

CAPÍTULO 12

DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD COMPOSICIONAL DE LA LECHE.

José de la C. Molina Arango Zoot. Esp. Cienc. y Tecnol. de alimentos.
Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. (djose@une.net.co)

1. LA LECHE COMO MATERIA PRIMA

La leche es una materia prima constituida por la mezcla variable y compleja de varios elementos de alto valor nutritivo, y de gran importancia para la industria, pues de estos depende la composición de los productos a fabricar. Es necesario, por consiguiente, que la industria ejerza un estrecho control de la leche acopiada, dando especial énfasis al elemento que tenga más influencia en la fabricación del producto específico de interés de la empresa, así: para los productos como leche fluida, leche condensada, o leche en polvo, interesa que la materia prima sea rica en sólidos totales; si se trata de producir queso, importa la caseína y la grasa; y cuando la producción está dirigida a la obtención de mantequilla y crema, el elemento principal a proteger es la grasa.

En la recepción de la leche es necesario controlar los contenidos y la calidad bacteriológica; esta última es el resultado de la frescura, de la higiene y de la cadena de frío. Para establecer este control, es necesario definir criterios y métodos que sean precisos, rápidos y de fácil medición e interpretación. Es importante recordar que, si bien los componentes propios de la leche, son relativamente estables, la calidad microbiana, por el contrario,

estará en constante cambio, tanto en la materia prima como en los productos.

De un modo general, las pruebas rápidas de plataforma sirven para decidir la aceptación o rechazo de la leche y pueden utilizarse, igualmente en la selección de la leche para los diferentes destinos industriales. Mientras que las pruebas de detalle y más rigurosas, sirven como apoyo a las pruebas rápidas, y para clasificar la leche según su calidad, para efectos de pago a los productores.

2. LA TOMA DE MUESTRAS DE LECHE

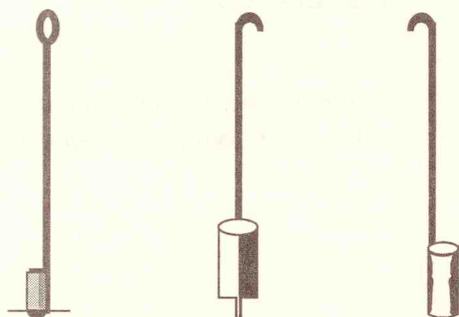
La persona encargada de tomar dicha muestra, debe haber sido entrenada para el efecto. El volumen de la muestra debe ser suficiente (mínimo 100 ml) y fiel representante del lote a examinar. Para tomar la muestra, la leche debe agitarse fuertemente, por lo menos durante 30 segundos. Si la toma de muestras representativas del lote presenta dificultades, ellas deberán tomarse de diferentes lugares y luego mezclarse mediante agitación.

Los envases, agitadores, y demás equipos, deben estar en lo posible estériles. Cada muestra se toma por duplicado y debe ser analizarse dentro de los 30 minutos si-

guientes; si esto no fuere posible, se debe proceder a almacenarla en refrigerador a 5 °C, por periodos no mayores de 18 horas.

Si se trata de muestras para el control estatal, se deben acompañar de un acta donde se mencionen claramente las circunstancias en las cuales se obtuvieron las muestras, el objetivo del muestreo, el lugar, la fecha, la hora, el número de muestras obtenidas y los lotes de los cuales se obtuvieron; y de las características del lugar.

Figura 1: diferentes tipos de recipientes para tomar la muestra de leche del tanque o de la cantina.



Las muestras para análisis químicos pueden conservarse mediante la adición de preservativos adecuados. La naturaleza de dichos preservativos y su cantidad deben especificarse en la etiqueta. Para los análisis bacteriológicos u organolépticos, el único método de conservación de la leche es la refrigeración entre 0 y 4°C.

Entre los químicos utilizados se encuentra el bicarbonato de potasio (KHCO₃) y el alcohol amílico, este último protege particularmente la grasa. También se puede usar solución de Fenol al 40 % en proporciones del 0.1 %, respecto al peso de la leche. El fenol también puede ser utilizado en dilución de 50 mgs en 10 mls de alcohol. Éste es usado en proporción del 1% del peso de la leche. Una tercera alternativa es el uso de ácido salicílico diluido en alcohol amílico (solución estándar).

