



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Caracterización de leches con diferentes grados de estabilidad proteica**

**Erika Mabel Rodríguez Tavera**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de química  
Bogotá D.C, Colombia  
2012



# **Caracterización de leches con diferentes grados de estabilidad proteica**

**Erika Mabel Rodríguez Tavera**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Especialista en Ciencia y Tecnología de alimentos**

Director:

Zootecnista, M.Sc Carlos Fernando Novoa Castro

Línea de Investigación:

Tecnología y aseguramiento de calidad de leches y derivados

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de química  
Bogotá D.C, Colombia

2012

## Resumen

La leche cruda debe ser sometida a tratamiento térmico para su industrialización, debido a esto, la estabilidad térmica de la leche se usa como parámetro para evaluar la capacidad de resistir las altas temperaturas del procesamiento sin presentar coagulación o gelificación visibles. Entre los múltiples factores que ocasionan inestabilidad en la leche se encuentran: la raza, el polimorfismo genético de la caseína, la composición de la leche, pH de la leche, equilibrio mineral, dieta del animal y época del año.

En el presente trabajo se evaluará los contenidos de calcio iónico de las diferentes muestras; así como la correlación que existe con las pruebas de estabilidad térmica, en presencia de alcohol y el test de ramsdell, para establecer procedimientos en la evaluación de la estabilidad de proteína; que permitan a la industria tomar decisiones asertivas en el rechazo y tratamiento de la leche, con el fin de evitar los defectos (gelificación o coagulación dulce) que se presentan durante la vida en anaquel de los productos larga vida.

**Palabras clave:** proteína, leche, calcio iónico, estabilidad, test de ramsdell.

## Abstract

Raw milk must be subjected to heat treatment for its industrialization, because of this, the thermal stability of the milk is used as parameter to evaluate the ability to withstand the high processing temperatures without showing visible coagulation or gelation. Among

many factors that cause instability in milk there are: race, genetic polymorphism of casein, milk composition, milk pH, mineral balance, animal's diet and season.

In this paper we evaluate the calcium ion in different samples as well as the correlation with thermal stability tests in the presence of alcohol and Ramsdell test, to establish procedures for the evaluation of protein stability, to enable industry to make decisions assertive rejection and treatment of milk in order to avoid the defects (gelation or coagulation sweet) occurring during the shelf life of the products long life.

**Keywords: protein, milk, calcium ion, stability, test of Ramsdell.**



# Contenido

	Pág.
Resumen .....	IV
Lista de figuras .....	IX
Lista de tablas .....	X
Introducción.....	1
Justificación .....	2
Objetivos generales y específicos: .....	1
Objetivo general .....	1
Objetivos específicos.....	1
<b>2. Generalidades .....</b>	<b>3</b>
2.1 Revisión del estado del arte.....	3
2.2 Proteínas de la leche .....	4
2.3 Interacciones y características morfofuncionales de las caseínas.....	6
1.3.1. Modelos de subunidades.....	7
2.4 Factores que afectan la estabilidad de las proteínas:.....	9
<b>3. Metodología .....</b>	<b>17</b>
3.1. Diseño experimental y muestreo.....	17
3.1.1. Diseño experimental .....	17
3.1.2. Muestreo .....	17
3.2. Análisis de Estabilidad de proteína .....	18
3.2.1. Revisión de los protocolos de análisis existentes.....	18
3.2.2. Prueba de Estabilidad empleando alcohol etílico .....	18
3.2.3. Prueba de Termoestabilidad o tiempo de coagulación térmico (TCT) .....	19
3.2.4. Test de Ramsdell.....	19
<b>4. Resultados obtenidos .....</b>	<b>21</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
<b>6. Recomendaciones.....</b>	<b>29</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>31</b>

<b>8. ANEXO .....</b>	<b>33</b>
<b>9. Materiales y equipos.....</b>	<b>33</b>
9.1. Materiales.....	33
9.2. Equipos.....	33



## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Modelos de las subunidades de miscelas de caseína.....	12
<b>Figura 2:</b> Protocolo estabilidad de proteína prueba de alcohol .....	22
<b>Figura 3:</b> Protocolo estabilidad térmica de proteína.....	22
<b>Figura 4:</b> <i>Score plot</i> categoría de tanques.....	23
<b>Figura 5:</b> <i>Loading plot</i> comportamiento de las variables.....	24
<b>Figura 6:</b> Detección de datos anómalos.....	25
<b>Figura 7:</b> Árbol CART para clasificación de estabilidad de leche.....	25

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1:</b> Composición química de la leche.....	7
<b>Tabla 2:</b> Principales componentes de la leche.....	8
<b>Tabla 3:</b> Análisis de muestras y diseño.....	20
<b>Tabla 4:</b> Criterios para evaluar la calidad de la clasificación.....	26
<b>Tabla 5:</b> Matriz de confusión.....	27

## Introducción

La estabilidad térmica se refiere a la capacidad de la leche para resistir a altas temperaturas de procesamiento, sin presentar coagulación o gelificación visibles (Singh2004). Entre los múltiples factores que ocasionan inestabilidad de la leche, se encuentran la raza (Hernández & Ponce, 2005), el polimorfismo genético, de la caseína (Williams, 2002; Raynal-Ljutovac et al.,2007), la composición de la leche (Williams, 2002;Hernández & Ponce, 2005), el pH de la leche (Guo et al.,1998; O'Sullivan et al., 2001), el equilibrio mineral (Guo et al., 1998; Williams, 2002; Raynal-Ljutovac et al., 2007)y el tratamiento térmico (Williams, 2002; Hernández & Ponce, 2005).

La inestabilidad no sólo se debería a la actividad proteolítica, sino también a procesos fisicoquímicos en la micela de caseína (Venkatachalam et al., 1993). Es así como frecuentemente las muestras de leche resultan positivas a la prueba de alcohol, sin estar ácidas (Ponce & Hernández, 2001). Esta prueba es aplicada en las plantas procesadoras, durante la recepción de la leche, para detectar problemas de termoestabilidad en la leche cruda (Guo et al., 1998; Raynal-Ljutovac et al., 2007). En ella, se puede observar la desestabilización coloidal de la micela de caseína, por el efecto desnaturador del alcohol (O'Connell et al., 2001).

A pesar de ser conocidos los factores de la industria y de la leche que ocasionan la inestabilidad, no hay claridad sobre cuales factores de manejo predial generarían dicha inestabilidad. Según Auld et al.(2007), hay condiciones climáticas y ambientales que pueden afectar la estacionalidad de la producción de leche, no obstante existe escasa información sobre el impacto de estos factores en vacas a pastoreo. La calidad de la ración recibida por el rebaño lechero y, en particular, el tipo de proteína y el balance iónico cumplirían un rol relevante en la estabilidad de la leche.

La leche cruda debe ser sometida a tratamiento térmico como paso tecnológico obligatorio para su industrialización, debido a esto, la estabilidad térmica de la leche se usa como parámetro para evaluar la capacidad de resistir las altas temperaturas del procesamiento sin presentar coagulación o gelificación visibles<sup>1</sup>. Entre los múltiples factores que ocasionan inestabilidad en la leche se encuentran: la raza<sup>2</sup>, el polimorfismo genético de la caseína<sup>3</sup>, la composición de la leche<sup>4</sup>, pH de la leche<sup>5</sup>, equilibrio mineral<sup>6</sup>, dieta del animal y época del año.<sup>7</sup>

De acuerdo con la legislación colombiana (Decreto 616 de 2006) la leche debe presentar una acidez de 0,13 a 0,17%. Entre los ensayos exigidos para rechazar la leche cruda entera se encuentra la prueba del alcohol, que presenta un resultado positivo para leches demasiado ácidas y/o que presentan inestabilidad a la prueba del alcohol, pero se ha demostrado que no es un buen indicador<sup>8</sup> que presenta falsos positivos, representado un problema para los productores de leche.

