Ciencia de la leche, principios de técnica lechera"
Edit. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México.
14. CLAVIJO, M. 1997. "La calidad de la leche en Venezuela. Interpretación de los análisis para su control". FCV
15. COMERON, E. 2000. El impacto económico de la calidad de la leche en la cuenca central Argentina. Anuario 2000.
16. COULTATE T.P. 1998. "Manual de química y bioquímica de los alimentos"
Editorial Acribia, S.A. 2da Edición. España.
17. CUNNINGHAM, A. 2000 Proteínas del queso. México ediciones Saltillo.
18. DEPETERS, E. Y CANT, J. 1992. "Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. Journal of dairyscience".
19. DESROSIER. 1983 "Elementos de tecnología de alimentos" Editorial Continental México.
20. DILANJAN, S. 1984. "Fundamentos de elaboración de queso". Edit. Acribia Zaragoza España.
21. ECK, A. 1990. "El queso traducido por Mestres Joseph". España Ediciones Omega, S.A.
22. ECKH ARDSCHLIMME Y WOLFGANG BUCHHEIM. 2002. "La leche y sus componentes, propiedades químicas y físicas" Edit. Acribia S.A. Zaragoza-España.
23. FERNÁNDEZ, EMILIO Y GALVÁN, AURORA "Métodos para la cuantificación de proteínas"-Universidad de Rabanales

24. GARASSINI, L. 1964. "Microbiología de alimentos". Cuarta edición Edit. Acribia Zaragoza España.
25. GODDARD, M Y WIGGANS, G. 1996. Genetic improvement of dairy cattle in: Fries, R. Y Ruvinsky, A. CABIPublishing.
26. GORDON, J; SHAPTON, M. 1977. "Characteristics and use of starter for the manufacture of yogurt. Cheese, Cultured, buttermilk and other fermented. Products. Journal of the society of dairy technology".
27. GUZMÁN, J. 1990. "Elaboración de quesos". Segunda edición España Edit. Espande:
28. HART, L Y FISHER, J. 1991. "Análisis moderno de alimentos". Segunda edición Edit. Acribia, S.A. Zaragoza España.
29. HARRIS, D.C. 2003. "Análisis químico cuantitativo" Editorial Reverte
30. HIDALGO QUESADA, CLAUDIA. "Evaluación del método del Biuret para la cuantificación de la proteínas totales en el líquido cefalorraquídeo" –Universidad de Costa rica
31. JOHANNSEN, L. 1990. "Hay que darle una mayor importancia al contenido de proteína en la leche". Lechero Latinoamericano.
32. KINDSTEDT, Paul S. 1983 "American cheese society" American dairy association.
33. KIRK, R. Sawyer, H. Egan. 1989 "Composición y análisis de alimentos de Pearson" 9na edición Edit. CECSA-México.
34. MADONALD, P; EDWAEDS, R; GREENHALGH, J Y MORGAN, C. 1999. "Nutrición animal". Quinta edición. Edit. Madrid Zaragoza España.
35. MADRID VICENTE A. 1999. "Nuevo manual de industrias alimentarias" Edit. Mundi Prensa – España.

36. MAMANI AYCACHI. 1998. "Guía de prácticas de bioquímica" UNSCH.
37. MARZIALI, A.S. 1986. "Tecnología quesera". España. AMV Editores.
38. NORMAN W. DESROSIER. 1983. "Elementos de tecnología de alimentos"
Edit. Continental, S.A. de CV. México.
39. Oriol y Anguera, Luis. 1952 "Quimicofísica para biólogos" Editorial Labor.
40. PHILLIPS, C. 2001. "Principles of cattle production". CABI Publishing. Londres
Inglaterra.
41. PYNE, Gerald Thomas. 1932. "The determination of milk-proteins by
formaldehyde titration" The departament of dairy chemistry, university college
cork.
42. POTER, J. 1981. "Leche y productos lácteos". Edit. Acribia, S.A. Zaragoza
España.
43. PRIMO, E. 1973. "Química agrícola III". Segunda edición Edit. Alambra Madrid
España.
44. REVILLA, A. 1985. "Tecnología de la leche". Edit. IICA. San José Costa Rica.
45. ROSELL, J Y DOS SANTOS, I. 1952. "Métodos analíticos de laboratorio
lactológico y microbiología de las industrias lácteas". Tomo I. Barcelona España.
Edit. Labor S.A.
46. SANTOS, A. 1998. "Leche y sus derivados". México editorial Trillas.
47. SEGAL, 2005 Science computer Standford University.
48. SZIJARTO, L. BIGGS, E IRVINE, D.1973. "Variability of casein, serum protein
and non-protein nitrogen in plant milk in ontario". Journal dairy sciences.
49. TORNADIJO, M; MARRA, A; GARCIA, F; PRIETO, B Y CARBALLO, J.
1998. Milk quality for cheese production: Chemical quality.