3. INDICADORES DE CALIDAD DE LECHE Y SU INTERPRETACIÓN

3.1 Calidad composicional de la leche La leche se compone básicamente de agua (88%) y materia seca (12%); en esta última se encuentra la grasa que corresponde a un 3.7% aproximadamente. La grasa se encuentra en emulsión, la caseína y las sales en suspensión, y la lactosa en solución. (Ver tablas 1 y 2)

Tabla 1: Composición en porcentaje de la materia seca de la leche

Componentes	Máximo %	Mínimo %	% Promedio
Lactosa	6,1	2,1	4,9
Grasa	5,5	1,2	3,8
Proteína	6,4	2,07	3,55
Sales Minerales	1,21	0,35	0,71
Total Materia Seca			12,96

3.2 Las proteínas de la leche

Caseínas: Son complejos fosforados ácidos que precipitan a pH 4.6 y se sintetizan en la glándula mamaria. Existen tres clases de caseínas determinadas genéticamente: alfa, beta y kappa. Lo característico de estas proteínas es que tienen la propiedad de asociarse con el calcio para formar agregados denominados micelas. La caseína se degrada a altas temperaturas, altas presiones, altas concentraciones de iones minerales, o por acidificación. Industrialmente, la caseína se utiliza en quesería y en fabricación de papel, fibras textiles (aralac), pegantes, botones, aisladores eléctricos, bolas de billar, ceras, pinturas y fertilizantes.

Lactoalbúmina y lactoglobulina: Éstas son proteínas del suero lácteo. La globulina es la responsable del sabor particular de la leche caliente, debido la producción de sulfuro de H a partir de la cisteína. Las lactoproteínas se precipitan a temperaturas superiores a 77°C.

3.2.1 Método de cuantificación de la proteína

Para determinar la cantidad de **proteína** en la leche, se utilizan métodos analíticos, colorimétricos y físicos; entre los que se destacan la prueba de Kjendahl, micro Kjendahl, el índice aldehído (prueba de formol), Biuret y la cromatografía.

El método Kjendahl mide el **nitrógeno**, en porcentaje ponderal. Una cantidad pesada de la leche se desmineraliza con ayuda de ácido sulfúrico, en presencia de óxido de mercurio (como catalizador), para transformar el nitrógeno de los compuestos orgánicos en nitrógeno amoniacal; el amoniaco se libera por adición de soda cáustica, destilado sobre el ácido Bórico.

Los reactivos utilizados en el método anterior, son: sulfato potásico, óxido rojo de mercurio, ácido sulfúrico de den-

Tabla 2: Composición química de la leche

Proteínas	3,3	Vitaminas	
Caseína	2,6	Liposolubles	
Globulina	0,34	A	34 ug
Albúmina	0,06	Carotenoides	38 ug
Lactosa	4,96	D	2,36 u.s.p.
Cenizas	0,72	E	0,06 mg
Minerales		K	100 Unid Dam Glav
Calcio	122 mg	Hidrosolubles	
Fósforo	96 mg	Acido Ascórbico	1,6 mg
Magnesio	12 mg	Biotina	3,5 mg
Potasio	138 mg	Colina	13,0 mg
Sodio	58 mg	Acido Fólico	0,23 ug
Cloro	103 mg	Inositol	13 mg
Azufre	30 mg	Acido Nicotínico	85,0 mg
Enzimas		Acido Pantoténico	350 ug
Catalasa	Amilasa	Piridoxina	48,0 ug
Peroxidasa	Fosfatasa	Riboflavina	157,0 ug
Lipasa	Aldehido reductasa	Tiamina	42,0 ug
Proteasa	Reductasa Microb	B12	0,56 ug
		Gases	
		disueltos	O2
			N
			N2S

sidad 1.84, solución de soda cáustica (500 g de soda, 12 g de sulfato sódico con nueve moléculas de agua y agua en cantidad suficiente para un litro), solución de ácido bórico (40 g en un litro de agua), ácido clorhídrico 0.1 N, solución de tetraborato sódico y un indicador (2 g de rojo de metilo y un gramo de azul de metileno en un litro de alcohol metílico de 96%).

La muestra se calienta a 20°C mientras se homogeniza. En un matraz kjeldahl se colocan, sucesivamente, perlas de vidrio, 10 g. de sulfato potásico, 0.05 g. de óxido rojo de mercurio, 5 g de leche, 20 ml de ácido sulfúrico y se mezclan. Se calienta hasta que deje de formar espuma y el líquido quede claro e incoloro (más de 1,5 hrs.), se deja enfriar a temperatura ambiente y, finalmente, se añaden 150 ml de agua destilada y un poco de piedra pómez, y se mezclan.

En un erlenmeyer se colocan 50 ml de solución de ácido bórico y 4 gotas de indicador, depositadas por la pared del cuello. Se añaden al Kjendahl 80 ml de solución

de soda cáustica por la pared del cuello, a fin de que los líquidos no se mezclen; se monta en el aparato de destilación, y se calienta por 20 minutos, cuidando que no se forme espuma. Un poco antes de terminar, se baja el erlenmeyer de forma que el tubo de salida quede fuera del líquido, se apaga el calentador, y se valora el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N. A modo de control, se hace una prueba en blanco con 5 ml de agua a cambio de leche.