---

<sup>1</sup> Singh, H. Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, v.57, p. 111-119, 2004

<sup>2</sup> Hernández, R.; Ponce, P. efecto de 3 tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. *Zootecnia tropical*, v.23, p. 295-310, 2005.

<sup>3</sup> Williams, R. P. W. The relationship between the composition of milk and the properties of bulk milk products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v.57, p. 30-44, 2002; Raynal-Ljutovac, K; Park, Y.W; Gaucheron, F.; Bouhallab, S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 207-220, 2007

<sup>4</sup> Williams, 2002; Hernández & Ponce, 2005

<sup>5</sup> Gou, M.; Wang, S.; Li, Z.; Qu, J.; Jin, L.; Kindstedt, P. ethanol stability of goat's milk: review 1968-1979. *International Dairy Journal*, 8, 57-60, 1998

<sup>6</sup> Guo et al., 1998; Williams, Raynal-Ljutovac et al., 2007.

<sup>7</sup> C. Barchiesi; P. Williams; S. Salvo, Inestabilidad de la leche asociada a componentes lácteos y estacionalidad en vacas a pastoreo. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42, 1785-1791, 2007.

<sup>8</sup> Chavez M., Negri L., Taverna M. y Robert L. Factores que afectan el resultado de la prueba del alcohol en leches con bajos recuentos de bacterias totales. *Revista Argentina de producción animal*, 21, 275 (2001)



## Justificación

Durante años se han investigado la relación existente entre los componentes de la leche y su estabilidad térmica. Por ejemplo, Negri y colaboradores<sup>9</sup> demostraron que el tiempo de coagulación térmico (TCT) depende de la concentración de calcio (iónico y total), sodio más potasio, urea, proteína sérica, potasio y pH de la leche.

Es importante caracterizar muestras de leches que den resultado positivo y negativo a la prueba del alcohol y comparar con su estabilidad térmica; así como con la prueba usada a nivel industrial (test de ramsdell), y sus características fisicoquímicas, dando pie a futuras investigaciones que permitan conocer los factores que causan estas distorsiones en el control de calidad de la leche cruda, evitando rechazos innecesarios de la leche a los ganaderos, pero asegurando una materia prima estable térmicamente como la requieren algunos procesos de industrialización de la leche, pues últimamente el rechazo de la leche cruda debido a la prueba del alcohol se ha hecho más frecuente, causando enormes pérdidas.

El incremento de productos elaborados utilizando como materia prima la leche se debe principalmente a las características que ésta presenta, ya sea, por su composición y su

---

<sup>9</sup> Negri L., Chavez M., Taverna M., Cuatrín A., Rubiola A. Determination of variables affecting thermal milk stability using a capillary method for evaluation of thermal coagulation time

uso universal en la alimentación. La leche posee diversos usos en el ámbito industrial, por lo cual es importante caracterizar su composición y los factores que la afectan.

Las proteínas representan uno de los componentes de la leche con mayor valor nutritivo y de importancia en su procesamiento, y en la estabilidad frente a tratamientos térmicos. Así mismo, los minerales calcio y fósforo que forman parte del equilibrio del complejo micelar, poseen una marcada influencia en la estabilidad de la leche, debido a las modificaciones que se producen en el contenido de las fases solubles y coloidal por efecto de los tratamientos térmicos.

En diversos estudios se ha descrito que las variantes genéticas de las proteínas poseen influencia en las propiedades de la leche, especialmente con relación a las variantes A y B de k-caseína. Se ha especificado que la variante genética B de k-caseína influye en forma positiva tanto en el contenido de proteína como en el equilibrio físico químico de las sales, otorgándole a la leche una mayor estabilidad en aquellos procesos que involucran tratamientos térmicos.

En el presente trabajo se evaluará los contenidos de calcio iónico de las diferentes muestras; así como la correlación que existe con las pruebas de estabilidad térmica, en presencia de alcohol y el test de ramsdell, para establecer procedimientos en la evaluación de la estabilidad de proteína; que permitan a la industria tomar decisiones acertivas en el rechazo y tratamiento de la leche, con el fin de evitar los defectos (gelificación o coagulación dulce) que se presentan durante la vida en anaquel de los productos larga vida.





## **Objetivos generales y específicos:**

### **Objetivo general**

- Caracterizar y categorizar muestras de leches en rangos de estabilidad alta y estabilidad baja.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la relación entre las características fisicoquímicas de la leche (pH, acidez titulable, calcio iónico, estabilidad al etanol) y los resultados de la prueba de tiempo de coagulación térmico y estabilidad del test de ramsdell.
- Verificar la relación entre los parámetros fisicoquímicos analizados y la estabilidad térmica en la leche cruda entera mediante herramientas estadísticas.
- Evaluar la efectividad de la prueba del alcohol como indicador para predecir la estabilidad térmica.
- Evaluar la relación entre los parámetros de estabilidad térmica y la prueba de estabilidad del test de ramsdell.



## 2. Generalidades

### 2.1 Revisión del estado del arte

La leche es el producto normal de secreción de la glándula mamaria. La leche es un producto nutritivo complejo que posee más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en solución, suspensión o emulsión en agua. Por lo que se altera muy fácilmente, especialmente bajo la acción del calor, numerosos microorganismos pueden proliferar en ella, se considera un alimento altamente perecedero y debe ser enfriado a 4°C lo más rápidamente posible después de su recolección. Las temperaturas extremas, la acidez o contaminación por microorganismos pueden deteriorar su calidad rápidamente (Wattiaux, 2000). En la Tabla 1 muestra la composición química de la leche y en la Tabla 2 los principales componentes presentes en la leche

Tabla 1. Composición química de la leche

<b>Constituyente Principal</b>	<b>Valor medio %</b>	<b>Limites de variación %</b>
Agua	87,5	85 – 89,5
Sólidos totales	13,0	10,5 – 14,5
Grasa	3,9	2,5 – 6,0
Proteínas	3,4	2,9 – 5,0
Lactosa	4,8	3,6 – 5,5
Minerales	0,8	0,6 – 0,9

Ruegg, 2002

Tabla 2. Principales componentes de la leche

Componentes	Porcentaje aproximado
Grasa	3,80
Proteína	3,38
Lactosa	5,0
Sales	0,90
Agua	87
Pigmentos	Caroteno, riboflavina, xantofila
Enzimas	Lipasas, proteasas, reductasas, fosfatasa, lactoperoxidasas
Vitaminas	A, D, E, K, C y grupo B
Gases	Oxígeno, nitrógeno, CO <sub>2</sub> amoníaco
Volátiles	Parafinas, volátiles extraños
Material celular	Células epiteliales, leucocitos
Micro organismos	Bacterias, hongos, levaduras
Contaminantes	Semillas, paja, urea, desinfectantes

McDonald *et al.*, 1999.

## 2.2 Proteínas de la leche

La proteína en leche se distribuye entre las caseínas (76%), proteínas del suero (18%) y nitrógeno no proteico (6%) como se muestra en el Cuadro 3. La caseína se encuentra en la leche en forma de agregados llamados micelas, las micelas de caseína se encuentran en equilibrio con la caseína en solución, así como con el Ca y P, esta caseína está formada por  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  y  $\kappa$ - caseína (Alais, 1998 ).