50. TORO, P. 1994. CONTENIDO DE PROTEÍNA PRESENTE EN LA LECHE Y EL QUESO DURO ARTESANAL “Llanero y su relación con el rendimiento”. Venezuela.
51. VEISSEYRE, R. 1980. “Lactología técnica”. Edit. Madrid. Zaragoza España.
52. VELÁZQUEZ, M. 2000. “Udder health and milk composition, whit special reference to beef cows”. A literature review. Swedish University of agricultural sciences Skara. Faculty of veterinary medicine. Departament of animal environmet and health. Skara, Suecia.
53. WALASTRA, P Y JENNES R.1987. “Química y física litológica”. Edit. Acribia Zaragoza España.
54. WATTIAUX, M. 2003. “Composición de la leche y valor nutricional”. Instituto Babcock para el desarrollo y la investigación internacional de la lechería de la universidad de Wisconsin Madison.
55. WONG DOMINIC W.S.1995. “Química de alimentos mecanismo y teoría” Editorial Acribia, S.A.

ANEXOS

ANEXO 1

PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS

1.1. PRUEBA DEL ALCOHOL

Una prueba de alcohol positiva indica poca estabilidad de la leche al calor, lo cual es muy importante si el producto ha de ser pasteurizado o esterilizado.

1. Tomar 5 ml de muestra (leches comerciales) y 5 ml. de etanol de 72° en un tubo de ensayo. Mezclar suavemente invirtiendo 2 a 3 veces el tubo sin agitación.
2. Observar a contraluz si ha ocurrido floculación o coagulación de la mezcla.

1.2. MEDICIÓN DE LA DENSIDAD

Es el peso de un mililitro de leche a una temperatura de 20°C. Se le determina con un lactodensímetro. La densidad promedio de la leche es aproximadamente $1,030 \pm 0,02$ g / ml Cuando la leche está alterada por adición de agua, la densidad será menor. En el caso de que la leche haya sido desnatada, la densidad será mayor.

1. Tomar 100 ml de muestra (leches comerciales) en la probeta.
2. Sumergir el lactodensímetro. Leer la densidad.
3. Determinar la temperatura de la leche en la probeta.
4. Hacer la respectiva corrección de la densidad con la temperatura.
5. Hacer la corrección de la densidad con la siguiente ecuación:

$$\rho_c = \rho_d + 0,0002 (T - 20)$$

Dónde:

ρ_c : densidad corregida

ρ_d : densidad determinada con el lactodensímetro

T: temperatura de la leche en la probeta

1.3.MEDICIÓN DEL pH

El pH normal de la leche fresca es de 6,5 - 6,8. Valores superiores a esta se observan en leches mastíticas, mientras que valores inferiores indican la presencia de calostro o descomposición bacteriana.

1. Tomar 20 ml de muestra.
2. Calibrar el potenciómetro con solución Buffer de pH conocido.
3. Medir el pH y anotar los resultados.

1.4.MEDICIÓN DE LA ACIDEZ

La acidez de la leche se expresa en la cantidad de ácido que puede neutralizarse con hidróxido de sodio al 0,1 N. De esta forma se mide el ácido presente en la solución. Esta clase de acidez se llama acidez real. La leche fresca tiene una acidez titulable equivalente a 13 a 20 ml de NaOH 0,1 N/100 ml (0,12 - 0,18 % ácido láctico) debido a su contenido de anhídrido carbónico, proteínas y algunos iones como fosfato, citrato, etc.

1. Tomar 10 ml. de leche a analizar.
3. Añadir gotas del indicador fenolftaleína.
4. Titular con NaOH 0,1 N.
5. Llegar a la coloración rosa persistente.

$$\% \text{ Acidez total} = (V_1 \times N \times \text{Meq-g} \times 100) / V$$

V_1 : Volumen de la solución de NaOH usados (ml).

V : volumen de la muestra (ml).

N : Normalidad de la solución de NaOH.

Meq: Mili equivalente de ácido en términos del cual se expresa la acidez.

Ácido	Meq-g
Acético	0,060
Cítrico	0,064
Málico	0,067
Tartárico	0,075
Láctico	0,090

1.5.DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES

Los sólidos totales de la leche son el residuo obtenido de la desecación de la leche mediante procedimientos normalizados.

El método consiste en transferir a una cápsula debidamente preparada, 5 ml de leche, colocando luego ésta en baño maría durante 10 – 15 minutos. Luego la cápsula

se transfiere a la estufa ajustada a 100 °C y se seca por 4 horas. Posteriormente se deja enfriar la cápsula tapada en el desecador y se procede el pesado.

% Sólidos totales = (Masa seca/Volumen total de la muestra) x 100

1.6.PORCENTAJE DE GRASA

1. En el Butirómetro, llenar 10 ml. de H₂SO₄ al 91%
2. Luego agregar muestra 10,75 ml.
3. Agregar 1 ml de alcohol amílico.

Se debe tener cuidado a que la leche no se mezcle muy rápido con el H₂SO₄ y que se debe cerrar el Butirómetro con todas las medidas de precaución (lentes, guantes, mandil plástico), este cuidado es más importante en el momento de agitar el Butirómetro.

4. Luego centrifugar de 1 000 a 1 200 RPM.
5. Colocar el Butirómetro en Baño María a 65°C por 5 minutos.
6. Luego efectuar la lectura, mirar la escala en punto más bajo del menisco y colocar siempre el Butirómetro a la altura de los ojos. El contenido de grasa que se vea en la escala significa gramos de grasa en 100 g de leche (Atherton, 1981).