Los cálculos se realizan en la siguiente forma:

$$\%NT = \frac{1.40N(V - V')}{P}$$

NT es el nitrógeno total, N es la normalidad del ácido clorhídrico, V y V' los ml gastados de ácido clorhídrico (gastados en ambas pruebas), y P el peso de la leche. Para determinar el valor proteico, se multiplica el valor hallado para Nitrógeno por 6.25.

3.3. La grasa de la leche

La grasa de la leche, en un 89%, se compone de triglicéridos (glicerol y tres moléculas de ácido graso); fosfolípidos 0.5-1%; sustancias insaponificables, 1%. Incluye 60 tipos diferentes de ácidos grasos, entre los que se destacan: Butírico, Caproico, Caprílico, Cáprico, Láurico, Mirístico, Palmítico, Esteárico, Oleico, Araquidónico, Linoleico. Para su determinación, existen métodos volumétricos (Babcock, Gerber), gravimétricos (Soxhlet Mojonnier) y fisicoquímicos (Milk-o-tester, lactoscan, Milk-o-scan)

3.3.1 Método del butirómetro

Este método se basa en los siguientes principios:

Al mezclar el H₂SO₄ con leche, en proporciones adecuadas, la proteína se hidroliza, y en esta forma no es capaz de mantener la grasa en estado de emulsión; esto permite, entonces, que la grasa suba libremente.

Al aplicar la fuerza centrífuga, la grasa es forzada a acumularse en el cuello de la botella (butirómetro). Debido a la temperatura que alcanza la muestra durante la prueba, se hacen más fluidas las grasas, y aumenta la densidad de la mezcla. La densidad de la grasa es de más o menos, 0.93 y la de la solución ácida, más o menos, 1.43.

El procedimiento se realiza de la siguiente forma: Se marcan los butirómetros; se homogeniza la muestra de leche, calentándola a 40° C, agitando, y luego enfriando a 20° C. Se toman con pipeta 17.6 ml de muestra y se llevan al butirómetro. Se le agregan 17.5ml de ácido sulfúrico (puro) de densidad 1.82 a 1.83, a 20° C, fraccionándolo en tres porciones, y dando al butirómetro un movimiento rotatorio (en este momento es necesario ser muy cuidadosos, pues si la leche tiene carbonatos o bicarbonatos, la reacción es brusca, y se pueden producir quemaduras). Se deben usar pipetas de seguridad y copas para la medición del ácido. Luego, se centrifuga durante 5 minutos, a una velocidad, que se calcula según la siguiente tabla:

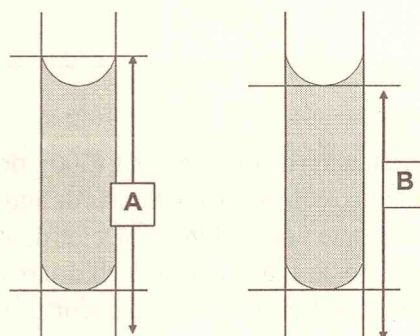
Tabla 3: Relación de la centrifuga en revoluciones por minuto, con respecto al diámetro de la centrifuga en pulgadas

14" ≅	909 rpm
16" ≅	808 rpm
18" ≅	800 rpm
20" ≅	759 rpm
22" ≅	720 rpm
24" ≅	693 rpm

Se agrega agua a 65 - 70°C hasta el cuello de butirómetro, se vuelve a centrifugar por 2 minutos, se agrega agua a 65 - 70° C hasta que la base de la columna de agua esté arriba de "0". Nuevamente se centrifuga por un minuto, se llevan los butirómetros a baño María a 65° C durante tres minutos. El agua debe estar al mismo nivel que la superficie de grasa del butirómetro. Se agregan dos o tres gotas de Glimol (el color rojo demarca bien la línea de lectura superior).

Para realizar la lectura, con la ayuda de una pinza se coloca la abertura exacta de la columna de grasa, y luego se traslada uno de los extremos al "0" de la graduación, para leer así de "0" en adelante. Unos autores dicen que se debe leer como "A" (Manual de Lechería para América Tropical. "Hudson"). Otros autores hablan de leer como "B" (Tecnología de la leche Aurelio Revilla). Como se muestra en la figura que aparece a continuación; entre las dos formas de leer existe una diferencia de más o menos 0.1 %. La lectura da directamente en porcentaje de grasa.

Figura 2: dos formas de leer los resultados del butirómetro (ver texto).



Si una vez realizada la prueba se encuentra que en la base de la columna de grasa aparecen partículas de color blanco (coágulos), se debe a una de las siguientes causas: mala agitación al mezclar, ácido de densidad menor, o malas medidas en volumen; en este caso se repite la prueba.

El tiempo de centrifugación depende del tipo de leche que se utilice: la leche cruda no homogenizada se centrifuga cinco, dos y un minuto; la leche homogenizada, se centrifuga diez, dos y un minuto, por el menor tamaño de las partículas de grasa.