La  $\alpha$  – caseína, contiene 199 restos de amino ácidos. Es un compuesto estratificado con fósforo y 12 grupos carboxilo, lo que le confiere una carga neta negativa, que es altamente sensible al Ca. Tiene un peso molecular de 23,000 Daltons y corresponde al 50% de la micela, aproximadamente a partir de la mitad de la porción terminal existe una alta proporción de grupos no polares, ésta es la porción hidrofóbica, que puede establecer una asociación tipo hidrofóbica dependiente de la temperatura. Otra característica importante es que a pH y temperatura normal de la leche es insoluble (Akers, 2000).

La  $\beta$  – caseína está constituida por 209 restos de aminoácidos. Es sensible al calcio, debido a la presencia de una carga neta negativa causada por la esterificación con fósforo. Su peso molecular es de 24,500 Daltons. La beta caseína tiene la propiedad de lograr una mayor solubilidad conforme baja la temperatura, además es insoluble al pH, fuerza iónica y temperatura normal de la leche (Fox y McSweeney, 1998).

La  $\kappa$  – caseína, es la proteína considerada como responsable de la estabilidad de la micela. Está constituida por 169 restos de aminoácidos. Existe como un agregado ligado con enlaces disulfuro. Posee un peso molecular de 19,000 Daltons como monómero y una porción con estructura globular, con dos grupos sulhidrilos sensibles al calcio (Holt, 1998). Entre los aminoácidos 105 y 106 es el sitio de ataque de la renina dividiendo a la Kappa caseína en dos porciones, una que contiene a la región globular y que recibe el nombre de para – Kappa caseína de peso molecular de 13,000 Daltons y pasa a formar parte del coagulo, la otra porción se denomina macropéptido con un peso molecular de 6,000 Daltons tiene la particularidad de poseer cadenas de carbohidratos (glucosa, galactosamina y ácido Siálico) que le confieren la propiedad de ser altamente hidrofílico. Se cree que es el macropéptido el que estabiliza a la Kappa caseína y a todas las caseínas.

La  $\gamma$  – caseína, es una mezcla de caseínas, se considera como porciones terminales de la beta caseína puesto que posee la misma secuencia de la porción terminal (Holt, 1994).

Las proteínas del suero, incluyen:  $\beta$  – Lactoglobulina,  $\alpha$  – Lactoalbumina e inmunoglobulinas.

La  $\beta$  – Lactoglobulina, tiene un peso molecular de 18,300 Daltons, formada por 162 restos de aminoácidos con dos puentes disulfuro y un grupo sulhidrilo, lo que la hace altamente reactiva (Hambling et al., 1992).

La  $\alpha$  – Lactoalbúmina, formada por 123 restos de aminoácidos y 4 puentes disulfuro, con un peso molecular de 14, 200 Daltons. Esta proteína además de su función nutritiva posee una función biológica que es la de formar parte de la enzima lactosa – sintetasa (Hambling et al., 1992).

Las inmunoglobulinas, suelen ser monómeros y polímeros, son anticuerpos. Entre las inmunoglobulinas más importantes están las euglobulinas que actúan como pegamento

entre los glóbulos de grasa durante la formación de la capa de crema y de la mantequilla (Hambling et al., 1992).

## 2.3 Interacciones y características morfofuncionales de las caseínas

La formación de las micelas de caseína depende de los fenómenos de interacción que se establecen entre ellas, en presencia del ion calcio. De acuerdo con Brule y Lenoir (1989), la composición y estructura primaria de las caseínas les confieren importantes propiedades fisicoquímicas de interés funcional como: a) marcado carácter aniónico en medio neutro por la presencia de radicales fosfoserina y/o ácido glutámico; b) insolubilidad en agua a pHi (pH = 4.6 para la caseína entera o bruta) por la elevada proporción de radicales apolares y c) agregación en medio cálcico de las caseínas  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 y  $\beta$  por disminución de su carga eléctrica negativa y de su hidrofilia, como consecuencia de la complejación del  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de los radicales fosfoserina presentes en la estructura de dichas caseínas. Este comportamiento corresponde a las caseínas consideradas de forma aislada, pero en presencia de  $\kappa$ -CN en proporción suficiente, cercana al 10%, las demás caseínas son solubles en presencia de calcio.

El poder estabilizante de la  $\kappa$ -CN se relaciona directamente con la marcada tendencia asociativa típica de todas las caseínas (Darling y Dickson, 1979; Mercier et al., 1972). En soluciones puras, a pH neutro y en ausencia de calcio las caseínas presentan una tendencia a polimerizarse en grados variables según el tipo de caseína de que se trate, mayor en el caso de las caseínas  $\beta$  y  $\kappa$ , en las que la repartición desigual de las cargas les confiere características detergentes (Brule y Lenoir, 1989). En medio acuoso se asocian a través de enlaces hidrofóbicos, lo que se traduce en repulsión de las zonas hidrofílicas hacia el exterior de los polímeros caseínicos. La asociación de las caseínas  $\alpha$ S parece que se produce principalmente por enlaces electrostáticos, al presentar éstas un reparto más homogéneo de las cargas.

Cuando se mezclan los diferentes tipos de caseína, su carácter anfifílico y su fosforilación y facilita las interacciones entre ellas y con el fosfato cálcico para formar complejos (Varnam y Sutherland, 1995; Swaisgood, 1996). En ausencia de calcio las asociaciones se establecen a partir de las zonas hidrofóbicas y de las cargadas eléctricamente, pero en presencia de

calcio intervienen enlaces entre los radicales fosfoserina de las caseínas y los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y el grado de asociación aumenta considerablemente. Entre 0 y 4°C sólo las caseínas  $\beta$  y  $\kappa$  son solubles a una concentración 0,03 M de calcio. Sin embargo a esa misma concentración y a temperatura entre 20 y 25°C sólo es soluble la  $\kappa$ -CN. Por su baja solubilidad en presencia de calcio, las caseínas  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 y  $\beta$  se conocen como caseínas “sensibles al calcio”.

### **1.3.1. Modelos de subunidades**

Estos modelos consideran que la micela de caseína está dividida en subunidades individuales denominadas submicelas que pueden tener una composición idéntica o variable entre sí (Figura 1). La existencia de submicelas se ha fundamentado ampliamente en base a métodos físico-químicos (Creamer, 1991, Kumosinski et al., 1991, Rollema, 1992 y Farrell et al., 1994) como la disociación de las micelas en submicelas o el análisis de submicelas de caseinato sódico y su sucesivo crecimiento por adición de calcio. La estructura submicelar también ha sido defendida mediante observación con microscopía electrónica (Schmidt y Buchheim, 1970; Kalab et al., 1982 y Carrol et al., 1985) y estudio con dispersión de neutrones (Stothart y Cebula, 1982; Lomholt, 199