ANEXO 2

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CASEÍNA

2.1. DETERMINACIÓN DE CASEÍNA POR EL MÉTODO BIURET

Preparar el reactivo de Biuret de la siguiente manera:

Preparación del reactivo de Biuret.- En un frasco volumétrico de un litro, disolver 3,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 5,0 g de yoduro de potasio y 1,0 g de $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; en 500 ml de NaOH 6N, con agitación constante llevar a un litro en una fiola de dicha capacidad, enrasando hasta el aforo.

Preparación de NaOH 6 N: Pesar 24 g NaOH que están en forma de lentejas, disolver en un vaso de precipitado, posteriormente trasvasar a una fiola de capacidad de 500 ml, enrasar hasta el aforo.

Una vez obtenido el reactivo de Biuret, guardar en un lugar oscuro a temperatura ambiente, este reactivo es estable por aproximadamente 5 meses.

- Para realizar la determinación de la curva estándar, disolver 0,125 g de caseína QP/100 ml de agua (solución estándar), y en cuatro tubos de ensayo adicionar dicha solución en las proporciones como se muestra en la tabla. Luego realizar la figura de absorbancia vs % de caseína y determinar la ecuación de la recta por regresión lineal.

Tubo	Estándar 0,125g/100 ml	H ₂ O (ml)	Biuret (ml)
Blanco	0	10	10
1	2,5 ml	7,5	10
2	5 ml	5	10
3	7,5 ml	2,5	10
4	10 ml	0	10

- Para realizar la determinación de la longitud de onda óptima, disolver 0,5 g de caseína en 50 ml de agua, luego se tomar de esta disolución 10 ml vertiéndose en un tubo de ensayo y en la misma proporción se adicionar el reactivo de Biuret, realizándose la lectura de las absorbancias a diferentes longitudes de onda, Luego de realizar las lecturas anteriores, graficar absorbancia vs longitud de onda (nm), para determinar en qué longitud de onda se da la mayor absorbancia, y con dicha longitud de onda determinada realizar las lecturas de las absorbancias de las diferentes muestras.
- Para realizar el análisis de la muestra de leche fresca, diluir 0,5 ml de leche fresca/100 ml de agua y seguir el procedimiento señalado en la tabla anterior y realizar las lecturas luego de cinco a 10 minutos después de adicionar el reactivo, la reacción es estable por espacio de una hora. El blanco contiene agua y el reactivo, no contiene a la muestra.

2.2. DETERMINACIÓN DE CASEÍNA POR EL MÉTODO FORMOL DE WALKER

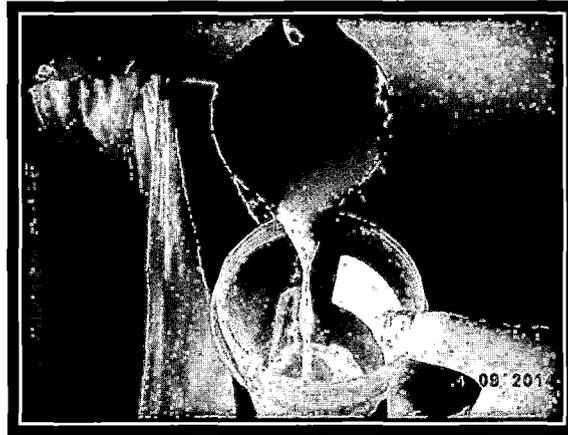
Se fundamenta en la unión del formaldehído a los grupos aminos de la caseína y la titulación de los grupos carboxilos libres con NaOH 0,1 N en presencia de fenolftaleína, previa titulación de la acidez de la leche, lo cual explica tales resultados ya que la unión de los grupos aminos de la caseína con el formaldehído, forma la base schiff, pudiéndose formar posteriormente enlaces entre las cadenas de péptidos.

La técnica de Rosell y Dos Santos, 1952, consistió en medir 9 ml de la muestra de leche en una fiola, adicionar 3 gotas de solución alcohólica de fenolftaleína al 1% y

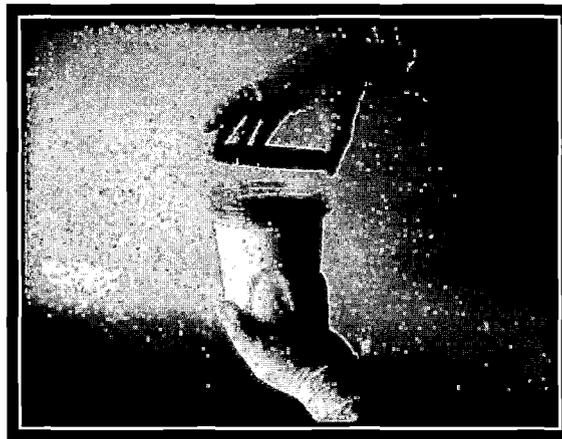
titular con solución de NaOH 0,1 N colocada en una bureta de 150 ml hasta la aparición del primer color rosado permanente inmediatamente agregar 2 ml de solución de formaldehído al 40% neutralizado y el color rosado desaparece. Luego volver a titular con NaOH 0,1N hasta la aparición de color rosado nuevamente. Se anotan los mililitros empleados en la segunda titulación y se procede a calcular el porcentaje de caseína multiplicando el número de ml de NaOH gastados en la segunda titulación por el factor 1,63. Obteniéndose el porcentaje de caseína.