Cuando en la base de la columna de grasa, se encuentran partículas de color oscuro, se debe a un exceso de ácido

(mal medido), o porque el trabajo se hizo con ácido y leche a temperaturas muy elevadas.

3.3.2 Método de Gerber

Para realizar esta prueba se pipetea 10 ml de H₂SO₄, densidad 1.82 a 20°C, sin mojar las paredes del frasco o butirometro. Se gotean suavemente sobre el ácido, 11 ml de leche a 20°C. La leche debe estar bien mezclada. Se agrega 1 ml de alcohol amílico puro (densidad 0.815 a 15°C, y punto de ebullición 128 a 132°C). Se tapa herméticamente con el tapón de caucho. Se voltea varias veces el butirómetro suavemente, y se agita para que se homogenice la muestra. Se centrifuga por cinco minutos, se lleva al baño María a 65°C durante tres minutos (el agua debe cubrir la línea superior de la columna de grasa). Se presiona el tapón, y se lleva la columna de grasa sobre el "0" de la escala y se lee el porcentaje.

El alcohol amílico tiene la función de clarificar la grasa mostrando una columna más limpia y clara al leer. Cuando el alcohol amílico no es puro se mezcla completamente con la grasa y da lugar a errores de lectura.

- El método Gerber es más preciso que el Babcock, generalmente detecta 0.1 % más que el Babcock.
- El método Gerber es muy usado en la Sabana de Bogotá, Boyacá, Nariño; en Antioquia predomina el método Babcock.
- El inconveniente mayor del método Gerber son los taponos de caucho, que se deterioran por acción del ácido, ocasionando escapes, daño de muestras y corrosión de las centrífugas.

3.4. Los azúcares de la leche

La lactosa se presenta en dos formas en la naturaleza: alfa y beta, las cuales permanecen en constante equilibrio; la lactosa beta es 22% más soluble que la alfa. La

lactosa es débilmente dulce. Se puede desdoblarse en glucosa y galactosa, con un rendimiento de 71g de lactosa hidratada equivalentes a 50 g de glucosa.

3.4.1 Métodos de determinación de la lactosa

Para su determinación se utilizan: una solución de acetato de zinc al 30%, una solución de ferrocianuro potásico al 15%, licor cúprico (sulfato de cobre al 4%), licor tartárico (formado por 200 g de sal de Seignette, 150 g de soda cáustica y ajustado a un litro de agua) licor férrico (formado por 50 g de sulfato férrico en 200 g de ácido sulfúrico y llevado a un litro con agua destilada) y permanganato 0.1 N.

La técnica consiste en añadir a 10 ml de leche un ml de acetato de zinc y un ml de solución de ferrocianuro potásico; agitar y completar a 100 ml con agua destilada; agitar y dejar en reposo por 15 minutos. Luego, se filtra hasta clarificar la sustancia. A continuación en un erlenmeyer de 150 ml se colocan 20 ml de licor cúprico, 20 ml de licor tartárico, 10 ml de filtrado clarificado (que corresponda a 1 ml. de leche) y 10 ml de agua destilada. Agitar, hervir suavemente, y mantener en hervor por tres minutos, dejar en reposo y decantar sobre filtro de amianto, o de lana de vidrio, con pequeño vacío, cuidando de arrastrar la menor cantidad de precipitado; lavar el precipitado con 10 ml de agua destilada y hervida; se deja reposar y se decanta nuevamente. Disolver el precipitado en 10 ml de licor férrico, pasar esta solución por un nuevo filtro para disolver las pequeñas cantidades de óxido cuproso que fueron arrastradas; lavar a fondo con agua destilada hervida. Titular el filtrado con permanganato, hasta obtener coloración rosa.

Se puede también separar el precipitado por centrifugación a 5000 rpm durante cinco minutos; se lava con agua y se centrifuga de nuevo, y con licor férrico centrifugar y valorar con permanganato. Un ml de permanganato N/10 corresponde a 6.35 mg de cobre. La siguiente tabla, permite el cálculo de la lactosa:

ml permanganato	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lactosa hidratada gr/l	23,6	28,5	33,4	38,5	43,5	48,6	53,8	59	64,1

3.5. El pH de la leche

La leche es una sustancia con tendencia a la neutralidad. Aunque es una sustancia anfotérica, su pH normal es de 6.8 y tiende a disminuir a medida que se presente crecimiento bacterial. Para su determinación, se utilizan potenciómetros calibrados previamente a pH 4 y a pH 7

3.6. Minerales, sales minerales y gases disueltos en la leche

En la leche existen sustancias salinas en proporciones de 9.0 g/l; entre ellas, están los cloruros de sodio y potasio; los fosfatos de potasio, de magnesio y de calcio; los citratos de calcio, magnesio y potasio; bicarbonato y sulfato de sodio. También se encuentran minerales a niveles de 7.0 g/l como Na, K, Ca, P, Fe, Cu, Mn y Zinc. El ácido cítrico es importante en el aroma de fermentados y de la mantequilla, y el calcio se requiere en la coagulación.