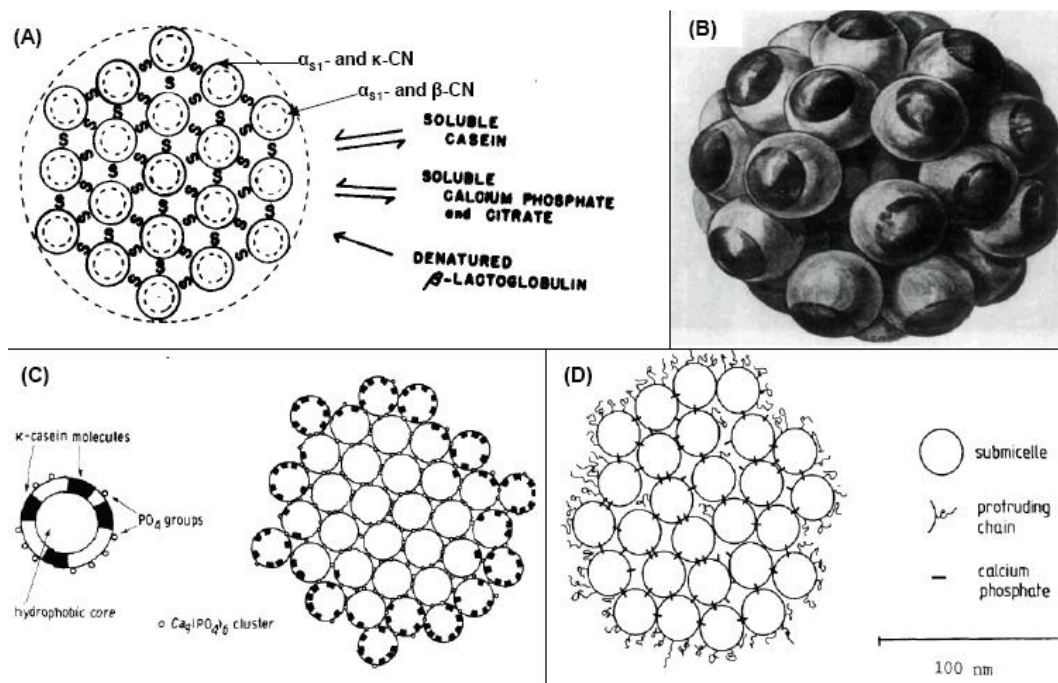


Figura 1: Modelos de subunidades de la micela de caseína. A) Morr (1967); B) Slattery y Evard (1973); las superficies claras representan los polímeros de  $\alpha_{s1}$ - y  $\kappa$ -CN (áreas hidrofóbicas) y las superficies oscuras que cubren una quinta parte del área de la superficie representan los polímeros de  $\beta$ -CN (área hidrofílica). C) Schmidt (1982); D) Walstra y Jenness (1984).

## 2.4 Factores que afectan la estabilidad de las proteínas:

### 1.4.1. Polimorfismo genético de las proteínas de la leche.

Se han descubierto proteínas muy semejantes entre sí, ya sea en composición, peso molecular y propiedades, las que representan varias formas genéticas de una misma proteína. Las variantes genéticas se designan por las letras A, B, C. Es así, como existen individuos homocigotos (AA, BB, CC) y heterocigotos (AB, AC, BC) (ALAIS, 1985). Aschaffenburg citado por GONZÁLEZ de LLANO, 1990), sostiene que las variantes genéticas de las proteínas, son producto de genes alélicos, autosomales y codominantes que se transmiten en forma de herencia mendeliana simple.

Existen distintas variantes genéticas, cuya diferencia radica fundamentalmente en la sustitución de unos cuantos aminoácidos en la secuencia de su estructura primaria. Estas pequeñas modificaciones pueden traducirse en un cambio importante de sus propiedades (NG-KWAI-HANG, 1997; BADUI, 1984; VEISSEYRE, 1980). ALAIS (1985),

sostiene que las diferencias entre las variantes genéticas son la causa de los distintos comportamientos que posee una determinada leche frente a un tratamiento industrial. Por ejemplo, BADUI (1984), menciona que la  $\gamma$ -caseína tiene una secuencia de aminoácidos muy parecida a una fracción de la molécula de  $\beta$ -caseína, y por lo tanto la  $\gamma$ -caseína se considera como resultado de una degradación o una síntesis incompleta de la  $\beta$ -caseína.

Estas variantes genéticas han sido detectadas en varias proteínas de la leche, incluyendo, caseína  $\alpha_1$ , caseína  $\alpha_2$ , caseína  $\beta$ , caseína  $\kappa$ ,  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina (NG-KWAI-HANG, 1997).

El efecto de las variantes genéticas sobre la composición y propiedades tecnológicas de la leche ha sido objeto de diferentes estudios. De acuerdo a ROBITAILLE (1995), el polimorfismo genético afecta la producción de leche y también su composición, otorgándole a la leche diferencias en las características tecnológicas, como por ejemplo, la estabilidad frente a tratamientos térmicos, tiempo de coagulación, entre otros, los cuales son de suma importancia para la industria láctea. Así mismo JAKOB (1994), señala la importancia que han alcanzado las variantes genéticas de las proteínas, debido a que éstas se han relacionado fundamentalmente con la aptitud quesera de la leche.

Estas diferencias que aún se encuentran entre las diferentes variantes genéticas, corresponderían a factores influyentes como la alimentación de las vacas, edad, estado fisiológico, estado de salud, raza, estación del año, entre otros (NG-KWAI-HANG, 1997; McLEAN et al., 1984).

NG-KWAI-HANG et al. (1986), realizaron un estudio en el cual una mayor producción de leche se encontraba asociada a la presencia de los fenotipos BB de la caseína  $\alpha_1$ , A1A3 de  $\beta$ -caseína, AA  $\kappa$ -caseína y AA de la  $\beta$ -lactoglobulina.

FITZGERALD y HILL (1997), señalan que la variante B de  $\kappa$ -caseína otorga a la leche un menor tiempo de coagulación y forma una cuajada más firme, esta misma variante es asociada a una menor proteólisis en la maduración de quesos.

En cuanto a la composición mineral Berg et al. citados por HORNE y MUIR 1994), señalan que leches con presencia del genotipo BB de  $\kappa$ -CN presenta un mayor contenido

de ión calcio. DALGLEISH (1989) y DELACROIX – BUCHET et al. (1993), encontraron que leches que poseían la variante B de  $\kappa$ - caseína presentaban un tiempo de coagulación menor, que aquellas leches que presentan la variante A de  $\kappa$ -caseína. Esta situación tendría relación con el tamaño de la micela y también a la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  libres.

VEISSEYRE (1980), revela que se ha demostrado que leches que contienen únicamente la variante  $\alpha_1$  A, tienen una velocidad de acidificación pequeña y producen una cuajada blanda con respecto a las leches que sólo contienen caseína  $\alpha_1$  BC.

McLEAN et al. (1984), señalan una relación entre la termoestabilidad de leches concentradas y el polimorfismo de las proteínas lácteas, la cual especifica que en leches con  $\kappa$ -caseína B son más estables al calor que las leches con  $\kappa$ - caseína AB y éstas más estables que la  $\kappa$ -CN A. La diferencia podría ser explicada debido a la variación de la composición y tamaño de las micelas, debido principalmente a que las leches que presentan la  $\kappa$ -caseína B poseen una mayor cantidad de micelas pequeñas, proporcionándole así una mayor estabilidad.

ROBITAILLE (1995), estudió la influencia de la  $\kappa$ -caseína (variantes AA, AB) y de la  $\beta$ -lactoglobulina (variantes AA, AB, BB), obteniendo como resultado que la máxima estabilidad térmica se encontraba en leches con la presencia del genotipo AA de  $\kappa$ -CN en comparación con leches que presentaban el genotipo AB. En cuanto a la influencia de la  $\beta$ -Lg, sólo era significativo cuando se encontraba presente la  $\kappa$ -CN AA, hallándose que la  $\beta$ -Lg AA poseía mayor termoestabilidad que la  $\beta$ -Lg BB.

En un experimento se determinó la estabilidad térmica en algunas variantes de  $\kappa$ -caseínas, obteniéndose como resultado que  $\kappa$ -caseína BB posee una mayor estabilidad que  $\kappa$ -caseína AB y ésta a su vez que la  $\kappa$ -caseína AA (Schulte y Coerne et al. citados por JAKOB (1994).