ANEXO 3

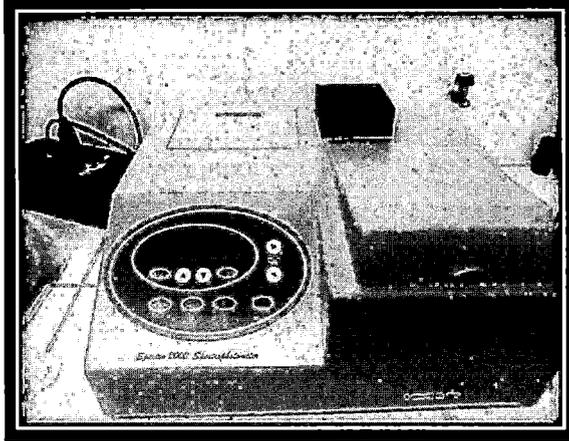
FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



Fotografía 1: Toma de muestra de leche fresca



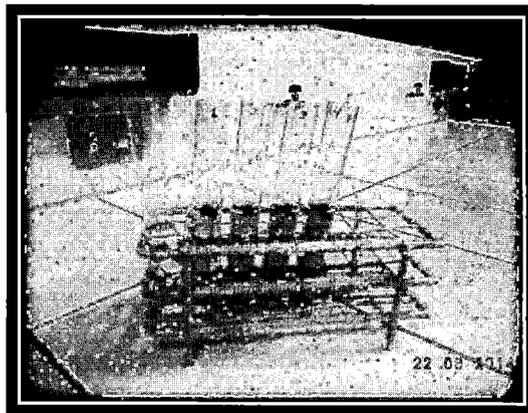
Fotografía 2: Tapado de la muestra para su transporte



Fotografía 3: Espectrofotómetro



Fotografía 4: Acondicionamiento de la muestra para lectura de absorbancia en el espectrofotómetro



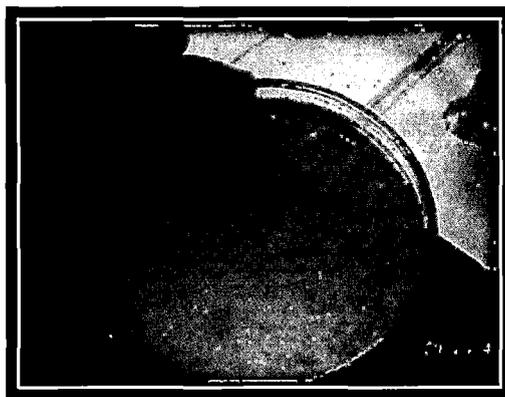
Fotografía 5: Muestra acondicionada con el reactivo de Biuret adicionada



Fotografía 6: Trasvasado del blanco en la celda de cristal para su lectura de absorbancia en el espectrofotómetro



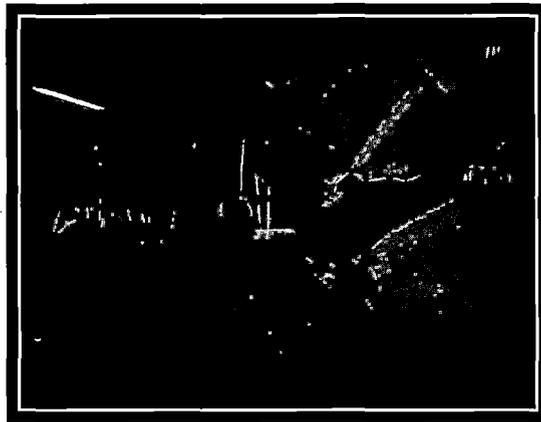
Fotografía 7: Potenciómetro digital



Fotografía 8: Ejemplo de coagulación de leche ácida, frente al alcohol



Fotografía 9: Secado de las placas petri en la estufa



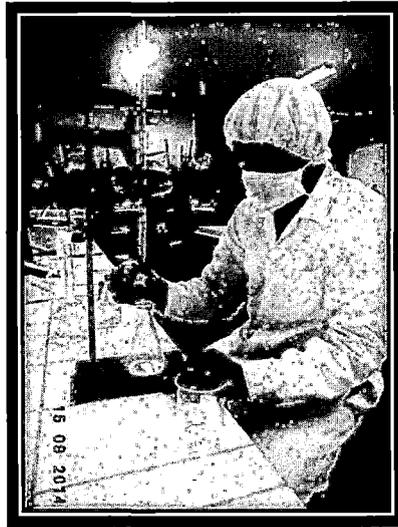
Fotografía 10: Adición de la muestra de leche a las placas petri



Fotografía 11: Muestras de leche fresca secas



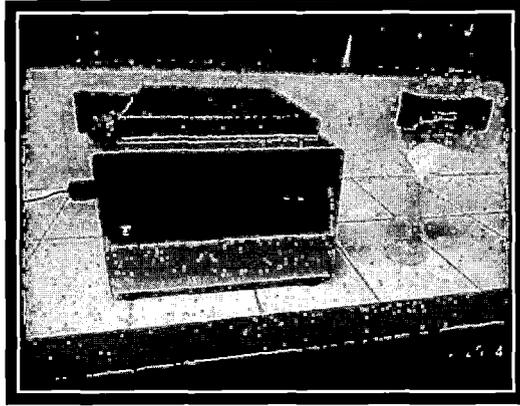
Fotografía 12: Pesado de placas petri más muestra de leche fresca