Entre los gases encontrados se tienen anhídrido carbónico, N y O₂. Además, cuando la leche es calentada, es posible determinar H₂S después de descomponer la proteína.

3.6.1 Métodos de determinación de minerales

Para cuantificar minerales, se usan pruebas de determinación de cloruros, de opalescencia, de potenciometría, espectrofotometría de masas y colorimetría.

3.6.1.1. Para la determinación de fósforo se trabaja sobre las cenizas. Se añaden, a 1 ml. de leche, dos gotas de acético y dos gotas de reactivo de tanred; se agita y se completa a 100 ml; se filtra, y sobre 5 ml de filtrado se determina el fósforo con 6 ml de reactivo Deniges (partes iguales de sulfúrico y molibdato aminito al 10%, en contacto durante una hora con limaduras de cobre). Se hierva por 10 segundos, y se compara el color azul desarrollado con escala preparada con concentraciones conocidas de fosfatos

3.6.1.2. El calcio se determina por medición del volumen de un precipitado obtenido; por medidas volumétricas, calorimétricas, turbidimétricas; cromatografía del papel, cromatografía de columna, espectrofotometría, gravimetrías, polarografía y fotometría de llama.

Para determinarlo por el volumen del precipitado se usa:

a) Solución de metaestanoato potásico (en un vaso se colocan 15 grs de estaño puro y un poco de agua destilada;

se adicionan más o menos 80 mls. ácido nítrico concentrado hasta disolver el estaño, El precipitado blanco de ácido metaestánico se lava por decantación tres veces, cada una de ellas con medio litro de agua; el líquido recuperado se filtra y se disuelve mediante la adición de 5 ml de solución alcalina fuerte al 71%; se espera con dos ml de dicha solución se recuperen las trazas de ácido metaestánico que quedaron en el filtro.

La solución obtenida se lleva a 250 ml con agua destilada.

b) Ácido Nítrico

c) Solución de soda caústica (potasa) de normalidad media

d) Solución de EDTA: se prepara con 4 g de sal sódica en agua destilada hasta ajustar un litro. Luego esta solución se titula de tal forma que cada ml equivalga a 0.0004 g de calcio.

e); Murexida (indicador).

f) Solución estándar de cloruro cálcico: disolver 2 gr en ácido clorhídrico diluido y ajustado a 1 litro.

Se procede de la siguiente forma: A 5 ml de leche se le añaden 30 ml de agua destilada, 1 ml de ácido nítrico diluido, se agita y se adicionan 10 ml de metaestanoato potásico, se mezcla lentamente y con agitación constante; se completa a 100 ml con agua destilada, se deja en reposo y luego se elimina el precipitado blanco mediante filtración; se desechan los primeros mililitros. 50 ml de este filtrado se neutralizan con potasa, y una vez alcanzada la neutralidad, se añaden 2 ml más de potasa, se titula con EDTA previa adición de murexina.

El resultado se tabula de la siguiente manera:

ml corregidos por el precipitado (C) = 50.A/(B-C)

A: Cantidad en ml de EDTA gastados para titular 5 ml de solución estándar, requeridos en 5 ml de solución estándar de cloruro cálcico.

B: Son los ml de EDTA requeridos para titular en 50 ml de filtrado, más 5 ml de solución estándar de cloruro cálcico.

C: Son los ml de EDTA usados para 50 ml de filtrado, sin solución estándar.

El valor (C) se multiplica por 0.0004, puesto que cada ml equivale a .0004 gr de Ca

Cantidad de calcio en 50 ml = $C \times 0.0004$

3.7. Vitaminas lácteas

Las vitaminas encontradas en la leche pueden ser clasificadas de acuerdo con su solubilidad:

Las **Liposolubles** se encuentran en la grasa: Vit A: 1500 U.I/lt, Vit D: 20 U.I/lt, Vit E: 1.5 mg/lt.

Las **Hidrosolubles** se encuentran en leche desnatada. Vit B1 (Tiamina): 400 a 1000 mg/lt, Vit B2 (Riboflavina): 800 a 3000 mg/l, Vit B6 (Piridoxal), Vit B12 (Cobalamina), Vit C (Ac. Ascórbico), Vit PP (Ácido nicotínico y niacina): 1-2 mg/l, ácido pantoténico: 2-5 mg/lt, ácido fólico: 0.3 - 6 mg/l.

Entre los métodos conocidos para determinación de vitaminas, se encuentran los cromatográficos que son los de mayor utilización en la actualidad. A continuación se describe el procedimiento para determinar las vitaminas liposolubles.