## 1.4.2. Minerales de la leche

Los minerales en la leche se presentan en dos estados: disolución y coloidal. En el estado de disolución se encuentran los cloruros, fosfatos solubles e indicios de sulfatos, yoduros, fluoruros y bromuros, el sodio y potasio, además, también se encuentra parte de calcio. En tanto, dentro de la fase coloidal, los minerales que se encuentran en mayor proporción son el calcio y el fósforo, los que se acompañan de pequeñas cantidades de magnesio y ácido cítrico (CASADO y GARCÍA 1985; RENNER 1983; CASADO y GARCÍA 1982).

El calcio y fósforo presentes en la leche se encuentran formando las micelas de fosfocaseinato cálcico, teniendo una participación clave en la termoestabilidad de la leche (CASADO y GARCÍA, 1985). FAO (1981), agrega que el calcio y fósforo forman el fosfato cálcico en la leche, esta sal disminuye su solubilidad a medida que se incrementa la temperatura, hasta que a temperaturas altas comienza a precipitar (efecto de leches sobrecalentadas ó sobre pasteurizadas), produciendo coagulaciones defectuosas.

La proporción de las concentraciones de las sales de la leche desempeña un rol importante en la estabilidad térmica de los productos lácteos, de tal forma que los iones calcio y magnesio tienden a inestabilizar el sistema proteico, mientras que los citratos y fósforo lo estabilizan (BADUI, 1984). DALGLEISH (1989), concuerda con este principio, agregando que es aplicado en la elaboración de leches concentradas o evaporadas, en donde, se hace necesario añadir fosfatos o citratos para impedir la coagulación de las proteínas durante el proceso de esterilización.

El calcio es fundamental para producir la coagulación de la leche mediante el cuajo (ALAIS, 1985). LUCEY y FOX (1993) y McMAHON *et al.* (1984), argumentan que un nivel adecuado de calcio en la leche favorece la coagulación de las caseínas *a* y *b*. Las caseínas son precipitadas por el ión  $Ca^{++}$  cuando se han separado de la *k*-caseína, produciéndose una última hidrólisis enzimática al nivel de los aminoácidos 105 – 106 (fenilalanina – metionina), liberándose la fracción soluble del glicomacropéptido. La precipitación producida de las caseínas se conoce como cuajada. Así mismo, pequeños cambios en la concentración de iones afecta la velocidad de coagulación y cuerpo de la cuajada (LUCEY y FOX, 1993).

Además, se debe señalar que en aquellas vacas que padecen de mastitis segregan leches con un alto contenido de cloruros, por lo que la concentración de estos aniones

indican un índice de sanidad de las vacas (CASADO y GARCÍA, 1985; BADUI, 1984). Del mismo modo, WHEELLOCK (1980), estableció que niveles altos de cloruros, así como también, contenidos bajos de potasio en la leche podrían revelar serios daños en la glándula mamaria.

### **1.4.3. Presencia de células somáticas y plasmina.**

En años recientes, una mayor preocupación y conocimiento por parte del consumidor se ha enfocado en la calidad de la leche y seguridad de los alimentos de la industria lechera. La principal preocupación ha sido por los residuos de antibióticos y bacterias de origen alimentario en la leche. Además de esas preocupaciones, la industria cada vez exige más a los productores leche de mayor calidad, medida a través de menores células somáticas para asegurar una elevada producción y una vida de anaquel prolongada.

El Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche (COFOCALEC) menciona que la leche con células somáticas altas contiene menor cantidad de componentes deseables como lactosa, proteína, caseína y grasa, y mayor cantidad de enzimas indeseables, como la lactasa, plasmina y lipasa. Esto coincide con los resultados de Philpot y Nickerson (1991); Korhonen y Kaartinen (1995), Kelly et al., (2000) encontraron que una elevada CCS puede alterar la distribución de la fracción proteica, es decir disminuyen los niveles de caseína y lactosa en leche. Kelly y McSweeney (2002) reportaron que las células somáticas, son la principal función fisiológica con la cual se defiende la ubre de infecciones, contiene lisosomas que aumentan la actividad proteolítica de las enzimas (i.e. elastasa, colagenasa y catepsina).

La plasmina juega el papel principal dentro de las enzimas proteolíticas en la leche. La plasmina puede rápidamente desnaturalizar ambas caseínas ( $\beta$ ,  $\gamma$ ) y pequeños polipéptidos (Le Bars y Gripon, 1993).

El incremento en la actividad de la plasmina, es el principal factor responsable de características indeseables en la coagulación y degradación de la caseína en la leche (Urech, 1999), y la posterior reducción en producción de queso, además de los cambios en funcionalidad de las proteínas durante el cuajado.

En un caso de mastitis la células somáticas en leche se incrementa rápidamente, debido al masivo flujo de leucocitos polimorfonucleares (LPM), (Ostensson, 1993). Las células somáticas en leche contienen cadenas proteolíticas y otras enzimas, que significan la calidad de los productos lácteos.

Leche con Células somáticas es correlacionada con la actividad proteolítica (Saeman, et al., 1988), pero no del todo, debido a la secreción de plasmina en leche, con el resto de proteinasas lisosomales de las células somáticas. Durante una infección con mastitis la actividad de la plasmina puede llegar a un máximo antes que las proteinasas de las células somáticas (Michelutti et al., 1999). Las proteinasas mejor caracterizadas en las células somáticas de la leche es la proteinasa aspártica lisosomal y catepsina D. La catepsina es similar a la proteinasa quimosina y pepsina, tiene preferencia por los residuos de amino ácidos hidrofóbicos. La catepsina está presente principalmente en la fracción de la leche (Larsen et al., 1996). Está en la leche ya que esta enzima es secretada por las células epiteliales mamarias, mamocitos y activan a los linfocitos (Hurley et al., 2000). El nivel de catepsina es correlacionado significativamente con cuenta de células somáticas (O'Driscoll et al., 1999).

La catepsina puede activar los neutrófilos y linfocitos a través de regular los receptores de su superficie (Hurley et al., 2000) y esto puede sugerir que la catepsina D tiene una función inmune en la defensa del neonato (Munro, et al 1984).

Un factor que influencia la importancia de la catepsina D en los productos lácteos es la pasteurización de la leche, donde se a reportado que sobrevive (Hayes et al., 2001) encontró evidencia de actividad de proteólisis de la catepsina D en queso tipo suizo.

La contribución de las proteínas de los leucocitos en la proteólisis en queso durante la maduración fue estudiado por Considine (2000), aisló células somáticas de leche mastítica y las adicionó a leche normal, en niveles correspondientes de 0 a  $1.2 \times 10^6$  cél/ml leche; elaboró quesos miniatura tipo Cheddar (20gr). Los quesos hechos con esta leche incrementaron los niveles de células somáticas por la mezcla y también contenían péptidos los cuales no estaban presentes en el control y donde no hubo características de la acción de la quimosina o plasmina sobre las caseínas, sugiere el papel de las proteinasas de leucocitos como la catepsina D en la maduración de los quesos

Plasmina. La presencia de plasmina en leche y la significancia sobre la calidad de los productos lácteos ha sido reconocida por muchas décadas (Bastian y Brown, 1996). Sin embargo, otras enzimas proteolíticas están presentes en la leche las cuales son originadas por las células somáticas. La principal función fisiológica de estas células es la defensa de la ubre contra una infección bacteriana, tienen lisosomas los cuales activan las enzimas proteolíticas, incluye elastasa, colagenasa y catepsinas B, D, G, H y L.