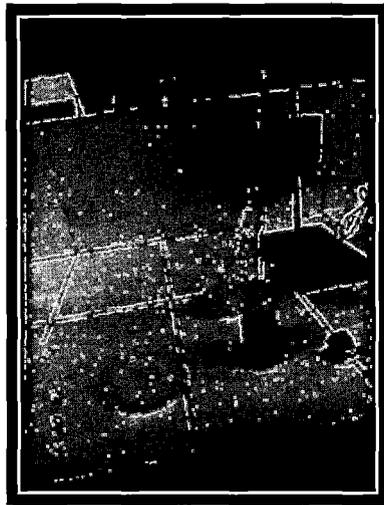
Fotografía 13: Determinación de acidez y el número de Walker



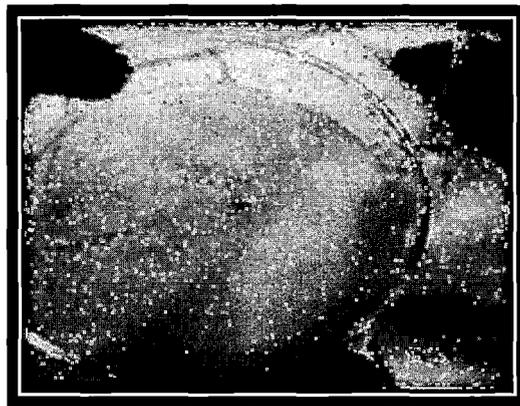
Fotografía 14: Solución de leche fresca 0,5 ml/100 ml de agua



Fotografía 15: Centrífuga



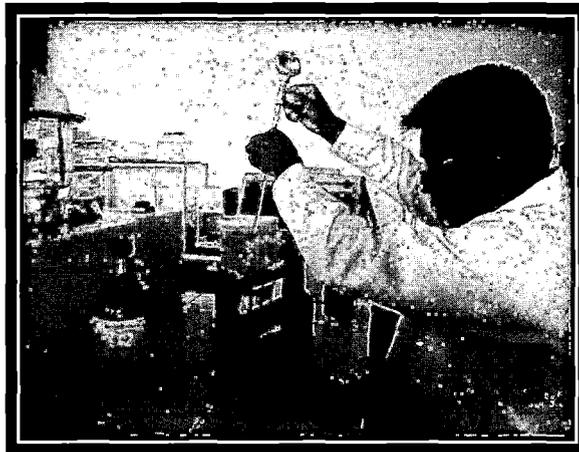
Fotografía 16: Realización de la prueba de alcohol a la leche fresca



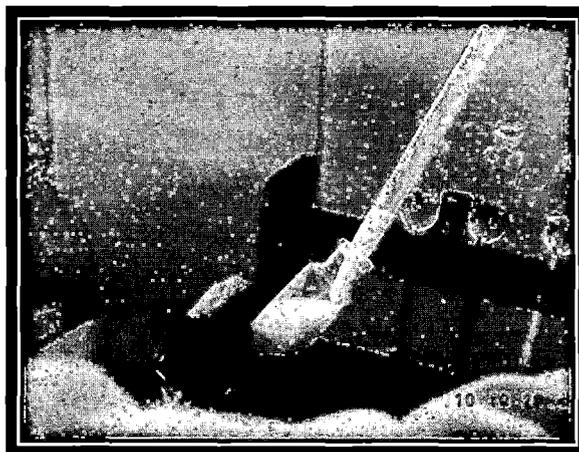
Fotografía 17: Reacción de la leche fresca con el alcohol



Fotografía 18: determinación de la densidad de la leche, mediante el uso del lactodensímetro



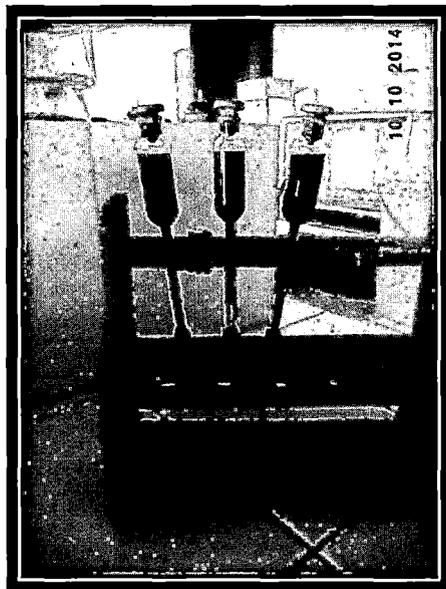
Fotografía 19: Adición de ácido sulfúrico al Butirómetro de Gerber



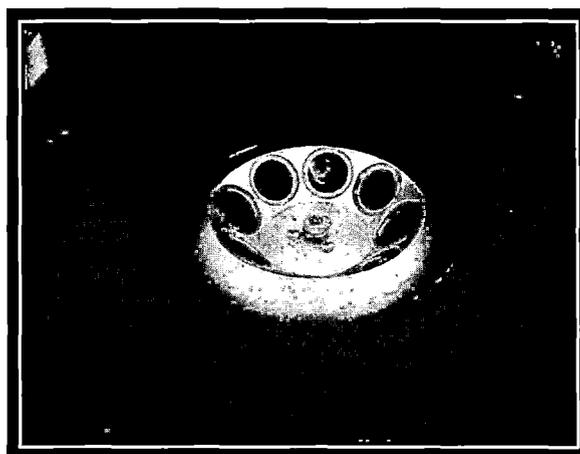
Fotografía 20: Adición de la muestra de leche al Butirómetro de Gerber