3.7.1 Determinación de vitamina A: El contenido de esta vitamina varía con el contenido de grasa en la leche, o con las estaciones climáticas. No se afecta ante la pasterización, ni con la presencia de cobre, pero sí se pierde algo en los procesos de congelación, y la presencia de oxígeno la destruye lentamente. Para su medición se puede usar el método de cromatografía, así:

Un gramo de grasa butírica se disuelve en heptano (10ml), y se hace pasar por una columna de alúmina (3-4 cm. de alto y 1.3 cm. de diámetro); allí quedan retenidas la xantofila y la forma alcohólica de la vitamina A. Para completar la elusión de la forma éster se pasa a través de la columna de hexano con 2% de acetona, hasta conseguir 30 ml de eluido; luego se eluyen la xantofila y la fracción alcohólica de la vitamina A, pasando 30 ml de hexano normal con 8% de etanol.

A continuación debe saponificarse la fracción correspondiente a la vitamina A, ya que su concentración en la leche es demasiado baja para valorarla por la reacción del tricloruro de antimonio; además se debe eliminar la carotina beta. Para ello se toman 2.5 g de grasa, y se añaden 1.1 ml de potasa al 60% y 5 ml de etanol; se hierva con refrigerante de reflujo durante 3-5 minutos (hasta que haya desaparecido el olor característico). Luego, se diluye con 20 ml. de agua destilada, y se agota tres veces con porciones de 25, 15 y 5 ml de éter (libre de

peróxidos); se reúnen los extractos etéreos y se lavan tres veces con 20 ml de destilada; se desecan sobre sulfato sódico anhidro, y se evaporan. El residuo se recupera con cloroformo (para realizar la reacción del tricloruro de antimonio); o bien con hexano, para realizar una segunda cromatografía que permite separar la forma alcohólica de la vitamina A de la carotina beta.

3.7.2 Determinación de vitamina D: Esta vitamina aumenta con la luz solar; por tanto, está incrementada en el verano. La dieta baja en proteínas afecta negativamente la cantidad de esta vitamina. Es termosensible, pero la pasterización no la afecta.

El método más conocido para su medición es el de cromatografía, que se describe a continuación. Se trata la leche por calentamiento con reflujo, con potasa al 50%, más un antioxidante; se extrae con éter de petróleo, se lava con agua bajo atmósfera de nitrógeno, se deseca sobre sulfato sódico, y se purifica por paso a través de columna cromatográfica. El eluido se disuelve en tricloroetano, después de eliminar el solvente, y se lee a 500-550 nanómetros.

3.7.3 Determinación de vitamina E: Se pueden utilizar los métodos colorimétricos, entre otros. Se toman 10 gr de grasa extraída de la leche, se tratan con 5 ml de pirogalol (5 gr en 100 ml de metanol absoluto); se somete esta mezcla a reflujo en frasco de extracción los 20 ml de potasa alcohólica 3.5 N, manteniendo la temperatura de 80°C durante 10 minutos. Cuando cesa el calentamiento, se lava el condensador con 5 ml. de metanol absoluto y se agregan 40 ml de agua destilada y 15 ml de metanol absoluto, se tapa y enfría a temperatura ambiente, se pasa por un embudo separador agregando 60 ml de agua destilada y 80 ml de éter libre de peróxidos. Separar la capa acuosa y tratar con potasa al 7% (en agua) y 50 ml de "Calgón" al 2%, desecar sobre sulfato sódico, eliminar el éter, disolver en 2 ml. de benceno, completar a volumen conocido con etanol absoluto, y desarrollar el color como en el caso anterior.

3.7.4 Determinación de vitamina K: La metodología más usada es por cromatografía. Para ello, se hace una solución estándar de vitamina K, disolviendo 25 mgr en 100 ml de benceno (estable en la oscuridad por pocas semanas). Se hace una solución de 2-4 dinitrofenilhidrazina con 50 mgr en 20 ml de etanol clorhídrico. Estas dos diluciones se mezclan en partes iguales de etanol de 96% y amoniaco de 0.90 de densidad. Se purifica la floridita, hirviéndola con clorhídrico al 37%;

se lava 3 veces con agua hasta que el agua de lavado sea neutra, y luego se deseca a 37°C.

La calibración de las curvas se hace agregando a 2 ml de solución estándar de la vitamina, 1 ml de 2-4 dinitrofenilhidrazina y 2 ml. de alcohol absoluto; se somete a calentamiento con refrigerante de reflujo, de 80-90 minutos, manteniendo los 80°C; se deseca con corriente de aire a 40-50°C, se disuelve en alcohol caliente, se añaden 2.5 ml de la mezcla de etanol y amoniaco, y se lee a 635 milimicras. 2 ml de extracto en benceno se pasan por columna de Forisil, se lava dos veces (cada una con 1 ml de benceno), se eluye con 1 ml de 2-4 dinitrofenilhidrazina y 5 ml de alcohol, y se sigue como para el calibrado.