La plasmina es una proteinasa tripsina-serina que se activa óptimamente a un pH alrededor de 7.5 y 37°C (Bastian y Brown, 1996). La función fisiológica de la plasmina es la solubilización de fibras. Es un componente del complejo sistema de la activación de la enzima zimogénico, plasminógeno, activador de plasminógeno (AP) e inhibidor de plasmina y AP, todos presentes en la leche (figura 1). La función fisiológica en la sangre no es sorprendente la actividad de la plasmina de activadores e inhibidores. El plasminógeno no es expresado en la glándula mamaria (Berglund et al., 1995) y consecuentemente el origen de la plasmina y plasminógeno en leche proviene de la sangre. La concentración de plasmina en leche y sangre es de 0.3 y 200 mg/l respectivamente (Halpaap et al., 1977).

La plasmina y plasminógeno está asociado con las micelas de caseína en la leche, muchos autores reportan la presencia en leche en la membrana de glóbulo de grasa (Benfeldt et al., 1995) donde probablemente debido a la contaminación de la membrana con caseína. Plasmina libera las micelas de caseína a pH debajo de 4.6 o por adición de 1 mol/l de NaCl, pero la temperatura tiene alta influencia sobre la interacción de la plasmina con las caseínas (Grufferty y Fox, 1988).

Factores que afectan la actividad de la plasmina en leche. La variación en la actividad de la plasmina en leche, puede elevarse debido a la alteración en el transporte de la enzima de la sangre o diferentes grados de plasminógeno. Uno de los factores más significativos que afectan la actividad de la plasmina es la etapa de lactación. La actividad de la plasmina y plasminógeno decrecen después del parto (Benslimane et al., 1990)





## 3. Metodología

### 3.1. Diseño experimental y muestreo

#### 3.1.1. Diseño experimental

Se analizaran muestras de 200 hatos; que corresponden a la leche recibida en la planta para su industrialización, a la leche se realizaron pruebas de estabilidad térmica, estabilidad de alcohol y test de ramsdell. Para objeto de este ensayo se tomaron todas las muestras y se establecieron hatos que se encontraban en un rango bajo de estabilidad (Test de Ramsdell positivo tubo 1-3), en rango medio (Test de Ramsdell positivo tubo 4-5) y en un rango alto (Test de Ramsdell positivo tubo 6-8), A la leche de estos hatos se les realizó seguimiento por 3 meses consecutivos y se les aplicó los siguientes análisis:

**Tabla 3. Análisis de muestras y Diseño**

Muestras	Factores	Respuesta estudiada
Leche de diferentes hatos en rangos altos, medios y bajos de ramsdell	Muestreo	Contenido de proteína (método IDF141C.2000) pH (método potenciométrico) Calcio iónico (método ión selectivo) Termoestabilidad de la leche (método Huppertz) Prueba de alcohol (Decreto 616) Test de Ramsdell (Método Tetra Pak)

#### 3.1.2. Muestreo

Se realizó el muestreo de 500ml; después de agitar el tanque que contiene la leche por 10 minutos, el volumen a trabajar permite una fácil homogenización que asegure la uniformidad de la composición y propiedades en toda la masa de la leche.

## 3.2. Análisis de Estabilidad de proteína

### 3.2.1. Revisión de los protocolos de análisis existentes

A las muestras se realizó la prueba de estabilidad de alcohol ya existente y que es la prueba es aplicada en las plantas procesadoras, durante la recepción de la leche, para detectar problemas de termoestabilidad en la leche cruda (Guo et al., 1998; Raynal Ljutovac et al., 2007).

En ella, se puede observar la desestabilización coloidal de la micela de caseína, por el efecto desnaturalizador del alcohol (O'Connell et al., 2001). Empleando adición de volúmenes iguales de alcohol a diferentes concentraciones y de leche (Decreto 616 Min. Salud)

### 3.2.2. Prueba de Estabilidad empleando alcohol etílico

Método propuesto por Huppertz y colaboradores<sup>10</sup>, que consiste en reportar la concentración más alta de etanol (%v/v) a la cual no se observa precipitación al hacer la prueba del alcohol.

El protocolo propuesto se resume a continuación:

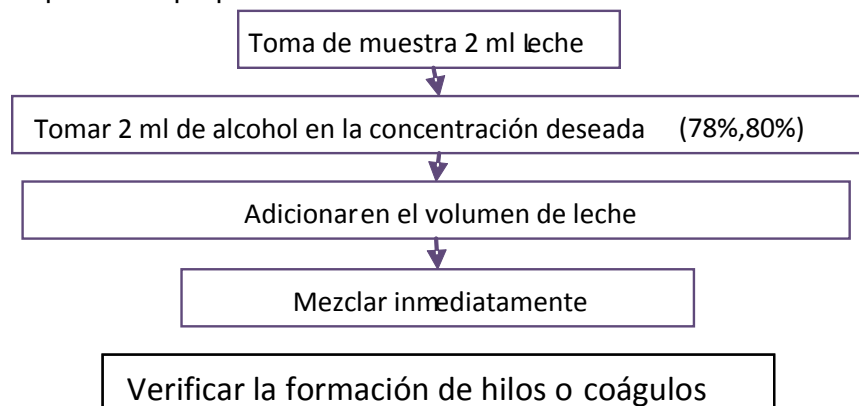


Figura 2. Protocolo de estabilidad prueba de alcohol

<sup>10</sup> Huppertz T., Grosman S., Fox P., Kelly A., Heat and etanol stabilities of high-pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal*, 14, 125-133 (2004)

### 3.2.3. Prueba de Termoestabilidad o tiempo de coagulación térmico (TCT)

Método propuesto por Davies y White<sup>11</sup>. En el cual se mide el tiempo transcurrido de una muestra de leche a una temperatura de 140°C hasta la aparición de los primeros signos de coagulación. El protocolo propuesto se resume a continuación:

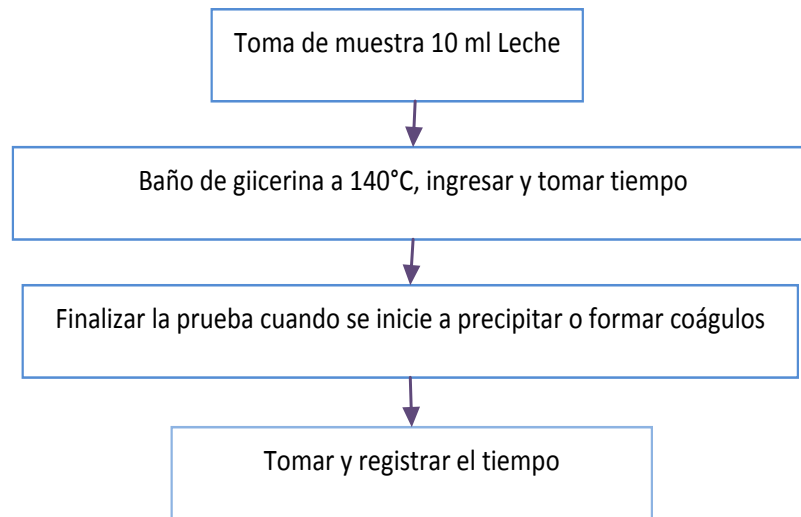


Figura 3. Protocolo de estabilidad térmica

### 3.2.4. Test de Ramsdell

Método sugerido por Tetra Pak, en el cual se mide la estabilidad de los tubos con diferentes dosificaciones de fosfato diácido de potasio al 68%, se somete a calentamiento y luego a choque térmico y determina la cantidad de estabilizante a dosificar.