Fotografía 21: Agitación del Butirómetro de Gerber



Fotografía 22: Reacción producida luego de la agitación del Butirómetro de Gerber



Fotografía 23: Centrifuga Gerber

ANEXO 4

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS

4.1. Resultados de análisis de la densidad de la leche fresca

Nº de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	30	33	28	31	30	30	29	30	29,2	30
	30	34	29	31,1	31	30	30	29,5	29	29,8
	29,5	34	29,1	31,1	30	30	29,5	30	29,3	29,9
Promedio	30	33,7	28,5	31	30,3	30	29,5	30	29,2	29,9
Densidad corregida (°Quevenne)	30	33,67	28,50	31	30,33	30	29,5	30	29,17	29,9

4.2. Resultados de la lectura del pH

Nº de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	6,6	6,8	6,7	6,8	6,9	6,7	6,5	6,8	6,9	6,8
	6,7	6,7	6,8	6,8	6,8	6,5	6,6	6,7	6,8	6,7
	6,5	6,8	6,5	6,9	6,6	6,9	6,6	6,9	6,9	6,7
pH Promedio	6,6	6,8	6,7	6,8	6,8	6,7	6,6	6,8	6,9	6,7

4.3. Resultados de la determinación del % de acidez, número de Walker y % de caseína

Nº de muestra	Vol. NaOH (ml)	% de acidez	Nº de Walker	% de caseína
1	2	0,18	2	3,26
	2	0,18	2,1	3,42
	2	0,18	2	3,26
2	1,7	0,153	2,25	3,67
	1,7	0,153	2,2	3,59
	1,65	0,149	2,2	3,59

3	1,85	0,167	1,8	2,93
	1,95	0,176	1,7	2,77
	1,9	0,171	1,75	2,85
4	1,7	0,153	2,3	3,75
	1,7	0,153	2,35	3,83
	1,75	0,158	2,35	3,83
5	2,1	0,189	1,8	2,93
	2,05	0,185	2	3,26
	1,95	0,176	2,02	3,29
6	2,3	0,207	1,8	2,93
	2,1	0,189	2,01	3,28
	2,2	0,198	2,01	3,28
7	2,2	0,198	2	3,26
	2,1	0,189	2,05	3,34
	2,2	0,198	2,05	3,34
8	2,1	0,189	2	3,26
	2,2	0,198	2	3,26
	2,1	0,189	2,1	3,42
9	2	0,18	2	3,26
	1,9	0,171	2	3,26
	2	0,18	1,7	2,77
10	2	0,18	1,8	2,93
	2,05	0,185	1,9	3,1
	2	0,18	1,8	2,93

4.4. Resultados de la determinación de sólidos totales

N° de muestra	Masa de placa vacía	Masa de placa + muestra	Masa de placa + muestra seca	Masa de muestra	Masa seca	% de sólidos totales
1	42,4521	47,4825	43,0921	5,0304	0,64	12,7226463
	42,3151	47,3455	42,9675	5,0304	0,6524	12,9691476
	31,6321	36,6825	32,2543	5,0504	0,6222	12,3198163
2	35,3302	40,4085	35,9783	5,0783	0,6481	12,7621448
	36,1247	41,1775	36,697	5,0528	0,5723	11,3263933
	35,1602	40,202	35,8216	5,0418	0,6614	13,1183308
3	42,4505	47,508	43,0855	5,0575	0,635	12,5556105