3.8 Enzimas

La leche contiene varias enzimas; entre ellas, las **Lipasas**: (hidrolizan los glicéridos), **Fosfatasa**s, (la alcalina hidroliza los esteres fosfóricos). **Proteasas** o **galactasas** que degradan los prótidos. **Amilasas**: (Hidrolizan el almidón), **Aldehido reductasas**: (Oxida el formol en presencia del azul de metileno). La reductasa sola sirve como patrón microbiano. **Peroxidasa** y **catalasa** que descomponen el peróxido de hidrógeno. Se describirá la determinación de aquéllas con mayor importancia industrial, incluyendo la reductasa.

3.8.1 Determinación de lipasa: Se determina la descomposición de la butirina a pH 8.5, y cuando ha quedado libre el ácido butírico, se destila para evaporarlo y valorar. El fluor, el ácido butírico, el benzol, el éter y los ácidos retardan su acción. La aureomicina la inhibe parcialmente. La homogenización aumenta su acción. Diez partes por millón de cobre, o 25 ppm de hierro destruyen su acción. La acción de la lipasa es máxima a pH de 8.5 o entre 5.4 y 6.3.

3.8.2 Determinación de fosfatasa: Esta enzima libera el fenol de las combinaciones de éste con el ácido fosfórico. Se destruye con la pasterización y por lo tanto, es un indicador de eficiencia de este procedimiento. Entre las pruebas de identificación reconocidas, se destaca la técnica de Scharer y lactognost Heyl, comercializada por laboratorios Merck; esta técnica se describe a continuación.

Para iniciar, se debe tener cuidado que no existan trazas de fenol, por residuos de desinfectantes; el material debe estar bien lavado, las pipetas no deben estar contamina-

das con saliva, se debe usar una pipeta distinta para cada muestra, conservar todos los reactivos en nevera y fuera de la acción de la luz. La muestra deberá conservarse hasta el análisis entre 2-8°C, y se calienta para homogenizar hasta 38°C.

En un tubo de ensayo se vierten 10 ml. de agua destilada, a 37°C, y se añade una tableta de éster fenílico del ácido fosfórico y otra tableta de sustancia tampón alcalina. Una vez disueltas, se adiciona un ml de leche, se mantiene la mezcla 10 minutos, a 37°C, se añade el contenido de una cucharadita dosificadora del reactivo del formol en polvo, se deja actuar por 3-5 minutos agitando 30 segundos, y se observa el color. La reacción positiva da coloración azul, y es indicativo de calentamiento, de pasterización insuficiente o de contaminación con leche cruda. Tonos pardos indican negatividad, y calentamiento de pasterización suficiente

3.8.3 Determinación de amilasa: La alfa amilasa cataliza la dextrinificación del almidón sin, con o con poca sacarificación simultánea. La amilasa beta provoca la sacarificación sin dextrinificación. Las amilasas se inactivan entre 50 y 65°C.

La determinación se inicia con la obtención de suero, tratando 100 ml de la leche con 3 ml de acetato de plomo, o bien, 5 ml de leche con 15 ml de solución de hierro coloidal a 1%. El licuado del almidón, se determina calculando el tiempo que tarde en salir una mezcla de suero y fécula de papa, por un aparato semejante a un viscosímetro, manteniendo la temperatura a 37°C. La dextrinización se determina añadiendo cantidades de solución reciente de almidón en distintos tubos, en cada uno de los cuales se han puesto 10 ml de leche y 3 ml de tolueno, manteniendo durante 24 horas a 37°C; luego se añade solución de yodo potásico y se comparan tonalidades. La sacarificación se logra añadiendo a 100 ml de leche, 30 ml de solución de almidón y 5 ml de tolueno, manteniéndolos a 37°C; luego se determinan las sustancias reductoras.

La licuefacción la da la siguiente fórmula:

$$dv/dtC^2 * 106 V/a$$

dv.= Derivada de la viscosidad específica

dt = Derivada del tiempo en minutos

C=Concentración de almidón

V=Total gramos o ml de la mezcla que reacciona

a= el valor de la licuefacción

3.8.4. Determinación de peroxidasa: Ésta oxida el guayacolato, convirtiéndolo en parafenilenodiamina, en presencia de agua. Se precipita con la lacto albúmina y no con la caseína.