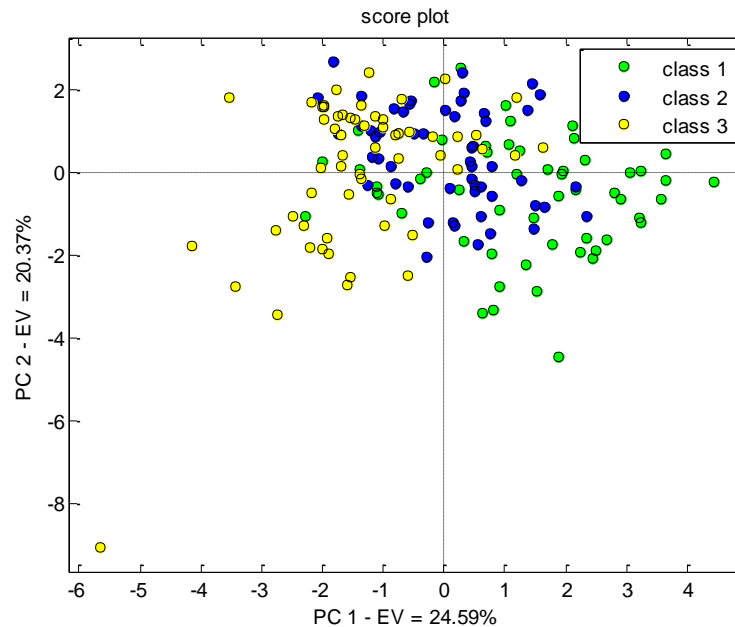
---

<sup>11</sup> Davies D.T. y White J.C.D. The stability of milk protein to heat. Journal of Dairy Research, 33, 67-71 (1966)



## 4. Resultados obtenidos

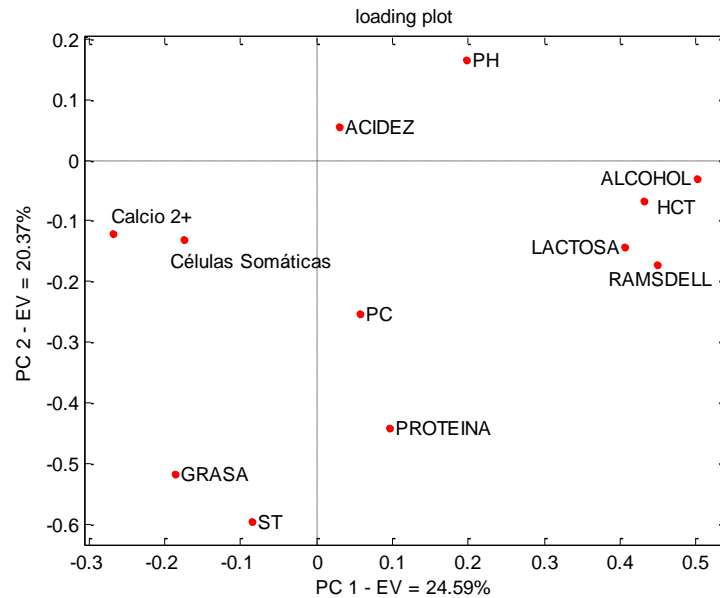
A los datos de los análisis obtenidos, se aplicó análisis de componentes principales empleando, los gráficos *score plot* y *loading plot* son el resultado del análisis multivariado de toda la información consistente en los muestreos. En el *score plot* cada uno de los puntos es la representación de cada muestra analizada de acuerdo con las categorías establecidas como: Clase 1 más estable, Clase 2 estabilidad media y Clase 3 inestable donde se obtiene:



**Figura 4 Score plot comportamiento de categorías**

Existe una tendencia hacia la separación de las categorías 1 y 3 (más y menos estable, respectivamente). La categoría 2 presenta un solapamiento entre las dos clases, lo cual es un indicador que con las variables medidas no es posible establecer una diferencia en la estabilidad de las leches.

Además se realizó un *loading plot* para constatar el comportamiento de las variables con respecto a las muestras, evidenciado el comportamiento de la figura 5. Se observa que las variables lactosa, ST y grasa, tienen un comportamiento inversamente proporcional al factor de calidad HCT. Entre tanto proteína tiene una distribución directamente proporcional a HCT.



**Figura 5: Loading plot comportamiento de las variables**

**Detección de datos anómalos:** En segundo lugar, se realizó un análisis de datos con el fin de encontrar muestras con comportamientos anómalos. Los datos anómalos deben ser sacados de la matriz ya que afectan la calidad de los análisis a realizar posteriormente. La búsqueda de estos datos se realiza mediante el cálculo de los estadísticos Q y Hotelling  $T^2$ . El resultado se observa en la gráfica a continuación:

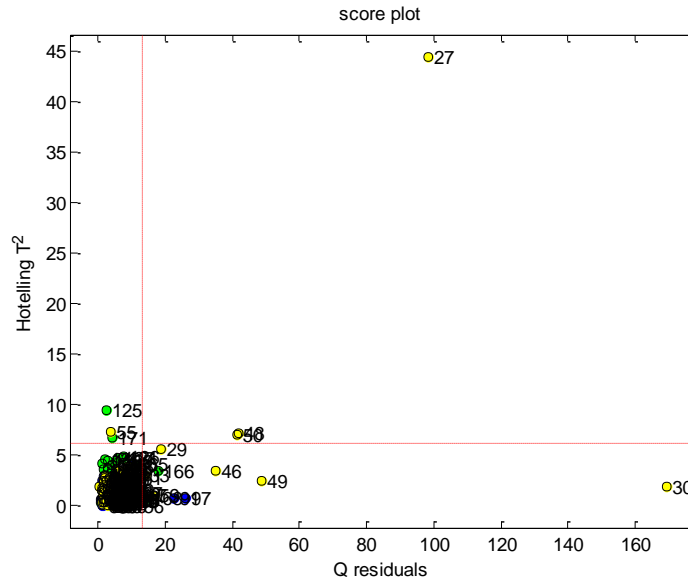


Figura 6: Detección de datos anómalos.

**Regresión de los datos de análisis**

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, se seleccionó la técnica de Árboles de Clasificación y Regresión – CART, para la clasificación de los datos. Esta técnica es conocida por su robustez y la facilidad de análisis y la capacidad de esta técnica para escoger las variables óptimas.