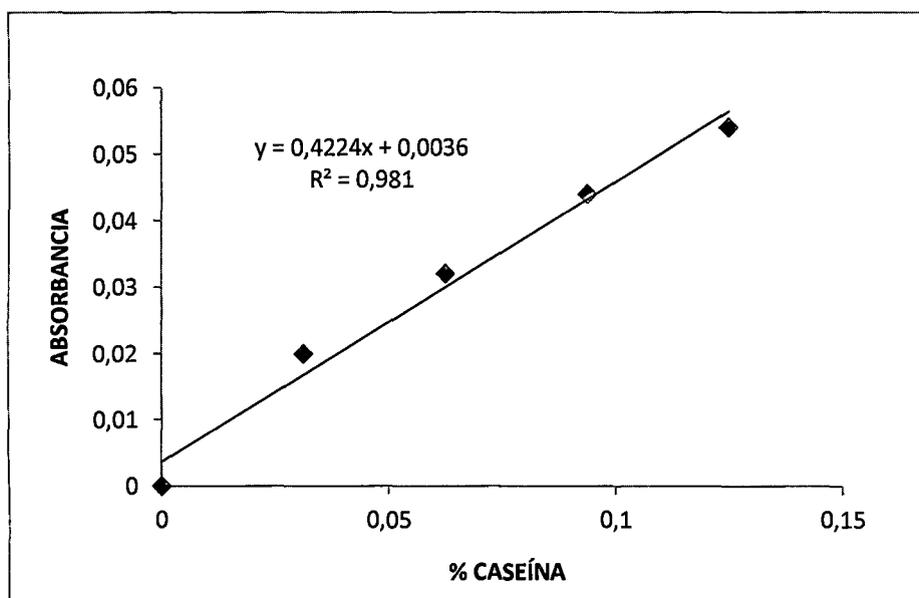
	42,3153	47,538	42,9664	5,2227	0,6511	12,4667318
	31,6346	36,7682	32,272	5,1336	0,6374	12,4162381
4	35,3309	40,4606	35,9709	5,1297	0,64	12,4763631
	36,1256	41,292	36,7876	5,1664	0,662	12,8135646
	35,1613	40,398	35,7869	5,2367	0,6256	11,9464548
5	36,5786	41,554	37,175	4,9754	0,5964	11,9869759
	42,3156	47,3645	42,9429	5,0489	0,6273	12,4244885
	28,1532	33,205	28,7881	5,0518	0,6349	12,5677976
6	35,3305	40,375	35,9208	5,0445	0,5903	11,7018535
	39,322	44,454	39,942	5,132	0,62	12,08106
	35,1607	40,2713	35,7907	5,1106	0,63	12,3273197
7	42,4518	47,4870	43,0718	5,0352	0,62	12,3133143
	42,3142	47,5542	42,8978	5,24	0,5836	11,1374046
	31,632	36,8451	32,2591	5,2131	0,6271	12,0293108
8	35,3300	40,5558	35,9438	5,2258	0,6138	11,7455701
	36,1245	41,168	36,7479	5,0435	0,6234	12,360464
	35,1600	40,1924	35,7775	5,0324	0,6175	12,2704872
9	42,4503	47,6954	43,0831	5,2451	0,6328	12,0645936
	42,315	47,3363	42,9113	5,0213	0,5963	11,8754108
	31,6339	36,6871	32,2614	5,0532	0,6275	12,4178738
10	36,5779	41,7211	37,21	5,1432	0,6321	12,290014
	42,3148	47,3580	42,9472	5,0432	0,6324	12,5396574
	28,1522	33,2086	28,777	5,0564	0,6248	12,3566174

4.5. Resultados de la determinación del porcentaje de grasa

Muestra	1	2	3
% de grasa	3,5	3,4	3,6
	3,4	3,5	3,5
	3,6	3,4	3,4
% de grasa promedio	3,5	3,43	3,5

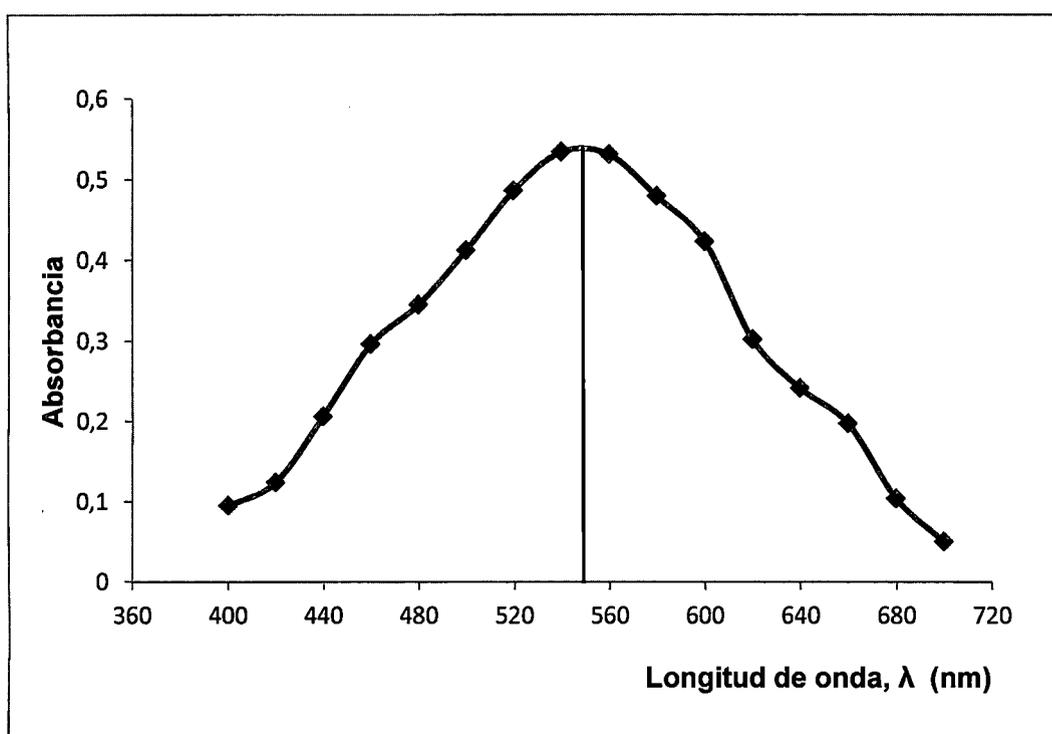
4.6. Determinación de la curva estándar

Tubo	Estándar 0,125g/100 ml	H ₂ O (ml)	Biuret (ml)	Concentración de caseína (%)	Absorbancia a 550 (nm)			Promedio de absorbancia
Blanco	0	10	10	0	0	0	0	0
1	2,5 ml	7,5	10	0,03125	0,02	0,02		0,02
2	5 ml	5	10	0,0625	0,032	0,032	0,032	0,032
3	7,5 ml	2,5	10	0,09375	0,044	0,044	0,044	0,044
4	10 ml	0	10	0,125	0,054	0,054	0,054	0,054