No la modifican, el carbonato sódico, el bórax, alcohol bencílico, ácido salicílico, cloruro mercúrico ni el clorofórmico. Dificultan su acción: los sulfocianatos, ácido cianhídrico, ácido láctico, hiposulfito sódico, alcohol metílico y alcohol amílico. Su pH óptimo está entre 6.5-7.2; se destruye por calentamiento por encima de 80°C; por lo tanto, es otro indicador de calentamiento de la leche. La no presencia en leche pasteurizada, indica un sobrecalentamiento durante la pasteurización y, por ende, una disminución del valor biológico de la leche.

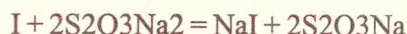
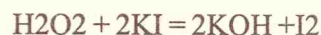
Por su acción de descomponer el agua oxigenada, liberando oxígeno atómico, la peroxidasa es capaz de fijarse sobre una sustancia oxidable, tal como el guayacolato, que al quedar oxidado, da una coloración rojo salmón. La técnica de identificación incluye, entre otros, el de Tillmans y el método francés que se describe a continuación:

En un tubo de ensayo se colocan 2 ml. de leche con 2 ml. de solución saturada de guayacol en agua, y una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes, agitar y conservar el tubo en la mano para que alcance 25°C. Se da por bien pasteurizada la leche, si se observa cambio de coloración a salmón después de un minuto de reacción (peroxidasa positiva en la prueba). Si no presenta cambio de coloración será negativo, y ello indica sobrecalentamiento de la leche

3.8.5. Determinación de catalasa. Tiene un gran valor diagnóstico, especialmente para detectar leches procedentes de ubres enfermas; guarda relación con el número de leucocitos y otros elementos celulares. Descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno molecular; se expresa bien por el oxígeno que libera, o por la cantidad de agua oxigenada que descompone un volumen dado de leche. Los leucocitos, especialmente los polimorfonucleares y ciertos microorganismos originan catalasas. Bien es sabido que los fermentos lácticos genuinos no secretan catalasa, contrario a los espúreos (proteolíticos y coli-aerógenos) que producen lactasa en abundancia. Normalmente la catalasa aumenta por inflamación de la glándula mamaria, la riqueza microbiana, y el calostro; el calentamiento a 62°C por una hora destruye la actividad de la enzima.

La catalasa puede determinarse midiendo el volumen de oxígeno desprendido, valorando con permanganato, por el agua oxigenada que no fue destruida, o bien, por iodometría. Para conocer la cantidad de agua oxigenada sobrante después de haber detenido la acción de la catalasa con sulfúrico concentrado, se hace la prueba sobre placa de Odo Buyvid.

A un volumen determinado de leche, se le añade un volumen conocido de agua oxigenada; se deja pasar un cierto tiempo y se añade ioduro potásico; con hiposulfito valorado se determina el yodo liberado, según las reacciones:



Para ello, se mezclan 5 ml de leche con 5 ml de agua oxigenada y tres gotas de ácido clorhídrico concentrado; se deja en contacto dos horas y luego, se añaden 10 ml de ácido clorhídrico concentrado, para destruir la catalasa, y 10 ml de ioduro potásico al 10%; se deja en contacto 10 minutos, se agregan 100 ml de agua y se valora con hiposulfito N/10 y almidón.

Sean **A** los ml gastados. Se hace otra determinación, sin añadir los 3 ml de ácido clorhídrico, y se obtiene otro valor de **B**. La cifra catalasa (Cantidad de agua oxigenada destruida en 100 ml de leche durante dos horas), sería:

$$(A - B) * 0.017 * 20$$

Un mililitro de hiposulfito N/10 corresponde a 0.0017 g. de agua oxigenada. Un gramo de yodo liberado, equivale a 43.83 ml de oxígeno, medido a 0°C y 760 mm. Para estar seguros de que el agua oxigenada ha conservado su título, bastará tratar 1 ml de ella con 17 ml de agua y 2 ml de sulfúrico; se añade, gota a gota, permanganato (N/10) hasta obtener un color rosa; si es de 1%, gastará 6 ml de permanganato.

4. BIBLIOGRAFÍA

Clay C.I., M.B. Burke y G. Junquer *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1965 pp 310-318.

Consejo Nacional de Política Económica y Social República de Colombia Documento Conpes 3376 Departamento Nacional de Planeación POLÍTICA SANITARIA Y DE INOCUIDAD PARA LAS CADENAS DE LA CAR-

NE BOVINA Y DE LA LECHE Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Ministerio de Protección Social Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Ministerio de Comercio, Industria y Turismo DNP: Dirección de Desarrollo Rural Sostenible; Dirección de Desarrollo Social, Dirección de Desarrollo Territorial Versión aprobada Bogotá, D.C., 5 de septiembre de 2005.

Goded y Mur Antonino. Técnicas Modernas al análisis de leche. Ed Dossat. Madrid 1966

Monografías. Com:

<http://www.monografias.com/trabajos17/antibioticos/antibioticos.shtml>

Álvarez Orejón Juan.

http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D8519%2526ISID%253D427,00.html.