Para esta técnica se recogieron todos los datos, el resultado obtenido es el siguiente:

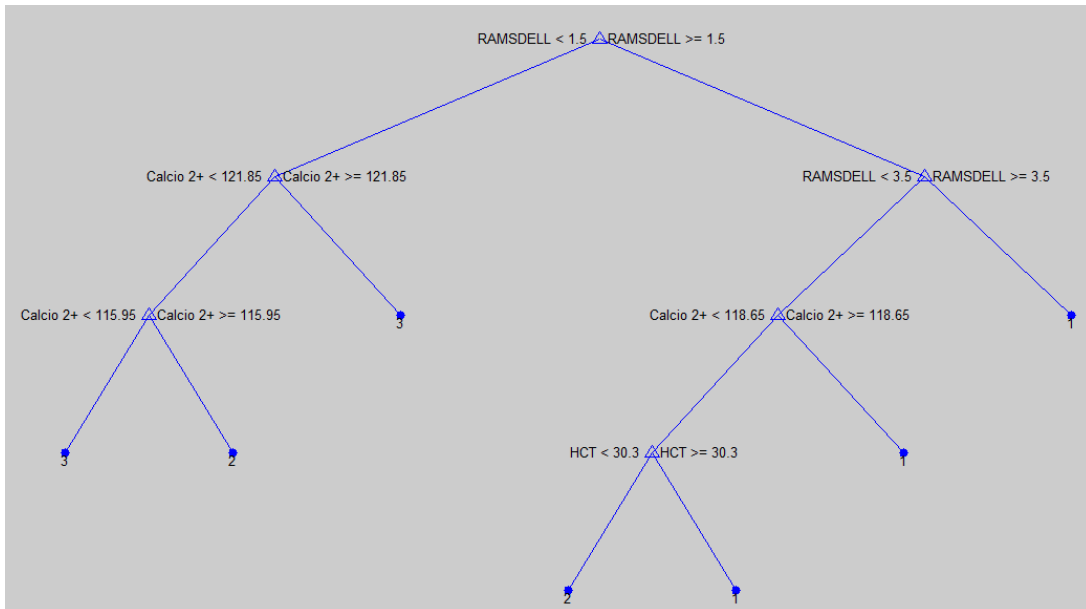


Figura 7: Árbol CART para clasificación de estabilidad de leche.

Este gráfico se interpreta de manera similar a un árbol de decisión, a manera de ejemplo se inicia con el valor de Ramsdell, si este es mayor o igual a 1.5 se sigue por el lado derecho del gráfico hasta el nuevo nodo, si Ramsdell es mayor o igual a 3.5, la categoría de la muestra será 1, de lo contrario se sigue hasta el otro nodo.

Como se observa esta técnica es muy sencilla de aplicar. Adicionalmente la técnica realiza automáticamente una reducción de variables, en la cual los parámetros seleccionados son:

- Ramsdell
- HCT
- Calcio<sup>2+</sup>

Es decir, con la medición de estas variables únicamente, es posible determinar la estabilidad de la leche.

Esta técnica fue validada con la técnica *leave-more-out*. Los resultados de la validación se presentan en las siguientes dos tablas. La tasa de no error (La probabilidad que el modelo clasifique correctamente una muestra desconocida) fue del 82%.

En esta primera tabla, se presentan criterios para evaluar la calidad de la clasificación. La especificidad, sensibilidad y precisión indican la capacidad del modelo matemático de impedir la clasificación errónea de muestras. Estos valores entre más cercanos a 1 indican un modelo más acertado.

**Tabla 4. Criterios para evaluar la calidad de la clasificación**

Categoría	Especificidad	Sensibilidad	Precisión
1	0.94	0.88	0.88
2	0.87	0.79	0.75
3	0.92	0.79	0.83

La matriz de confusión es otro indicador de calidad del modelo, esta es una tabla cruzada en donde las filas representan las categorías reales, mientras que las columnas representan las categorías creadas utilizando el modelo matemático. El resultado ideal es que todos los datos de la matriz queden en la diagonal, lo cual representa las muestras que se clasifican en cada una de las categorías.



Tabla 5. Matriz de confusión.

		Categorías Predichas		
		Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3
Categorías Reales	Categoría 1	49	5	2
	Categoría 2	5	45	7
	Categoría 3	2	10	45



## 5. Conclusiones

- Fue posible crear un modelo con una capacidad predictiva del 82%. Se observa entonces que el análisis de Calcio <sup>2+</sup> es fundamental para evaluar la estabilidad de la leche.
- El análisis del modelo de clasificación permite establecer que es suficiente con la medición de los parámetros de calidad HCT y Ramsdell y del parámetro fisicoquímico Calcio <sup>2+</sup> para determinar la estabilidad de la leche.
- El modelo empleado es de tipo Árbol de Clasificación y Regresión – CART. Es importante establecer que esta técnica no es del tipo regresión  $Y = \sum b_i * X_i$ . El modelo CART es un árbol de decisión con base en los parámetros descritos en la figura mostrada para esta técnica.



## 6. Recomendaciones

- Investigar el efecto de la dieta de las vacas lecheras en el contenido de calcio iónico de la leche
- Evaluar la efectividad de la prueba del alcohol, como prueba de plataforma y buscar otras pruebas alternativas para predecir estabilidad proteica de la leche
- Determinar la relación de otros iones con la termoestabilidad de la leche
- Sensibilizar a la industria de la importancia de la estabilidad de la leche como parámetro de calidad tecnológica



## 7. Bibliografía

AALTONEN, M. y ANTILA, V. 1987. Milk renneting properties and the genetic variants of proteins. *Milchwissenschaft*. 42 (8): 490-492.

ALAIS, CH. 1985. *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. Editorial Reverté, S.A.. Barcelona. España. 873 p.

ALANIS, M. y CASTRO, J. 1992. Mineral composition of milk produced in Monterrey, Nuevo León, México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 42 (4): 456-459

AMIOT, J. 1991. *Ciencia y tecnología de la leche*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 547 p.

BADUI, S. 1984. *Química de los alimentos*. Editorial Alambra mexicana S. A.. México DF. 427 p.

BELITZ, H. y GROSCH, W. 1997. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1087 p.

BENAVIDES, T. 2003. Efecto de las variantes genéticas A y B de k-caseína y b lactoglobulina sobre las propiedades de coagulación de la leche. Tesis Lic. en Ing. en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. 108 p.

BUCHHEIM W. y WELSCH U. 1973. Evidence for the submicellar composition of casein micelles on the basis of electron microscopical studies. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27: 163-180

CASADO, P. y GARCÍA, J. 1982. Composición química de la leche. *Industrias Lácteas Españolas* 40: 56-60.

CASADO, P. y GARCÍA, J. 1985. La calidad de la leche cruda y los factores que la influyen. *Industrias Lácteas Españolas* 81: 1-294.

DALGLEISH, D., POULIOT, Y. y PAQUIN, P. 1987. Studies on the stability of milk. *Journal of Dairy Research*. 54: 29-37.

DALGLEISH, D. 1989. The behaviour of minerals in heated milks. In *International Dairy Federation. Bulletin Document*. 248: 31-34.

DAVIES, D. y WHITE, J. 1966. The stability of milk protein to heat. I Subjective measurement of heat stability of milk. *Journal of Dairy Research*. 33: 67- 81.

DELACROIX – BUCHET, A., LEIFIER, D. y NUYTS – PETIT, V. 1993. Polymorphism of kappa casein from three French breeds and its coagulability. *Lait*. 73: 61-72.

HERNÁNDEZ, R.; PONCE, P. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Zootecnia Tropical**, v.23, p.295-310, 2005

McMAHON, D; BROWN, R; RICHARDSON, G. y ERNSTROM, C. 1984. Effects of calcium, phosphate, and bulk culture media on milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*. 67 (5): 930-938.

NEVILLE, M. y WATTERS, C. 1983. Secretion of calcium into milk. Review. *Journal of Dairy Science*. 66 (3): 371-380.

PONCE, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. (Ed.). *Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p.61-72.



## **8. ANEXO**

### **9. Materiales y equipos**

#### **9.1. Materiales**

- Tubo de ensayo tapa rosca
- Balón aforado
- Pipetas
- Vaso de precipitados
- Bureta
- Pinzas
- Termómetro
- Agitadores magnéticos

#### **9.2. Equipos**

- Balanza analítica
- Estufa o plancha de calentamiento
- Analizador Infrarrojo FT 120
- pH-metro con electrodo de vidrio
- Electrodo ión selectivo Calcio
- Electrodo ión selectivo Fósforo
- Baño termostático
- Baño de hielo