4.7. Determinación de la longitud de onda óptima

Longitud de onda (λ) nm	Absorbancia
400	0,095
420	0,124
440	0,206
460	0,296
480	0,345
500	0,412
520	0,486
540	0,534
560	0,531
580	0,479
600	0,423
620	0,302
640	0,241
660	0,197
680	0,104
700	0,05



4.8. Resultados de análisis espectrofotométrico

% de concentración = (Concentración estándar x Volumen de muestra tomada) / 10

% caseína calculada según dilución = (Absorbancia - 0,0036) / 0,4224

Factor de dilución = (Vol. de dilución (10 ml)) / % de concentración

% de caseína en la muestra = % caseína calculada según dilución x Factor de dilución

lectura en espectrofotómetro: se diluyó 0.5 ml de leche/100 ml de agua												
N° de muestra	Tubo de ensayo N°	Estándar (0.5 ml de leche/100ml)	agua (ml)	Biuret (ml)	Concentración (%)	Absorbancia a 550 nm			Promedio	% Caseína calculada según dilución	Factor de dilución	% Caseína en la muestra
1	1	2,5	7,5	10	0,125	0,023	0,021	0,023	0,0223	0,0443	80	3,548
	2	5	5	10	0,25	0,039	0,041	0,042	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,058	0,056	0,057	0,0570	0,1264	26,67	3,372
	4	10	0	10	0,5	0,073	0,077	0,076	0,0753	0,1698	20	3,396
2	1	2,5	7,5	10	0,125	0,025	0,021	0,022	0,0227	0,0451	80	3,611
	2	5	5	10	0,25	0,037	0,039	0,04	0,0387	0,0830	40	3,321
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,059	0,054	0,056	0,0563	0,1248	26,67	3,330
	4	10	0	10	0,5	0,071	0,075	0,073	0,0730	0,1643	20	3,286
3	1	2,5	7,5	10	0,125	0,024	0,025	0,02	0,0230	0,0459	80	3,674
	2	5	5	10	0,25	0,035	0,038	0,041	0,0380	0,0814	40	3,258
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,059	0,053	0,055	0,0557	0,1233	26,67	3,287
	4	10	0	10	0,5	0,07	0,073	0,075	0,0727	0,1635	20	3,270
4	1	2,5	7,5	10	0,125	0,02	0,024	0,022	0,0220	0,0436	80	3,485
	2	5	5	10	0,25	0,032	0,04	0,039	0,0370	0,0791	40	3,163
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,054	0,051	0,057	0,0540	0,1193	26,67	3,182
	4	10	0	10	0,5	0,071	0,073	0,074	0,0727	0,1635	20	3,270
5	1	2,5	7,5	10	0,125	0,021	0,023	0,022	0,0220	0,0436	80	3,485
	2	5	5	10	0,25	0,034	0,038	0,04	0,0373	0,0799	40	3,194
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,058	0,056	0,057	0,0570	0,1264	26,67	3,372
	4	10	0	10	0,5	0,072	0,077	0,076	0,0750	0,1690	20	3,381
6	1	2,5	7,5	10	0,125	0,026	0,02	0,021	0,0223	0,0443	80	3,548
	2	5	5	10	0,25	0,039	0,041	0,042	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,056	0,056	0,057	0,0563	0,1248	26,67	3,330
	4	10	0	10	0,5	0,073	0,077	0,074	0,0747	0,1682	20	3,365

7	1	2,5	7,5	10	0,125	0,023	0,021	0,024	0,0227	0,0451	80	3,611
	2	5	5	10	0,25	0,039	0,041	0,042	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,057	0,055	0,057	0,0563	0,1248	26,67	3,330
	4	10	0	10	0,5	0,073	0,077	0,076	0,0753	0,1698	20	3,396
8	1	2,5	7,5	10	0,125	0,023	0,02	0,024	0,0223	0,0443	80	3,548
	2	5	5	10	0,25	0,039	0,041	0,042	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,058	0,056	0,057	0,0570	0,1264	26,67	3,372
	4	10	0	10	0,5	0,073	0,077	0,076	0,0753	0,1698	20	3,396
9	1	2,5	7,5	10	0,125	0,023	0,022	0,021	0,0220	0,0436	80	3,485
	2	5	5	10	0,25	0,039	0,043	0,042	0,0413	0,0893	40	3,573
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,055	0,056	0,057	0,0560	0,1241	26,67	3,308
	4	10	0	10	0,5	0,073	0,077	0,076	0,0753	0,1698	20	3,396
10	1	2,5	7,5	10	0,125	0,023	0,021	0,024	0,0227	0,0451	80	3,611
	2	5	5	10	0,25	0,039	0,041	0,042	0,0407	0,0878	40	3,510
	3	7,5	2,5	10	0,375	0,054	0,056	0,055	0,0550	0,1217	26,67	3,245
	4	10	0	10	0,5	0,073	0,074	0,076	0,0743	0,1675	20	3,349

